

UNIVERSIDADE CATÓLICA PORTUGUESA
CENTRO REGIONAL DAS BEIRAS
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DE SAÚDE

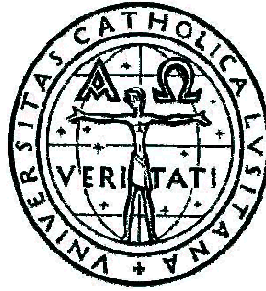
*Biomarcadores para o processo de malignização de lesões
pré-malignas da cavidade oral*

Dissertação apresentada à Universidade Católica Portuguesa
para obtenção do grau de Mestre em Medicina Dentária

Por

Maria Isabel Durão Claro Nunes

Julho de 2012



UNIVERSIDADE CATÓLICA PORTUGUESA
CENTRO REGIONAL DAS BEIRAS
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DE SAÚDE

*Biomarcadores para o processo de malignização de lesões
pré-malignas da cavidade oral*

Dissertação apresentada à Universidade Católica Portuguesa
para obtenção do grau de Mestre em Medicina Dentária

Por Maria Isabel Durão Claro Nunes

Sob orientação de:

Professora Doutora Marlene Maria Tourais de Barros

Professor Doutor Nuno Ricardo das Neves Rosa

Julho de 2012

O SONHO

Pelo Sonho é que vamos,
comovidos e mudos.
Chegamos? Não chegamos?
Haja ou não haja frutos,
pelo Sonho é que vamos.
Basta a fé no que temos.
Basta a esperança naquilo
que talvez não temos.
Basta que a alma demos,
com a mesma alegria,
ao que desconhecemos
e ao que é do dia-a-dia.
Chegamos? Não chegamos?
- Partimos. Vamos. Somos

Sebastião da Gama

Aos meus pais,
por toda a orientação pessoal e espiritual, que me permitiu fazer este percurso.

Aos meus irmãos João e Rita,
por todos os bons momentos que temos partilhado.

Ao meu avô Zé Claro,
que com certeza deve estar orgulhoso de me ver chegar a esta etapa.

Ao João,
por me ouvir, por aconselhar e por opinar.

AGRADECIMENTOS

À Professora Dra. Marlene Barros,

por todo o incentivo e motivação durante a elaboração deste trabalho e por me ter ajudado a ter uma nova perspectiva sobre a Medicina Dentária.

Ao Professor Dr. Nuno Rosa,

pela grande ajuda e motivação dadas ao longo do desenvolvimento deste trabalho.

Aos grandes amigos, Marcelo Rua, Margarida Marques, Catarina Fernandes, Sara Paixão Frederico Cardoso e tantos outros,

que ao longo destes anos fizeram parte de momentos memoráveis, inesquecíveis.

RESUMO

O carcinoma espinocelular da cabeça e pescoço é um dos cancros mais comuns a nível mundial. Os principais factores de risco são os hábitos tabágicos e alcoólicos, associados a factores genéticos. A presença de lesões pré-malignas é também um factor de risco, uma vez que estas apresentam um potencial de malignização considerável. O carcinoma espinocelular da cavidade oral apresenta um prognóstico reservado e uma taxa de sobrevivência baixa, que agrava quando não é detectado atempadamente. Neste sentido, o diagnóstico precoce assume um papel fulcral na diminuição da taxa de mortalidade associada ao carcinoma espinocelular da cavidade oral. A identificação de biomarcadores específicos para detecção precoce destas lesões assume um papel essencial, permitindo uma intervenção atempada pelo Médico Dentista. O trabalho realizado no âmbito da presente dissertação permitiu a catalogação de todas as proteínas que foram identificadas na bibliografia como estando associadas a lesões pré-malignas e a carcinoma espinocelular criando-se para o efeito uma base de dados dedicada a cancro oral. Partindo da base de dados gerada e fazendo recurso de ferramentas bioinformáticas, foi possível identificar os processos biológicos e vias de sinalização celular em que participam as proteínas identificadas como estando presentes em quantidades alteradas e que poderão constituir potenciais alvos de estudo em futuras pesquisa de biomarcadores para o processo de malignização das lesões pré-malignas. Os resultados obtidos com este trabalho permitiram igualmente uma avaliação crítica dos biomarcadores já propostos na literatura para cancro oral.

Palavras-chave: carcinoma espinocelular oral, lesões pré-malignas orais, biomarcador, proteómica.

ABSTRACT

Head and neck squamous cell carcinoma is one of the most common types of cancer worldwide. The major risk factors are smoking and drinking habits, associated with genetic factors. The presence of pre-malign lesions, with high malignization potential, is also one important risk factor. The squamous cell carcinoma has a bad prognosis and a low survival rate, which are worsened when an early diagnosis isn't achieved. Therefore, an early diagnosis plays a central role in lowering the mortality rate associated to oral squamous cell carcinoma. The identification of specific biomarkers for early detection of pre-malign lesions plays an essential role, allowing timely intervention by a dentist. This dissertation allowed the organization of the proteins associated with oral pre-malign lesions and oral squamous cell carcinoma, already identified in other works. The application of bioinformatics tools to the preview information allowed the determination of the biological processes and pathways associated with malignization, thereby highlighting which proteins could be of interest for future research for the discovery of new biomarkers. Moreover, the results of this work also gave an opportunity for reviewing the biomarkers already proposed in existing literature.

Keywords: oral squamous cell carcinoma, oral pre-malign lesion, biomarker, proteomics.

ÍNDICE

AGRADECIMENTOS	XI
RESUMO	XIII
ABSTRACT	XV
Lista de Figuras	XIX
Lista de Gráficos	XXIII
Lista de Tabelas	XXV
Lista de Abreviaturas	XXVII
Nota Introdutória	1
1. INTRODUÇÃO	3
1.1. BIOLOGIA E ASPECTOS HISTOLÓGICOS DA MUCOSA ORAL	3
1.2. CARCINOMA ESPINOCELULAR E LESÕES PRÉ-MALIGNAS DA CAVIDADE ORAL	6
1.2.1. Sistema de classificação da Organização Mundial de Saúde	6
1.2.2. Carcinoma espinocelular da cabeça e pescoço	6
1.2.3. Lesões pré-malignas	8
1.2.4. Evolução e prognóstico do carcinoma espinocelular da cabeça e pescoço.....	16
1.2.5. A regulação comprometida da apoptose como principal mecanismo molecular de malignização.....	18
1.3. SALIVA	24
1.3.1. Origem e composição.....	24
1.3.2. Funções.....	26
1.3.3. A saliva como fluido de diagnóstico	27
1.4. BIOMARCADORES MOLECULARES E A SUA IMPORTÂNCIA NA IDENTIFICAÇÃO DE MECANISMOS MOLECULARES ALTERADOS	31
1.5. CIÊNCIAS ÓMICAS.....	37
1.5.1. A bioinformática para estudo e interpretação de dados biomédicos.....	39
1.5.2. Contributo das ciências ómicas para as áreas médicas.....	42
2. OBJECTIVOS	45
3. MATERIAL E MÉTODOS	47
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	55

5. CONCLUSÕES	77
6. TRABALHO FUTURO.....	79
BIBLIOGRAFIA	81
ANEXOS	93

Lista de Figuras

Figura 1: Carcinoma espinocelular no pavimento oral (adaptado de *Regezi J. A. “Oral Pathology-Clinical Pathologic Considerations” 2003^[12]*)

Figura 2: Carcinoma espinocelular no palato (adaptado de *Regezi J. A. “Oral Pathology-Clinical Pathologic Considerations” 2003^[12]*)

Figura 3: Leucoplasia no bordo lateral e na zona ventral da língua (adaptado de *Regezi J. A. “Oral Pathology-Clinical Pathologic Considerations” 2003^[12]*)

Figura 4: Leucoplasia no bordo lateral da língua (adaptado de *Regezi J. A. “Oral Pathology-Clinical Pathologic Considerations” 2003^[12]*)

Figura 5: Eritroplasia no bordo lateral e na zona dorsal da língua (adaptado de *Regezi J. A. “Oral Pathology-Clinical Pathologic Considerations” 2003^[12]*)

Figura 6: Representação das moléculas envolvidas na via intrínseca da apoptose e das interações entre elas. Verifica-se um estímulo inicial a nível da mitocôndria que vai induzir a produção de BID a partir do BCL-2, que por sua vez induz uma alteração na permeabilidade da membrana mitocondrial levando à libertação de citocromo *c* e outras moléculas pró-apoptóticas. O citocromo *c* forma um complexo, o apoptosoma com a APAF 1, com a pró-caspase 9 e com ATP. Este complexo permite a activação da caspase 9 que vai accionar as caspases efectoras 3, 6 e 7, culminando com a apoptose. A inibição das vias de apoptose pode ser conseguida através de factores anti-apoptóticos da família BCL-2, como a BCL-2 e a BCL-X que impedem a libertação de moléculas pró-apoptóticas da mitocôndria. Pode também ser feita através de IAPs que são reguladas pela SMAC/DIABLO e impedem a activação da cascata de caspases. Por outro lado, factores de crescimento específicos e citocinas podem funcionar como sinais de sobrevivência (*survival signals*) e activar a via da PI3K, provocando a activação de AKT que vai fosforilar e inactivar o factor pró-apoptótico BAD (adaptado de *Igney et al 2002^[31]*)

Figura 7: Representação das moléculas envolvidas na via extrínseca da apoptose e das interações entre elas. Os receptores de morte são receptores de membrana da superfamília dos factores de necrose tumoral que têm um domínio intracelular específico. Uma vez ligados

aos substratos específicos como o CD95, formam um complexo com proteínas FADD, denominado DISC, que recruta as pró-caspases iniciadoras 8 e 10 que depois de serem activadas vão accionar as caspases efectoras 3, 6 e 7. Está então activa a cascata de caspases que vai culminar com as alterações morfológicas e bioquímicas características da apoptose. Este processo pode ser inibido a vários níveis. A ligação dos substratos CD95 aos receptores de morte pode ser impedida por outras moléculas (sCD95); moléculas específicas como as FLIP que são homólogas das caspases 8 mas não apresentam domínio catalítico, podem impedir a activação das caspases iniciadoras por ligação ao DISC; ligação de IAPs às caspases, inibindo-as ou degradando-as, impedindo assim a continuação da cascata de caspases (adaptado de *Igney et al 2002*^[31])

Figura 8: Representação esquemática das várias etapas que devem ser realizadas para a validação de um biomarcador. ^[45,46,49]

Figura 9: Página *web* da base de dados *Pubmed*.

Figura 10: Página *web* inicial do *UniProt*. A seta vermelha indica a caixa onde deve ser inserida a denominação da proteína, da qual se pretende obter a informação (exemplificado com “*Proliferating cell nuclear antigen*”)

Figura 11: Página *web* do *UniProt* após a pesquisa. As setas vermelhas indicam o código *UniProtKB AC* e a espécie onde a proteína foi identificada.

Figura 12: Página *web* do PANTHER. As setas vermelhas indicam as zonas de inserção dos códigos *UniProtKB AC* e o círculo o ícone de pesquisa.

Figura 13: Página *web* do PANTHER com a indicação a vermelho do ícone de LOGIN e da área de trabalho (*Workspace*).

Figura 14: Página *web* do PANTHER. A seta vermelhas e azul indicam, respectivamente, os ícones que devem ser seleccionado para obter os dados relativos ao componente celular (*cellular component*) e aos processos biológicos (*biological process*) em que as proteínas listadas estão envolvidas.

Figura 15: Página *web* da ferramenta DAVID, através da qual se obtiveram os dados para elaboração da representação gráfica das vias de sinalização nas quais as proteínas em estudo estão envolvidas.

Figura 16: Representação das vias de sinalização associadas a cancro (*pathways in cancer*), elaboradas através da ferramenta KEGG. Destaca-se a survivina (a vermelho), envolvida na via de sinalização que culmina com a inibição da apoptose (*evading apoptosis*)

Figura 17: Representação da via de sinalização da p53 (*p53 signaling pathway*), elaboradas através da ferramenta KEGG. Destaca-se a serpina B5 (*maspin*) (a vermelho) que está envolvida em vias de sinalização que inibem a angiogénese e a metastização.

Lista de Gráficos

Gráfico 1: Representação esquemática, elaborada a partir da Tabela I, representando o nº total de proteínas identificadas em carcinoma espinocelular (83) e em lesões pré-malignas (62), evidenciando o número de proteínas comuns (41). Os números com um asterisco (*) representam os totais de proteínas exclusivas de carcinoma espinocelular e de lesões pré-malignas (42* e 21*, respectivamente).

Gráfico 2: Representação do nº total de proteínas identificadas em carcinoma espinocelular e em lesões pré-malignas (colunas a azul) e destas, as que já foram identificadas como estando presentes na saliva (colunas a vermelho).

Gráfico 3: Representação do nº total de proteínas identificadas em carcinoma espinocelular e lesões pré-malignas e dessas o nº de proteínas sugeridas pela bibliografia como biomarcadores.

Gráfico 4: Representação das diferentes origens de recolha das amostras, a partir das quais foram obtidas as proteínas associadas a carcinoma espinocelular e a lesões pré-malignas. Para as diferentes origens de recolha das amostras (língua, mucosa, saliva total e SM/SL) é apresentado o nº de proteínas identificadas em cada uma, em relação ao número total de proteínas.

Gráfico 5: Representação da distribuição das proteínas identificadas em carcinoma espinocelular (colunas a vermelho) e lesões pré-malignas (colunas a azul), pelos diferentes componentes celulares: componente ribonucleoproteico (ribonucleoprotein complexo), componente extracelular (*extracellular*), componente membranar (*plasma membrane*) e componente intracelular (*intracellular*).

Gráfico 6: Distribuição das proteínas identificadas em carcinoma espinocelular de acordo com os processos biológicos em que estão envolvidas.

Gráfico 7: Distribuição das proteínas identificadas em lesões pré-malignas de acordo com os processos biológicos em que estão envolvidas.

Gráfico 8: Representação das vias de sinalização em que estão envolvidas as proteínas identificadas em carcinoma espinocelular.

Gráfico 9: Representação das vias de sinalização em que estão envolvidas as proteínas identificadas em lesões pré-malignas.

Lista de Tabelas

Tabela 1: Entidades clínicas que podem ser confundidas com leucoplasia e características que permitem fazer um diagnóstico diferencial (adaptado de *Regezi J. A. “Oral Pathology-Clinical Pathologic Considerations” 2003*^[12])

Tabela 2: Apresentação das várias funções da saliva e dos constituintes salivares envolvidos nas mesmas (adaptado de *Kaufman E. 2002*^[41])

Tabela 3: Comparação entre marcadores imunohistoquímicos e biomarcadores ómicos, no que diz respeito à sua natureza, especificidade, utilidade biomédica e qualidade dos resultados obtidos.^[47]

Tabela 4: Principais aplicações dos biomarcadores e respectivas limitações das mesmas.^[46]

Tabela 5: Proteínas extracelulares identificadas como estando presentes (x) em carcinoma espinocelular e em lesões pré-malignas.

Tabela 6: Proteínas identificadas em carcinoma espinocelular e lesões pré-malignas, envolvidas em vias associadas a cancro (*pathways in cancer*).

Tabela 7: Proteínas identificadas em carcinoma espinocelular e lesões pré-malignas, envolvidas em vias associadas à p53 (*p53 signaling pathways*).

Tabela I: Lista de proteínas identificadas até à data em carcinoma espinocelular e lesões pré-malignas da cavidade oral.

Lista de Abreviaturas

ADN – Ácido Desoxirribonucleíco

AKT – Protein Kinase B

APAF -1 – Apoptotic Potease Activating Factor-1

ARN – Ácido Ribonucleico

ARNm – Ácido Ribonucleico mensageiro

ATP – Adenosina Trifosfato

BAD – Bcl 2-associated death promoter

BAK – Bcl-2 homologous antagonist/killer

BAX – Bcl-2-associated X protein

BCL-2 – Apoptosis regulator Bcl-2

BCL-w – Bcl-2-like protein 2

BCL-XL – B-cell lymphoma-extra large

BID – BH3 interacting-domain death agonist

BIK – Bcl-2-interacting killer

BIR – Baculoviral IAP Repeat

BIRC5 – Baculoviral IAP repeat-containing protein 5

BOK – Bcl-2-related ovarian killer protein

Ca^{2+} - Ião cálcio

CD95 – Cluster of differentiation 95

cIAP1 – Cellular inhibitor of apoptosis 1

cIAP2 – Cellular inhibitor of apoptosis 2

Cl^- - Ião cloreto

CO_2 – Dióxido de carbono

DAVID – Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery

DISC – Death-inducing signalling complex

EGF – Epidermal growth factor

ELISA – Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay

F - Ião fluoreto

FADD – Fas-associated death domain protein

FAS – Tumor necrosis factor receptor superfamily member 6

FASL – Tumor necrosis factor ligand superfamily member 6

FLIP – FADD-like interleukin-1 β -converting enzyme-like protease inhibitory protein

GO – Gene Ontology

H_2PO_4^- - Ião hidrogenofosfato

HCO_3^- - Ião hidrogenocarbonato

I⁻ - Ião iodeto

IAPs – Inhibitors of Apoptosis Proteins

Ig – Imunoglobulina

IgA – Imunoglobulina A

IgG – Imunoglobulina G

IgM – Imunoglobulina M

ILP2 – IAP-like protein-2

K⁺ - Ião potássio

KEGG – Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes

KIAP – Kidney inhibitor of apoptosis protein

LC-MS/MS – Liquid chromatography–mass spectrometry

MDM-2 – E3 ubiquitin-protein ligase

MeSH – Medical Subject Headings

Mg²⁺ - Ião magnésio

ML-IAP – Melanoma inhibitor of apoptosis protein

Na⁺ - Ião sódio

NCBI – National Center for Biotechnology Information

NIAP – Neuronal inhibitor of apoptosis protein

NIH – National Institutes of Health

NLM – U.S. National Library of Medicine

OMS – Organização Mundial de Saúde

p53 – Cellular tumor antigen p53

PANTHER – Protein Analysis Through Evolutionary Relationships

PCR - Polymerase chain reaction

PI3K – Phosphoinositide 3-kinase

PMID – PubMed identifier

RT-PCR – Real Time-Polymerase Chain Reaction

sCD95 – soluble cluster of differentiation

SMAC/DIABLO – Second Mitochondria-derived Activator of Caspase/Direct IAP Binding

Protein with Low pI

STRING – Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins

TNF- Tumoral necrotic factor

TNFr - Tumoral necrotic factor receptor

TRAILR1– TNF-related apoptosis inducing ligand receptor-1

TRAILR2 – TNF-related apoptosis inducing ligand receptor-2

TUNEL – Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling

UniProt – Universal Protein Resource

U.V. – Ultra-violeta

VIH – Vírus da imunodeficiência humana

XIAP – X-linked inhibitor of apoptosis protein

Nota Introdutória

O crescimento exponencial do conhecimento científico gera quantidades extraordinárias de informação que, não estando uniformizada de modo a ser compreendida por toda a comunidade científica, acaba por ser perdida. Deste modo, as técnicas de organização da informação são essenciais. As ontologias são criadas por especialistas, com o objectivo de definir critérios de regulação de termos e relações. O termo ontologia deriva do grego “*ontos*”, ser, e “*logos*”, palavra, isto é estruturas organizadas a partir de conceitos e da interligação entre os mesmos. As ontologias melhoram a organização da informação através da sua uniformização e padronização, permitindo fazer representações lógicas que possibilitam a recolha de evidências.^[1]

Ao longo deste trabalho são usadas várias ontologias em língua inglesa, uma vez que a sua tradução poderia reflectir-se numa perda de conceitos ou interligações entre os mesmos, induzindo o leitor em erro. Do mesmo modo, o nome das proteínas e algumas técnicas de análise também são apresentados em inglês e, quando pertinente, precedidos pela terminologia em português.

1. INTRODUÇÃO

1.1. BIOLOGIA E ASPECTOS HISTOLÓGICOS DA MUCOSA ORAL

A cavidade oral tem sido citada em inúmeras fontes bibliográficas como “o espelho da condição geral do indivíduo”, reflectindo estados patológicos ou de saúde. Existem várias condições sistémicas, como a diabetes ou deficiências vitamínicas, que apresentam manifestações a nível oral.^[2] Nesta primeira secção introdutória, visa-se descrever brevemente aspectos biológicos da cavidade oral, bem como fazer uma referência sumária às suas funções e características histológicas.

Todas as superfícies corporais estão cobertas por uma superfície epitelial, suportada por tecido conjuntivo. Os epitélios têm como função primária a protecção dos tecidos e órgão subjacentes de agressões físicas e mecânicas. Por outro lado, o tecido conjuntivo oferece propriedades nutritivas e de suporte. Apesar de pertencente ao sistema gastrointestinal, a cavidade oral apresenta características mucosas bastante diferentes do restante tracto gastrointestinal. De facto, a mucosa oral têm mais características em comum com a pele, com a qual se une a nível labial, do que com a mucosa intestinal.^[2]

Toda a cavidade oral, bem como o esófago, é recoberta por epitélio escamoso estratificado. Nas zonas sujeitas a forças mecânicas verifica-se a presença de uma camada de epitélio queratinizado (gengiva e palato duro), que está aderido a uma camada de tecido conjuntivo, denominada lâmina própria. Esta camada de epitélio queratinizado denomina-se estrato córneo e é ela que permite a dissipação das forças mecânicas exercidas. Nas regiões que não estão sujeitas a forças mecânicas tão intensas, por exemplo o soalho da cavidade oral e as regiões jugais, verifica-se a presença de epitélio não queratinizado, o que confere uma maior flexibilidade de modo a permitir a mastigação, a fonação e a deglutição. Em ambos os epitélios referidos anteriormente, existem camadas lipídicas nas zonas epiteliais mais externas que servem de barreiras de protecção contra vários agentes, como toxinas microbianas, enzimas e carcinogénios. O dorso da língua encontra-se recoberto por um epitélio específico, que engloba epitélio queratinizado e não queratinizado, aderido à porção muscular lingual. Em termos percentuais, o epitélio queratinizado representa cerca de 25%, o epitélio não-queratinizado aproximadamente 60% e os restantes 15% correspondem ao epitélio que recobre o dorso da língua.^[2]

As glândulas salivares são entidades características da mucosa oral e estão concentradas na submucosa, servindo-se de ductos para excretar a saliva para a cavidade oral. São estas glândulas que conferem ao epitélio oral o seu carácter húmido, através da excreção de saliva rica em proteínas específicas, factores de crescimento e agentes antimicrobianos.^[2]

Nas regiões jugais, lábios e algumas áreas do palato duro, pode ser identificada uma camada de tecido conjuntivo onde estão localizadas estruturas vasculares nobres, que fazem o suprimento sanguíneo e nervoso da mucosa. Esta camada de tecido conjuntivo denomina-se submucosa e, para além da função referida anteriormente, desempenha também o importante papel de separar a mucosa dos tecidos ósseos e musculares subjacentes. A composição da submucosa influencia a flexibilidade da mucosa e a sua aderência aos tecidos subjacentes. Em algumas zonas gengivais e do palato duro, não se verifica a presença de submucosa, estando a mucosa directamente em contacto com o perióstio do tecido ósseo, denominando-se mucoperióstio. Um pouco por toda a mucosa oral existem nódulos de tecido linfático, formados por invaginações do epitélio para a lâmina própria, que contêm um infiltrado de linfócitos e células plasmáticas. Estas regiões são essenciais para a resposta imunológica a nível oral.^[2]

Para que se mantenha a homeostase celular, é essencial que haja um equilíbrio entre os processos de diferenciação e descamação epitelial. Vários factores como a idade ou estados patológicos alteram este equilíbrio, causando hiperplasias ou atrofia epiteliais. Para se dar o processo de diferenciação celular é necessário existirem células progenitoras, situadas na camada basal, geralmente agrupadas em núcleos celulares. Os fenómenos através dos quais é conseguido o equilíbrio entre diferenciação e proliferação, apesar de extensamente estudados, ainda não são totalmente claros. No entanto, sabe-se que existem moléculas que actuam por regulação positiva e outras por regulação negativa, através de sistemas de controlo complexos envolvendo cascatas de sinalização intracelular. Para além destes processos moleculares, existem outras condicionantes como o ritmo circadiano, stress e processos inflamatórios. Sabe-se também que a taxa de renovação epitelial é mais elevada nas zonas não-queratinizadas do que nas zonas queratinizadas. À medida que as células vão sofrendo migração devido a processos de descamação, vai havendo acumulação de filamentos proteicos no citoplasma, até este estar completamente preenchido. Este tipo celular denomina-se queratina, cujo peso molecular varia consoante as diferentes áreas anatómicas. Por exemplo, as queratinas 8 e 18 são as que têm menor peso molecular e são encontradas em epitélio

glandular. As queratinas 5 e 14 estão presentes em todo o epitélio oral estratificado, enquanto o epitélio não queratinizado apresenta as queratinas 4 e 13. Uma das diferenças mais significativas entre o epitélio queratinizado e não queratinizado é a presença de núcleo e restantes organelos celulares nas células da camada mais superficial. As células da camada mais superficial do epitélio não queratinizado, apesar de também sofrerem alterações estruturais, mantêm a sua componente citoplasmática. A capacidade descamativa do epitélio oral é um importante mecanismo de defesa já que, através da rápida renovação da camada mais superficial, impede-se a adesão de muitos microorganismos, diminuindo assim a sua acção agressora sobre o epitélio.^[2]

1.2. CARCINOMA ESPINOCELULAR E LESÕES PRÉ-MALIGNAS DA CAVIDADE ORAL

1.2.1. Sistema de classificação da Organização Mundial de Saúde

De modo a uniformizar os conceitos relativos às patologias utilizados ao longo deste trabalho, optou-se por seguir a terminologia sugerida pela Organização Mundial de Saúde (OMS). Em 1973 a OMS, definiu uma lesão pré-maligna como um tecido morfológicamente alterado no qual a probabilidade de se desenvolver cancro oral é maior do que em tecido não alterado. De acordo com esta entidade, um epitélio atípico pode ser dividido em dois estados distintos: um que evolui para carcinoma espinocelular e outro que se mantém estável. No entanto, ambas as categorias estão englobadas pelo conceito de displasia epitelial. O modelo de evolução de lesões displásicas até carcinoma, formulado pela OMS, tem como referência o conhecimento proveniente do carcinoma no cérvix uterino.^[3]

A classificação da OMS tem sido usada como guia de diagnóstico. Os critérios usados para a classificação das displasias definem quais as alterações que se devem verificar para a lesão ser incluída em determinada categoria. Os termos 1/3 inferior, médio e superior, usados mais à frente neste trabalho para diferenciar os tipos de displasias, são aplicados de acordo com as especificações da OMS. Apesar das especificações dadas por esta entidade, o diagnóstico continua a ser bastante subjectivo, não havendo um limite definido entre os diferentes tipos de displasia. Para contrariar esta parcialidade, inerente à observação clínica e histopatológica, a OMS tem tentado definir novas estratégias para contornar este obstáculo.^[3]

1.2.2. Carcinoma espinocelular da cabeça e pescoço

De todos os cancros, cerca de 2 a 3% correspondem a cancro da cavidade oral, sendo diagnosticados, a nível mundial, cerca de 300000 novos casos todos os anos.^[3-7] Destes, aproximadamente 90% são casos de carcinoma espinocelular da cabeça e pescoço. O carcinoma espinocelular é então o tipo de cancro mais comum na cavidade oral, faringe e laringe. É também uma das formas mais vulgares de cancro associada à presença de lesões pré-malignas.^[3, 8-10] Devido à anatomia complexa da região da cabeça e pescoço, os pacientes sujeitos a tratamento para esta patologia, apresentam muitas vezes alterações na fonação, na deglutição e na respiração e têm um risco aumentado de desenvolver cancros nas vias aéreas superiores.^[4,5,9] Este tipo de carcinoma é caracterizado por uma invasão e disseminação bastante rápidas, sendo considerado um dos mais agressivos.^[11]

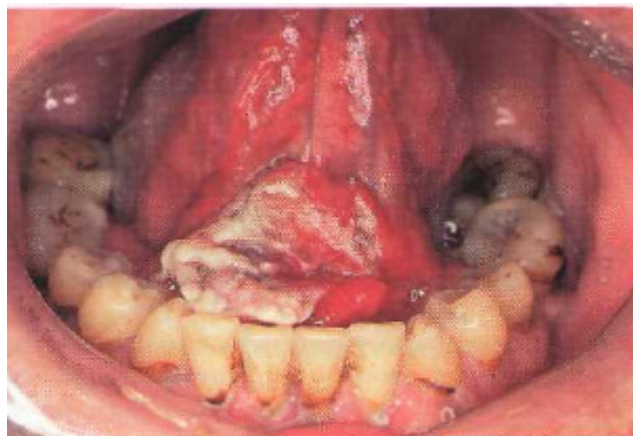


Figura 1: Carcinoma espinocelular no pavimento oral (adaptado de Regezi J. A. *“Oral Pathology-Clinical Pathologic Considerations”* 2003^[12])

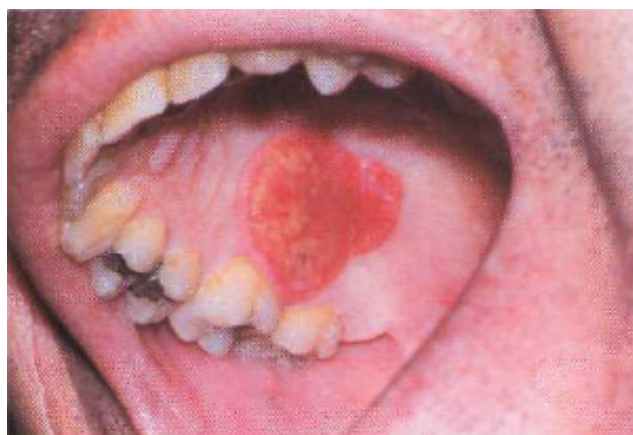


Figura 2: Carcinoma espinocelular no palato (adaptado de Regezi J. A. *“Oral Pathology-Clinical Pathologic Considerations”* 2003^[12])

A localização intra-oral mais comum do carcinoma espinocelular é a língua, especialmente o bordo póstero-lateral. É geralmente assintomático até fases avançadas, em que pode causar disfagia e dor. O carcinoma espinocelular apresenta-se então como uma massa endurecida, que pode ou não apresentar um padrão de crescimento exofítico e, na maioria dos casos, observa-se algum grau de ulceração.^[12]

O pavimento oral é a segunda localização intra-oral mais comum e, nestas situações, geralmente apresentando-se também como uma massa endurecida, ulcerada e indolor, que pode causar uma redução da mobilidade lingual. O carcinoma espinocelular também pode aparecer no palato, na mucosa jugal e a nível gengival, no entanto estas localizações são

menos comuns. A apresentação clínica é bastante variável, podendo verificar-se desde lesões ulceradas até lesões com padrão de crescimento exofítico.^[12]

A seguir às patologias cardiovasculares, em Portugal, o cancro é a segunda causa de morte mais comum. O cancro da cabeça e pescoço perfaz cerca de 10% de todos os casos, sendo a sua incidência maior do que o cancro do útero e da laringe. Um estudo recente^[13], indica que 80% dos casos estudados foram diagnosticados em indivíduos do sexo masculino. No entanto, o género não é considerado um factor de risco, existe sim uma associação de outros factores de risco, como os hábitos alcoólicos e tabágicos. Portugal é um dos países com maior média de consumo de álcool *per capita*, cerca de 12,1 litros, estando estes números muito associados ao consumo de tabaco. A idade média dos casos estudados foi 62,2 anos, o que está de acordo com estudos a nível internacional.^[13]

A maioria dos carcinomas espinocelulares da cabeça e pescoço são detectados em fases avançadas, uma vez que a maioria dos doentes só recorre aos serviços médicos quando a situação está já bastante desenvolvida.^[7,9,14,15] No entanto, se detectados em fases precoces, os carcinomas espinocelulares são menos debilitantes e a taxa de sobrevivência chega aos 80%, contrariamente a casos diagnosticados em fases mais tardias (taxa de sobrevivência inferior a 40%).^[4,9,11]

Os principais factores de risco são a exposição crónica a tabaco e álcool, susceptibilidade genética e infecções por papiloma vírus humanos do tipo 16 e 18.^[4,10,11,14,16]

1.2.3. Lesões pré-malignas

Os conceitos “lesão precursora”, “lesão pré-maligna”, “lesão pré-cancerígena” e “lesão potencialmente maligna” são usados na bibliografia científica para descrever entidades clínicas que podem ter potencial de malignização.^[17,18] Ao longo deste trabalho, optou-se por usar o termo lesão pré-maligna para denominar lesões com esta característica.

A nível da cavidade oral, uma lesão considera-se pré-maligna quando apresenta algum grau de displasia.^[3,19,20] Este tipo de lesões está geralmente associado epidemiologicamente, geograficamente e clinicamente a carcinoma espinocelular. Indivíduos com estas lesões

apresentam um risco aumentado de desenvolverem cancro oral.^[21] Importa então definir e distinguir os conceitos de hiperplasia e displasia.

A hiperplasia é um aumento do número de células, sem que haja alteração da arquitectura epitelial normal e sem sinais de atipia celular.^[18,19] Por outro lado, a displasia é caracterizada por atipia celular, perda do ciclo normal de maturação e estratificação, alteração da arquitectura epitelial associada a variação do tamanho e forma celulares. Quanto mais severa a displasia, maior a probabilidade de progressão maligna. No entanto, o contrário pode não se verificar e, portanto, lesões não-displásicas também podem progredir malignamente. As lesões displásicas têm uma apresentação clínica bastante heterogénea, não sendo possível fazer uma caracterização clínica e morfológica exacta. Deste modo, o diagnóstico destas lesões deve sempre ser confirmado a nível histológico, através de biópsias.^[3,18,19]

As displasias podem ser classificadas em leves, moderadas ou severas. Contudo, a diferenciação de um tipo para os outros não tem limites definidos, apresenta-se sim como uma progressão de estágios, com um aumento escalonado de severidade.^[3,18,19]

A displasia leve verifica-se quando a alteração da arquitectura epitelial está confinada ao terço inferior do epitélio e está presente atipia celular mínima.^[18,19]

A displasia moderada apresenta uma extensão da alteração da arquitectura epitelial até ao terço médio do epitélio, associada a atipia significativa. No entanto, uma displasia que afecte o terço médio epitelial mas que não apresente atipia significativa, deve ser considerada como displasia leve. Do mesmo modo, uma displasia que afecte apenas até ao terço médio epitelial mas apresente uma atipia bastante significativa, deve ser considerada uma displasia severa.^[18,19]

A displasia severa é identificada quando há um envolvimento de mais de dois terços do epitélio, com alteração da arquitectura associada a atipia significativa.^[18,19]

Existem algumas situações que podem ser confundidas com lesões displásicas com potencial maligno. É o caso de estados regenerativos ou reparativos do epitélio escamoso, em resposta a trauma, inflamação ou irradiação. Estas agressões podem causar uma perda da arquitectura epitelial que pode ser confundida com uma displasia. As deficiências nutricionais de ferro e vitamina B12 também podem causar displasias, no entanto, estas não apresentam potencial de malignidade, devendo ser feito um bom diagnóstico diferencial.^[19]

A data de aparecimento da lesão, a idade do doente, a localização intra-oral, hábitos de risco e infecções virais ou fúngicas, são factores que podem influenciar os estados displásicos,

exacerbando-os ou mascarando-os. Lesões presentes na cavidade oral durante várias décadas, sem que haja intervenção médica, podem ter resolução espontânea ou podem piorar e levar o doente a procurar ajuda médica. Sabe-se que os hábitos alcoólicos e tabágicos têm um papel fulcral no desenvolvimento displásico, no entanto os mecanismos envolvidas neste processo ainda não são totalmente conhecidos. As infecções fúngicas, as mais comuns por *Candida albicans*, contribuem para a hiperplasia epitelial e aumento dos processos inflamatórios, dificultando a avaliação histológica do grau de displasia.^[19]

Quando a displasia severa prossegue no processo de malignização, pode verificar-se uma outra entidade clínica, o carcinoma *in situ*. O conceito de carcinoma *in situ* pressupõe a ocorrência de transformação maligna sem invasão tecidual. Do mesmo modo que a displasia, esta entidade clínica não é diagnosticável apenas através do exame clínico, sendo imprescindível a realização de biópsia. Histologicamente verifica-se uma alteração da arquitetura de toda a extensão epitelial e atipia significativa associada a anomalias na mitose. No entanto, esta diferenciação entre displasia e carcinoma *in situ* não é tão linear quanto seria desejável, não sendo muitas vezes possível fazê-la.^[18,19]

O critério histológico que permite distinguir uma situação de cancro de uma lesão precursora é a invasão dos tecidos. No entanto, na prática clínica, o problema mais frequente é determinar quando há ou não invasão da lâmina própria.^[19]

1.2.3.1. LEUCOPLASIA

O termo leucoplasia refere-se a uma lesão branca da mucosa oral, não removível por raspagem, sem padrão histológico específico, não identificável como outra qualquer patologia, sem características patognomónicas e com risco aumentado de evoluir para carcinoma, podendo aparecer em qualquer zona da cavidade oral e orofarínge.^[8,17,18,22,23] É a lesão pré-maligna mais estudada cientificamente e é também a mais comum na população, com uma incidência de cerca de 1 a 5% na população em geral.^[24,25]

A prevalência relativamente ao género ainda não está bem definida, havendo estudos que apontam para uma maior prevalência num dos sexos e outros que referem não haver diferenças significativas. Quanto à idade, o aparecimento da leucoplasia dá-se, geralmente, entre os 40 e os 60 anos.^[20]

Esta entidade clínica é cerca de seis vezes mais comum em indivíduos fumadores em comparação a indivíduos não fumadores. Sabe-se também que os hábitos alcoólicos são um

factor de risco, independentemente do tipo de bebida. Por outro lado, ainda não está definido o eventual papel da infecção pelo papiloma vírus humano.^[18,20]

A leucoplasia tem um padrão de apresentação clínica bastante variável, podendo apresentar atrofia epitelial, hiperplasia com ou sem hiperqueratose, diferentes graus de displasia e até carcinoma *in situ*.^[17,22,23] Quando há evidência histológica de displasia moderada ou severa, o risco de evolução para carcinoma aumenta para 39%.^[17,19,26] Devido à variabilidade na sua morfologia clínica, a leucoplasia pode ser confundida com outras entidades patológicas a nível oral.^[12] A Tabela 1 sintetiza as situações que mais comumente podem ser confundidas com leucoplasias.



Figura 3: Leucoplasia no bordo lateral e na zona ventral da língua (adaptado de Regezi J. A. “Oral Pathology-Clinical Pathologic Considerations” 2003^[12])



Figura 4: Leucoplasia no bordo lateral da língua (adaptado de Regezi J. A. “Oral Pathology-Clinical Pathologic Considerations” 2003^[12])

Verifica-se um potencial de malignidade da leucoplasia, evidenciado pela progressão das características histológicas, desde a ausência de displasia, passando por estados gradualmente mais severos e culminando em carcinoma.^[8,18] A presença de displasia e o seu grau é geralmente usado para prever o potencial de transformação maligna e o prognóstico das leucoplasias.^[22,23] O diagnóstico é subjectivo e nem todas as lesões que apresentam displasia se tornam malignas, algumas podem mesmo regredir. Por outro lado, podem surgir carcinomas a partir de lesões que não apresentam displasia.^[20,27]

A leucoplasia pode ser classificada como homogénea ou não-homogénea, sendo a sua distinção feita a nível da apresentação clínica, de acordo com características morfológicas.^[17,18] A leucoplasia homogénea apresenta-se como uma lesão não exofítica, de superfície lisa e com risco de malignização relativamente baixo. A leucoplasia não-homogénea pode ter uma variedade de aspectos morfológicos, podendo ter um aspecto predominantemente esbranquiçado mas com zonas vermelhas ou azuladas. É uma lesão exofítica e com uma morfologia superficial irregular e rugosa.^[17,18] Dentro das leucoplasias não-homogéneas, pode ainda ser considerado um outro subtipo de leucoplasia, a leucoplasia verrucosa. Apesar da sua aparência uniforme, a leucoplasia verrucosa insere-se na categoria de não-homogénea pela sua textura característica. Estas lesões são clinicamente indistinguíveis do carcinoma verrucoso, sendo a sua identificação feita apenas a nível histopatológico.^[18]

Tabela 1: Entidades clínicas que podem ser confundidas com leucoplasia e características que permitem fazer um diagnóstico diferencial (adaptado de Regezi J. A. “Oral Pathology-Clinical Pathologic Considerations” 2003^[12])

LESÃO	CRITÉRIOS DE DIAGNÓSTICO
Queimadura química	História de contacto de substâncias químicas com a mucosa
Candidíase pseudomembranosa	Aspecto clínico (pseudomembranas geralmente com padrão simétrico)
Linea alba	Localização clínica (na mucosa jugal, ao nível do plano oclusal detário)
Lesões de fricção	Presença de irritação mecânica (superfícies dentárias irregulares, trauma por mordida, etc)
Leucoedema	Aspecto clínico (padrão simétrico)
Lúpus eritematoso	História de lesões cutâneas e aspecto clínico (lesões bilaterais)
Lesões induzidas por tabaco	História de hábitos tabágicos
Sífilis secundária	Serologia para detecção de <i>T. pallidum</i> e história clínica
Nevo branco esponjoso	História familiar e aspecto clínico (geralmente com padrão simétrico)

O diagnóstico de leucoplasia é sempre provisório até ser realizada uma biópsia. A biópsia confirma se se trata de uma outra patologia ou se efectivamente não pode ser caracterizada como outra entidade clínica conhecida.^[17,20]

Estima-se que anualmente cerca de 1% das leucoplasias sofrem transformação maligna, sendo que destas, a maioria são leucoplasias não-homogéneas. O processo de malignização é fortemente influenciado pelos seguintes factores:^[18]

- Localização - Língua ou soalho da cavidade oral
- Tamanho – Maior que 200mm²
- Leucoplasias do tipo não-homogéneo
- Duração da presença da lesão
- Presença de *Candida albicans*

- Presença de displasia epitelial

Apesar da percentagem de malignização da leucoplasia ser significativa, ainda não é consensual que o tratamento deva ser iniciado em fases pré-invasivas, já que nem todas as lesões evoluem para carcinoma.^[17]

Quando se verifica a presença de possíveis factores etiológicos, por exemplo hábitos tabágicos, as possíveis lesões de leucoplasia devem ser observadas minuciosamente num período de 2 a 4 semanas após a identificação inicial. Este período de tempo permite uma remissão/cicatrização, pelo menos parcial, da lesão em causa, no caso de não se tratar de uma leucoplasia. Não é aconselhável adiar a biópsia para além deste período de tempo. O tipo de biópsia realizado vai depender das dimensões da lesão e do tipo de leucoplasia em causa. No caso de leucoplasias não-homogéneas, uma biópsia incisional, em que se remove parte da lesão, pode não ser representativa da mesma, dadas as suas características variáveis. Em situações em que são identificadas lesões com dimensões inferiores a 2-3cm, pode ser considerada uma biópsia excisional, de modo a remover a totalidade da lesão, deixando uma margem de segurança.^[18]

Após diagnosticada uma leucoplasia, o clínico pode questionar-se sobre se deve tomar medidas terapêuticas ou não. A prevenção da malignização e a presença de sintomas referidos pelo doente devem ser tidos em conta e, nestes casos deve-se optar por intervir. Por outro lado, lesões difusas que afectam áreas bastante extensas são mais complexas aquando da toma de decisões terapêuticas. Apesar de não existirem *guidelines* específicas para quando tratar ou não uma leucoplasia, existem vários métodos de tratamento que vão desde a excisão cirúrgica até à cirurgia com laser. Após a remoção, a taxa de recidiva varia até cerca de 30%.^[18,20]

1.2.3.2. ERITROPLASIA

A eritroplasia é uma lesão vermelha, com superfície lisa ou irregular, não passível de remoção, presente na mucosa oral e com grande potencial de malignização. Apresenta-se como uma lesão vermelha, que não pode ser caracterizada como outra entidade clínica conhecida. É uma lesão relativamente menos comum do que a leucoplasia, mas cuja taxa de malignização é bastante mas elevada. Quando associada a lesões brancas denomina-se leucoeritroplasia.^[17,18,24]



Figura 5: Eritroplasia no bordo lateral e na zona dorsal da língua (adaptado de Regezi J. A. “Oral Pathology-Clinical Pathologic Considerations” 2003^[12])

Sabe-se que os hábitos alcoólicos e tabágicos são factores etiológicos importantes e que a maioria das lesões aparece a partir dos 50 anos em qualquer zona da cavidade oral e orofaríngea, sem preferência pelo género. A eritroplasia geralmente apresenta-se como uma lesão isolada. Esta característica permite distingui-la de lesões que, geralmente, apresentam um padrão bilateral, como o líquen plano, o lúpus eritematoso e a candidíase eritematosa.^[17,18,24]

A nível histopatológico, a eritroplasia apresenta, no mínimo, algum grau de displasia, sendo comum a presença de zonas características de carcinoma *in situ*. Ainda não existem estudos suficientes que permitam avaliar a taxa de malignização mas sabe-se que é superior à da leucoplasia e, por isso, as lesões de eritroplasia devem ser tratadas precocemente. O tratamento é semelhante ao da leucoplasia, sendo as opções mais comuns a excisão com margens cirúrgicas de segurança. Relativamente à recorrência destas lesões, também ainda não existem estudos disponíveis.^[18]

1.2.3.3. FIBROSE ORAL SUBMUCOSA, QUERATOSE ACTÍNICA, LÍQUEN PLANO

Existem ainda outras lesões como a fibrose oral submucosa, a queratose actínica e o líquen plano, que não são ainda cientificamente aceites como lesões pré-malignas, mas cujo potencial de malignização pode estar presente e que portanto podem evoluir para carcinoma.

A fibrose oral submucosa está associada ao consumo de tabaco de mascar e é característica da Ásia, no entanto pode ocorrer noutras zonas do globo, tendo sido identificados casos na

Grécia, Reino Unido e África do Sul.^[18] Para além do tabaco, existem outros factores que contribuem para a etiologia desta patologia, por exemplo, deficiências nutricionais. A nível histológico verifica-se uma degradação do colagénio pelos fibroblastos, com consequente fibrose do epitélio. A nível clínico, a fibrose oral submucosa apresenta-se como uma lesão endurecida e esbranquiçada, com elasticidade diminuída, podendo haver queixas de *trismus* e sensação de queimadura.^[12] Em estados avançados podem ser visíveis bandas fibrosas na mucosa jugal, causadas por uma fibrose da lâmina própria, levando a atrofia epitelial. As zonas com epitélio atrófico têm maior potencial de desenvolver carcinoma espinocelular. Prevê-se que a taxa de malignização seja de aproximadamente 0,5% por ano.^[18]

A queratose actínica apresenta-se como uma entidade clínica ulcerada da mucosa do bordo do lábio, associada a indivíduos com idade avançada. A nível histopatológico pode ir desde uma hiperqueratose com ou sem displasia epitelial, até um carcinoma espinocelular. Consoante a apresentação clínica, sintomas e resultado da biópsia, o tratamento pode passar por excisão cirúrgica ou evaporação com laser de CO₂. Não existem estudos que permitam inferir a taxa de malignização ou a percentagem de recorrência deste tipo de lesões.^[18]

Relativamente ao líquen plano, trata-se de uma patologia inflamatória crónica que envolve a resposta imune mediada por linfócitos T, caracterizando-se pela sua persistência e recorrência. A sua etiologia ainda é desconhecida e a taxa de malignização está entre os 0,5 e 2% por ano e, aparentemente, pode ocorrer em todos os subtipos de líquen plano. Ainda não existem medidas preventivas do processo de malignização por isso as consultas de *follow up* são essenciais.^[18,19]

1.2.4. Evolução e prognóstico do carcinoma espinocelular da cabeça e pescoço

A evolução do carcinoma espinocelular a partir de lesões consideradas pré-malignas é cientificamente aceite. Verifica-se a presença de uma lesão inicial pré-maligna, com potencial de malignização, que evolui para uma lesão cancerígena.^[4,14,25] Trata-se de um processo em etapas múltiplas, envolvendo mutações genéticas e anomalias cromossómicas. A transição de epitélio oral normal para displasia e, posteriormente, para cancro resulta da acumulação de alterações genéticas e epigénicas.^[10,19,27,28,29] De acordo com este modelo, o crescimento

tumoral é mediado por mutações que se vão acumulando a nível celular, bem como por várias alterações moleculares. Estas alterações moleculares activam protooncogenes que estimulam o crescimento celular e inibem moléculas com função inibidora tumoral, propiciando assim a transformação neoplásica. À medida que há uma progressão de displasia para carcinoma, verificam-se alterações genéticas a nível cromossómico, observando-se um aumento das perdas alélicas que evidencia um processo de malignização progressivo.^[29]

Apesar dos avanços significativos na terapêutica e no diagnóstico precoce, a taxa de sobrevivência de pacientes com cancro oral, não tem sofrido alterações positivas. O diagnóstico precoce desempenha um papel essencial na progressão, tratamento e qualidade de vida, permitindo melhorar os resultados da terapêutica. O tamanho das lesões, a sua localização, o envolvimento de nódulos linfáticos cervicais e a existência de metástases são factores que influenciam bastante o prognóstico.^[5,6,8,9,15,26]

A principal causa de morte associada ao cancro é a metastização. No caso do carcinoma espinocelular da cabeça e pescoço, a zona mais comum de metastização são os nódulos linfáticos cervicais. A presença de metástases nos nódulos linfáticos tem sido um indicador de prognósticos reservados, fazendo da detecção precoce um passo importante no tratamento. A progressão dos carcinomas envolve alterações a nível molecular que culminam com a invasão de tecidos adjacentes. Já existem algumas moléculas que apresentam evidência experimental de potenciais marcadores da proliferação celular. Dos reguladores propostos destacam-se os envolvidos no ciclo celular e proliferação celular: p53 (*cellular tumoral antigen p53*), factor de crescimento epidermal e ciclina D1. A regulação do ciclo celular implica uma interacção entre várias proteínas, contribuindo para o estabelecimento da homeostasia do processo que, quando desregulado, resulta na morte ou proliferação celular.^[30]

Os processos de invasão tumoral e metastização são complexos e envolvem múltiplas vias de sinalização celulares e componentes celulares. O desenvolvimento de metástases nos nódulos linfáticos é um factor que influencia significativamente o prognóstico. A identificação precoce de lesões com potencial de metastização elevado, permite personalizar estratégias de tratamento, melhorando assim os resultados da terapêutica.^[30]

Para além dos nódulos linfáticos cervicais, sabe-se que os pulmões são a zona de excelência para o aparecimento de metástases de carcinoma espinocelular da cavidade oral. No entanto, uma grande percentagem das neoplasias a nível pulmonar são de origem espinocelular e têm factores de risco semelhantes aos do carcinoma espinocelular da cavidade

oral.^[5] Verifica-se então uma grande associação entre os dois tipos de neoplasia, podendo haver um co-desenvolvimento das duas entidades no mesmo doente. Esta situação, dificulta bastante o diagnóstico diferencial entre metástases de carcinoma espinocelular da cavidade oral a nível pulmonar e carcinoma do pulmão. Esta dificuldade acrescida no diagnóstico diferencial implica uma complexidade acrescida no delineamento de estratégias terapêuticas já que tratar uma situação de metástase não é o mesmo que tratar um caso de neoplasia sem metástases.^[5]

A nível clínico, uma das maiores dificuldades quando se verificam recaídas, é determinar se a nova lesão é efectivamente uma recorrência local, no mesmo sitio onde existia a lesão anterior ou se, por outro lado, é uma nova lesão, completamente independente da anterior. Estas situações são mais comuns em doentes com hábitos tabágicos e/ou alcoólicos crónicos.^[5] Conseguir determinar o potencial de metastização deste tipo de carcinoma, permitiria melhorar o tratamento destas situações.^[30]

O exame clínico e a biópsia são os principais meios de avaliação de lesões mucosas a nível oral e deve incluir uma avaliação cuidadosa da zona da cabeça e pescoço, bem como uma observação e palpação intra-oral detalhadas.^[5,7]

Actualmente, a biópsia de lesões suspeitas é o método que permite um diagnóstico mais exacto deste tipo de lesões. A zona onde é feita a biópsia influencia o resultado histopatológico, por isso é essencial que sejam incluídas amostras de todas as diferentes zonas da lesão. Existem outros métodos de diagnóstico menos invasivos, como a citologia exfoliativa. No entanto, estas opções, apesar de mais confortáveis para o paciente, aumentam a probabilidade de falsos-positivos ou falsos-negativos.^[4]

1.2.5. A regulação comprometida da apoptose como principal mecanismo molecular de malignização

Na carcinogénese várias vias celulares, reguladoras de processos essenciais para a homeostase celular, estão alteradas. De todas elas, uma das que mais interesse tem suscitado na comunidade científica é a regulação da apoptose. Compreender os mecanismos a nível molecular que estão envolvidos na desregulação desta via, tem sido um objectivo *major* da área oncológica já que pode eventualmente permitir a identificação de moléculas chave que possam depois ser utilizadas em métodos de diagnóstico e estratégias terapêuticas mais específicas. A apoptose, ou morte celular programada é um processo biológico essencial para

o desenvolvimento tecidual normal e manutenção da homeostase celular.^[31,32] A alteração dos mecanismos de regulação da apoptose verifica-se em várias situações fisiológicas e patológicas das quais se destacam o desenvolvimento embrionário, as doenças neurodegenerativas e o cancro.^[1] No caso do cancro, verifica-se que há uma desregulação dos processos apoptóticos, associada a proliferação celular ilimitada.^[39]

A apoptose pode ser iniciada por duas vias distintas: a via extrínseca e a via intrínseca. A via extrínseca é desencadeada pela ligação de substratos específicos a receptores de membrana da família dos receptores de factores de necrose tumoral-TNFr (*Tumoral Necrotic Factor Receptor-TNFr*). A via intrínseca é activada em situações de stress celular e o principal organelo celular envolvido nesta via é a mitocôndria. Em situações de stress celular, há um aumento da permeabilidade da membrana mitocondrial que culmina com a libertação de moléculas pró-apoptóticas.^[1-5] Ambas as vias, intrínseca e a extrínseca, estão representadas nas Figuras 6 e 7 respectivamente.^[31]

Durante a apoptose ocorre uma retracção progressiva da célula devido à quebra das ligações entre as lamininas, com diminuição do volume celular e do volume do núcleo, perda de adesão às células vizinhas e condensação da cromatina. Há uma libertação de endonucleases que migram para o núcleo da célula e fragmentam o ADN. A quebra de ligações entre as proteínas do citoesqueleto como a actina, a plectina e a gelsolina leva à fragmentação da célula em várias vesículas apoptóticas, culminando com a sua fagocitose.^[2, 5] Todas as alterações morfológicas da célula são resultado da activação de vias de sinalização onde intervêm proteínas específicas, como as caspases, as proteínas da família BCL-2 (*apoptosis regulator Bcl-2*), a p53 (*cellular tumor antigen protein p53*) e as proteínas inibidoras da apoptose, IAPs (*Inhibitors of Apoptosis Proteins*).^[34]

As caspases desempenham um papel essencial nas vias apoptóticas, intervindo essencialmente ao nível da condensação e fragmentação nuclear.^[33,34,35] Já foram identificadas catorze caspases no Homem, das quais as caspases 3, 6, 7, 8, 9, 10 estão envolvidas especificamente nas vias de sinalização da apoptose.^[34,35] As caspases são expressas sob a forma de precursores inactivos que, após um estímulo apoptótico, são activados por processos autólogos ou por outras moléculas. De acordo com o seu papel na cascata de sinalização, as caspases podem então ser divididas em caspases iniciadoras (caspases 8 e 9), que após um estímulo, são activadas por auto-activação, e caspases efectoras (caspases 3 e 7), que são activadas por caspases iniciadoras.^[33,35] As caspases têm um domínio de ligação específico

para determinados substratos, de entre os quais se destaca a MDM-2 (*E3 ubiquitin-protein ligase MDM-2*). Ao ligar-se a uma caspase, a MDM-2 é clivada e liberta a p53, outra proteína essencial nas vias apoptóticas, que posteriormente vai activar a transcrição de genes pró-apoptóticos.^[34]

1.2.5.1. VIAS APOPTÓTICAS

Via intrínseca

A via intrínseca pode ser activada por vários estímulos, dos quais se destacam a radiação U.V., a radiação gama, factores virais, danos no ADN e factores oncogénicos. Estes estímulos são reconhecidos por componentes intracelulares que activam cascatas de sinalização, fazendo chegar a informação à mitocôndria, tendo como consequência um aumento da permeabilização da membrana mitocondrial. Esta alteração na permeabilização membranar vai permitir a difusão para o citoplasma de várias proteínas, incluindo factores indutores da apoptose, como o citocromo *c*.^[31-35]

No citoplasma o citocromo *c* liga-se ao factor activador da protease Apaf-1 (*apoptosis protease activating factor-1*), iniciando a formação do apoptossoma, um complexo que intervém na activação da caspase 9. Uma vez activada a caspase 9, esta vai activar as caspases efectores 3, 6 e 7, culminando com a desintegração celular.^[31-35]

Via extrínseca

A estimulação da apoptose pela via extrínseca inicia-se quando os receptores de morte (*death receptors*), um subtipo de receptores da superfamília dos TNFr, se ligam a citocinas específicas, da família dos factores de necrose tumoral-TNF (*Tumoral Necrotic Factors-TNF*). As principais ligações conhecidas com implicação na iniciação da sinalização da apoptose, pela via extrínseca são: factor de necrose tumoral alfa (*TNF-alpha*) com TNFr, FASL (*Tumor necrosis factor receptor superfamily member 6*) com FAS (CD95), Ligando para o receptor TNF relacionado com a apoptose-TRAIL (*TNF-related apoptosis inducing ligand -TRAIL*) com o receptor do ligando para o receptor TNF relacionado com a apoptose-TRAILR1 (*TNF-related apoptosis inducing ligand receptor-1 - TRAILR1*) e ligando para o receptor TNF que induz a apoptose-TRAIL (*TNF-related apoptosis inducing ligand -TRAIL*) com o receptor do ligando para o receptor TNF relacionado com a apoptose-TRAILR2 (*TNF-related apoptosis inducing ligand receptor 2-TRAILR2*).^[31-35]

A transmissão do estímulo apoptótico pelos receptores de morte é feita através de um domínio específico, o domínio de morte. A união de um dos receptores específicos enumerados anteriormente, ao ligando correspondente, leva ao recrutamento de proteínas específicas para domínios de morte, nomeadamente das FADD (*FAS-associated death domain protein*) e TNFR1 (*associated death domain protein*), o que vai provocar a mobilização das pró-caspases iniciadoras 8 e 10, formando-se o complexo DISC (*Death Inducing Signaling Complex*). O complexo DISC vai activar a caspase 8, que posteriormente activa as caspases efectoras 3, 6 e 7, promovendo o desenrolar da apoptose, até culminar com a desintegração celular.^[31-35]

As duas vias de sinalização da apoptose estão intimamente ligadas pela proteína BID (*BH3-interacting domain death agonist-BID*). A activação da BID pela caspase 8 é o elo de ligação entre as duas vias. A activação da caspase 8 pela via extrínseca permite que a proteína BID seja activada e migre para a mitocôndria, activando assim a via de sinalização intrínseca.^[35]

A família BCL-2 engloba proteínas pró-apoptóticas das quais se destacam BAX (*BCL-2 associated X protein*), BID (*BH3 interacting domain death agonist*), BAD (*BCL-2 associated death promoter*), BIK (*BCL-2 interacting killer*), BAK (*BCL-2 homologous antagonist/killer*) e anti-apoptóticas, a BCL-2, BCL-X_L (*B-cell lymphoma-extra large*), BCL-w (*BCL-2-like protein 2*), entre outras. Apesar de já ser bem conhecido o impacto da família de proteínas BCL-2 na apoptose, os mecanismos bioquímicos de funcionamento ainda não estão bem claros. O equilíbrio entre moléculas pró e anti-apoptóticas é essencial para manter a homeostase celular.^[31-34]

As IAPs são factores inibidores da apoptose com um papel fulcral nesta via celular. Têm um domínio proteico específico, o domínio BIR (*Baculoviral IAP Repeat*) e já foram identificadas várias IAPs diferentes em células humanas: XIAP, CIAP1, CIAP2, NIAP, ML-IAP, ILP2, KIAP e survivina-BIRC5 (*Baculoviral IAP repeat-containing protein 5*). Todas actuam a diferentes níveis, inibindo processos apoptóticos.^[31]

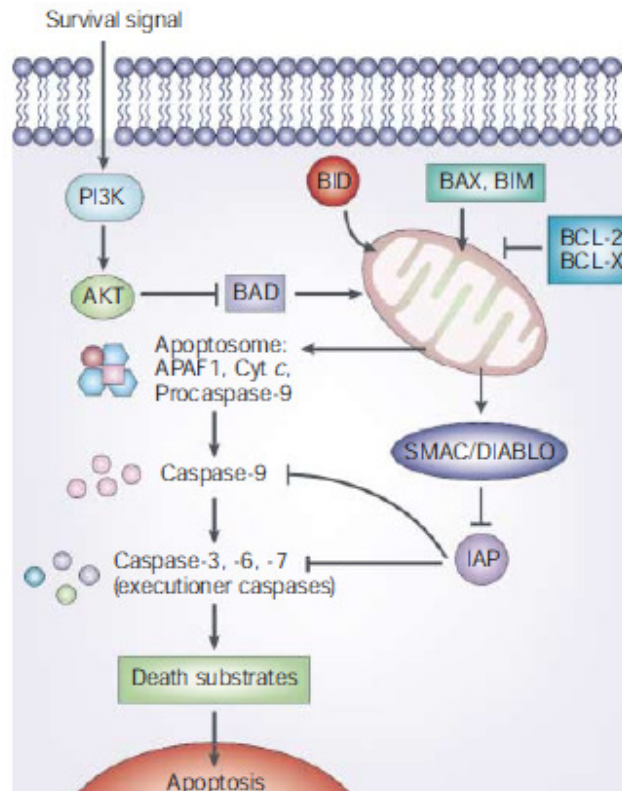


Figura 6: Representação das moléculas envolvidas na via intrínseca da apoptose e das interações entre elas. Verifica-se um estímulo inicial a nível da mitocôndria, o que vai induzir a produção de BID a partir do BCL-2, que por sua vez induz uma alteração na permeabilidade da membrana mitocondrial levando à libertação de citocromo *c* e outras moléculas pró-apoptóticas. O citocromo *c* forma um complexo, o apoptosoma com a APAF 1, com a pró-caspase 9 e com ATP. Este complexo permite a activação da caspase 9 que vai accionar as caspases efectoras 3,6 e 7, culminando com a apoptose. A inibição das vias de apoptose pode ser conseguida através de factores anti-apoptóticos da família BCL-2, como a BCL-2 e a BCL-X que impedem a libertação de moléculas pró-apoptóticas da mitocôndria. Pode também ser feita através de IAPs que são reguladas pela SMAC/DIABLO e impedem a activação da cascata de caspases. Por outro lado, factores de crescimento específicos e citocinas podem funcionar como sinais de sobrevivência (*survival signal*) e activar a via da PI3K, provocando a activação de AKT que vai fosforilar e inactivar o factor pró-apoptótico BAD (adaptado de Igney et al 2002^[31])

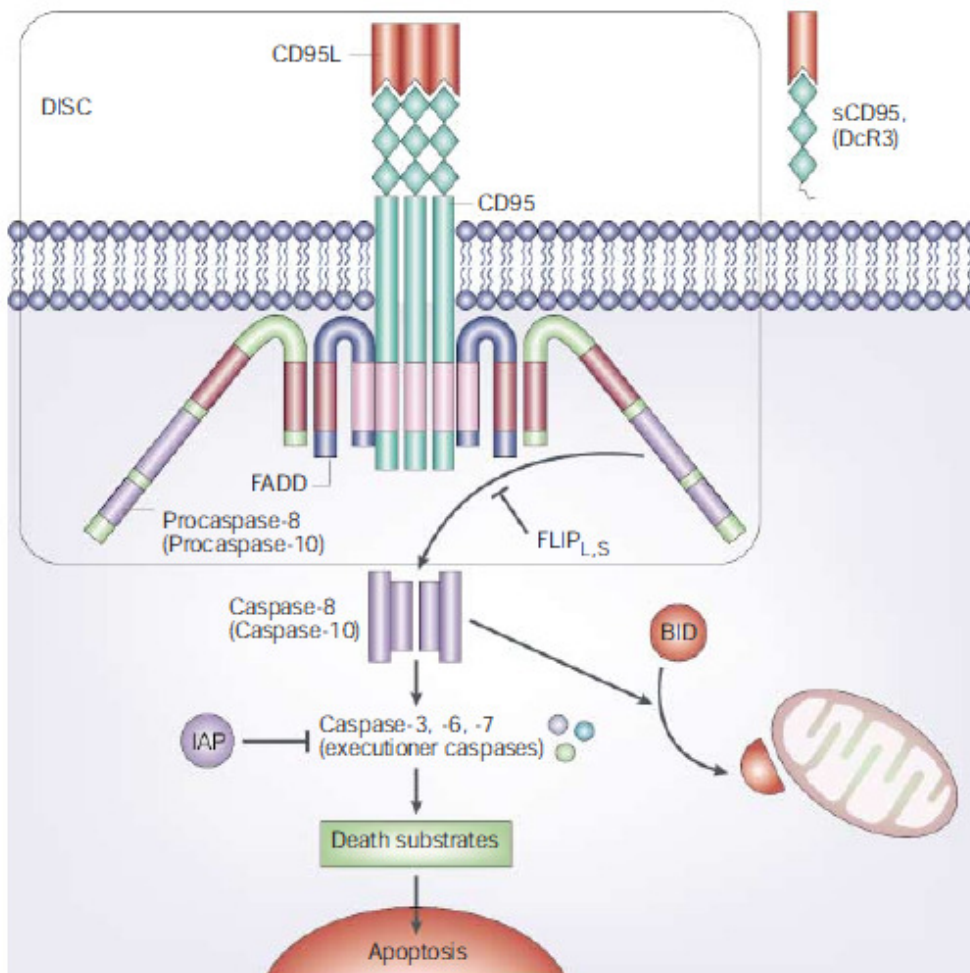


Figura 7: Representação das moléculas envolvidas na via extrínseca da apoptose e das interações entre elas. Os receptores de morte são receptores de membrana da superfamília dos factores de necrose tumoral que têm um domínio intracelular específico. Uma vez ligados aos substratos específicos como o CD95, formam um complexo com proteínas FADD, denominado DISC, que recruta as pró-caspases iniciadoras 8 e 10 que depois de serem activadas vão accionar as caspases efectoras 3, 6 e 7. Está então activa a cascata de caspases que vai culminar com as alterações morfológicas e bioquímicas características da apoptose. Este processo pode ser inibido a vários níveis. A ligação dos substratos CD95 aos receptores de morte pode ser impedida por outras moléculas (sCD95); moléculas específicas como as FLIP que são homólogas das caspases 8 mas não apresentam domínio catalítico, podem impedir a activação das caspases iniciadoras por ligação ao DISC; ligação de IAPs às caspases, inibindo-as ou degradando-as, impedindo assim a continuação da cascata de caspases (adaptado de *Igney et al 2002*^[31])

A proteína p53 é uma das mais estudadas pelo seu papel na tumorigénese. Esta proteína tem um papel essencial no *checkpoint* G1 do ciclo celular, permitindo a iniciação de vias de reparação celular. Quando se verifica dano a nível genético nesta fase do ciclo celular, há um aumento da expressão da p53, que resulta numa paragem do ciclo celular para permitir a reparação das alterações. Posteriormente a MDM-2 funciona como um regulador negativo e inibe a p53, permitindo que a célula prossiga no ciclo celular. No entanto, quando os danos existentes não podem ser reparados, são activadas vias de sinalização que culminam com a

apoptose. A presença de mutações no gene p53 tem como consequência uma desregulação no controlo na fase G1, permitindo que células danificadas prossigam no ciclo celular.^[31,34]

Os mecanismos que levam à transformação maligna de um grupo de células podem ser bastante heterogêneos. No entanto, a falha nos mecanismos de apoptose é uma característica comum nos processos de malignização.^[2, 3] A resistência das células tumorais aos processos de apoptose é uma característica essencial e pode ser conseguida por vários mecanismos diferentes. Para além da expressão de proteínas promotoras da progressão celular, para que se verifique desenvolvimento tumoral, é necessário que sejam expressadas moléculas anti-apoptóticas e inibidas moléculas pró-apoptóticas. Podem também ser inactivados receptores essenciais para o processo apoptótico como os receptores do factor de necrose tumoral. Sendo já conhecidos alguns dos mecanismos das vias apoptóticas, a aplicação destes conhecimentos na prática clínica é um passo essencial, que passa não só pela implementação de novas estratégias terapêuticas mas também pela identificação de moléculas que possam ser usadas como marcadores para diagnóstico precoce de lesões tumorais.^[31]

1.3. SALIVA

1.3.1. Origem e composição

A saliva é o fluido hipotónico que banha toda a cavidade oral e, quando em situação fisiológica, apresenta-se incolor e inodora e tem um papel fulcral no sistema digestivo e estomatognático. Este fluido é produzido nas diferentes glândulas salivares da cavidade oral, sendo que cada um dos diferentes tipos de glândulas produz saliva com composição e propriedades características.^[36-39] Para além do local de produção, existem outros factores que influenciam a composição salivar, destacando-se o modo de estimulação da secreção salivar, a dieta, a idade, o género, o ritmo circadiano, estados patológicos e agentes farmacológicos.^[36,37]

Quando se fala de saliva total (*whole saliva*), considera-se o fluido composto por diferentes tipos de saliva, originários dos três pares de glândulas *major*: as glândulas parótidas, as glândulas submandibulares e as glândulas sublinguais.^[4,36-39,41] Cerca de 90% do volume salivar resulta da produção das glândulas *major*, sendo 65% provenientes das glândulas submandibulares, 23% das glândulas parótidas e 4% das glândulas sublinguais. Os

restantes 8% são produzidos pelas glândulas *minor*, que se encontram dispersas pela mucosa oral.^[4,36,37] As glândulas salivares são compostas por diferentes elementos celulares, estando a produção e excreção da saliva confinada a dois tipos celulares: as células acinares e as células dos ductos excretores. As células acinares encontram-se no interior das glândulas e são responsáveis pela produção da saliva e pela maioria do seu conteúdo proteico. As células ductais encontram-se nos ductos excretores e promovem a excreção da saliva para a cavidade oral, ao mesmo tempo que também adicionam alguns componentes proteicos à saliva e alteram as suas propriedades iónicas.^[40]

É então possível, conforme os objectivos delineados, estudar a saliva total ou estudar a saliva proveniente de uma ou mais das diferentes glândulas separadamente. No entanto, a recolha de saliva específica de determinada glândula é um procedimento mais complexo e, geralmente, tem interesse apenas para estudo ou diagnóstico de situações de patologia glandular.^[41]

Outros componentes que contribuem para a composição da saliva provêm do fluido crevicular, secreções nasais e brônquicas, derivados do plasma sanguíneo, bactérias e produtos bacterianos, vírus, fungos, células epiteliais que sofreram descamação, componentes celulares e restos alimentares.^[36,37,39,41] Podem ainda ser encontrados constituintes do plasma sanguíneo que não são normalmente associados à constituição salivar. Por exemplo fármacos e hormonas, podem chegar à saliva através do transporte passivo ou difusão a partir do meio intracelular.^[36,37,41]

Os componentes salivares podem ser divididos em inorgânicos e orgânicos, conferindo à saliva o seu pH ligeiramente ácido (pH entre 6 e 7). De todos os componentes da saliva, a água é o mais abundante, estando presente numa percentagem de cerca de 99%. O componente aquoso tem origem, na sua maioria, no meio intracelular, sendo transportado para o meio extracelular através de processos de difusão. Para além da água, dos componentes inorgânicos, destacam-se os iões Na^+ , Cl^- , Ca^{2+} , K^+ , HCO_3^- , H_2PO_4^- , F^- , I^- e Mg^{2+} . A componente electrolítica é transportada para o meio extracelular de acordo com o gradiente osmótico e varia com a taxa de secreção e o tipo de estímulo. Das interacções entre a componente iónica, resulta o ião bicarbonato que, ao fazer uma ligação covalente com os iões cálcio e fosfato, confere à saliva a propriedade tampão, neutralizando ácidos que poderiam causar desmineralização do componente mineral das peças dentárias.^[2,36-38]

A saliva engloba também vários compostos orgânicos dos quais se destacam a ureia, o ácido úrico, a glicose, o colesterol, os ácidos gordos, os aminoácidos, as proteínas como as mucinas, as amilases, as glicoproteínas, as lisozimas, as peroxidases, as histatinas, as cistatinas, as imunoglobulinas e as defensinas. Estas moléculas formam uma película que, associada ao componente microbiano, se denomina biofilme oral.^[36-39]

Existem várias proteínas salivares responsáveis pela acção antimicrobiana da saliva. As histatinas são importantes pois têm uma acção antifúngica. As imunoglobulinas têm também uma acção antimicrobiana, que é complementada pela acção de outras proteínas como as peroxidases, as lisozimas, as mucinas e as defensinas.^[39]

1.3.2. Funções

As funções salivares estão intimamente relacionadas com os seus constituintes. As principais funções da saliva são a digestão, o auxílio da mastigação, da deglutição, da fonação, da protecção antibacteriana, antifúngica e antiviral e, por último, a acção lubrificante e de tampão. Para além das principais funções enumeradas anteriormente, destacam-se ainda as propriedades de retenção de dispositivos protéticos e o importante papel desempenhado no sentido do paladar.^[36-41]

Tabela 2: Apresentação das várias funções da saliva e dos constituintes salivares envolvidos nas mesmas (adaptado de Kaufman E. 2002^[41])

FUNÇÕES SALIVARES	CONSTITUINTES SALIVARES ENVOLVIDOS
Lubrificação	Mucinas, glicoproteínas, água
Acção antimicrobiana	Amilase, elementos do complemento, defensinas, lisozimas, mucinas, cistatinas, histatinas, glicoproteínas, IgA
Protecção das mucosas	Mucinas, electrólitos, água
Remineralização do esmalte e dentina	Iões de cálcio, fosfato e componente proteico
Solução tampão	Iões bicarbonato, cálcio e componente proteico
Formação do bolo alimentar	Mucinas, água, amilases, lipases, ribonucleases, proteases
Paladar	
Fonação	

1.3.3. A saliva como fluído de diagnóstico

Ao longo dos anos, a análise do sangue e dos seus componentes, tem tido um lugar privilegiado nos diagnósticos laboratoriais para as mais variadas patologias. No entanto, outros fluídos biológicos como a urina, também são frequentemente usados para diagnosticar patologias específicas. Do mesmo modo, a saliva, como fluído biológico essencial que é, não deve ser excluída.^[15,37,41,42]

A saliva foi inicialmente usada como fluido de diagnóstico na medicina tradicional chinesa, há mais de duzentos anos atrás. Actualmente, sabe-se que a nível salivar estão presentes compostos com origem no plasma sanguíneo, proveniente da vasculatura ramificada das artérias carótidas. Deste modo, a saliva tem um potencial imenso já que teoricamente, podem ser identificadas neste fluido, grande parte das moléculas encontradas na circulação sistémica.^[36-38,41,42] Este componente biológico apresenta-se então como um fluido corporal, que pode ser obtido por métodos não-invasivos, permitindo maior cooperação por parte dos doentes. Ao mesmo tempo, permite análises dinâmicas, com especificidade bastante

satisfatória e sem necessidade de ser recolhida em quantidades tão significativas como seria a recolha de sangue para análise. Outras vantagens são a possibilidade de efectuar estudos em amostras consideráveis com uma boa relação eficácia/custo e com um risco de infecção cruzada mais diminuto que no caso de recolhas de sangue, permitindo fácil armazenamento e transporte sem sofrer coagulação, ao contrário do sangue. Todas estas características fazem do diagnóstico a partir de saliva um método mais acessível, menos dispendioso e com um risco diminuto para doentes e profissionais de saúde.^[4,7,14,15,36,43,44]

As principais condicionantes da implementação em grande escala de métodos de diagnóstico a partir de saliva, devem-se essencialmente a obstáculos na especificidade e no estabelecimento e validação de biomarcadores. Estas dificuldades são na sua maioria influenciadas pelas baixas quantidades de possíveis biomarcadores, encontradas na saliva quando em comparação com as que podem ser identificadas no sangue. Para além disto, o elevado conteúdo em proteínas características da saliva podem mascarar e dificultar a identificação de potenciais biomarcadores, bem como estados de desidratação, toma de fármacos e drogas ilícitas, podem alterar a disponibilidade do fluido salivar. Assim, é essencial ter em conta todos estes factores, de modo a prever a sua influência na interpretação dos resultados.^[14,36,37,44]

A utilização da saliva como fluído de diagnóstico foi bastante potenciada pelo desenvolvimento dos vários métodos de análise molecular, como o PCR (*polymerase chain reaction*), dedicado à pesquisa de ADN específico ou o *western blot assay* para a pesquisa dirigida de proteínas, recorrendo à utilização de anticorpos. Para além destes, foram também importantes vários avanços feitos nas diferentes áreas das ciências ómicas, da biologia, da química, da física e das engenharias, para o desenho de biossensores para a saliva, por exemplo.^[36,43,44]

A utilidade clínica da saliva depende de vários factores, sendo o tipo de saliva em causa, um dos que mais condiciona os resultados. A saliva total é a que mais facilmente pode ser recolhida, com métodos não-invasivos e sem necessidade de equipamentos especializados, justificando-se assim a razão pela qual a saliva total é o tipo de saliva mais estudado. A saliva total pode ser obtida com ou sem estimulação. Nas situações em que há estimulação, geralmente esta é feita através da acção mastigatória (são usados pequenos blocos de parafina para promover a mastigação) ou gustativa (colocação de algumas gotas de ácido cítrico sobre o dorso lingual), culminando ambos os métodos com a expulsão da saliva para recipientes

próprios. Este método de obtenção de saliva é menos indicado para diagnóstico já que as substâncias usadas para estimular a salivação podem alterar a composição e propriedades da saliva. No caso das situações em que não existe estímulo para incrementar a salivação, os indivíduos dos quais é feita a recolha são instruídos a inclinar a cabeça frontalmente, de modo a permitir a movimentação da saliva para a zona anterior da cavidade oral, onde depois é recolhida para um recipiente adequado.^[15,41]

Tanto a saliva como as glândulas salivares podem ser afectadas directa ou indirectamente por alterações a nível sistémico. Estas mudanças são, cada vez mais, alvo de estudo para a descoberta de novos métodos de diagnóstico precoce de patologias sistémicas.^[36]

A fibrose quística é um exemplo de uma patologia sistémica que despertou interesse neste sentido. Estudos actuais demonstram que a saliva de doentes com esta patologia, contém quantidades aumentadas de cálcio o que promove a alteração das propriedades físico-químicas da saliva, acentuando a formação de cálculo nos dentes destes doentes. Para além do cálcio, está também estudada a presença de quantidades elevadas de prostaglandinas e de um factor de crescimento (*EGF epidermal growth factor*). A identificação destas alterações é um passo importante no desenvolvimento de métodos de diagnóstico através da saliva, para a fibrose quística.^[15,36]

Também em relação ao Síndrome de Sjögren, a saliva desempenha um papel importante no diagnóstico. O Síndrome de Sjögren é uma condição auto-imune, de etiologia desconhecida, que afecta as glândulas exócrinas, causando uma redução na secreção lacrimal e salivar com consequente *keratoconjuntivitis sicca* e xerostomia, respectivamente. Em doentes com esta patologia, uma análise bioquímica da saliva permite detectar concentrações elevadas de sódio e cloro, imunoglobulinas A e G, lactoferrina, albumina e mediadores inflamatórios, como a interleucina 6^[15,36,43].

A aplicação da saliva na avaliação da função endócrina, está também em estudo pela comunidade científica. Os níveis salivares de hormonas esteróides reflectem a percentagem livre das mesmas, ou seja, a porção activa, enquanto a medição dos níveis sanguíneos traduz a percentagem total das mesmas hormonas. Actualmente já é possível identificar na saliva a aldosterona, a insulina, o cortisol, a progesterona e a testosterona, entre outras^[15,36].

A nível viral, sabe-se que a saliva é o fluído biológico mais adequado para a detecção dos vírus da imunodeficiência humana (VIH), herpes vírus humano, citomegalovirus, vírus Epstein-Barr e vírus da hepatite C. Esta evidência deve-se ao facto de a saliva conter

imunoglobulinas (Ig) de origem salivar e plasmática. A imunoglobulina predominante é a IgA, originária das glândulas salivares, responsável pela maioria dos mecanismos de defesa imunitária a nível salivar. No entanto, também existem na saliva, ainda que em menor quantidade, IgM e IgG, com origem no plasma sanguíneo. Estas imunoglobulinas, quando específicas para determinado vírus ou componente viral, ao serem detectadas na saliva, são de extrema importância na detecção de infecções virais.^[15,36,43]

Para além das condições sistémicas, a saliva é também útil na detecção de substâncias ilícitas como anfetaminas, cocaína, marijuana, opióides, entre outros. Esta foi uma área que, nos últimos anos sofreu um desenvolvimento exponencial, permitindo grandes melhorias não só na detecção de consumos ilegais pelas autoridades, mas também no que diz respeito ao controlo parental.^[15,36,43]

Não sendo uma substância ilegal, o tabaco tem inúmeros malefícios associados, e também nesta área a saliva pode ser bastante útil. Actualmente, já é possível quantificar os níveis de nicotina na saliva, podendo assim por exemplo monitorizar a *compliance* de doentes em programas de desintoxicação. Para além de ser possível fazer esta quantificação do nível de nicotina, pode também ser detectada uma diminuição significativa nos níveis de agentes antioxidantes, que se admite que possa ser um dos mecanismos através dos quais se iniciam processos pré-malignos.^[36]

Para além dos processos referidos anteriormente, as alterações quantitativas a nível salivar podem também ser devidas a fármacos. De todos os fármacos que podem ter consequências a nível salivar, destacam-se: os diuréticos, os anti-hipertensores, os anti-histamínicos, os anti-depressivos, os barbitúricos, as carbamazepinas e as ciclosporinas. Todos os fármacos mencionados estão associados a uma diminuição do fluxo salivar que pode ter como consequência disfagia, infecções fúngicas e cárie dentária.^[15,36]

A nível dentário e periodontal, existem também evidências que fazem da saliva um importante fluído de diagnóstico. Por exemplo, no caso da cárie dentária, sabe-se que quantidades elevadas de *Streptococcus mutans* na saliva estão associadas a um aumento na prevalência de lesões de cárie. Também na doença periodontal está provado que a presença de determinadas espécies bacterianas na saliva, está correlacionada com a sua existência nas bolsas periodontais e com a consequente patologia a nível periodontal.^[15,36,43]

Uma outra área de interesse científico, diz respeito ao estudo da presença de marcadores do *turnover* ósseo na saliva. A ser comprovado que os níveis salivares de marcadores deste

fenómeno, correspondem aos mesmos níveis identificados no sangue ou na urina, a saliva pode vir a ser uma ferramenta essencial na avaliação da osteointegração de implantes bem como no diagnóstico de osteoporose.^[36,43]

Na área oncológica, para além do factor-chave que é a prevenção, é também evidente que um tratamento de sucesso depende grandemente de um diagnóstico o mais precoce possível. O diagnóstico através de biópsia tem várias vantagens e é já um método bem estudado e com protocolos específicos. No entanto, a zona de onde é recolhida a amostra pode influenciar o resultado histopatológico, já que pode não ser uma representação exacta de toda a lesão.^[11] Como nas restantes áreas de estudo referidas em cima, também relativamente ao cancro se têm feitos inúmeros estudos para a utilização da saliva como fluído de diagnóstico. Por exemplo, num estudo feito em mulheres com carcinoma da mama, foi identificado na saliva, um marcador tumoral, que não estava presente em mulheres saudáveis. Também num estudo em doentes com cancro do ovário, foi identificado um marcador tumoral específico em amostras de saliva.^[15,36]

Considerando todas as evidências científicas citadas anteriormente, conclui-se que o estudo dos métodos de diagnóstico através de amostras de saliva é uma área com um enorme potencial de desenvolvimento, que certamente vai desempenhar um papel essencial quer no diagnóstico precoce, quer na monitorização da progressão e tratamento das mais variadas patologias. No entanto, é necessário que a comunidade científica se debruce sobre a identificação e validação de biomarcadores proteicos e/ou genéticos, existentes na saliva e específicos para as mais variadas patologias a nível local e sistémico. É também essencial que seja apreciado o impacto de todos os factores que podem influenciar os resultados obtidos.^[14,15,36,43,44]

1.4. BIOMARCADORES MOLECULARES E A SUA IMPORTÂNCIA NA IDENTIFICAÇÃO DE MECANISMOS MOLECULARES ALTERADOS

A nível da cavidade oral existem lesões que, como referido anteriormente, têm potencial de transformação maligna, as denominadas lesões pré-malignas. A avaliação clínica da morfologia e o estudo histológico deste tipo de lesões, não são, na maioria das vezes, suficientes para a sua completa caracterização e mesmo identificação. Também não permitem prever com suficiente evidência a sua evolução clínica. Deste modo, não permitem averiguar se

estas lesões vão permanecer estáveis ou se vão avançar para carcinoma. Um biomarcador é uma molécula biológica, encontrada numa amostra também biológica, que indica um perfil específico de determinada entidade clínica.^[7,23,24,45-48] As moléculas usadas como biomarcadores podem ser proteínas, metabolitos, ADN, ARN, entre outras e podem ser produzidas pelas células patológicas ou devido a outros processos que ocorrem como consequência da patologia inicial.^[46]

O biomarcador ideal deve ser específico para a patologia, evitando falsos-positivos ou negativos, ter uma metodologia de aplicação fácil e permitir a aplicação de critérios de uniformização dos resultados obtidos, que permitam uma padronizaç. Todos os pontos anteriores afectam a prestação dos biomarcadores num contexto clínico mas, infelizmente, a maioria dos biomarcadores usados não possuem estas características. O diagrama seguinte representa os passos que idealmente deveriam ser seguidos, ininterruptamente, desde a descoberta de um novo biomarcador até à sua aplicação clínica.^[45,46,49]

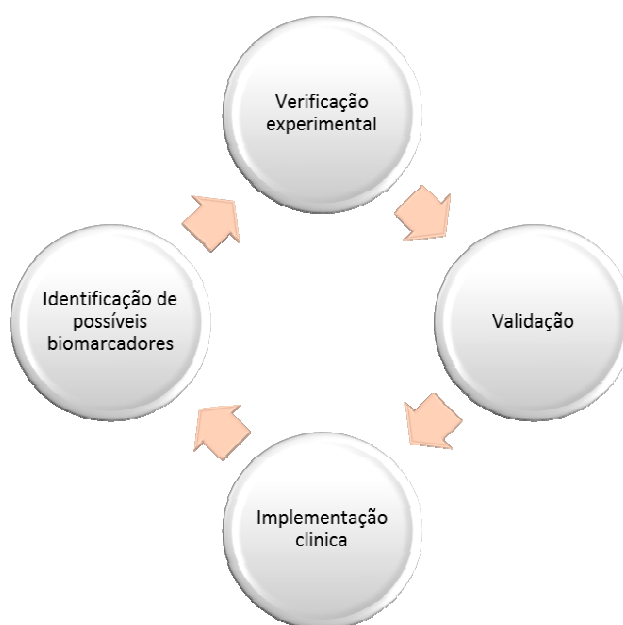


Figura 8: Representação esquemática das etapas que devem ser realizadas para a validação de um biomarcador.^[45,46,49]

O primeiro passo deve ser a identificação de possíveis biomarcadores através de estudos ómicos. Posteriormente devem ser feitos ensaios de modo a validar experimentalmente determinada molécula e averiguar se efectivamente pode ser considerada um biomarcador. De seguida devem ser feitos estudos longitudinais, considerando situações patológicas e controlos sem patologia. Apenas depois de apresentados vários estudos que evidenciam a validade de determinada molécula como biomarcador, esta pode ser implementada em ambiente clínico.^[45,46,49]

Para o carcinoma espinocelular já foram identificados alguns potenciais biomarcadores mas, até à data, estes candidatos a marcadores tumorais ainda não apresentam evidência suficiente para serem usados no diagnóstico e avaliação de risco de malignização de lesões orais pré-malignas. O processo de transformação maligna envolve várias alterações genéticas e vias de sinalização celulares que regulam a sinalização e o ciclo celular, alteram os processos de diferenciação celular, dos mecanismos de apoptose, a estabilidade genómica, a motilidade e a angiogénese. Alterações nas vias de sinalização mencionadas culminam numa desregulação do desenvolvimento celular, levando à tumorigénese.^[24,27,28]

A proliferação celular descontrolada é uma das alterações mais características do cancro. As células neoplásicas têm alterações genéticas que desregulam o ciclo celular e, alguns destes genes, controlam outros processos como a proliferação, diferenciação e apoptose.^[50] Identificar as moléculas envolvidas nestas vias e perceber o seu papel no processo de malignização vai permitir melhorar o diagnóstico precoce, implementar uma abordagem terapêutica adequada e multidisciplinar, reduzir a taxa de mortalidade e melhorar o prognóstico e a qualidade de vida.^[51]

A avaliação do risco de malignização de lesões pré-malignas é actualmente feita com base em critérios histológicos de proliferação celular, maturação do epitélio e atipia celular. No entanto, estes métodos não são objectivos o suficiente no que diz respeito aos critérios histológicos.

Um método de diagnóstico precoce deve ser não-invasivo, de fácil aplicação e com custo relativamente baixo, permitindo uma avaliação rápida, específica e o mais confortável possível para o doente.^[45,52] No entanto, os rastreios baseados na observação clínica apresentam sensibilidade e especificidade limitadas, sendo bastante influenciados pela técnica, sensibilidade e conhecimentos do operador. Para além disso, lesões não superficiais na mucosa ou lesões em fases muito precoces, não detectáveis ao exame visual, podem passar

despercebidas.^[52] Devido a estas desvantagens apresentadas pelos meios de rastreamento actual, as novas directrizes de pesquisa estão orientadas no sentido da procura de soluções a nível molecular.

A pesquisa de biomarcadores em lesões da cavidade oral pode ser feita a nível serológico, a nível histológico através de biópsias representativas da lesão, ou através de recolha de saliva. O uso de saliva é vantajoso em relação aos outros, já que a saliva é um fluido de recolha fácil, indolor, rápida e não invasiva.^[53-55]

As ferramentas de detecção molecular podem ser baseadas em proteínas ou em ácidos nucleicos. Consideram-se marcadores moleculares baseados em ácidos nucleicos as mutações no gene p53, hipermetilação anormal de promotores, mutações no ADN mitocondrial, actividade da telomerase, entre outros. Os marcadores moleculares proteicos referem-se a alterações pós-transcrição que podem ser causadas por processos de tumorigénese, nomeadamente processos de hipermetilação.^[53-55]

A identificação destes biomarcadores tem sido maioritariamente feita em amostras de tecido obtido através de biópsias representativas. No entanto, este método mostra-se bastante invasivo, não é bem aceite pelos doentes e depende das capacidades técnicas do médico que realiza a biópsia. Por outro lado, a identificação destes marcadores moleculares em amostras de saliva é um método bastante mais atractivo, mas que necessita ainda de evidências experimentais válidas.^[53-55]

A longo prazo, a determinação de um padrão de proteínas características das lesões pré-malignas, passível de identificação em amostras de saliva, pode vir a melhorar bastante o prognóstico destas lesões. Deste modo, pode ser conseguida uma diminuição da taxa de malignização e, conseqüentemente, uma diminuição da percentagem de doentes com carcinoma espinocelular na cavidade oral.^[53-55]

Existem, no entanto, vários obstáculos que têm dificultado o desenvolvimento desta área, sendo que a maioria deles se prende com a heterogeneidade da informação existente. Esta heterogeneidade de informação reflecte a vastidão de patologias existentes e a complexidade dos processos biológicos envolvidos nas mesmas.^[47] Com o desenvolvimento das diferentes ciências ómicas era de esperar que a descoberta de novos biomarcadores fosse conseguida com mais facilidade. No entanto, este processo tem-se mostrado mais complexo, tendo sido identificadas relativamente poucas moléculas capazes de servir este propósito. Um dos principais problemas é o tamanho reduzido dos grupos de controlo, quando existem. Não

havendo uma amostra de controlo, não é possível inferir com exactidão a utilidade de determinada molécula como biomarcador.^[47]

Os biomarcadores podem ser classificados em biomarcadores de diagnóstico, biomarcadores de prognóstico e biomarcadores de previsão. Os biomarcadores de diagnóstico permitem detectar e identificar determinada patologia no indivíduo e, idealmente, devem ser bastante específicos. No caso dos biomarcadores de prognóstico, a sua utilização é essencialmente feita para prever o curso de determinada patologia, incluindo a probabilidade de recorrência. São por isso importantes para a escolha da terapêutica mais adequada. Por último, os biomarcadores de previsão, permitem prever a resposta a determinado agente terapêutico antes de ser iniciado o tratamento, verificando-se assim se determinado indivíduo vai ou não responder positivamente à terapêutica.^[46,56]

No que diz respeito à metodologia para a sua detecção, os marcadores moleculares podem ser divididos em marcadores imunohistoquímicos ou biomarcadores ómicos. A Tabela 3 apresenta as principais diferenças entre os dois tipos de marcadores.^[47]

Tabela 3: Comparação entre marcadores imunohistoquímicos e biomarcadores ómicos, no que diz respeito à sua natureza, especificidade, utilidade biomédica e qualidade dos resultados obtidos.^[47]

	Marcadores imunohistoquímicos	Biomarcadores ómicos
Natureza da análise	Natureza qualitativa: avaliação da presença/ausência de determinada molécula	Natureza quantitativa: quantificação do número de moléculas
Especificidade	Especificidade tecidual: indicação da origem do tecido com alteração patológica	Especificidade para a patologia: definem a alteração patológica
Utilidade biomédica	Utilização em diagnóstico diferencial mas com poucas vantagens no diagnóstico precoce	Pouco utilizadas por falta de evidência científica suficiente
Qualidade dos resultados obtidos	Resultados não são afectados pela distribuição heterógena nas amostras	Resultados são afectados pela distribuição heterógena nas amostras

Muito dificilmente um bom marcador imunohistoquímico pode ser considerado um biomarcador ómico. Isto porque, os primeiros, correlacionam o fenótipo da patologia com o tecido de origem, sendo por isso específicos de determinado tecido e não de uma patologia. Para além disso, os marcadores imunohistoquímicos são empregues em metodologias

seleccionadas pelo técnico que faz a análise, para permitir um melhor diagnóstico diferencial. Deste modo, os marcadores escolhidos podem não estar biologicamente associados. Com os biomarcadores ómicos, verifica-se o contrário, a análise é feita para encontrar alterações comuns entre diferentes amostras e as moléculas escolhidas estão presentes nos mesmos processos biológicos.^[47]

As dificuldades na identificação de biomarcadores válidos, prendem-se com diversos factores, de entre os quais se destacam os seguintes:^[46-48,56]

- Heterogeneidade dos processos de iniciação e progressão das patologias;
- Dificuldade em distinguir claramente estados patológicos de estados fisiológicos;
- Preparação das amostras para remover moléculas que podem interferir com os resultados;
- Metodologias com vários passos podem introduzir mais factores que levam a incorrecções na interpretação dos resultados.

Mesmo após a descoberta de um potencial biomarcador, o caminho a percorrer até à sua utilização em larga escala não é tão linear quanto seria desejável. Para além da especificidade e sensibilidade necessários, é essencial que a molécula em causa seja passível de ser reproduzida em laboratórios, com um custo relativamente baixo, que permita a sua utilização em larga escala.^[48]

Para além dos obstáculos encontrados no processo de descoberta de um novo biomarcador até ao processo de validação do mesmo estar concluído podem ainda ser encontradas novas dificuldades. As principais barreiras no processo de validação de biomarcadores prendem-se com três pontos-chave:

- Existência de amostras significativas para análise;
- Uniformização nas metodologias;
- Possibilidade de fazer ensaios clínicos em larga escala.

Verifica-se então uma lacuna entre a descoberta laboratorial e a aplicação clínica, que impede a utilização rotineira da avaliação destas moléculas no diagnóstico.^[45,46] A Tabela 4 apresenta as principais aplicações dos biomarcadores e as respectivas limitações.^[46]

O estudo e a descoberta de biomarcadores é uma área científica que ainda tem muito para evoluir, sendo essencial que haja uma uniformização de metodologias e protocolos, de modo a obter informação válida. Só assim será possível conseguir identificar moléculas que

efectivamente possam ser usadas na prática clínica para auxiliar nas várias etapas, desde o diagnóstico à avaliação da eficácia terapêutica.^[49,56]

Tabela 4: Principais aplicações dos biomarcadores e respectivas limitações das mesmas^[46]

Aplicação	Grau de utilização	Limitações
Rastreios populacionais	Limitado	Um teste para o rastreio de determinada patologia deve ser bastante específico de modo a evitar falsos-positivos/negativos. A maioria dos biomarcadores ainda não apresenta a especificidade necessária.
Diagnóstico	Limitado	A maioria dos biomarcadores ainda não apresenta a especificidade necessária.
Prognóstico	Limitado	A maioria dos biomarcadores ainda não apresenta a especificidade necessária para permitir prever o desenrolar de determinada situação clínica.
Previsão da resposta à terapêutica	Elevado	Apesar de não terem especificidade suficiente para diagnóstico e prognóstico, uma grande percentagem de biomarcadores já permite prever qual a resposta a determinada terapêutica.
Estadiamento tumoral	Limitado	A maioria dos biomarcadores ainda não apresenta a especificidade necessária.
Detecção precoce de recorrência	Controverso	A recorrência de determinada patologia pode ocorrer sem um aumento da concentração do biomarcador em análise; Um aumento na concentração de biomarcador pode não ser específico para a patologia e dar um falso-positivo.
Monitorização da eficácia terapêutica	Elevado	Alguns biomarcadores já permitem verificar se determinada terapêutica está a ser eficaz ou não.

1.5. CIÊNCIAS ÓMICAS

As ciências ómicas englobam várias áreas das quais se destacam a genómica, a proteómica, a interactómica e a metabolómica. Nos últimos anos, estas áreas têm sofrido um crescimento exponencial, que tem permitido abrir novas portas do conhecimento científico.^[6,48,57] No entanto, o significado clínico de todas estas descobertas ainda não é claro, existindo várias que podem ou não ser relevantes para a aplicação biomédica. É então essencial aplicar padrões de validação, que sejam seguidos por todas as equipas científicas que se dedicam a estudos nestas áreas. Só com critérios definidos é possível validar e avaliar clinicamente o risco/benefício, bem como a eficácia e eficiência de tais aplicações.^[6,57] Esta validação deve envolver os seguintes passos específicos^[57]:

- Validação analítica – Averiguar se diferentes laboratórios, através de técnicas diferentes, chegam aos mesmos resultados;
- Repetição – Avaliar se outros investigadores, que não os que inicialmente fizeram determinado estudo, conseguem aceder à informação, repetir os protocolos e obter os mesmos resultados;
- Replicação – Determinar se diferentes meta-análises apresentam resultados coerentes;
- Validação externa – Verificar se diferentes estudos, realizados por equipas diferentes, apresentam resultados coerentes e evidencias em larga escala;
- Validação clínica – Averiguar se a informação descoberta consegue prever prognósticos clínicos;
- Aplicação clínica – Avaliar se a informação descoberta permite melhorar prognósticos clínicos;

Só após se terem verificado todos os pontos enumerados em cima, deve ser assumido que determinada informação é válida para a comunidade científica e a nível biomédico.^[57]

A proteómica consiste na determinação dos proteomas, ou seja, de todas as proteínas expressas numa determinada amostra e a identificação das proteínas com expressão alterada face ao normal. Esta metodologia de análise de proteínas constitui uma ferramenta preciosa para a caracterização molecular quer de estados fisiológicos, quer de determinadas patologias.^[39,48,58,59] A genómica engloba a determinação dos diferentes genomas.^[48,58,59] Não é possível determinar qual das duas ciências ómicas, genómica ou proteómica é mais relevante ou tem maior potencial, uma vez que elas dependem uma da outra, estão intimamente relacionadas. Conhecer e perceber alterações no genoma e no proteoma, é essencial para diagnosticar, avaliar a progressão da patologia, determinar prognósticos e averiguar a eficácia da terapêutica.^[48]

A importância quer da proteómica, quer da genómica, só começou a ser efectivamente reconhecida após terem sido desenvolvidas as primeiras redes de interacções, os interactomas. Os interactomas de alguns microorganismos menos complexos, como a *Saccharomyces*

cerevisiae, estão praticamente todos definidos. Por outro lado, o interactoma humano, devido à complexidade dos diferentes sistemas biológicos, ainda está relativamente pouco estudado. A construção de mapas de interações é de extrema importância, já que permite compreender a função de proteínas envolvidas em diferentes complexos e vias de sinalização.^[58,60] Estudando redes de interações próximas, pode ser possível descobrir proteínas que estão envolvidas nos mesmos processos patológicos. Assim, a análise de mapas de interações, é também útil no estudo de novas proteínas associadas a determinada patologia.^[60]

Uma outra área de interesse associada à proteômica é a identificação de modificações pós-tradução nas proteínas. Após a tradução, algumas proteínas sofrem modificações enzimáticas como a fosforilação, a glicosilação e a acetilação. Estas modificações são essenciais na regulação da actividade da proteína na qual ocorrem e portanto podem, teoricamente, estar associadas a alterações características de estados patológicos.^[45,58] Com todas estas vertentes, através de estudos de proteômica é possível identificar proteínas associadas a estados patológicos e, a partir daqui, desenvolver sistemas de identificação de biomarcadores específicos.^[4,10,45] Este princípio já foi aplicado com êxito em alguns estudos em casos de cancro gastrointestinal, cancro da mama, cancro do pulmão e carcinoma de células escamosas da cabeça e pescoço.^[10]

Apesar das inúmeras vantagens associadas ao estudo do genoma, do proteoma e do interactoma humano, estas ciências têm ainda que ultrapassar obstáculos relativos à qualidade da informação obtida e à validação como aplicação biomédica. As principais dificuldades prendem-se com a obtenção de quantidades de amostra significativas e clinicamente bem definidas, com a selecção de protocolos e preparação das amostras e com a metodologia de análise.^[48] É essencial continuar a promover uma interligação das diferentes ciências ómicas com a prática clínica, utilizando as diferentes ferramentas disponíveis, para conseguir desenvolver e melhorar a prestação de cuidados clínicos, cada vez mais especializados e personalizados.^[45]

1.5.1. A bioinformática para estudo e interpretação de dados biomédicos

O desenvolvimento de ferramentas bioinformáticas e a organização de bases de dados permite uma análise de dados em larga escala.^[8,48,61] Actualmente existem *on-line* diferentes bases de dados biomédicas, que permitem aceder a informação de resultados de proteômica e

à caracterização de cada proteína.^[38] Em especial na área dos biomarcadores moleculares, existe uma grande quantidade de informação disponível, mas retirar o significado biomédico dessa informação é ainda um processo complexo. Neste domínio, as ferramentas bioinformáticas que permitem a análise e a integração da informação têm um valor indiscutível.^[58]

Para o desenvolvimento do presente trabalho, foram utilizadas as seguintes ferramentas bioinformáticas UniProt, OralCard, PANTHER, DAVID e KEGG, das quais será feita uma descrição sumária.

O grande desenvolvimento das metodologias de sequenciamento de proteínas ocorrido na última década levou a uma grande evolução na compreensão das relações entre a sequência de aminoácidos que compõe a proteína e as suas funções. A partir de estudos genómicos têm sido inferidas centenas de sequências de proteínas que, para serem usadas de forma eficaz na classificação funcional, têm que ser organizadas para que possam ser mais facilmente consultadas e comparadas. Para isto, existem algoritmos e bases de dados que fazem a comparação das sequências de proteínas depositadas.^[62]

Actualmente já é possível inferir a função de proteínas sabendo apenas a que famílias pertencem. No entanto, no caso de proteínas mais complexas, é necessário saber qual a subfamília em que se englobam. A subfamília define-se como um grupo de proteínas que têm uma denominação e função biológica semelhantes.^[62]

A base de dados PANTHER é um recurso *on-line* que permite organizar proteínas, classificando-as de acordo com a família e subfamília a que pertencem. As informações são mantidas o mais actual possível através de recursos informáticos e manuais. O principal objectivo desta ferramenta é a classificação das proteínas de acordo com a sua função. Esta classificação é feita de acordo com estudos experimentais publicados e, quando não existem evidências científicas claras, de acordo com deduções de analogias evolutivas feitas por revisores especializados. Para isto são necessárias *guidelines* de modo a saber como agrupar as proteínas. As ontologias servem exactamente este propósito.^[62]

Entende-se por ontologia, um vocábulo ou expressão que permite fazer análises computacionais em larga escala, sendo aceite por toda a comunidade científica. No caso dos organismos eucariotas, a ontologia que mais se usa é a *Gene Ontology (GO)*. A *Gene Ontology* consiste numa representação bastante detalhada das funções biológicas, através de

vocabulário específico. Esta ferramenta contém mais de 7000 termos para descrever as funções moleculares e cerca de 5000 termos para descrever os processos biológicos.^[62]

A nível biológico, sabe-se que as proteínas interagem entre si e com outras moléculas, permitindo a condução de todas as funções biológicas, incluindo a formação de complexos estáveis, vias metabólicas e de regulação. Todas estas interacções podem ser representadas a nível gráfico, como redes de interacções de tamanho e complexidade variáveis. Deste modo é possível ter uma visão abrangente e sintetizada de um genoma, não apreendendo apenas funções genéticas estáticas, que não se relacionam entre si.^[63] A ferramenta DAVID – *the Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery* consiste também numa base de dados associada a vários instrumentos de análise que têm a capacidade de analisar listas extensas de genes e proteínas e agrupá-las de acordo com as vias de sinalização a que estão associadas.

As funções biológicas a nível celular são fruto de uma série de interacções entre diferentes moléculas, não sendo apenas da responsabilidade de um único gene. A ferramenta *on-line Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes – KEGG* foi criada com o intuito de associar a informação genómica à informação funcional, tendo por base as vias celulares conhecidas. Este recurso *on-line* foi criado em 1995 ao abrigo de um programa relativo ao genoma humano, implementado pelo Ministério da Ciência, Desporto e Cultura Japonês. O sistema KEGG é composto por três bases de dados principais denominadas *PATHWAY*, *GENES* e *LIGAND*. A base de dados *PATHWAY* elabora diagramas esquemáticos das interacções entre as diferentes moléculas. Na base de dados *GENES* está armazenada a informação disponível relativa ao sequenciamento genómico. Por último, a base de dados *LIGAND* organiza os compostos químicos que intervêm nos diferentes processos biológicos a nível celular.^[64]

As ferramentas bioinformáticas referidas anteriormente, são apenas uma pequena amostra de todo o universo de sistemas de tratamento e organização de dados biológicos disponíveis *on-line*. No entanto, as ferramentas existentes são extensas e não são específicas para a cavidade oral, dificultando a integração da informação e a sua aplicação a nível clínico.^[38]

O OralOme é uma base de dados que armazena informação obtida através dos proteomas orais, onde estão depositadas várias proteínas humanas e do microbiota oral. O OralCard é o portal da *web* que permite aceder à informação contida no OralOme. Permite fazer pesquisas de modo intuitivo para localizar proteínas de interesse e consultar informação relevante sobre as mesmas. O principal objectivo do desenvolvimento desta plataforma de dados foi criar uma

ferramenta que englobasse todas as proteínas presentes na saliva, bem como informação biomédica relevante sobre as mesmas. Deste modo, através do OralCard, a plataforma de acesso *on-line* ao OralOme, é possível obter informações tão específicas como a origem da proteína, a sua função, as vias de sinalização e processos biológicos em que está envolvida e a sua associação com determinada patologia permitindo estudos para identificação de possíveis biomarcadores.^[38]

Ainda não é totalmente compreendido o papel de todas as proteínas presentes na cavidade oral, qual o seu contributo para a fisiologia oral e o seu papel como indicadores de estados patológicos. O desenvolvimento de ferramentas que auxiliem a determinação e organização do proteoma salivar permite não só, fazer uma caracterização funcional das proteínas, mas também elucidar o papel de cada proteína na biologia oral.

1.5.2. Contributo das ciências ómicas para as áreas médicas

O conhecimento da sequência genómica e das proteínas implicadas nos diferentes processos biológicos e diferentes vias de sinalização, tem um impacto profundo no desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas, novos métodos de diagnóstico e eventuais processos preventivos.^[65] A nível médico, os contributos das diferentes ciências ómicas passam por^[65]:

- Identificar e listar genes e proteínas humanas, estudando possíveis alvos-terapêuticos para as mais variadas patologias;
- Definir variantes genómicas comuns e factores hereditários, para delinear estratégias preventivas individualizadas, melhorar os resultados terapêuticos e avaliar factores de risco individuais;
- Identificar factores reguladores da expressão genética em estados fisiológicos e patológicos;
- Identificar e determinar a estrutura das proteínas com interesse terapêutico, de modo a desenhar drogas específicas para determinado domínio funcional;
- Desenvolver estratégias de terapia genética;

- Conhecer e explorar as implicações a nível ético, social e legal da investigação do genoma humano.

Conclui-se então que as ciências ómicas têm um papel fulcral no conhecimento dos vários processos biológicos, sendo também essenciais no desenvolvimento de novos métodos de diagnóstico e abordagens terapêuticas.

2.OBJECTIVOS

Não existem actualmente critérios clínicos de diagnóstico inequívocos, que permitam a identificação de lesões pré-malignas com potencial de malignização. Apesar dos vários esforços feitos neste sentido, ainda não é possível fazer o diagnóstico precoce de lesões pré-malignas através de evidências moleculares. Tendo por base a informação bibliográfica disponível sobre proteínas com expressão alterada, associadas ao processo de malignização de lesões pré-malignas da cavidade oral e de proteínas envolvidas em cancro oral, temos como objectivo no presente trabalho proceder à:

1. Construção de uma base de dados com toda a informação disponível na bibliografia sobre as proteínas que até à data de 23/1/2012 foram identificadas como estando associadas a lesões pré-malignas e a carcinoma espinocelular da cabeça e pescoço.
2. Expansão da base de dados do OralOme com a informação relativa a cancro oral.
3. Identificar quais os processos biológicos e respectivas vias de sinalização que se encontram comprometidas nas patologias em estudo e identificar nessas vias de sinalização quais são as proteínas que se apresentam com quantidades alteradas face ao normal, relacionando as mesmas com os biomarcadores de carcinoma espinocelular e lesões pré-malignas propostos pela literatura.
4. Identificação das proteínas com função pró e anti-apoptose implicadas nas lesões pré-malignas e que se encontram em quantidades alteradas, no sentido de poderem ser sugeridas como possíveis marcadores para diagnóstico precoce em futuros estudos experimentais.

3.MATERIAL E MÉTODOS

Actualmente já existe alguma informação relativa a biomarcadores do processo de malignização das lesões pré-malignas e de carcinoma espinocelular da cabeça e pescoço mas esta não está organizada e depositada numa única base de dados. No OralCard a informação apresentada sobre lesões pré-malignas e carcinoma espinocelular ainda é pouca, estando catalogadas apenas 315 proteínas associadas a cancro oral. Com o intuito de adicionar ao OralCard informação sobre estas patologias, as metodologias de recolha de dados e a organização dos mesmos foi feita de acordo com as estratégias utilizadas na elaboração da base de dados OralOme. Seguidamente são então apresentadas as metodologias seguidas.

Começou-se por fazer uma pesquisa bibliográfica na base de dados *on-line Pubmed* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>), cuja página *on-line* inicial está ilustrada na Figura 9. Esta base de dados tem mais de 21 milhões de citações de bibliografia relativas às ciências biomédicas, bem como várias revistas científicas e livros *on-line*. O desenvolvimento e manutenção desta base de dados são da responsabilidade do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), da *U.S. National Library of Medicine* (NLM), sediada nos *National Institutes of Health* (NIH). A pesquisa foi feita a partir dos termos *oral premalignant lesions biomarkers* e *head and neck squamous cell carcinoma*, definindo critérios de filtragem para serem obtidos artigos publicados entre Outubro de 2000 até Janeiro de 2012, relativos apenas à espécie *homo sapiens*. Definiu-se o espaço temporal referido anteriormente, com o intuito de conseguir uma quantidade de informação significativa que fosse actualizada e que reflectisse a evolução dos estudos feitos na área.

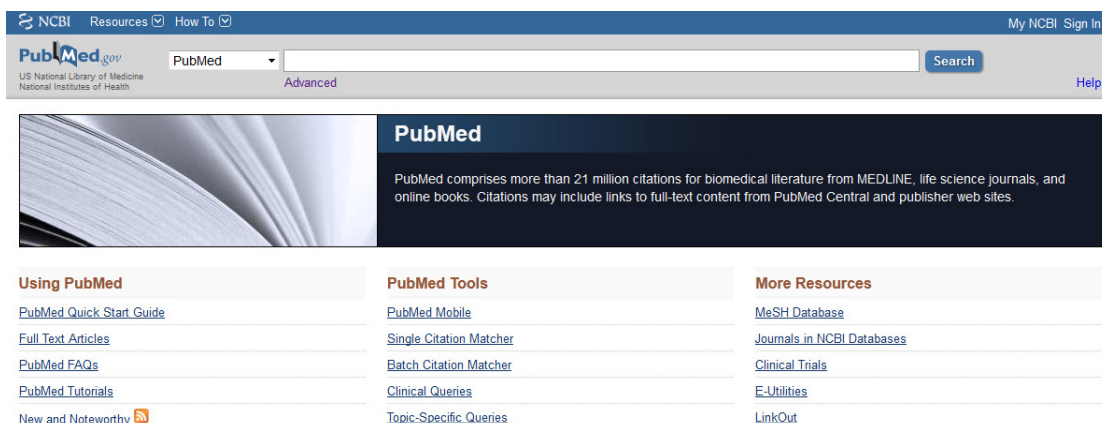


Figura 9: Página web da base de dados *Pubmed*

O que se pretendeu, numa primeira fase, foi criar uma base de dados sobre todas as proteínas identificadas, que pudesse ser usada como instrumento de trabalho, para chegar aos objectivos mencionados anteriormente. Desta pesquisa inicial, foram recolhidos os artigos relevantes, a partir dos quais foi extraída e catalogada a informação necessária.^{[8,9,22,28,50,61,66-}

^{110]} Desta fase, obteve-se a Tabela I (ver capítulo ANEXOS, pág. 101), organizada de acordo com os seguintes critérios:

- Código *UniProtKB AC*;
- Nome da proteína;
- Origem da amostra onde foi identificada a proteína:
 - Saliva das glândulas submandibular/sublingual → Coluna com o cabeçalho SM/SL
 - Saliva total → Coluna com o cabeçalho Saliva Total
 - Mucosa → Coluna com o cabeçalho Mucosa
 - Língua → Coluna com o cabeçalho Língua
- Estado fisiológico saudável → Coluna com o cabeçalho Saúde
- Estado patológico (Código MeSH) → Coluna com o cabeçalho Patologia MeSH
- Quantificação da expressão proteica → Coluna com o cabeçalho Quantificação
- Faixa etária → Coluna com o cabeçalho Faixa Etária
- Género → Coluna com o cabeçalho Género
- Hábitos sociais → Coluna com o cabeçalho Hábitos Sociais
- Método de recolha da amostra → Coluna com o cabeçalho Método de Recolha
- Método de análise → Coluna com o cabeçalho Método de Análise
- Tipo de estudo → Coluna com o cabeçalho Tipo de estudo
- Modificações pós-tradução → Coluna com o cabeçalho Modificações pós-tradução
- Identificação como biomarcador → Coluna com o cabeçalho Biomarcador
- Identificação no OralCard (fonte bibliográfica) → Coluna com o cabeçalho OralCard
- Identificação da fonte bibliográfica a partir da qual foi obtida a informação para a realização deste trabalho → Coluna com o cabeçalho Referência

As proteínas foram identificadas através do código *UniProtKB AC*, obtido a partir da base de dados *UniProt* (<http://www.uniprot.org/>). Para este efeito, começou-se por anotar

manualmente o nome com o qual as proteínas são referidas nos artigos, tendo-se posteriormente feito uma pesquisa na base de dados *UniProt* por esse mesmo nome (Figura 10).



Figura 10: Página web inicial do *UniProt*. A seta vermelha indica a caixa onde deve ser inserida a denominação da proteína, da qual se pretende obter a informação (exemplificado com “*Proliferating cell nuclear antigen*”)

Após inserido o nome da proteína, a base de dados dá várias opções, das quais foi seleccionada a que corresponde à proteína em causa, na espécie *homo sapiens* (Figura 11).

Entry	Entry name	Status	Protein names	Gene names	Organism
<input type="checkbox"/> P15873	PCNA_YEAST	★	Proliferating cell nuclear antigen	POL30 YBR088C YBR0811	Saccharomyces cerevisiae (strain ATCC 204508 / S288c) (Baker's yeast)
<input checked="" type="checkbox"/> P12004	PCNA_HUMAN	★	Proliferating cell nuclear antigen	PCNA	Homo sapiens (Human)
<input type="checkbox"/> P17918	PCNA_MOUSE	★	Proliferating cell nuclear antigen	Pcna	Mus musculus (Mouse)
<input type="checkbox"/> Q9PTP1	PCNA_DANRE	★	Proliferating cell nuclear antigen	pcna	Danio rerio (Zebrafish) (Brachydanio rerio)
<input type="checkbox"/> Q9DEA3	PCNA_CHICK	★	Proliferating cell nuclear antigen	PCNA	Gallus gallus (Chicken)
<input type="checkbox"/> Q03392	PCNA_SCHPO	★	Proliferating cell nuclear antigen	pcn1 pcn SPBC16D10.09	Schizosaccharomyces pombe (strain 972 / ATCC 24843) (Fission yeast)
<input type="checkbox"/> P17070	PCNA_ORYSJ	★	Proliferating cell nuclear antigen	Os02g0805200 LOC_Os02g56130 OJ1548_F12.18 OSJNBa0049O12.19	Oryza sativa subsp. japonica (Rice)
<input type="checkbox"/> O82134	PCNA_PEA	★	Proliferating cell nuclear antigen	PCNA	Pisum sativum (Garden pea)
<input type="checkbox"/> Q92W35	PCNA2_ARATH	★	Proliferating cell nuclear antigen 2	At2g29570 F16P2.5	Arabidopsis thaliana (Mouse-ear cress)

Figura 11: Página web do *UniProt* após a pesquisa. As setas vermelhas indicam o código *UniProtKB AC* e a espécie onde a proteína foi identificada.

Sendo o interesse principal a identificação de biomarcadores para o processo de malignização de lesões pré-malignas, foram excluídas as proteínas que, de acordo com a bibliografia lida, apenas tinham sido identificadas em patologias de outras áreas que não a cavidade oral. Com vista à adição de informação ao OralCard e sendo esta uma base de dados de proteínas presentes na cavidade oral, foram também excluídas proteínas cuja identificação apenas tinha sido feita em plasma sanguíneo. No OralCard é possível obter informação sobre

a fonte de origem de determinada proteína. Deste modo, também visando a adição desta informação à base de dados, optou-se por identificar a fonte da qual foram obtidas as proteínas, nas colunas com os cabeçalhos: SM/SL, Saliva Total, Mucosa, Língua.

Na coluna Saúde assinalaram-se as proteínas, cuja bibliografia revista indicava estarem presentes em indivíduos sem patologia. Na coluna Patologia (*MeSH*), optou-se por organizar todas as proteínas identificadas em lesões pré-malignas com o código 68011230, não diferenciando os vários tipos de lesões já que, na base de dados dos termos *MeSH*, não existe ainda uma designação para os diferentes estados de displasia. No caso do carcinoma espinocelular, utilizou-se o código 68009062

Na coluna Quantificação, optou-se por identificar apenas se as proteínas estavam aumentadas ou diminuídas em relação a indivíduos saudáveis, uma vez que a maioria dos artigos sobre o tema não são estudos de proteómica, não sendo por isso feita uma análise quantitativa rigorosa deste parâmetro.

Em relação à coluna Faixa Etária, alguns artigos fazem referência a um intervalo de idades, outros a um valor médio de idades, outros ainda só referem ter sido obtidos consentimentos informados de pacientes em idade adulta. A anotação foi então feita de acordo com estas três designações:

- Intervalo de idades, por exemplo 26-77;
- Valor médio de idades
- Adultos

No que diz respeito ao género dos dadores da amostra, a anotação foi feita na coluna Género com a letra “**M**” para o sexo masculino, com a letra “**F**” para o sexo feminino ou com a designação “**M/F**” no caso de serem incluídos indivíduos de ambos os sexos. Na coluna Hábitos Sociais, registaram-se as referências a hábitos como tabagismo e alcoolismo. Fez-se o registo destes dados relativos aos dadores das amostras, uma vez que são factores de variabilidade que devem ser considerados a quando da análise da informação.

Nas colunas Método de Recolha e Método de Análise registaram-se as diferentes técnicas empregues para recolha e análise das amostras, respectivamente. Nos métodos de recolha, as várias terminologias empregues foram: biópsia, *drooling method*, bochecho oral, *brush biopsy/saliva total*, *exsudate/brush biopsy/saliva total*. Optou-se por deixar alguns itens em língua inglesa uma vez que a sua denominação em língua portuguesa não é clara. O registo destas informações é importante na medida em que múltiplas origens de recolha da

amostra oferecem diferentes universos de análise, isto é, as proteínas encontradas em saliva não são exactamente as mesmas encontradas em amostras de mucosa. Relativamente aos métodos de análise, os métodos registados de acordo com a bibliografia revista foram: imunofluorescência, imunohistoquímica, *confocal laser scan microscopy*, RT-PCR, *microarray analysis*, *laser capture microdissection*, *surface enhanced laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (SELDI-TOF)*, *multianalyte profiling (xMAP)*, espectrometria de massa, electroforese 2D, ELISA, *multidimensional LC-MS/MS*, hibridização *in situ*, *westernblot*, TUNEL, hibridização com fluorescência, *laser capture microdissection with liquid chromatography*, *cDNA microarray*, PCR-multiplex, PCR-fluorescência. As técnicas para análise do conteúdo proteico de determinada amostra, variam no método de detecção que é empregue e na especificidade para as proteínas que se pretende analisar. Por exemplo, a imunofluorescência é uma técnica dirigida para determinada(s) proteína(s) que se pretende estudar, enquanto a espectrometria de massa é uma técnica que permite analisar um universo muito maior de proteínas. Estas diferenças introduzem factores de variabilidade que também devem ser tido em conta na análise dos resultados.

Registou-se também se o artigo em causa dizia respeito a um estudo de proteómica ou não (coluna denominada Tipo de Estudo) e se a proteína em causa foi ou não sugerida como possível biomarcador (coluna denominada Biomarcador).

Por fim, nas duas últimas colunas, registaram-se os códigos *PMID* da base de dados *Pubmed*. Na coluna OralCard registaram-se os códigos *PMID* dos artigos citados no OralCard, indicando deste modo que determinada proteína já foi identificada no oraloma. Na coluna Referência, registaram-se os códigos *PMID* dos artigos obtidos da pesquisa bibliográfica para a realização deste trabalho

Após terminada a anotação manual nesta tabela, procedeu-se à análise dos resultados e à representação gráfica para a interpretação dos mesmos. Utilizou-se a ferramenta de classificação PANTHER para fazer uma análise do grupo de proteínas associadas a carcinoma espinocelular e do grupo associado a lesões pré-malignas. Dos dois grupos enumerados anteriormente, foram excluídas as isoformas (proteínas com diferentes formas que podem ser originadas através de polimorfismos genéticos e outros mecanismos de modificações genéticas)^[111], já que esta ferramenta *on-line* não discrimina estas moléculas. Para utilizar a ferramenta PANTHER foi necessário fazer o registo e *login* na página *web* da mesma, de modo a ter acesso à zona denominada *Workspace* (Figura 13).

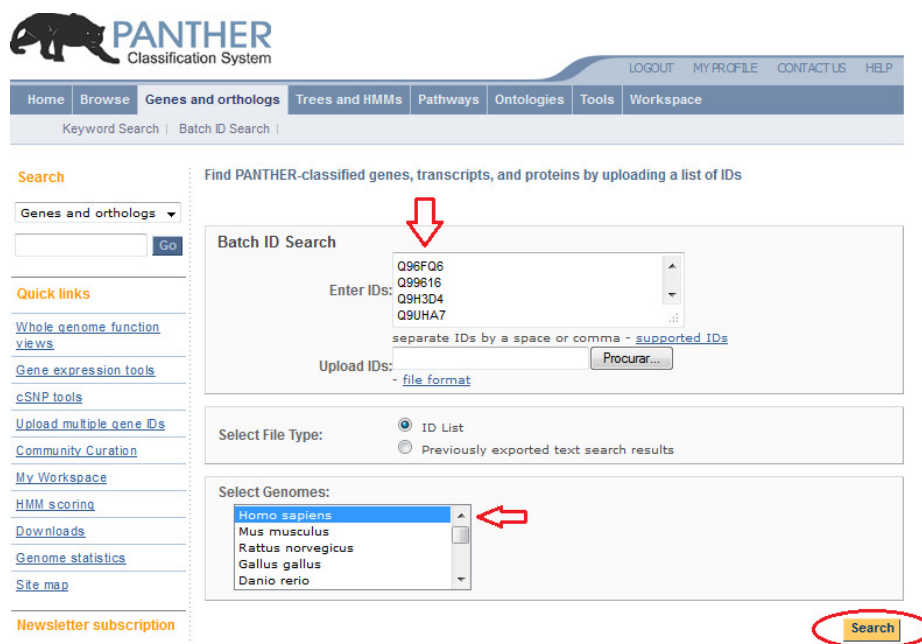


Figura 12: Página web do PANTHER. As setas vermelhas indicam as zonas de inserção dos códigos *UniProtKB AC* e o círculo o ícone de pesquisa.

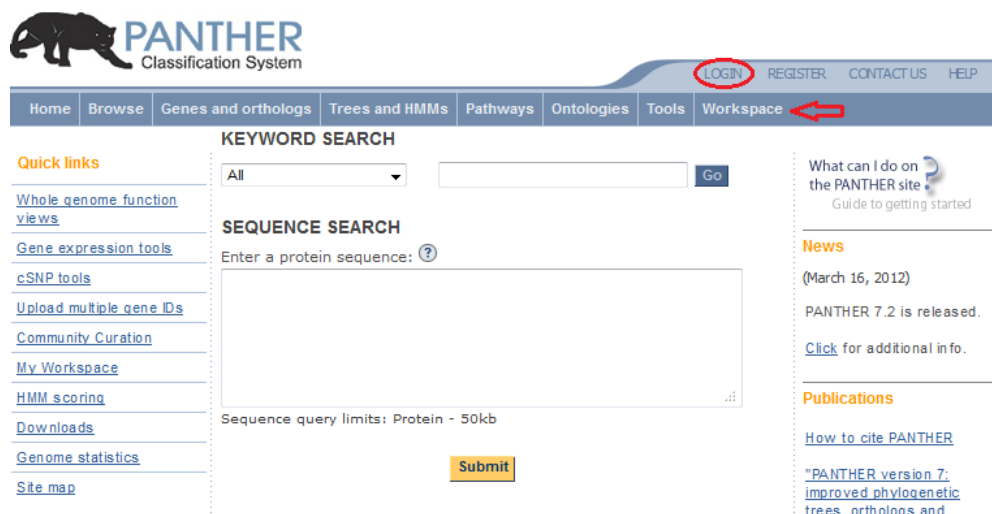


Figura 13: Página web do PANTHER com a indicação a vermelho do ícone de LOGIN e da área de trabalho (*Workspace*).

Após o *login*, foi inserida a lista dos códigos *UniProtKB AC* correspondentes ao carcinoma espinocelular e seleccionou-se a espécie *homo sapiens* (Figura 12). Repetiu-se o processo descrito acima para as listas dos códigos *UniProtKB AC* correspondentes às proteínas identificadas em lesões pré-malignas.

PANTHER
Classification System

Home Browse Genes and orthologs Trees and HMMs Pathways Ontologies Tools Workspace

PANTHER GENE LIST [Customize Gene list](#)

Convert List to: -Select- Send list to: -Select-

Display: 30 items per page [Refine Search](#)

Hits 1-30 of 102 [page: (1) 2 3 4]

Species Filter: All

Gene ID	Gene Name Gene Symbol	Ortholog	PANTHER Family/Subfamily
1. HUMAN ENSEMBL=ENSG00000103502 UniProtKB=O14735	CDP-diacylglycerol-- inositol 3-phosphatidyltransferase CDIPT ortholog		SUBFAMILY NOT NAMED (PTHR15362:SF2)
2. HUMAN ENSEMBL=ENSG00000129451 UniProtKB=O43240	Kallikrein-10 KLK10 ortholog		SUBFAMILY NOT NAMED (PTHR24265:SF36)

Figura 14: Página web do PANTHER. A seta vermelhas e azul indicam, respectivamente, os ícones que devem ser seleccionados para obter os dados relativos ao componente celular (*cellular component*) e aos processos biológicos (*biological process*) em que as proteínas listadas estão envolvidas.

Com este processo obtiveram-se duas listas separadas no *Workspace*, correspondentes a cada uma das situações. Esta ferramenta permite obter dados para interpretação de vários aspectos relevante, dos quais se destacam a distribuição das proteínas de acordo com a componente celular (*cellular component*) e os processos biológicos (*biological process*) em que estão envolvidas. A Figura 14 mostra a área de trabalho da página web do PANTHER, onde é possível aceder a esta informação.

A ferramenta bioinformática DAVID foi utilizada para determinar as vias de sinalização em que as diferentes proteínas listadas estão envolvidas. Fez-se o *upload* das listas dos códigos *UniProtKB AC*, correspondentes às proteínas identificadas em carcinoma espinocelular e em lesões pré-malignas separadamente para depois extrair os dados necessários (Figura 15).

Functional Annotation Tool
DAVID Bioinformatics Resources 6.7, NIAID/NIH

Home Start Analysis Shortcut to DAVID Tools Technical Center Downloads & APIs Term of Service Why DAVID? About Us

Upload List
Background

Upload Gene List

[Demolist 1](#) [Demolist 2](#)
[Upload Help](#)

Step 1: Enter Gene List

A: Paste a list

014713
014735
014746
014904

Or

B: Choose From a File

Multi-List File ?

Step 2: Select Identifier

UNIPROT_ACCESSION

Step 3: List Type

Gene List
Background

Step 4: Submit List

Functional Annotation Tool

← Submit your gene list to start the tool!

[Tell us how you like the tool!](#)
[Read technical notes of the tool!](#)
[Contact us for questions](#)

Key Concepts:

The DAVID Gene Concept

DAVID 6.7 is designed around the "DAVID Gene Concept", a graph theory evidence-based method to agglomerate species-specific gene/protein identifiers from a variety of public genomic resources including NCBI, PIR and Uniprot/SwissProt. The DAVID Gene Concept method groups tens of million of identifiers from over 65,000 species into 1.5 million unique protein/gene records. [More](#)

Term/Gene Co-Occurrence Probability

Ranking functional categories based on co-occurrence with sets of genes in a gene list can rapidly aid in unraveling new biological processes associated with cellular functions and pathways. DAVID 6.7 allows investigators to sort gene categories from dozens of annotation systems. Sorting can be based either the number of genes within each category or by the EASE-score. [More](#)

Gene Similarity Search

Any given gene is associating with a set of annotation terms. If genes share similar set of those terms, they are most likely involved in similar biological mechanisms. The algorithm tries to group those related genes based on the agreement of sharing similar annotation terms by Kappa statistics. [More](#)

Term Similarity Search

Typically, a biological process/term is done by a corporation of a set of genes. If two or more biological processes are done by similar set of genes, the processes might be related in the biological network somehow. This search function is to identify the related biological processes/terms by quantitatively measuring the degree of the agreement how terms share the similar participating genes. [More](#)

Figura 15: Página web da ferramenta DAVID, através da qual se obtiveram os dados para elaboração da representação gráfica das vias de sinalização nas quais as proteínas em estudo estão envolvidas.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O desenvolvimento do carcinoma espinocelular da cavidade oral a partir de lesões pré-malignas, já é um facto aceite pela comunidade clínica e científica como se evidenciou ao longo da introdução deste trabalho. No entanto os critérios de diagnóstico actualmente utilizados não permitem uma clara caracterização das lesões pré-neoplásicas e não existem métodos de diagnóstico que permitam prever a evolução destas patologias. Reconhecer os mecanismos moleculares subjacentes à transformação de lesões pré-malignas para carcinoma espinocelular e identificar as moléculas envolvidas nesses mecanismos, nomeadamente as que se apresentem em quantidades alteradas ou que estejam ausentes ou então novas moléculas que sejam expressas tipicamente na situação de cada uma das patologias e que possam ser consideradas como potenciais biomarcadores, constitui um contributo importante para o desenho de futuras estratégias de diagnóstico para a área de oncologia oral. A presente dissertação propõem-se, através da informação constante na bibliografia, a identificar as proteínas que estão implicadas na desregulação dos mecanismos moleculares responsáveis pela malignização de células tumorais. No sentido de organizar toda a informação disponível sobre proteínas que já foram identificadas como estando implicadas em carcinoma espinocelular e em lesões pré-malignas foi elaborada uma base de dados (Tabela I), que foi estruturada de acordo com os critérios enumerados no capítulo MATERIAL E MÉTODOS (página 51). A organização da Tabela I foi feita de acordo com critérios específicos, de modo a permitir a adição da informação ao OralCard. Esta ferramenta é um meio de pesquisa que permite aceder a informação variada sobre o proteoma da cavidade oral, desde associações entre proteínas e patologias até dados sobre a estrutura e as vias de sinalização onde as proteínas estão envolvidas. Deste modo, as colunas de organização incluídas na Tabela I, estão elaboradas de acordo com os diferentes modos de pesquisa e informação que o OralCard oferece. Na página inicial do OralCard a pesquisa pode ser feita indicando o nome da proteína ou o respectivo código UniProt e pela designação MeSh ou OMIM da patologia de interesse. Deste modo, na Tabela I optou-se por fazer a identificação das proteínas não só através do nome mas também com o código *UniProtKB AC*, nas colunas Nome da proteína e UniProtKB AC. Para além disso, na coluna Patologia (MeSh) anotou-se o código MeSh correspondente ao carcinoma espinocelular da cavidade oral e a lesões pré-malignas, também para permitir a pesquisa por patologia, uma vez que esta informação será depositada no OralCard. A organização da informação constante da Tabela I permite que, ao fazer a pesquisa no OralCard quer pelo nome da proteína quer pelo código *UniProtKB AC* esta ferramenta

disponibilize informação sobre a proteína pretendida. No caso da pesquisa ser feita com o nome da patologia, o OralCard fornece uma lista de proteínas que estão associadas à mesma, a partir da qual é possível seleccionar a proteína de interesse.

Uma das informações relevantes que o OralCard também oferece sobre as proteínas prende-se com a expressão e as alterações pós-tradução apresentadas pelas mesmas, sendo possível verificar se determinada proteína apresenta expressão alterada ou diminuída e, quando existem evidências experimentais, a quantificação exacta dessa alteração, bem como se apresenta alguma modificação pós-tradução. Deste modo, também com vista à adição desta informação ao OralCard, registou-se na coluna Quantificação e na coluna Modificações pós-tradução da Tabela I, se a expressão das diferentes proteínas foi referida na bibliografia como estando aumentada ou diminuída e se apresentavam alguma alteração pós-tradução, respectivamente. Este parâmetro foi limitado pela escassa bibliografia existente de estudos de proteómica relativos a este tema.

Para além da informação específica das proteínas, o OralCard também apresenta várias informações sobre a amostra e os dadores da mesma. Também para ser possível a adição desta informação, registou-se a idade e o género dos dadores das amostras, a existência de hábitos sociais, os métodos de recolha e análise da mesma e o tipo de estudo que foi feito, nas colunas Faixa Etária, Género, Hábitos Sociais, Método de Recolha, Método de Análise e Tipo de estudo.

Após a anotação de toda a informação na Tabela I passou-se à análise dos dados contidos na mesma. De modo a averiguar a quantidade de proteínas identificadas em saliva em relação ao número total de proteínas, construiu-se o Gráfico 1, que mostra o número de proteínas que foram identificadas por nós, a partir da bibliografia sobre carcinoma espinocelular e lesões pré-malignas e, dessas proteínas, quantas são exclusivas de carcinoma espinocelular e quantas correspondem a cada entidade clínica.

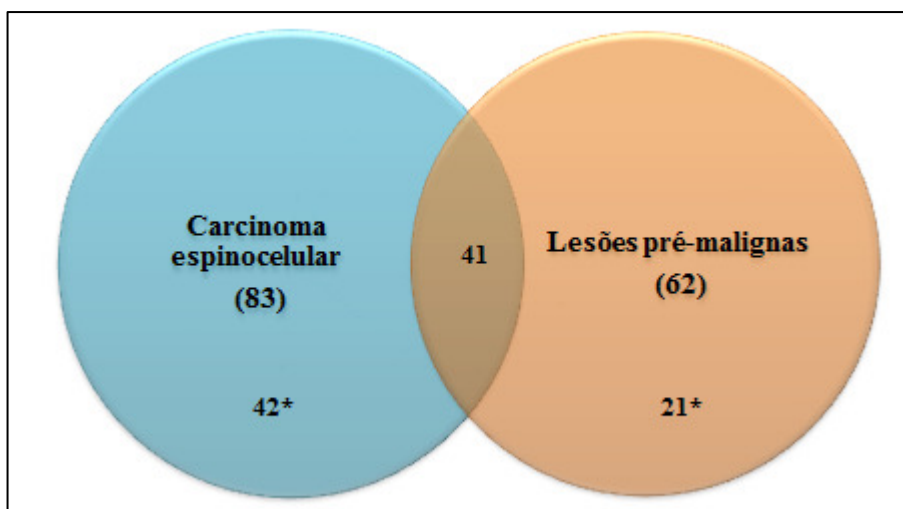


Gráfico 1: Representação esquemática, elaborada a partir da Tabela I, representando o nº total de proteínas identificadas em carcinoma espinocelular (83) e em lesões pré-malignas (62), evidenciando o número de proteínas comuns (41). Os números com um asterisco (*) representam os totais de proteínas exclusivas de carcinoma espinocelular e lesões pré-malignas (42* e 21*, respectivamente).

A análise do Gráfico 1 permite verificar que existem 83 proteínas identificadas em carcinoma espinocelular, das quais 42 são exclusivas desta patologia. Nas lesões pré-malignas foram identificadas 62 proteínas das quais 21 são exclusivas, não estando presentes em lesões de carcinoma espinocelular. Entre as duas entidades existem 41 proteínas comuns.

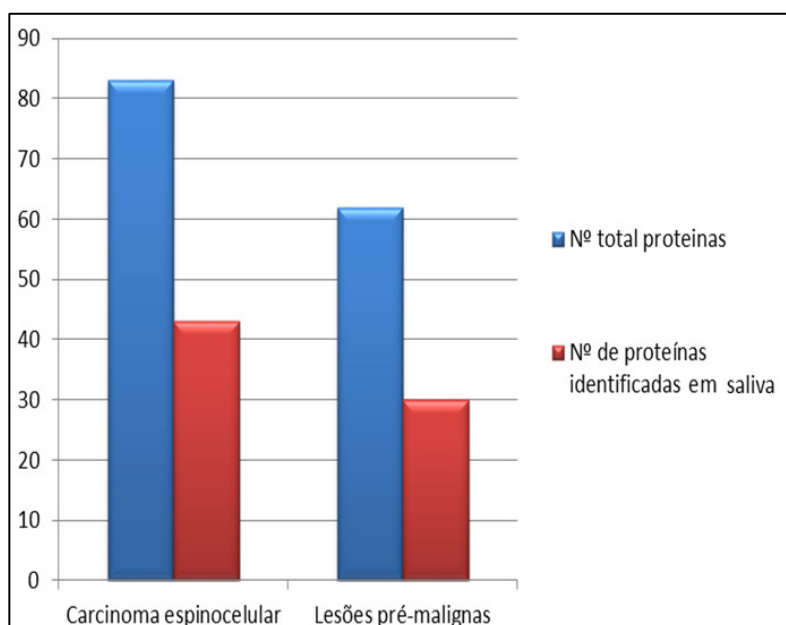


Gráfico 2: Representação do nº total de proteínas identificadas em carcinoma espinocelular e em lesões pré-malignas (colunas a azul) e destas, as que já foram identificadas como estando presentes na saliva (colunas a vermelho).

No Gráfico 2 são representados os números de proteínas identificadas em carcinoma espinocelular e em lesões pré-malignas e dessas quantas as que já foram identificadas como estando presentes em amostras de saliva. Pela análise do Gráfico 2 verifica-se que um grande número de proteínas já foram identificadas na saliva, quer para o carcinoma espinocelular (das 83 proteínas totais, 43 estão já identificadas na saliva), quer para as lesões pré-malignas (das 62 proteínas totais, 29 estão identificadas na saliva). Uma vez que um número considerável das proteínas estão presentes na saliva, estes dados indicam que a saliva poderá vir a ser considerada um fluido adequado para a pesquisa de biomarcadores para as patologias em estudo. Estes resultados positivos fomentaram a análise mais aprofundada da Tabela I (capítulo ANEXOS, página 101) representada no Gráfico 3, que quantifica as proteínas sugeridas como biomarcadores na bibliografia e compara com o nº total de proteínas identificadas em carcinoma espinocelular e em lesões pré-malignas.

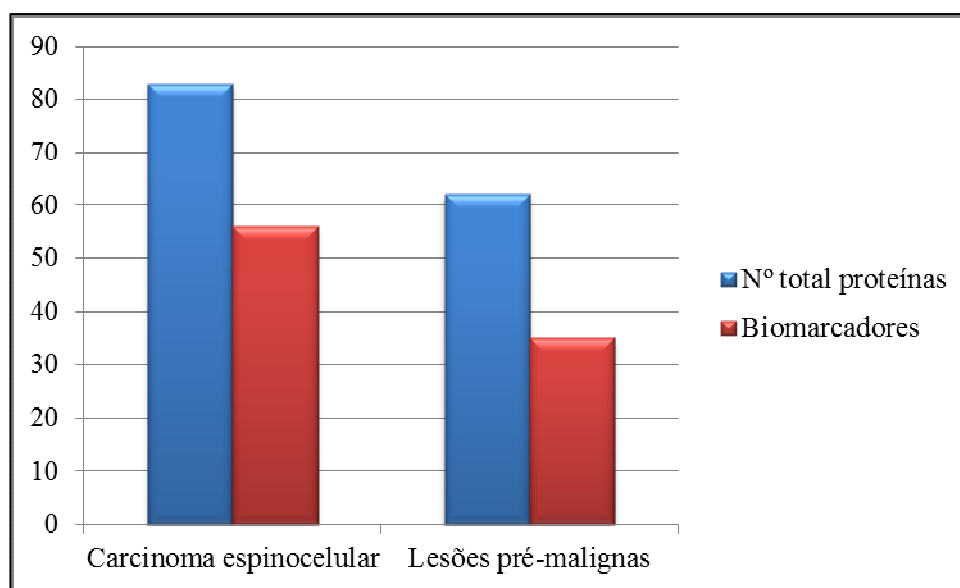


Gráfico 3: Representação do nº total de proteínas identificadas em carcinoma espinocelular e lesões pré-malignas e dessas o nº de proteínas sugeridas pela bibliografia como biomarcadores.

Da análise do Gráfico 3 verifica-se que das 83 proteínas identificadas em carcinoma espinocelular, 56 foram sugeridas como biomarcadores. No caso das lesões pré-malignas, das 62 proteínas identificadas, 35 foram sugeridas como biomarcadores. Em ambos os casos, verifica-se que mais de metade das proteínas identificadas já foram sugeridas como biomarcadores, evidenciando a crescente importância dada a este método de diagnóstico.

O Gráfico 4 compara a origem de recolha das amostras que deram origem à identificação das proteínas associadas a carcinoma espinocelular e a lesões pré-malignas. Analisando o Gráfico 4 e considerando os vários métodos de recolha listados na Tabela I (capítulo ANEXOS, página 101), verifica-se que a grande maioria das proteínas foram identificadas em amostras de mucosa, obtidas através de métodos de biópsia, quer de carcinoma espinocelular, quer de lesões pré-malignas. Esta evidência mostra que foram realizados poucos estudos de pesquisa de proteínas envolvidas em cancro oral utilizando a saliva como fluído para estudos moleculares. Observa-se que no caso das lesões pré-malignas, o número de proteínas identificadas em amostras de saliva total é maior. Considerando que as proteínas identificadas em amostras de mucosa serão proteínas intracelulares, ou membranares, a sua eventual identificação em amostras de saliva poderá acontecer por esfoliação decorrente de morte celular ou lesão tecidual.

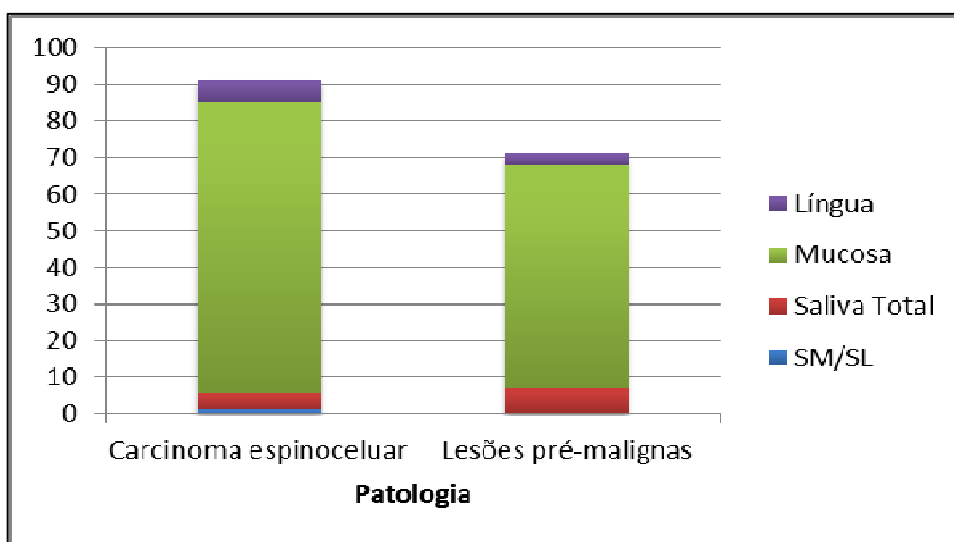


Gráfico 4: Representação das diferentes origens de recolha das amostras, a partir das quais foram obtidas as proteínas associadas a carcinoma espinocelular e a lesões pré-malignas. Para as diferentes origens de recolha das amostras (língua, mucosa, saliva total e SM/SL) é apresentado o nº de proteínas identificadas em cada uma, em relação ao número total de proteínas.

Uma vez que estávamos interessados em identificar os mecanismos moleculares implicados em carcinoma espinocelular e em lesões pré-malignas, o passo seguinte de análise da nossa base de dados (Tabela I) teve por objectivo organizar as proteínas de acordo com os processos biológicos e respectivas vias de sinalização em que participam. Esta organização permite, como objectivo final, identificar quais são as proteínas que se apresentam com quantidades alteradas face à situação normal, ou se eventualmente poderiam aparecer em

qualquer das patologias, proteínas que não sejam expressas em situações normais. Uma vez essas proteínas identificadas, relacioná-las com os biomarcadores de carcinoma espinocelular e lesões pré-malignas propostos pela literatura, permitirá lançar luz sobre novos biomarcadores ou corroborar os já propostos. Neste contexto, foi importante começar por analisar qual a localização celular das proteínas implicadas nas patologias. Assim, as proteínas identificadas em carcinoma espinocelular e em lesões pré-malignas foram organizadas no Gráfico 5, de acordo com a ontologia componente celular (*cellular component*), com recurso à ferramenta PANTHER (capítulo MATERIAL E MÉTODOS, página 51).

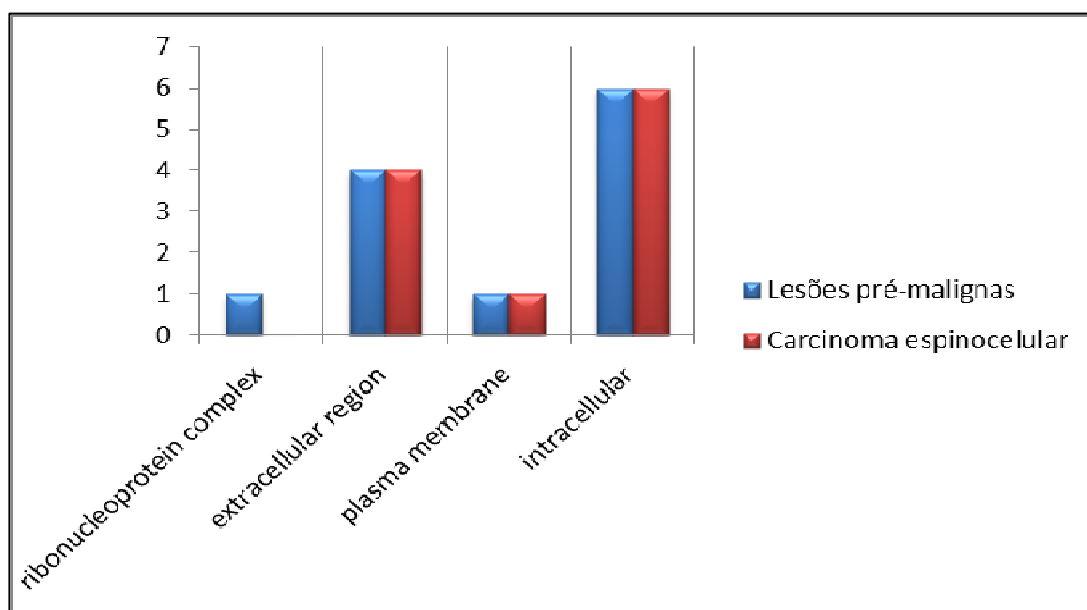


Gráfico 5: Representação da distribuição das proteínas identificadas em carcinoma espinocelular (colunas a vermelho) e lesões pré-malignas (colunas a azul), pelos diferentes componentes celulares: componente ribonucleoproteico (ribonucleoprotein complex), componente extracelular (*extracellular*), componente membrana (*plasma membrane*) e componente intracelular (*intracellular*).

Observando o Gráficos 5, verifica-se que em ambas as patologias existe um maior número de proteínas que são intracelulares. Entre o carcinoma espinocelular e as lesões pré-malignas, a diferença mais evidente verifica-se ao nível das proteínas que integram complexos ribonucleoproteicos, que não estão presentes em carcinoma espinocelular. Assumindo que as proteínas extracelulares são as que mais facilmente poderão passar para a saliva, já que este fluido banha constantemente toda a mucosa oral, tínhamos interesse em identificar as proteínas desta origem. Utilizou-se novamente a ferramenta PANTHER (capítulo MATERIAL E MÉTODOS, página 51), para identificar as proteínas de origem extracelular implicadas em carcinoma e em lesões pré-malignas (Tabela 5).

Tabela 5: Proteínas extracelulares identificadas como estando presentes (x) em carcinoma espinocelular e em lesões pré-malignas.

Proteínas	Carcinoma espinocelular	Lesões pré-malignas
<i>Integrin beta-4</i>	X	X
<i>Syndecan-1</i>	X	X
<i>Tenascin</i>	X	X
<i>Protein Wnt-9^a</i>	X	
<i>Stromelysin</i>		X

Pela Tabela 5 verifica-se que apenas cinco proteínas do componente extracelular foram identificadas. Destas proteínas, a integrina beta-4 (*integrin beta-4*), o sindecano 1 (*syndecan-1*), e a tenascina (*tenascin*) são comuns entre carcinoma espinocelular e lesões pré-malignas. A proteína Wnt-9a (*protein Wnt-9a*) é exclusiva de carcinoma espinocelular e a estromelisina (*stromelysin*) de lesões pré-malignas. A integrina beta-4 é uma proteína que actua como receptor da laminina, promovendo a invasão tumoral, através da regulação de vias de sinalização essenciais para a organização do citoesqueleto celular.^[112] O sindecano-1 está envolvido na ligação entre o citoesqueleto e a matriz extracelular e já foi identificado como estando em níveis elevados, no soro de pacientes com carcinoma hepatocelular. No entanto, este é um ponto controverso na literatura,^[113] tanto que, analisando esta proteína na Tabela I (capítulo ANEXOS, página 101), verifica-se que a sua expressão não está aumentada mas sim diminuída, tanto no carcinoma espinocelular, como nas lesões pré-malignas. A tenascina intervém essencialmente em processos de adesão celular e já foi identificada em adenocarcinoma e em carcinoma espinocelular do pulmão, com níveis de expressão aumentados.^[114] Analisando a Tabela I, (capítulo ANEXOS, página 101) verifica-se que esta proteína foi identificada em lesões pré-malignas e também apresenta expressão aumentada. A proteína Wnt-9a está presente numa via de sinalização celular específica, a via Wnt, que está envolvida em processos de carcinogénese.^[115] A estromelisina está descrita como tendo um papel fulcral nos processos de degradação e formação de matriz extracelular e nas interações célula-célula. Para além destes processos, esta proteína também intervém em vias de sinalização envolvidas no processo de metastização tumoral.^[116] Verifica-se então que todas as proteínas do componente extracelular, identificadas em carcinoma espinocelular e lesões pré-malignas da cavidade oral, já foram descritas como estando associadas a processos de carcinogénese.

Para esclarecer quais os processos biológicos em que estão envolvidas as proteínas identificadas em carcinoma espinocelular e lesões pré-malignas, recorreu-se à ferramenta PANTHER, na qual se geraram os Gráficos 6 e 7 que apresentam os diferentes processos biológicos nos quais estão envolvidas as proteínas listadas na Tabela I (capítulo ANEXOS, página 101), identificadas em carcinoma espinocelular e lesões pré-malignas respectivamente.

Comparando os Gráficos 6 e 7, verifica-se uma distribuição semelhante das proteínas pelos vários processos biológicos. No entanto, existem alguns processos biológicos que não são comuns a ambas as patologias, como: localização (*localization*), reprodução (*reproduction*) e produção de precursores metabólicos e energia (*generation of precursor metabolites and energy*). Pensamos que a não identificação de proteínas correspondentes a alguns dos processos biológicos, numa das patologias, deve-se ao facto de a grande maioria dos estudos, serem dirigidos e não de proteómica e, portanto, muito mais restritivos em termos do universo de proteínas que pode ser detectado. Deste modo, o universo de proteínas identificadas é bastante limitado, influenciando por isso a informação global sobre os processos biológicos presentes.

Um dos processos biológicos mais característicos da malignização celular consiste na desregulação das vias apoptóticas. A apoptose é essencial para a manutenção da homeostasia celular e, uma vez alterados os mecanismos que a regulam, podem-se verificar duas situações: inibição das vias de sinalização apoptótica ou activação excessiva dos processos apoptóticos. No caso da carcinogénese, o que se verifica é uma acção anti-apoptótica, que pode ocorrer a diferentes níveis e envolver diferentes vias de sinalização. Esta acção anti-apoptótica vai permitir que células com danos significativos, as células cancerígenas, se desenvolvam e dividam, permitindo deste modo a evolução dos processos de carcinogénese.^[31,33,35] Faz então sentido, analisar e procurar evidências relevantes, nomeadamente identificar entre as proteínas identificadas em carcinoma espinocelular e em lesões pré-malignas que compõem a porção correspondente à apoptose (*apoptosis*) dos Gráficos 6 e 7 respectivamente, quais as que se encontram com expressão alterada ou se eventualmente existem proteínas que apenas estão presentes numa das patologias. Recorreu-se à ferramenta PANTHER (capítulo MATERIAL E MÉTODOS, página 51), para verificar quais as proteínas identificadas como implicadas nos processos biológicos de apoptose (*apoptosis*) e também para averiguar se as mesmas apresentam função inibidora ou promotora deste processo. Desta tarefa apurou-se que, para as proteínas identificadas em carcinoma espinocelular, as envolvidas na apoptose são a survivina

(*baculoviral IAP repeat-containing protein 5*), que é uma proteína anti-apoptótica e a interleucina-6 (*interleukin-6*) também anti-apoptótica. No caso das lesões pré-malignas, verificou-se que as proteínas envolvidas na apoptose eram a survivina (*baculoviral IAP repeat-containing protein 5*), com função anti-apoptótica, a p53 (*cellular tumor antigen p53*), a proteína tumoral 63 (*Tumor protein 63*), ambas pró-apoptóticas, e a sub-unidade catalítica tipo 3 da cinase-fosfatidilinositol 3 (*Phosphatidylinositol 3-kinase catalytic subunit type 3*), que integra um complexo anti-apoptótico. Deste modo, é interessante verificar que entre as proteínas associadas à apoptose, identificadas em carcinoma espinocelular e lesões pré-malignas existe uma proteína comum, a survivina (*baculoviral IAP repeat-containing protein 5*).

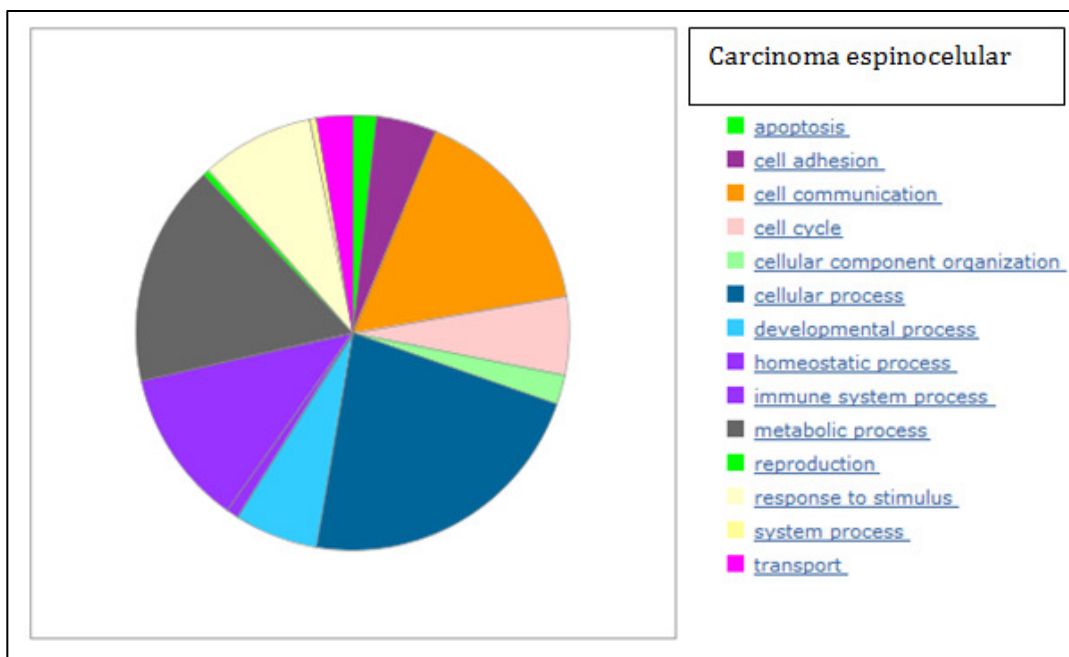


Gráfico 6: Distribuição das proteínas identificadas em carcinoma espinocelular de acordo com os processos biológicos em que estão envolvidas.

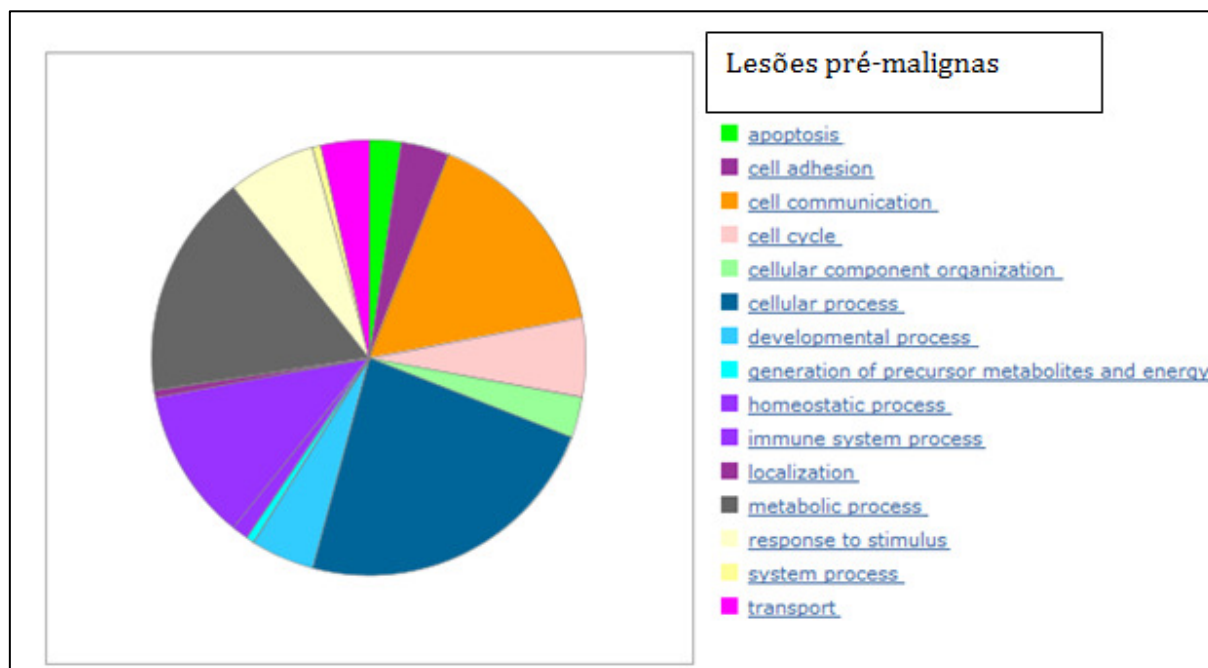


Gráfico 7: Distribuição das proteínas identificadas em lesões pré-malignas de acordo com os processos biológicos em que estão envolvidas.

Uma vez identificados os processos biológicos em que participam as proteínas implicadas em carcinoma espinocelular e em lesões pré-malignas foi importante saber se já estavam identificadas as vias de sinalização em que estas proteínas podem estar envolvidas. O papel conduzido por cada proteína numa determinada via de sinalização é crucial para o correcto funcionamento dessa via. Se a proteína em questão estiver expressa em maior ou menor quantidade, o funcionamento dessa via estará comprometido.

Carcinoma espinocelular

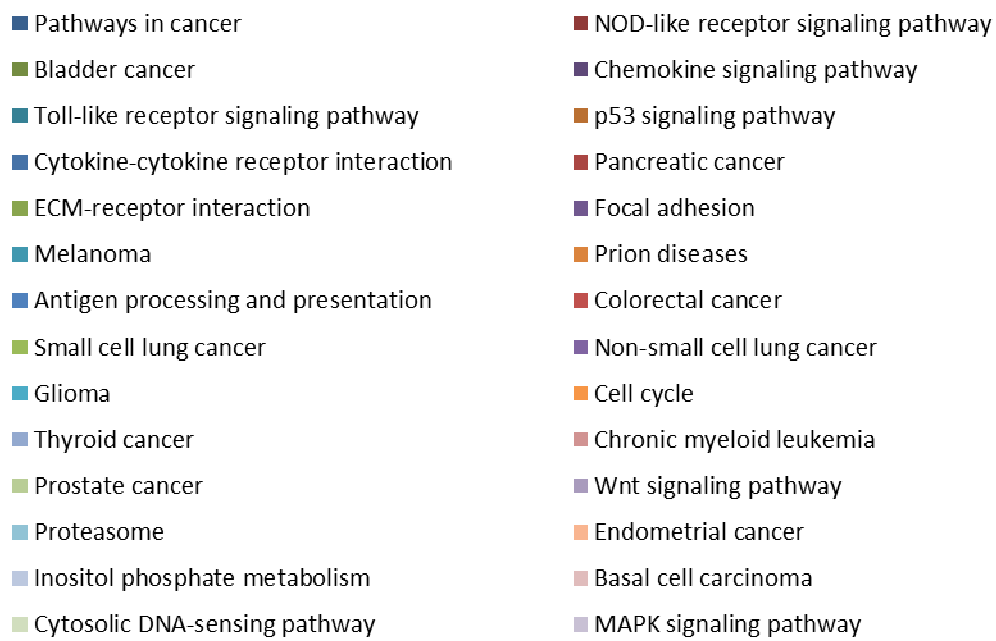
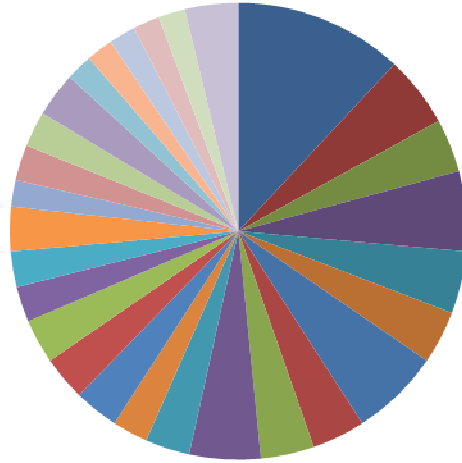
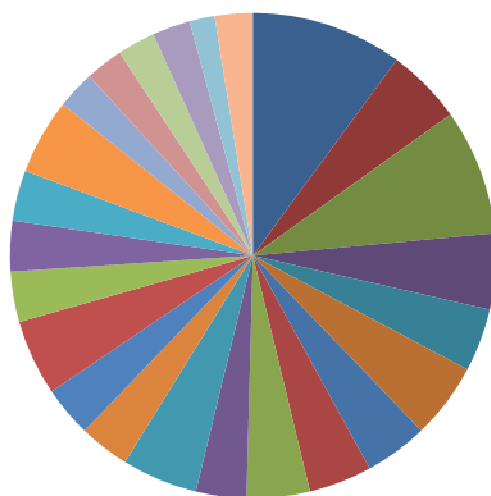


Gráfico 8: Representação das vias de sinalização em que estão envolvidas as proteínas identificadas em carcinoma espinocelular.

Lesões pré-malignas



- Pathways in cancer
- Bladder cancer
- Cytokine-cytokine receptor interaction
- Pancreatic cancer
- Melanoma
- Cell cycle
- ECM-receptor interaction
- Colorectal cancer
- Small cell lung cancer
- Non-small cell lung cancer
- Chemokine signaling pathway
- NOD-like receptor signaling pathway
- Glioma
- Focal adhesion
- p53 signaling pathway
- Chronic myeloid leukemia
- Toll-like receptor signaling pathway
- MAPK signaling pathway
- Endometrial cancer
- Arachidonic acid metabolism
- Epithelial cell signaling in Helicobacter pylori infection
- Renal cell carcinoma
- Non-homologous end-joining
- VEGF signaling pathway

Gráfico 9: Representação das vias de sinalização em que estão envolvidas as proteínas identificadas em lesões pré-malignas.

Como se verifica pela observação dos Gráficos 8 e 9, para as proteínas identificadas em carcinoma espinocelular ou em lesões pré-malignas ainda são poucas as vias de sinalização conhecidas e às quais podem ser associadas. A maioria das vias de sinalização que foram identificadas correspondem a vias comuns a vários tipos de cancro, nomeadamente cancro do pâncreas (*pancreatic cancer*), cancro do endométrio (*endometrial cancer*) ou melanoma.

Face às evidências resultantes da análise feita anteriormente, relativa aos processos biológicos, optou-se por centrar o estudo dos Gráficos 8 e 9 nas vias associadas a cancro (*pathways in cancer*) e a via da proteína p53 (*p53 signaling pathway*). Para estas duas vias de sinalização distintas, identificaram-se as proteínas que nelas intervêm e, recorrendo à Tabela I (capítulo ANEXOS, página 101), registou-se se as proteínas presentes apresentam expressão aumentada ou diminuída ou se apenas estão identificadas como estando presentes, se são exclusivas de carcinoma espinocelular ou de lesões pré-malignas e se já foram propostas como biomarcadores. A organização da informação referente às vias associadas a cancro (*pathways in cancer*) e à via da p53 (*p53 signaling pathway*), está patente nas Tabela 6 e Tabela 7, respectivamente.

Analisando a Tabelas 6 constata-se que das proteínas identificadas em carcinoma espinocelular, a interleucina 6 (*interleukin-6*), a catenina beta-1 (*catenin beta-1*), a caderina-1 (*cadherin-1*), a *heat shock protein HSP 90-beta*, a glutationa S transferase P (*Glutathione S-transferase P*), a cinase 4 dependente de ciclina (*cyclin-dependente kinase 4*) e a interleucina 8 (*interleukin-8*) já foram identificadas em saliva. À exceção da cadeia-alfa 1 de colagénio (*collagen-alpha 1 chain*), da integrina alfa-V (*integrin alfa-V*), da proteína Wnt-6 (*Wnt-6 protein*), das isoformas 1,2 e 3 da proteína inibidora das ciclinas dependentes de cinases (*Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A, isoforms 1/2/3*) e da catenina beta-1 (*catenin beta-1*), todas as outras proteínas identificadas em carcinoma espinocelular na Tabela 6 apresentam expressão aumentada. Ainda na Tabela 6 é possível verificar que para o carcinoma espinocelular, as proteínas já identificadas ou sugeridas como biomarcadores são a proteína Wnt-6, a interleucina 6, a catenina beta-1, a proteína Wnt-9a, a integrina alfa-V, a *heat shock protein HSP 90-beta*, a glutationa S transferase P, a *placental growth factor* e a interleucina 8. As proteínas enumeradas anteriormente como biomarcadores, intervêm numa multiplicidade de processos biológicos, não apresentando especificidade suficiente para serem bons biomarcadores. No caso das lesões pré-malignas, as proteínas identificadas na Tabela 6 como estando já identificadas em saliva são a caderina-1 e a cinase 4 dependente de ciclina. Na

bibliografia analisada referente a lesões pré-malignas, alguns dos estudos foram feitos em lesões com características displásicas, não sendo especificado o tipo de lesão. Deste modo, optou-se por identificar nas Tabelas 6 e 7 as diferentes entidades clínicas como displasia epitelial oral ou com o nome da patologia quando especificado (leucoplasia, líquen plano). Analisando este parâmetro na Tabela 6 verifica-se que todas as proteínas, excepto a integrina alfa-V que foi identificada em leucoplasia e líquen plano, foram identificadas ou em lesões de displasia epitelial oral ou em leucoplasias. Para além disso, verifica-se também que apenas três proteínas não apresentam expressão aumentada: a p53 (*cellular tumor antigen p53*), a caderina-1 e as isoformas 1, 2 e 3 da proteína inibidora das ciclinas dependentes de cinases. Para as lesões pré-malignas, das proteínas envolvidas nas vias de sinalização associadas a cancro, apenas foram identificadas/sugeridas como biomarcadores a p53, a integrina alfa-V e a *prostaglandin G/H synthase 2*. Tanto a integrina alfa-V como a *prostaglandin G/H synthase 2* estão envolvidas em várias vias de sinalização celular, não sendo específicas de um único processo ou tecido que permita a sua associação inequívoca ao processo de malignização de lesões pré-malignas, não sendo deste modo marcadores específicos do mesmo. A p53 pode ser mais interessante neste sentido já que é uma proteína que intervém na regulação da apoptose, tendo por isso um papel fulcral na progressão cancerígena. De todas as proteínas identificadas como estando envolvidas em vias associadas a cancro (*pathways in cancer*), são comuns a carcinoma espinocelular e a lesões pré-malignas: as isoformas 1, 2 e 3 da proteína inibidora das ciclinas dependentes de cinases, a survivina (*baculoviral IAP repeat-containing protein 5*), o factor de transcrição (*transcription factor AP-1*), a caderina-1, a integrina alfa-V, e a cinase 4 dependente de ciclina. Das proteínas anteriores, as únicas que apresentam expressão diminuída são as isoformas 1, 2 e 3 da proteína inibidora das cinases dependentes de ciclinas, e apenas nas lesões pré-malignas, estando todas as outras com expressão aumentada. Apenas a integrina alfa-V já foi proposta na literatura como biomarcador, tanto de carcinoma espinocelular como de lesões pré-malignas.

No caso da via de sinalização associada à p53 (*p53 signaling pathway*), verifica-se na Tabela 7 que as proteínas identificadas nesta via em carcinoma espinocelular são a ciclina D1 específica de G1/S (*G1/S specific cyclin D1*), a cinase 4 dependente de ciclina, a proteína sigma 14-3-3 (*14-3-3 protein sigma*), a serpina B5 (*serpin B5*), a cinase 6 dependente de ciclina (*cyclin dependent kinase 6*) e as isoformas 1,2 e 3 da proteína inibidora das cinases dependentes de ciclinas. As proteínas envolvidas na via de sinalização associada à p53,

identificadas em lesões pré-malignas são a p53, a serpina B5, a cinase 4 dependente de ciclina e as isoformas 1,2 e 3 da proteína inibidora das cinases dependentes de ciclinas. Das anteriores, apenas a serpina B5 e a cinase 4 dependente de ciclina já foram identificadas em saliva. As proteínas comuns entre carcinoma espinocelular e lesões pré-malignas são: a cinase 4 dependente de ciclina, a serpina B5 e as isoformas 1,2 e 3 da proteína inibidora das cinases dependentes de ciclinas. Das anteriores, todas apresentam expressão aumentada, excepto a *Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A, isoforms 1/2/3*, que foi identificada como estando apenas presente em carcinoma espinocelular e diminuída em lesões pré-malignas. Para além disso, nenhuma foi ainda proposta como biomarcador quer de carcinoma espinocelular, quer de lesões pré-malignas.

Tabela 6: Proteínas identificadas em carcinoma espinocelular e lesões pré-maligna, envolvidas em vias associadas a cancro (*pathways in cancer*).

	Nome	Presente na saliva	Tipo de lesão	Regulação			Exclusiva	Biomarcador
				Aumentada	Diminuída	Presente		
Carcinoma espinocelular	<i>G1/S-specific cyclin-D1</i>		<i>carcinoma espinocelular</i>	x			x	
	<i>Protein Wnt-6</i>		<i>carcinoma espinocelular</i>			x	x	x
	<i>Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A, isoforms 1/2/3</i>		<i>carcinoma espinocelular</i>			x		
	<i>interleukin-6</i>	x	<i>carcinoma espinocelular</i>	x			x	x
	<i>Catenin beta-1</i>	x	<i>carcinoma espinocelular</i>			x	x	x
	<i>Protein Wnt-9a</i>		<i>carcinoma espinocelular</i>	x			x	x
	<i>Collagen-alpha 1 chain</i>		<i>carcinoma espinocelular</i>		x		x	
	<i>Baculoviral IAP repeat-containing protein 5</i>		<i>carcinoma espinocelular</i>	x				
	<i>Transcription factor AP-1</i>		<i>carcinoma espinocelular</i>	x				
	<i>Cadherin-1</i>	x	<i>carcinoma espinocelular</i>		x			
	<i>Integrin alpha-V</i>		<i>carcinoma espinocelular</i>	x				x
	<i>Heat shock protein HSP 90-beta</i>	x	<i>carcinoma espinocelular</i>	x			x	x
	<i>Glutathione S-transferase P</i>	x	<i>carcinoma espinocelular</i>	x			x	x
	<i>Cyclin-dependent kinase 4</i>	x	<i>carcinoma espinocelular</i>	x				
	<i>Cyclin-dependent kinase 6</i>		<i>carcinoma espinocelular</i>	x			x	
	<i>Placenta growth factor</i>		<i>carcinoma espinocelular</i>	x			x	x
	<i>Proto-oncogene c-Fos</i>		<i>carcinoma espinocelular</i>	x			x	
<i>Interleukin-8</i>	x	<i>carcinoma espinocelular</i>	x			x	x	
<i>Signal transducer and activator of transcription 3</i>		<i>carcinoma espinocelular</i>	x			x		
Lesões pré-malignas	<i>Baculoviral IAP repeat-containing protein 5</i>		<i>displasia epitelial oral</i>	x				
	<i>Cellular tumor antigen p53</i>		<i>displasia epitelial oral</i>			x	x	x
	<i>Transcription factor AP-1</i>		<i>leucoplasia</i>	x				
	<i>Cadherin-1</i>	x	<i>leucoplasia</i>		x			
	<i>Integrin alpha-V</i>		<i>leucoplasia, líquen plano</i>	x				x
	<i>Prostaglandin G/H synthase 2</i>		<i>leucoplasia</i>	x			x	x
	<i>Cyclin-dependent kinase 4</i>	x	<i>leucoplasia</i>	x				
	<i>Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A, isoforms 1/2/3</i>		<i>displasia epitelial oral</i>		x			
	<i>Vascular endothelial growth factor A</i>		<i>displasia epitelial oral</i>	x			x	
	<i>Nitric oxide synthase, inducible</i>		<i>displasia epitelial oral</i>	x			x	
	<i>Epidermal growth factor receptor</i>		<i>displasia epitelial oral</i>	x			x	
	<i>Transforming growth factor beta-1</i>		<i>leucoplasia</i>	x			x	

Tabela 7: Proteínas identificadas em carcinoma espinocelular e lesões pré-maligna, envolvidas em vias associadas à p53 (*p53 signaling pathways*).

	Nome	Presente na saliva	Tipo de lesão	Regulação			Exclusiva	Biomarcador
				aumentada	diminuída	presente		
Carcinoma espinocelular	<i>G1/S-specific cyclin-D1</i>		<i>carcinoma</i>	x	x		x	
	<i>Cyclin-dependent kinase 4</i>	x	<i>carcinoma</i>	x				
	<i>14-3-3 protein sigma</i>	x	<i>carcinoma</i>	x			x	x
	<i>Serpin B5</i>	x	<i>carcinoma</i>	x				
	<i>Cyclin-dependent kinase 6</i>		<i>carcinoma</i>	x			x	
	<i>Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A, isoforms 1/2/3</i>		<i>carcinoma</i>			x		
Lesões pré-malignas	<i>Cellular tumor antigen p53</i>		<i>displasia epitelial oral</i>			x	x	x
	<i>Serpin B5</i>	x	<i>displasia epitelial oral</i>	x				
	<i>Cyclin-dependent kinase 4</i>	x	<i>leucoplasia</i>	x				
	<i>Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A, isoforms 1/2/3</i>		<i>displasia epitelial oral</i>		x			

Tendo identificado as proteínas envolvidas nas vias de sinalização associadas a cancro (*pathways in cancer*) e à via da p53 (*p53 signaling pathway*), e sabendo que a carcinogénese está directamente associada com a desregulação dos processos apoptóticos, importa perceber quais os principais mecanismos de regulação da mesma, averiguando se alguma das proteínas identificadas como comuns entre as duas entidades clínicas, está envolvida nestes processos.

Existem então três níveis distintos de regulação da apoptose: regulação da permeabilidade membranar da mitocôndria pela família BCL-2; regulação da cascata de caspases pelas IAPs; regulação apoptótica pela proteína c-FLIP.^[35]

Regulação da permeabilidade membranar da mitocôndria pela família BCL-2: os mecanismos de regulação das proteínas da família BCL-2 permitem alterar a estabilidade das mesmas ou a sua capacidade de ligação a outras proteínas. Deste modo, em resposta a diferentes estímulos, as proteínas podem ser activadas ou não, permitindo alternar a permeabilidade da membrana mitocondrial e controlando assim os processos de apoptose. As proteínas BH3 têm uma função pró-apoptótica quer pela inactivação das proteínas anti-apoptóticas BCL-2, quer pela activação das proteínas pró-apoptóticas BAX e BAK. Uma alteração no equilíbrio entre estes dois mecanismos pode levar a que as células não respondam a estímulos apoptóticos. É o que se verifica nos processos cancerígenos, as células não sofrem apoptose, porque se verifica ou um aumento da actividade das proteínas anti-apoptóticas BCL-2 ou uma inibição da actividade das proteínas pró-apoptóticas ou ambos, sendo deste modo conseguida uma progressão da carcinogénese.^[35] Estas alterações provavelmente devem-se a alterações genéticas e epigenéticas, a nível dos genes que codificam as proteínas envolvidas nestas vias, tendo já sido verificadas em vários tipos de cancro, incluindo cancro do colon e linfomas. Um aumento na expressão das proteínas anti-apoptóticas BCL-2 já foi verificado em diversos tipos de cancro: leucemia linfoblástica aguda, leucemia mielóide aguda, glioblastoma, melanoma e cancro da próstata. Verificou-se também que a proteína BCL-X_L tinha a expressão aumentada em mieloma múltiplo, adenoma colorectal, cancro pancreático e sarcoma de Kaposi. A expressão aumentada das proteínas anti-apoptóticas é causada por danos no ADN, que podem ser por exemplo, translocação de cromossomas ou amplificações de genes.^[35]

Regulação da cascata de caspases pelas IAPs: A degradação proteolítica é essencialmente controlada pela cascata de caspases envolvidas nos processos apoptóticos, sendo por isso necessários mecanismos de regulação desta via. As proteínas da família IAP, nomeadamente NAIP, XIAP, cIAP1, cIAP2, ILP2, livina e survivina, possuem pelo menos um domínio

estrutural BIR (*baculovirus IAP repeat*), responsável pela regulação das interações com outras proteínas, incluindo as caspases, as quais podem ser inibidas por este mecanismo. As proteínas cIAP1 e cIAP2 apresentam expressão desregulada em processos cancerígenos, tendo sido verificada uma ampliação dos genes codificadores das mesmas, em vários tipos de cancro, incluindo no mieloma múltiplo. A XIAP é a proteína desta família com maior potencial anti-apoptótico, podendo inibir a activação das caspases efectoras 3 e 7 e da caspase iniciadora 9. A desregulação funcional das IAPs, incluindo a XIAP, está descrita em vários cancros e está associada a estados de desenvolvimento cancerígenos avançados, bem como a prognósticos muito reservados. Um dos mecanismos propostos para o aumento da função anti-apoptótica da XIAP, envolve a co-expressão da survivina. A survivina apresenta duas funções: ligação ao complexo DIABLO/SMAC de modo a impedir a inibição da XIAP por este complexo; ligação à XIAP formando um complexo que aumenta a estabilidade da XIAP, diminuindo a degradação desta e potenciando a inibição da cascata de caspases. Estas funções da survivina estão associadas ao crescimento tumoral rápido e a processos de metastização através da activação de vias de sinalização específicas. A survivina, ao contrário das outras IAPs, ainda não foi identificada em células normais, apenas em células cancerígenas, estando associada a prognósticos reservados.^[35] Face aos resultados obtidos da análise dos Gráficos 9 e 10 e das Tabelas 6 e 7, esta evidência é fulcral, já que a survivina está identificada nas vias associadas a cancro (*pathways in cancer*), em carcinoma espinocelular e lesões pré-malignas, apresentando expressão aumentada em ambos. Para ter uma visão mais ampla dos processos em que a survivina está envolvida recorreu-se à ferramenta KEGG, de onde foi obtida a Figura 16 na qual se observa que a survivina (evidenciada a vermelho) está associada a vias de inibição da apoptose (*evading apoptosis*).

Regulação apoptótica pela proteína c-FLIP: A c-FLIP é uma proteína recrutada pelo complexo DISC, que regula a activação da caspase 8, e da qual são conhecidas três isoformas: c-FLIP_L, c-FLIP_S e c-FLIP_R. Quando a expressão destas proteínas está aumentada, as três isoformas são recrutadas para o complexo DISC e bloqueiam a activação da caspase 8. Um aumento da expressão destas proteínas já foi identificado em melanoma, carcinoma hepatocelular, cancro do endométrio, cancro do cólon e cancro da próstata. Para além da função anti-apoptótica, a c-FLIP está associada a vias de sinalização que promovem a proliferação e migração celular, podendo estar envolvida nos processos de metastização.^[35]

A serpina B5 ou maspina (*serpin B5/maspin*) pertence à família das proteases serínicas e está presente em diferentes tipos de epitélios, apresentando uma função inibidora das proteases serínicas, envolvida em vias de regulação da degradação da matriz extracelular. Existem evidências de que esta proteína se encontra aumentada em vários tipos de cancro, actuando como um supressor tumoral a nível da inibição dos processos de metastização.^[117] Observando a Figura 17, obtida através da ferramenta KEGG, que representa a via de sinalização da p53 (*p53 signaling pathway*), verifica-se que a serpina B5 (maspin), está envolvida na via que culmina com a inibição da angiogénese e dos processos de metastização (*inhibition of angiogenesis and metastasis*). Deste modo, faria sentido que a sua expressão estivesse diminuída em cancro. No entanto este facto ainda é controverso,^[117] verificando-se por exemplo, na Tabela 7, que a serpina B5 apresenta expressão aumentada.

Portanto, ambas as proteínas, survivina e serpina B5, mostram evidências interessantes: estão associadas a mecanismos de regulação da apoptose essenciais para a carcinogénese, estão identificadas em carcinoma espinocelular e em lesões pré-malignas e apresentam expressão aumentada, não tendo sido nenhuma das duas proposta como biomarcador até à data. Por um lado a survivina é mais específica, estando envolvida num mecanismo de regulação da apoptose e tendo sido identificada apenas em células tumorais. No entanto, ainda não foi identificada na saliva, o que não quer dizer que não esteja presente. Por outro lado, a serpina B5, apesar de ser menos específica no que diz respeito ao tipo de células onde se encontra (está presente em vários epitélios), já foi identificada em saliva. São assim bons candidatos para biomarcadores do processo de malignização, que podem indicar situações em que há perda da regulação de mecanismos essenciais à homeostase celular.

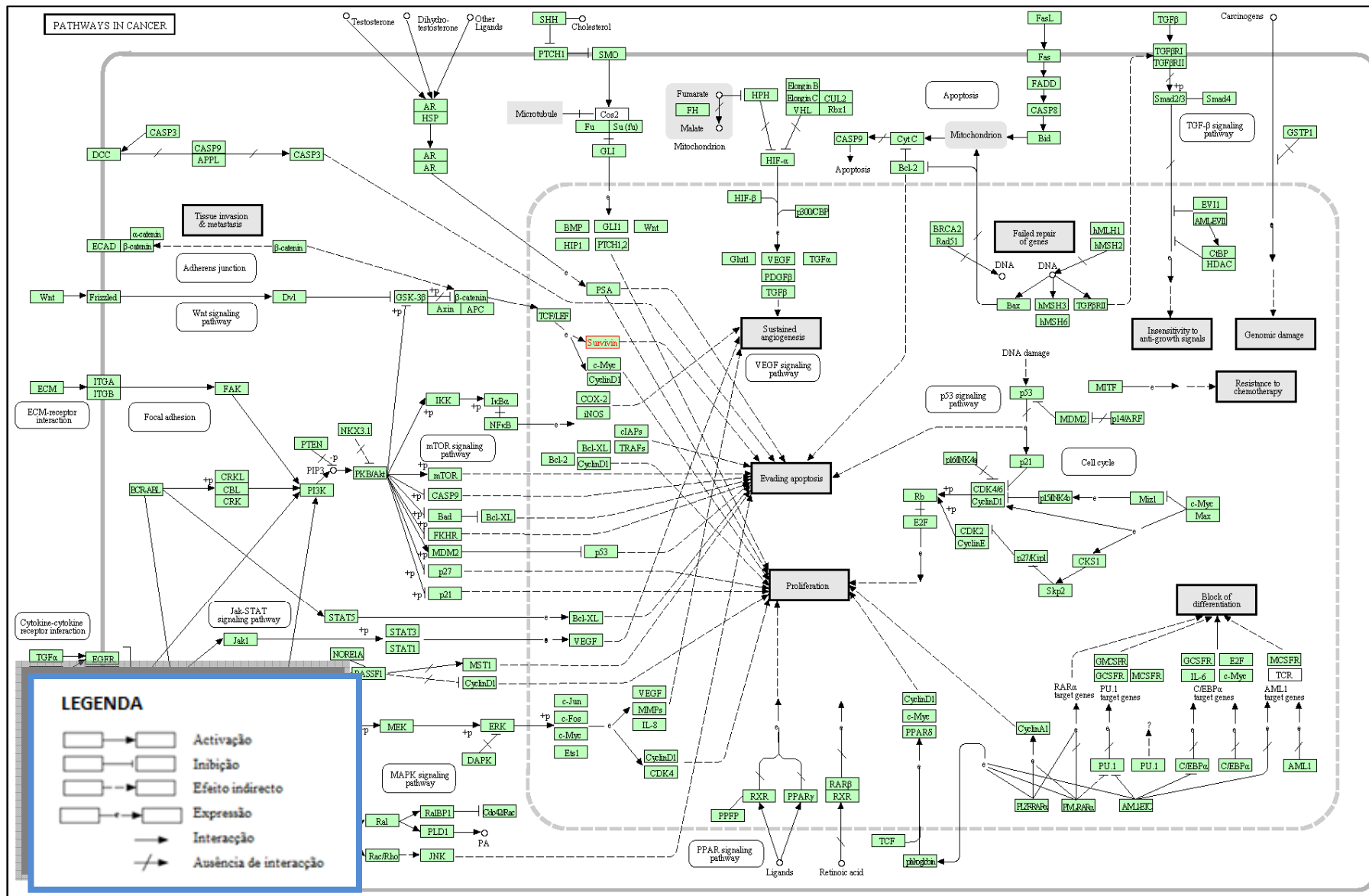


Figura 16: Representação as vias de sinalização associadas a cancro (*pathways in cancer*), através da ferramenta KEGG. Destaca-se a survivina (a vermelho), envolvida na via de sinalização que culmina com inibição da apoptose (*evading apoptosis*)

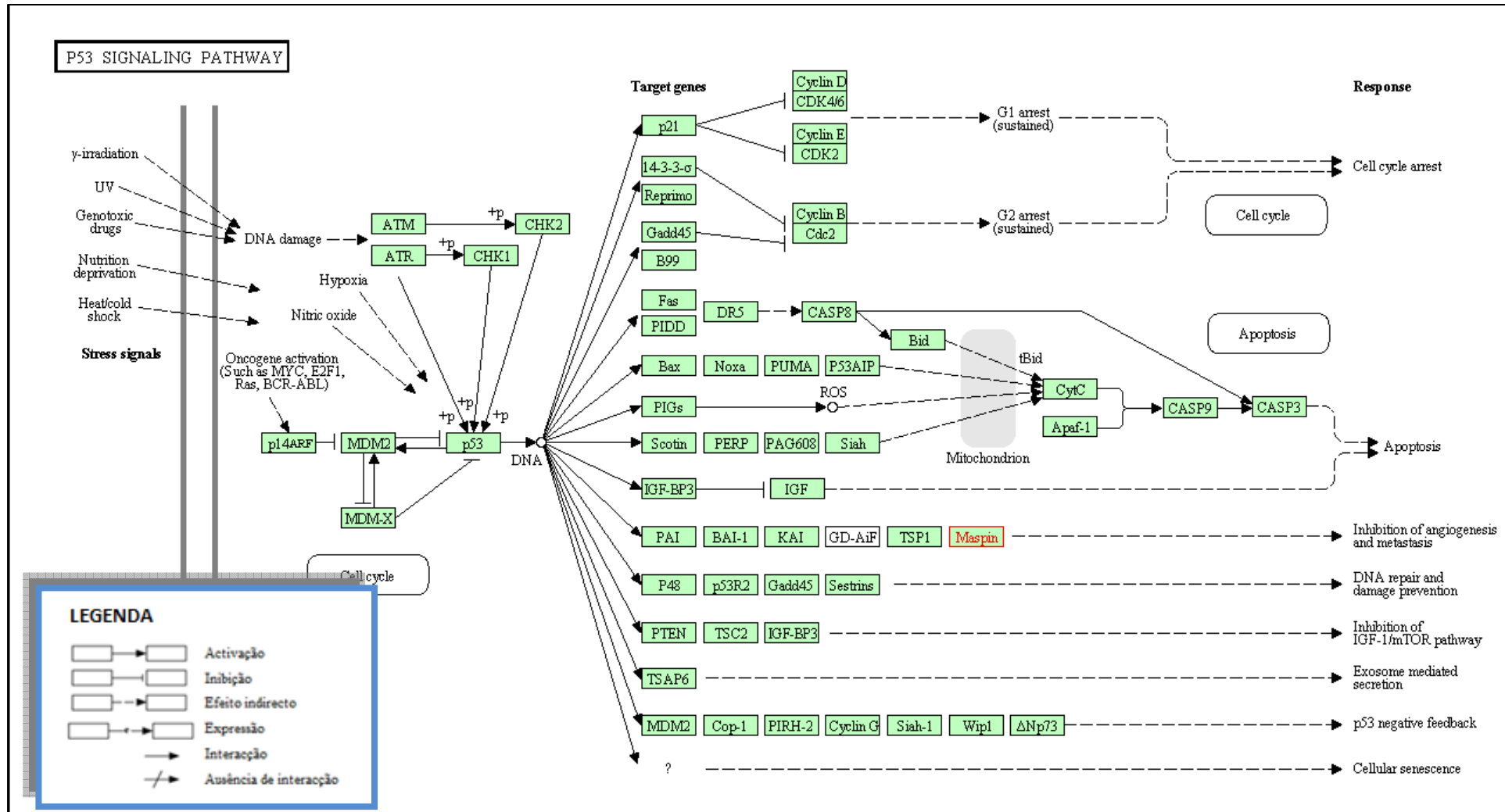


Figura 17: Representação da via de sinalização da p53 (*p53 signaling pathway*), através da ferramenta KEGG. Destaca-se a serpin B5 (*maspin*) (a vermelho) que está envolvida em vias de sinalização que inibem a angiogénese e a metastização.

5. CONCLUSÕES

O carcinoma espinocelular é o tipo de cancro mais comum da cavidade oral. A progressão rápida e o prognóstico reservado são duas características que têm fomentado o desenvolvimento de estudos direccionados para o diagnóstico precoce deste tipo de cancro. As lesões pré-malignas são um conjunto de entidades clínicas que têm potencial de malignização, podendo originar carcinomas de células escamosas. Neste sentido, compreender as evidências moleculares envolvidas nos processos de malignização são um factor chave para o posterior desenvolvimento de ferramentas de diagnóstico precoce, como os biomarcadores.

A saliva apresenta-se como um fluido corporal, que pode ser obtido por métodos não-invasivos, apresentando assim um potencial imenso em aplicações biomédicas como o diagnóstico precoce através de biomarcadores. Apesar de algumas limitações que apresenta, a saliva é um bom meio de análise, permitindo por um lado, maior cooperação por parte dos pacientes e, por outro, análises dinâmicas, com especificidade bastante satisfatória e sem necessidade de grandes quantidades de material biológico. Neste sentido, uma parte importante deste trabalho baseou-se na interacção com a base de dados OralOme, com a qual foram comparados os dados recolhidos e identificadas as proteínas já identificadas em saliva.

Tendo em conta o estado da arte no que diz respeito a biomarcadores para o processo de malignização de lesões pré-malignas, neste trabalho foi feita uma recolha de informação relevante sobre proteínas identificadas em carcinoma espinocelular e lesões pré-malignas da cavidade oral. Após todo o trabalho realizado, estando elucidados os processos biológicos e as vias de sinalização comprometidas no processo de malignização das lesões pré-malignas, identificaram-se duas proteínas-chave associadas a vias apoptóticas, que não estão ainda propostas na literatura actual, como biomarcadores: a serpina B5 (*serpin B5*) e a survivina (*baculoviral IAP repeat-containing protein 5*). Propõem-se então estas duas proteínas como possíveis biomarcadores do processo de malignização das lesões pré-malignas. Para além desta proposta de dois biomarcadores, este trabalho permitiu também recolher informação relevante para enriquecer o OralCard, no que diz respeito ao perfil proteico do cancro oral, especificamente do carcinoma espinocelular, e das lesões pré-malignas que podem estar na sua origem.

6. TRABALHO FUTURO

As evidências obtidas com a realização deste trabalho indicam que ainda há muito para desenvolver, nomeadamente na identificação de biomarcadores para o processo de malignização das lesões pré-malignas da cavidade oral. Neste sentido e de acordo com os resultados obtidos, o trabalho futuro deve ser direccionado para o desenvolvimento de procedimentos experimentais para a identificação das proteínas serpina B5 (*serpin B5*) e a survivina (*baculoviral IAP repeat-containing protein 5*), baseados preferencialmente na utilização de anticorpos específicos para estas proteínas. Propõe-se a elaboração de metodologias para desenvolvimento de um estudo transversal numa população representativa, de modo a apreciar o significado clínico destes possíveis biomarcadores.

BIBLIOGRAFIA

1. Almeida, M.B., Bax, Marcelo P., Uma visão geral sobre ontologias: pesquisa sobre definições, tipos, aplicações, métodos de avaliação e de construção. *Ci. Inf.*, 2003. 32(3): p. 7-20
2. Christopher A. Squier, M.J.K., *Biology of Oral Mucosa and Esophagus*. Journal of the National Cancer Institute Monographs 2001. 29.
3. T, I., Oral premalignant lesions: from the pathological viewpoint. *Int J Clin Oncol* 2011. 16(1): p. 15–26.
4. Jou YJ, L.C., Lai CH, Chen CH, Kao JY, Chen SY, Tsai MH, Huang SH, Lin CW, Proteomic identification of salivary transferrin as a biomarker for early detection of oral cancer. *Anal Chim Acta*, 2010. 681(1): p. 41-48.
5. Gasparotto D, M.R., Molecular approaches to the staging of head and neck carcinomas *Int J Oncol*, 2007. 31(1): p. 175-180.
6. R., R., Diagnostic Potential of Genomic and Proteomic Signatures in Oral Cancer. *Int J Hum Genet*, 2007. 7(1): p. 57-66
7. Hu S, A.M., Boontheung P, Wang J, Zhou H, Jiang J, Elashoff D, Wei R, Loo JA, Wong DT, Salivary proteomics for oral cancer biomarker discovery. *Clin Cancer Res*, 2008. 14(19): p. 6246-6252.
8. Wang Z, F.X., Liu X, Jiang L, Zeng X, Ji N, Li J, Li L, Chen Q, Involvement of potential pathways in malignant transformation from Oral Leukoplakia to Oral Squamous Cell Carcinoma revealed by proteomic analysis. *BMC Genomics*, 2009. 10: p. 383.
9. Franzmann EJ, R.E., Pedroso F, Pernas FG, Karakullukcu BM, Carraway KL, Hamilton K, Singal R, Goodwin WJ, Soluble CD44 Is a Potential Marker for the Early Detection of Head and Neck Cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2007. 16(7): p. 1348-1355.
10. Lo WY, T.M., Tsai Y, Hua CH, Tsai FJ, Huang SY, Tsai CH, Lai CC, Identification of over-expressed proteins in oral squamous cell carcinoma (OSCC) patients by clinical proteomic analysis. *Clinica Chimica Acta*, 2007. 376(1): p. 101-107.
11. Negishi A, M.M., Ono M, Honda K, Shitashige M, Satow R, Sakuma T, Kuwabara H, Nakanishi Y, Kanai Y, Omura K, Hirohashi S, Yamada T, Quantitative proteomics using formalin-fixed paraffin-embedded tissues of oral squamous cell carcinoma. *Cancer Sci*, 2009. 100(9): p. 1605–1611.

- 12.Regezi J. A., S.J.J., Jordan R. C. K, Oral Pathology-Clinical Pathologic Considerations. 4 ed. 2003: Saunders.
- 13.Dias GS, A.A., A histological and clinical study on oral cancer: Descriptive analyses of 365 cases. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*, 2007. 12(7): p. 474-478.
- 14.Dowling P, W.R., Meleady P, Henry M, Curran A, Clynes M, Analysis of the saliva proteome from patients with head and neck squamous cell carcinoma reveals differences in abundance levels of proteins associated with tumour progression and metastasis. *J Proteomics*, 2008. 71(2): p. 168-175.
- 15.Li Y, S.J.M., Zhou X, Kim Y, Sinha U, Jordan RC, Eisele D, Abemayor E, Elashoff D, Park NH, Wong DT, Salivary Transcriptome Diagnostics for Oral Cancer Detection. *Clin Cancer Res*, 2004. 10(24): p. 8442-8450.
- 16.R., R., Diagnostic Potential of Genomic and Proteomic Signatures in Oral Cancer. *Int J Hum Genet*, 2007. 7(1): p. 57-66.
- 17.Warnakulasuriya S, J.N., van der Waal I, Nomenclature and classification of potentially malignant disorders of the oral mucosa. *J Oral Pathol Med*, 2007. 36(10): p. 575-580.
- 18.I, v.d.W., Potentially malignant disorders of the oral and oropharyngeal mucosa; terminology, classification and present concepts of management. *Oral Oncol*, 2009. 45(4): p. 317-323.
- 19.Warnakulasuriya S, R.J., Bouquot J, Dabelsteen E, Oral epithelial dysplasia classification systems: predictive value, utility, weaknesses and scope for improvement. *J Oral Pathol Med* 2008. 37(3): p. 127-133.
- 20.Amagasa T, Y.M., Uzawa N, Oral premalignant lesions: from a clinical perspective. *Int J Clin Oncol* 2011. 16(1): p. 5-14.
- 21.Wu X, L.S., Lee JJ, Zhu Y, Wei QV, Thomas M, Hong WK, Spitz MR, Chromosome Instability in Lymphocytes: A Potential Indicator of Predisposition to Oral Premalignant Lesions. *Cancer Research*, 2002. 62(10): p. 2813-2818.
- 22.Cruz I, N.S., van der Waal I, Snijders PJ, Walboomers JM, Lamey PJ, Cowan CG, Gregg TA, Maxwell P, Meijer CJ, Suprabasal p53 immunoreexpression is strongly associated with high grade dysplasia and risk for malignant transformation in potentially malignant oral lesions from Northern Ireland. *J Clin Pathol*, 2002. 55(2): p. 98-104.
- 23.L, M., Can molecular assessment improve classification of head and neck premalignancy? *Clin Cancer Res*, 2000. 6(2): p. 321-322.

- 24.G, J., Using biomarkers to detect oral cancers holds potential for saving lives when cancer is most curable. *Biomark Med*, 2010. 4(6): p. 835-838.
- 25.J, R., Prognosis of oral pre-malignant lesions: significance of clinical, histopathological, and molecular biological characteristics. *Crit Rev Oral Biol Med*, 2003. 14(1): p. 47-62.
- 26.Kim J, S.D., El-Naggar A, Lee JS, Corrales C, Lippman SM, Hong WK, Hittelman WN, Chromosome Polysomy and Histological Characteristics in Oral Premalignant Lesions. *Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention*, 2001. 10(4): p. 319-325.
- 27.Rai B, K.J., Jacobs R, Singh J, Possible action mechanism for curcumin in pre-cancerous lesions based on serum and salivary markers of oxidative stress. *J Oral Sci*, 2010. 52(2): p. 251-256.
- 28.Abrahao AC, B.B., Nunes FD, Dias EP, Cabral MG, Immunohistochemical expression of p53, p16 and hTERT in oral squamous cell carcinoma and potentially malignant disorders. *Braz Oral Res*, 2011. 25(1): p. 31-41.
- 29.Santos-García A, A.-H.M., Fonseca-Sánchez E, Cruz-Hernández JJ, Bullón-Sopelana A, Proteic expression of p53 and cellular proliferation in oral leukoplakias. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2005. 10(1): p. 5-8.
- 30.Walk E., W.S., Recently Identified Biomarkers That Promote Lymph Node Metastasis in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Cancers*, 2011. 3: p. 747-772.
- 31.Igney FH, K.P., Death and Anti-Death: Tumour Resistance to Apoptosis. *Nat Rev Cancer*, 2002. 2(4): p. 277-288.
- 32.Gu S, L.Z., Pan S, Jiang Z, Lu H, Amit O, Bradbury EM, Hu CA, Chen X, Global Investigation of p53-induced Apoptosis Through Quantitative Proteomic Profiling Using Comparative Amino Acid-coded Tagging. *Mol Cell Proteomics*, 2004. 3(10): p. 998-1008.
- 33.Rufini A, M.G., Cell death pathology: The war against cancer. *Biochem Biophys Res Commun*, 2011. 414(3): p. 445-450.
- 34.Grivicich I., R.A., Brondani A., Apoptosis: Programmed Cell Death. *Revista Brasileira de Cancerologia* 2007. 53(3): p. 335-343.
- 35.Plati J, B.O., Khosravi-Far R, Apoptotic cell signaling in cancer progression and therapy. *Integr Biol (Camb)*. 2011. 3(4): p. 279-296.
- 36.Greabu M, B.M., Mohora M, Totan A, Didilescu A, Spinu T, Totan C, Miricescu D, Radulescu R, Saliva – a diagnostic window to the body, both in health and in disease. *J Med Life*, 2009. 2(2): p. 124-132.

37. Miller CS, F.J., Bailey AL, Campell CL, Humphries RL, Christodoulides N, Floriano PN, Simmons G, Bhagwandin B, Jacobson JW, Redding SW, Ebersole JL, McDevitt JT, Current developments in salivary diagnostics. *Biomark Med.* , 2010. 4(1): p. 171–189.
38. Rosa N, C.M., Arrais JP, Lopes P, Melo J, Oliveira JL, Barros M, From the salivary proteome to the OralOme: Comprehensive molecular oral biology. *Arch Oral Biol*, 2012.
39. Yamada N., Y.R., Suzuki E., The Current Status and Future Prospects of the Salivary Proteome. *Journal of Health Science*, 2009. 55(5): p. 682-688.
40. Turner RJ, S.H., Understanding salivary fluid and protein secretion. *Oral Dis*, 2008. 8(1): p. 3-11.
41. Kaufman E, L.I., The diagnostic applications of saliva--a review. *Crit Rev Oral Biol Med* 2002. 13(2): p. 197-212
42. Kowk, R., Studying the mouth, including the diagnostic potential of saliva, is offering opportunities to explore overall health. *Nature*, 2012. 486: p. 147-148.
43. J.M. Lee, E.G., D.T. Wong, Salivary diagnostics. *Orthod Craniofac Res.* , 2009. 12(3): p. 206–211.
44. Yang LL, L.X., Liu W, Cheng B, Li MT, Comparative analysis of whole saliva proteomes for the screening of biomarkers for oral lichen planus. *Inflamm Res* 2006. 55 (10): p. 405-407.
45. Boja E, H.T., Rivers R, Kinsinger C, Rahbar A, Mesri M, Rodriguez H, Evolution of Clinical Proteomics and its Role in Medicine. *J Proteome Res*, 2010. 10(1): p. 66–84.
46. Kulasingam V, D.E., Strategies for discovering novel cancer biomarkers through utilization of emerging technologies. *Nat Clin Pract Oncol*, 2008. 5(10): p. 588-599.
47. Abu-Asab MS, C.M., Alesci S, Galli S, Laassri M, Cheema AK, Atouf F, VanMeter J, Amri H, Biomarkers in the Age of Omics: Time for a Systems Biology Approach. *OMICS*, 2011. 15(3): p. 105-112.
48. Silberring J, C.P., Biomarker discovery and clinical proteomics. *Trends Analyt Chem.* , 2010. 29(2): p. 128.
49. Negm RS, V.M., Srivastava S, The promise of biomarkers in cancer screening and detection. *Trends Mol Med*, 2002. 8(6): p. 288-293.
50. Turatti E, d.C.N.A., de Magalhães MH, de Sousa SO, Assessment of c-Jun, c-Fos and cyclin D1 in premalignant and malignant oral lesions. *J Oral Sci*, 2005. 47(2): p. 71-76.

51. Khanna SS, K.F., Circulating Immune Complexes and trace elements (Copper, Iron and Selenium) as markers in oral precancer and cancer: a randomised, controlled clinical trial *Head and Face Medicine*, 2006. 2: p. 33.
52. Califano J, W.W., Koch W, Meininger G, Reed A, Yip L, Boyle JO, Lonardo F, Sidransky D, Unknown primary head and neck squamous cell carcinoma: molecular identification of the site of origin. *J Natl Cancer Inst* 1999. 91(7): p. 599-604.
53. Hu YC, S.D., Ahrendt SA, Molecular detection approaches for smoking associated tumors. *Oncogene*, 2002. 21(48): p. 7289-7297.
54. Califano J, A.S., Meininger G, Westra WH, Koch WM, Sidransky D, Detection of telomerase activity in oral rinses from head and neck squamous cell carcinoma patients. *Cancer Res*, 1996. 56(24): p. 5720-5722.
55. Wadsworth JT, S.K., Stack BC Jr, Cazares L, Malik G, Adam BL, Wright GL Jr, Semmes OJ, Identification of patients with head and neck cancer using serum protein profiles. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.*, 2004. 130(1): p. 98-104.
56. Chatterjee SK, Z.B., Cancer biomarkers: knowing the present and predicting the future. *Future Oncol*, 2005. 1(1): p. 37-50.
57. Ioannidis JP, K.M., Improving Validation Practices in "Omics" Research *Science*, 2011. 334(6060): p. 1230-1232.
58. Abu-Farha M, E.F., Zhou H, Tian R, Zhou H, Asmer MS, Figeys D, Proteomics: From Technology Developments to Biological Applications. *Anal. Chem*, 2009. 81(12): p. 4585–4599.
59. He QY, C.J., Kung HF, Yuen AP, Chiu JF, Identification of tumor-associated proteins in oral tongue squamous cell carcinoma by proteomics. *Proteomics*, 2004. 4(1): p. 271–278.
60. Ideker T, S.R., Protein networks in disease. *Genome Res.*, 2008. 18(4): p. 644-652
61. Kato H, U.K., Onda T, Kato Y, Saito K, Nakashima D, Ogawara K, Bukawa H, Yokoe H, Tanzawa H, Down-regulation of ID-myo-inositol 1,4,5-triphosphate 3-kinase A protein expression in oral squamous cell carcinoma. *Int J Oncol* 2006. 28(4): p. 873-881.
62. Thomas PD, C.M., Kejariwal A, Mi H, Karlak B, Daverman R, Diemer K, Muruganujan A, Narechania A, PANTHER: A Library of Protein Families and Subfamilies Indexed by Function. *Genome Res.*, 2003. 13(9): p. 2129-2141

- 63.Szkarczyk D, F.A., Kuhn M, Simonovic M, Roth A, Minguéz P, Doerks T, Stark M, Muller J, Bork P, Jensen LJ, von Mering C, The STRING database in 2011: functional interaction networks of proteins, globally integrated and scored. *Nucleic Acids Res*, 2011. 39.
- 64.Kanehisa M, G.S., KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. *Nucleic Acids Research*, 2000. 28(1): p. 27-30.
- 65.Collins FS, M.V., Implications of the Human Genome Project for Medical Science. *JAMA*, 2001. 285(5): p. 540-544.
- 66.Hamidi S, S.T., Kainulainen T, Epstein J, Lerner K, Larjava H, Expression of alpha(v)beta6 integrin in oral leukoplakia. *Br J Cancer*, 2000. 82(8): p. 1433-1440.
- 67.Chen HH, Y.C., Wang JT, Liu BY, Wang YP, Sun A, Tsai TC, Chiang CP, Expression of human telomerase reverse transcriptase (hTERT) protein is significantly associated with the progression, recurrence and prognosis of oral squamous cell carcinoma in Taiwan. *Oral Oncol*, 2007. 43(2): p. 122-127.
- 68.Pannone G, D.M.S., Zamparese R, Metafora S, Serpico R, Morelli F, Rubini C, Farina E, Carteni M, Staibano S, De Rosa G, Lo Muzio L, Bufo P, Prognostic value of human telomerase reverse transcriptase gene expression in oral carcinogenesis. *Int J Oncol*, 2007. 30(6): p. 1349-1357.
- 69.Leethanakul C, P.V., Gillespie J, Pallente M, Ensley JF, Koontongkaew S, Liotta LA, Emmert-Buck M, Gutkind JS, Distinct pattern of expression of differentiation and growth-related genes in squamous cell carcinomas of the head and neck revealed by the use of laser capture microdissection and cDNA arrays. *Oncogene*, 2000. 19(28): p. 3220-3224.
- 70.Jin G, K.H., Hirsch SA, Zeng C, Jia X, Feng Z, Ghosh SK, Zheng QY, Zhou A, McIntyre TM, Weinberg A, An Antimicrobial Peptide Regulates Tumor-Associated Macrophage Trafficking via the Chemokine Receptor CCR2, a Model for Tumorigenesis. *PLoS ONE* 2010. 5(6).
- 71.Lin CY, H.H., Kuo RC, Chiang CP, Kuo MY, Survivin expression predicts poorer prognosis in patients with areca quid chewing-related oral squamous cell carcinoma in Taiwan. *Oral Oncol*, 2005. 41(6): p. 645-654.
- 72.Nomura H, U.K., Yamano Y, Fushimi K, Ishigami T, Kato Y, Saito K, Nakashima D, Higo M, Kouzu Y, Ono K, Ogawara K, Shiiba M, Bukawa H, Yokoe H, Tanzawa H, Network-based analysis of calcium-binding protein genes identifies Grp94 as a target in human oral carcinogenesis. *Br J Cancer*, 2007. 97(6): p. 792-801.

73. Pettus JR, J.J., Shi Z, Davis JW, Koblinski J, Ghosh S, Liu Y, Ravosa MJ, Frazier S, Stack MS, Multiple kallikrein (KLK 5, 7, 8, and 10) expression in squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Histol Histopathol* 2009. 24(2): p. 197-207.
74. Li J, K.T., Kresty LA, Zhang Z, Lang JC, Schuller DE, Weghorst CM, Gankyrin, A Biomarker for Epithelial Carcinogenesis, Is Overexpressed in Human Oral Cancer. *Anticancer Res*, 2011. 31(9): p. 2683-2692.
75. Häyry V, M.L., Atula T, Sariola H, Mäkitie A, Leivo I, Keski-Säntti H, Lundin J, Haglund C, Hagström J, Bmi-1 expression predicts prognosis in squamous cell carcinoma of the tongue. *Br J Cancer*, 2010. 102(5): p. 892-897.
76. Roesch-Ely M, N.M., Karsai S, Ruess A, Bogumil R, Warnken U, Schnölzer M, Dietz A, Plinkert PK, Hofele C, Bosch FX, Proteomic analysis reveals successive aberrations in protein expression from healthy mucosa to invasive head and neck cancer. *Oncogene*, 2007. 26(1): p. 54-64.
77. St John MA, L.Y., Zhou X, Denny P, Ho CM, Montemagno C, Shi W, Qi F, Wu B, Sinha U, Jordan R, Wolinsky L, Park NH, Liu H, Abemayor E, Wong DT, Interleukin 6 and Interleukin 8 as Potential Biomarkers for Oral Cavity and Oropharyngeal Squamous Cell Carcinoma. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* , 2004. 130(8): p. 929-935.
78. Matthias C, M.B., Berghaus A, Gires O, Keratin 8 expression in head and neck epithelia. *BMC Cancer*, 2008. 8: p. 267.
79. Ralhan R, D.L., Matta A, Chandra Tripathi S, Ghanny S, Datta Gupta S, Bahadur S, Siu KW, Discovery and Verification of Head-and-neck Cancer Biomarkers by Differential Protein Expression Analysis Using iTRAQ Labeling, Multidimensional Liquid Chromatography, and Tandem Mass Spectrometry. *Mol Cell Proteomics*, 2008. 7(6): p. 1162-1173.
80. Choi P, J.C., Mendez E, Houck J, Yueh B, Farwell DG, Futran N, Chen C, Examination of Oral Cancer Biomarkers by Tissue Microarray Analysis. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.*, 2008. 134(5): p. 539-546.
81. Santos-García A, A.-H.M., Fonseca-Sánchez E, Julián-González R, Galindo-Villardón P, Cruz-Hernández JJ, Bullón-Sopelana A, E-cadherin, laminin and collagen IV expression in the evolution from dysplasia to oral squamous cell carcinoma. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*, 2006. 11(2): p. 100-105.

82. Bloor BK, S.S., Morgan PR, Gene expression of differentiation-specific keratins in oral epithelial dysplasia and squamous cell carcinoma. *Oral Oncol*, 2001. 37(3): p. 251–261.
83. Mack B, G.O., CD44s and CD44v6 Expression in Head and Neck Epithelia. *PLoS ONE* 2008. 3(10).
84. Jackson LL, W.Z., Hessler RB, Abdelsayed R, Rogers JB, Gourin CG, Quantitative Analysis of Syndecan-1 Expression in Dysplasia and Squamous Cell Carcinoma of the Oral Cavity. *Laryngoscope*, 2007. 117(5): p. 868–871.
85. Watanabe S, S.K., Okazaki Y, Tonogi M, Tanaka Y, Yamane GY, Activation of PI3K-AKT Pathway in Oral Epithelial Dysplasia and Early Cancer of the Tongue. *Bull Tokyo Dent Coll*, 2009. 50(3): p. 125-133.
86. Shibata M, K.I., Osaki M, Araki K, Adachi H, Ryoke K, Ito H, Cyclo-oxygenase-1 and -2 expression in human oral mucosa, dysplasias and squamous cell carcinomas and their pathological significance. *Oral Oncol*, 2005. 41(3): p. 304–312.
87. Molinolo AA, A.P., Squarize CH, Castilho RM, Patel V, Gutkind JS, Dysregulated Molecular Networks in Head and Neck Carcinogenesis. *Oral Oncol*, 2007. 45(4): p. 324-334.
88. Freitas Rde A, S.E., Silveira JP, Silva FM, Amorim RF, Correlation of β -catenin expression and metastasis in tongue squamous cell carcinoma. *Acta Cir Bras*, 2010. 25(6): p. 513-517.
89. Torres-Rendon A, R.S., Craig GT, Speight PM, Expression of Mcm2, geminin and Ki67 in normal oral mucosa, oral epithelial dysplasias and their corresponding squamous-cell carcinomas. *Br J Cancer*, 2009. 100(7): p. 1128 – 1134.
90. Montebugnoli L, F.L., Gissi DB, Cervellati F, Servidio D, Marchetti C, Prati C, Flamminio F, Foschini MP, Predictive Role of p53 Protein as a Single Marker or Associated to Ki67 Antigen in Oral Carcinogenesis. *Open Dent J*, 2008. 2: p. 24-29.
91. Kawsar HI, W.A., Hirsch SA, Venizelos A, Howell S, Jiang B, Jin G, Overexpression of human b-defensin-3 in oral dysplasia: Potential role in macrophage trafficking. *Oral Oncol*, 2009. 45(8): p. 696–702.
92. Taoudi Benchekroun M, S.P., Thomas SM, El-Naggat AK, Papadimitrakopoulou V, Ren H, Lang W, Fan YH, Huang J, Feng L, Lee JJ, Kim ES, Hong WK, Johnson FM, Grandis JR, Mao L, Epidermal Growth Factor Receptor Expression and Gene Copy Number in the Risk of Oral Cancer. *Cancer Prev Res*, 2010. 3(7): p. 800-809.

93. Begum S, Z.Y., Shintani T, Toratani S, Sato JD, Okamoto T, Immunohistochemical expression of heparin-binding protein 17/ fibroblast growth factor-binding protein-1 (HBp17/FGFBP-1) as an angiogenic factor in head and neck tumorigenesis. *Oncol Rep*, 2007. 17(3): p. 591-596.
94. Baker H, P.V., Molinolo AA, Shillitoe EJ, Ensley JF, Yoo GH, Meneses-García A, Myers JN, El-Naggar AK, Gutkind JS, Hancock WS, Proteome-wide analysis of head and neck squamous cell carcinomas using laser-capture microdissection and tandem mass spectrometry. *Oral Oncol*, 2005. 41(2): p. 183–199.
95. Kooren JA, R.N., Tang C, Jagtap PD, Horrigan BJ, Griffin TJ, Evaluating the potential of a novel oral lesion exudate collection method coupled with mass spectrometry-based proteomics for oral cancer biomarker discovery. *Clinical Proteomics*, 2011. 8(13).
96. Chiang CP, L.M., Liu BY, Wang JT, Leu JS, Hahn LJ, Kuo MY, Expression of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) in oral submucous fibrosis, oral epithelial hyperkeratosis and oral epithelial dysplasia in Taiwan. *Oral Oncol*, 2000. 36(4): p. 353-359.
97. Brennan PA, U.T., Wilson AW, Mellor TK, Expression of Type 2 Nitric Oxide Synthase and Vascular Endothelial Growth Factor in Oral Dysplasia. *J Oral Maxillofac Surg* 2002. 60(12): p. 455-1460.
98. Kresty LA, M.S., Knobloch TJ, Song H, Lloyd M, Casto BC, Weghorst CM, Alterations of p16INK4a and p14ARF in Patients with Severe Oral Epithelial Dysplasia. *Cancer Res*, 2002. 62(18): p. 5295-5300.
99. Bradley KT, B.S., Logani S, Immunohistochemical detection of p16INK4a in dysplastic lesions of the oral cavity. *Mod Pathol*, 2006. 19(10): p. 1310–1316.
100. Saintigny P, E.-N.A., Papadimitrakopoulou V, Ren H, Fan YH, Feng L, Lee JJ, Kim ES, Hong WK, Lippman SM, Mao L, Np63 Overexpression, alone and in combination with other biomarkers, predicts the development of oral cancer in patients with leukoplakia. *Clin Cancer Res*, 2009. 15(19): p. 6284-6291.
101. Ebrahimi M, B.L., Coates PJ, Wahlin YB, Bourdon JC, Nylander K, Expression of novel p53 isoforms in oral lichen planus. *Oral Oncol*, 2008. 44(2): p. 156-161.
102. Prado SM, C.J., Rey RL, Villaamil VM, García AA, Ayerbes MV, Aparicio LA, Evaluation of COX-2, EGFR, and p53 as biomarkers of non-dysplastic oral leukoplakias. *Exp Mol Pathol.*, 2010. 89(2): p. 197-203.

- 103.Nagpal JK, M.R., Das BR, Activation of Stat-3 as one of the early events in tobacco chewing-mediated oral carcinogenesis. *Cancer* 2002. 94(9): p. 2393-2400.
- 104.Vered M, A.I., Dayan D, Maspin, p53, p63, and Ki-67 in epithelial lesions of the tongue: from hyperplasia through dysplasia to carcinoma. *J Oral Pathol Med*, 2009. 38(3): p. 314-320.
- 105.Wenghoefer M, P.A., Najafi T, Deschner J, Allam JP, Novak N, Reich R, Martini M, Bergé S, Fischer HP, Jepsen S, Winter J, Gene expression of oncogenes, antimicrobial peptides, and cytokines in the development of oral leukoplakia. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 2010. 110(3): p. 351-356.
- 106.Poomsawat S, B.W., Khovidhunkit SO, Punyasingh J, Alteration in the expression of cdk4 and cdk6 proteins in oral cancer and premalignant lesions. *J Oral Pathol Med*, 2010. 39(10): p. 793-799.
- 107.Mishra R, D.B., Early overexpression of Cdk4 and possible role of KRF and c-myc in chewing tobacco mediated oral cancer development. *Mol Biol Rep*, 2003. 30(4): p. 207-213.
- 108.Arellano-Garcia ME, H.S., Wang J, Henson B, Zhou H, Chia D, Wong DT, Multiplexed immunobead-based assay for detection of oral cancer protein biomarkers in saliva. *Oral Dis*, 2008. 14(8): p. 705-712.
- 109.Shintani S, H.H., Ueyama Y, Hatori M, Toyoshima T, Identification of a truncated cystatin SA-I as a saliva biomarker for oral squamous cell carcinoma using the SELDI ProteinChip platform. *Int J Oral Maxillofac Surg*, 2010. 39(1): p. 68-74.
- 110.Kaur J, S.M., Dattagupta S, Shukla NK, Srivastava A, Ralhan R, Clinical significance of phosphatidyl inositol synthase overexpression in oral cancer. *BMC Cancer*, 2010. 10: p. 168.
- 111.Kaur J, S.M., Dattagupta S, Shukla NK, Srivastava A, Ralhan R, Clinical significance of phosphatidyl inositol synthase overexpression in oral cancer. *BMC Cancer*, 2010. 10: p. 168.
- 111.Zhou A, Z.F., Chen JY, PEPPI: a peptidomic database of human protein isoforms for proteomics experiments. *BMC Bioinformatics*, 2010. 6.
- 112.Gerson KD, S.J., Maddula VS, Seligmann BE, Mercurio AM, Integrin β 4 regulates SPARC protein to promote invasion. *J Biol Chem*, 2012. 287(13): p. 9835-9844.
- 113.Metwaly HA, A.-G.M., Eletreby S, Ebrahim MA, El-Shishtawy MM, Relevance of Serum Levels of Interleukin-6 and Syndecan-1 in Patients with Hepatocellular Carcinoma. *Sci Pharm*, 2012. 80(1): p. 179-188.

- 114.Kahn N, M.M., Eberhardt R, Muley T, Schnabel PA, Bender C, Johannes M, Keitel D, Sültmann H, Herth FJ, Kuner R, Early detection of lung cancer by molecular markers in endobronchial epithelial-lining fluid. *J Thorac Oncol*, 2012. 7(6): p. 1001-1008.
- 115.Noguti J, D.M.C., Hossaka TA, Franco M, Oshima CT, Dedivitis RA, Ribeiro DA, The role of canonical WNT signaling pathway in oral carcinogenesis: a comprehensive review. *Anticancer Res*, 2012. 32(3): p. 873-878.
- 116.Chuang JY, Y.N., Chiang IP, Lai CH, Lin CD, Tang CH, Cyr61 increases matrix metalloproteinase-3 expression and cell motility in human oral squamous cell carcinoma cells. *J Cell Biochem*, 2012. 113(6): p. 1977-1986.
- 117.H., S.C., Maspin is a tumour suppressor that inhibits breast cancer tumour metastasis in vivo. *Breast Cancer Res* 2003. 4: p. 137-140.

ANEXOS

Nesta secção são apresentadas: a lista de proteínas de carcinoma espinocelular e lesões pré-malignas, organizadas de acordo com as diferentes fontes de recolha a partir das quais foram obtidas (Lista 1), a lista de proteínas de carcinoma espinocelular e lesões pré-malignas divididas de acordo com o componente celular (*cellular component*) a que pertencem (Lista 2) e lista de proteínas de carcinoma espinocelular e lesões pré-malignas divididas de acordo com as vias de sinalização celular (*pathways*) em que estão envolvidas (Lista 3), a lista de proteínas identificadas em carcinoma espinocelular e lesões pré-malignas da cavidade oral, elaborada para o desenvolvimento deste trabalho (Tabela I),

Lista 1: Lista de proteínas de carcinoma espinocelular e lesões pré-malignas, organizadas de acordo com as diferentes fontes de recolha a partir das quais foram obtidas.

Carcinoma

Língua: *C-Myc-binding protein, Catenin beta-1 , Polycomb complex protein BMI-1 , Zinc finger protein SNAI1*

Mucosa: *Integrin beta-1-binding protein 1 , Telomerase reverse transcriptase , Protein Wnt-9a , Beta-defensin 4A , Baculoviral IAP repeat-containing protein 5, Group 10 secretory phospholipase A2 , Kallikrein-10, Kallikrein-8 , 26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 10, Zinc finger protein SNAI1 Cystatin-A, Proto-oncogene c-Fos, Collagen alpha-1(IV) chain, Annexin A1, Protein S100-A8, Transcription factor AP-1 , Keratin, type II cytoskeletal 8, Integrin alpha-V, Heat shock 70 kDa protein 1A/1B, Heat shock protein HSP 90-beta, Annexin A5, Glutathione S-transferase P, SPARC, Annexin A4 , C-C motif chemokine 3, Annexin A3, Cadherin-1, C-C motif chemokine 2 , C-C motif chemokine 5, Keratin, type I cytoskeletal 10, Keratin, type I cytoskeletal 13, Annexin A8, CD44 antigen, Integrin beta-4, Syndecan-1, Keratin, type II cytoskeletal 4, Cadherin-3 , Prostaglandin G/H synthase 1, Inositol-trisphosphate 3-kinase A, G1/S-specific cyclin-D1 , Tenascin, Protein S100-A2, Protein S100-A7, 14-3-3 protein sigma, Protein S100-A11, Catenin beta-1, Polycomb complex protein BMI-1, Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A, isoforms 1/2/3 ,*

Antigen KI-67, Stromal cell-derived factor 1, Placenta growth factor, Kallikrein-7, Cadherin-11, Neutrophil defensin 1, Neutrophil defensin 3, Proteasome activator complex subunit 3, Histone H4, C-C motif chemokine 7, Beta-defensin 103, Proteasome activator complex subunit 1, Protein-glutamine gamma-glutamyltransferase E, Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 1, Fibroblast growth factor-binding protein 1, Periostin, C-C motif chemokine 14, C-C motif chemokine 15, Phosphatidylinositol 3-kinase catalytic subunit type 3, Protein S100-A16, C-Myc-binding protein, C-C motif chemokine 13, PRKCA-binding protein, Proteasome activator complex subunit 2, Kallikrein-5, Protein Wnt-6

Saliva total:*Interleukin-6, Interleukin-8, CD44 antigen*

Glândulas submandibular e sublingual: *Cystatin-A*

Lesões pré-malignas

Língua: *Keratin, type I cytoskeletal 13, Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A, isoforms 1/2/3*

Mucosa:*Phosphatidylinositol 3-kinase catalytic subunit type 3, Keratin, type II cytoskeletal 8, Integrin alpha-V, Cadherin-1, Telomerase protein component 1, Integrin alpha-V, Integrin beta-1-binding protein 1, Telomerase reverse transcriptase, Baculoviral IAP repeat-containing protein 5, Group 10 secretory phospholipase A2, 26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 10, Annexin A1, Cellular tumor antigen p53, Protein S100-A8, Transcription factor AP-1, Stromelysin-1, Keratin, type I cytoskeletal 19, Annexin A5, Annexin A4, C-C motif chemokine 3, Proliferating cell nuclear antigen, Annexin A3, X-ray repair cross-complementing protein 6, X-ray repair cross-complementing protein 5, C-C motif chemokine 2, C-C motif chemokine 5, Keratin, type I cytoskeletal 10, Keratin, type I cytoskeletal 13, Annexin A8, NAD(P)H dehydrogenase [quinone] 1, Vascular endothelial growth factor A, CD44 antigen, Integrin beta-4, Syndecan-1, Keratin, type II cytoskeletal 4, Prostaglandin G/H synthase 1, Protein S100-A11, Nitric oxide synthase, inducible Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A, isoforms 1/2/3, Antigen KI-67, Stromal cell-derived factor 1, DNA replication licensing factor MCM2, Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein M, Proteasome activator complex subunit 3, Neutrophil gelatinase-associated lipocalin, Fibroblast growth factor-binding protein 1, C-C motif chemokine 14, C-C motif chemokine 15, Podoplanin, Protein S100-A16, C-C motif chemokine 13, Tumor protein 63, Interleukin-36 alpha, Proteasome activator complex subunit 2*

Saliva Total: *Protein S100-A8*, *X-ray repair cross-complementing protein 6*, *X-ray repair cross-complementing protein 5*, *NAD(P)H dehydrogenase [quinone] 1*, *Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein M*, *Neutrophil gelatinase-associated lipocalin*, *Interleukin-36 alpha*

Lista 2: Lista de proteínas de carcinoma espinocelular e lesões pré-malignas organizadas de acordo com o componente celular a que pertencem.

Carcinoma

Intracelular (intracellular): *Keratin, type II cytoskeletal 8*; *Keratin, type I cytoskeletal 13*; *Catenin beta-1*

Membrana plasmática (plasma membrane): *CD44 antigen*

Extracelular (extracellular): *Integrin beta-4*; *Syndecan-1*; *Tenascin*; *Protein Wnt-9^a*

Lesões pré-malignas

Intracelular (intracellular): *Keratin, type II cytoskeletal 8*; *Keratin, type I cytoskeletal 13*; *Keratin, type I cytoskeletal 10*; *Keratin, type II cytoskeletal 4*; *Syndecan-1*; *Keratin, type I cytoskeletal 19*

Membrana plasmática (plasma membrane): *CD44 antigen*

Extracelular (extracellular): *Integrin beta-4*; *Syndecan-1*; *Stromelysin-1*

Complexo ribonucleoproteico (ribonucleoprotein complex): *Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein M*

Lista 3: Lista de proteínas de carcinoma espinocelular e lesões pré-malignas organizadas de acordo com os processos biológicos em que estão envolvidas

Carcinoma

Adesão celular (cellular adhesion): *Catenin beta-1*

Processos do sistema imológico (immune system process): *Kallikrein-10*, *Glutathione S-transferase P*, *Protein S100-A2*, *Beta-defensin 2*, *Interleukin-6*, *CCL5*, *Prostaglandin G/H synthase 1*, *CCL15*, *C-C motif chemokine 2*, *CCL14*, *Heat shock 70 kDa protein 1*, *Protein S100-A8*, *Heat shock protein HSP 90-beta*, *MIP-1-alpha*, *Annexin A8*, *Integrin beta-4*, *Syndecan-1*, *Placenta growth factor*, *C-C motif chemokine 7*, *Proto-oncogene protein c-fos*

Ciclo celular (cell cycle): *Kallikrein-8, Protein S100-A2, Kallikrein-7, Protein S100-A7, G1/S-specific cyclin-D1, Transcription factor AP-1, Placenta growth factor, Protein S100-A16, Proto-oncogene protein c-fos, 14-3-3 protein sigma, Protein S100-A11*

Processos metabólicos (metabolic process): *Kallikrein-10, Kallikrein-8, Zinc finger protein SNAI1, Annexin A1, Annexin A5, Annexin A4, Kallikrein-7, Proteasome activator complex subunit 2, Beta-defensin 2, Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 1, Protein S100-A7, Proteasome activator complex subunit 1, Heat shock 70 kDa protein 1, Histone H4, C-Myc-binding protein, Kallikrein-5, Telomerase reverse transcriptase, Transcription factor AP-1, Heat shock protein HSP 90-beta, Annexin A8, Phosphatidylinositol 3-kinase catalytic subunit type 3, Proteasome activator complex subunit 3, Protein S100-A16, Proto-oncogene protein c-fos, Annexin A3, Polycomb complex protein BMI-1, Beta-defensin 103, Group 10 secretory phospholipase A2, 26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 10, Cystatin-A, Protein S100-A11*

Processos do desenvolvimento (developmental process): *Kallikrein-8, Keratin, type II cytoskeletal 8, Kallikrein-7, Keratin, type I cytoskeletal 13, Cadherin-11, Periostin, Keratin, type I cytoskeletal 10, Keratin, type II cytoskeletal 4, Syndecan-1, Tenascin, Placenta growth factor, Proto-oncogene protein c-fos, IL-8*

Processos homeostáticos (homeostatic process): *CCL15, HCC-1*

Resposta a estímulos (response to stimulus): *Kallikrein-10, Glutathione S-transferase P, Beta-defensin 2, CCL5, CCL15, C-C motif chemokine 2, CCL14, Heat shock 70 kDa protein 1, Heat shock protein HSP 90-beta, CCL3, Annexin A8, Integrin beta-4, Placenta growth factor, C-C motif chemokine 7, Beta-defensin 103, C-C motif chemokine 13, short chain, IL-8*

Reprodução (reproduction): *G1/S-specific cyclin-D1*

Processos do sistema celular (system process): *Periostin*

Apoptose (apoptosis): *Baculoviral IAP repeat-containing protein 5, Interleukin-6, Phosphatidylinositol 3-kinase catalytic subunit type 3*

Organização do component celular (cellular component organization): *Keratin, type II cytoskeletal 8, Keratin, type I cytoskeletal 13, Histone H4, Keratin, type I cytoskeletal 10, Keratin, type II cytoskeletal 4*

Transporte (transport): *Annexin A1, Annexin A5, Annexin A4, Annexin A8, Phosphatidylinositol 3-kinase catalytic subunit type 3, Annexin A3*

Comunicação celular (cell communication): *Annexin A1, Annexin A5, Annexin A4, Protein S100-A2, Interleukin-6, CCL5, CCL15, CCL2, Catenin beta-1, Cadherin-11, CCL14, Protein Wnt-6, Periostin, Protein S100-A8, Transcription factor AP-1, Annexin A8, CCL3, Phosphatidylinositol 3-kinase catalytic subunit type 3, PRKCA-binding protein, Integrin beta-4, Syndecan-1, Tenascin, Placenta growth factor, Protein S100-A16, CCL7, Protein Wnt-9^a, Annexin A3, E-Cad/CTF3, CD44 antigen, Cadherin-3, 14-3-3 protein sigma, CCL13, Group 10 secretory phospholipase A2, IL-8*

Lesões pré-malignas

Adesão celular (cell adhesion): *Integrin alpha-V light chain, Integrin beta-4, Syndecan-1, E-Cad/CTF3, CD44 antigen*

Processos do sistema imunológico (immune system process): *Neutrophil gelatinase-associated lipocalin, Interleukin-1 family member 6, ATP-dependent DNA helicase 2 subunit 1, Prostaglandin G/H synthase 1, CCL5, CCL15, CCL2, CCL14, Protein S100-A8, CCL3, Annexin A8, ATP-dependent DNA helicase 2 subunit 2, Vascular endothelial growth factor A, Integrin beta-4, Syndecan-1, CD44 antigen, CCL13*

Ciclo celular (cell cycle): *Cellular tumor antigen p53, Tumor protein 63, JUN, Vascular endothelial growth factor A, Protein S100-A16, Proliferating cell nuclear antigen, Protein S100-A11, DNA replication licensing factor MCM2*

Processos metabólicos (metabolic process): *Telomerase protein component 1, Annexin A5, Annexin A4, Neutrophil gelatinase-associated lipocalin, Proteasome activator complex subunit 2, Cellular tumor antigen p53, ATP-dependent DNA helicase 2 subunit 1, Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein M, Tumor protein 63, Nitric oxide synthase, inducible, Phosphatidylinositol 3-kinase catalytic subunit type 3, Telomerase reverse transcriptase, JUN, Annexin A8, ATP-dependent DNA helicase 2 subunit 2, Proteasome activator complex subunit 3, Protein S100-A16, Proliferating cell nuclear antigen, Annexin A3, Group 10 secretory phospholipase A2, 26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 10, Stromelysin-1, Protein S100-A11, DNA replication licensing factor MCM2*

Produção de energia e percursores metabólicos (generation of precursor metabolites and energy): *Nitric oxide synthase, inducible*

Processos de desenvolvimento (developmental process): *Keratin, type II cytoskeletal 8, Keratin, type I cytoskeletal 13, Keratin, type I cytoskeletal 10, Keratin, type II cytoskeletal 4, Vascular endothelial growth factor A, Syndecan-1, Keratin, type I cytoskeletal 19*

Processos de homeostasia (homeostatic process): *CCL15, CCL14*

Resposta a estímulos(response to stimulus): *Interleukin-1 family member 6, CCL5, CCL15, CCL2, CCL14, CCL3, Annexin A8, Vascular endothelial growth factor A, Integrin beta-4, CCL13*

Processos do sistema celular (system process):*Neutrophil gelatinase-associated lipocalin*

Apoptose (apoptosis): *Baculoviral IAP repeat-containing protein 5, Cellular tumor antigen p53*

Organização do component celular (cellular component organization): *Keratin, type II cytoskeletal 8, Keratin, type I cytoskeletal 13, Keratin, type I cytoskeletal 10, Keratin, type II cytoskeletal 4, Keratin, type I cytoskeletal 19*

Tranporte (transport): *Annexin A5, Annexin A4, Neutrophil gelatinase-associated lipocalin, Phosphatidylinositol 3-kinase catalytic subunit type 3, Annexin A8, Annexin A3*

Localização (localization): *Telomerase protein component 1*

Processos celulares (cellular process): *Keratin, type II cytoskeletal 8, Annexin A5, Annexin A4, Neutrophil gelatinase-associated lipocalin, Interleukin-1 family member 6, Cellular tumor antigen p53, CCL5, CCL15, CCL2, CCL14, Keratin, type I cytoskeletal 13, Tumor protein 63, Nitric oxide synthase, inducible, Phosphatidylinositol 3-kinase catalytic subunit type 3, Protein S100-A8, JUN, CCL3, Keratin, type I cytoskeletal 10, Annexin A8, Keratin, type II cytoskeletal 4, Integrin alpha-V light chain, Vascular endothelial growth factor A, Integrin beta-4, Syndecan-1, Protein S100-A16, E-Cad/CTF3, Keratin, type I cytoskeletal 19, Proliferating cell nuclear antigen, Annexin A3, CD44 antigen, CCL13, Group 10 secretory phospholipase A2, Protein S100-A11, DNA replication licensing factor MCM2*

Comunicação celular (cellular communication):*Annexin A5, Annexin A4, Neutrophil gelatinase-associated lipocalin, Interleukin-1 family member 6, CCL5, CCL15, CCL2, CCL14, Nitric oxide synthase, inducible, Phosphatidylinositol 3-kinase catalytic subunit type 3, Protein S100-A8, JUN, CCL3, Annexin A8, Annexin A8, Integrin beta-4, Syndecan-1, Protein S100-A16, E-Cad/CTF3, Annexin A3, CD44 antigen, CCL13, Group 10 secretory phospholipaseA2.*

Tabela I: Lista de proteínas identificadas até à data em carcinoma espinocelular e lesões pré-malignas da cavidade oral.

UniProtKB AC	Nome da proteína	SM/SL	Saliva Total	Mucosa	Língua	Saúde	Patologia (MeSH)	Quantificação	Faixa Etária	Género	Hábitos Sociais	Método de Recolha	Método de Análise	Tipo de estudo	Modificações pós-tradução	Biomarcador	OralCard	Referência
O14713	Integrin beta-1-binding protein 1			x			68009062	aumentada	Adultos			biópsia	imunofluorescência			x		10780523
O14735	CDP-diacylglycerol--inositol 3-phosphatidytransferase			x		x	68009062	aumentada	29-75			biópsia	<i>Tissue microarray (TMA), Western blotting, Confocal laser scan microscopy, RT-PCR, imunohistoquímica</i>					20426864
O14746	Telomerase reverse transcriptase			x		x	68009062	aumentada	59,1 - 65,25	M/F		biópsia	imunohistoquímica					21359449
O14746	Telomerase reverse transcriptase			x			68009062	aumentada	26-77	M/F		biópsia	imunohistoquímica			x		16798059
O14746	Telomerase reverse transcriptase						68009062	aumentada	42-81	M/F		biópsia	imunohistoquímica/ RT-PCR					17487355
O14904	Protein Wnt-9a			x		x	68009062	aumentada				biópsia	<i>laser capture microdissection</i>	proteómica		x		10918578
O15263	Beta-defensin 4A			x		x	68009062	diminuída				biópsia	imunohistoquímica				17614365	20544025
O15392	Baculoviral IAP repeat-			x			68009062	aumentada		M/F		biópsia	imunohistoquímica					15927524

UniProtKB AC	Nome da proteína	SM/SL	Saliva Total	Mucosa	Língua	Saúde	Patologia (MeSH)	Quantificação	Faixa Etária	Género	Hábitos Sociais	Método de Recolha	Método de Análise	Tipo de estudo	Modificações pós-tradução	Biomarcador	OralCard	Referência
	containing protein 5																	
O15496	Group 10 secretory phospholipase A2			x		x	68009062	aumentada	Adultos			biópsia	microarray analysis	proteómica		x		17726464
O43240	Kallikrein-10			x		x	68009062	aumentada	Adultos			biópsia	imunohist química/ RT-PCR				19118452	19085836
O43240	Kallikrein-10			x		x	68009062	aumentada	Adultos			biópsia	imunohist química/ RT-PCR				16103422	19085836
O43240	Kallikrein-10			x		x	68009062	aumentada	Adultos			biópsia	imunohist química/ RT-PCR				17614365	19085836
O43240	Kallikrein-10			x		x	68009062	aumentada	Adultos			biópsia	imunohist química/ RT-PCR				18361515	19085836
O43240	Kallikrein-10			x		x	68009062	aumentada	Adultos			biópsia	imunohist química/ RT-PCR				19297561	19085836
O43240	Kallikrein-10			x		x	68009062	aumentada	Adultos			biópsia	imunohist química/ RT-PCR				21299198	19085836
O43240	Kallikrein-10			x		x	68009062	aumentada	Adultos			biópsia	imunohist química/ RT-PCR				21936497	19085836
O60259	Kallikrein-8			x			68009062	aumentada	Adultos			biópsia	imunohist química				17614365	19085836
O75832	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 10			x		x	68009062	aumentada				biópsia	imunohist química			x		21868508
O95863	Zinc finger protein SNAIL			x	x		68009062		Adultos	M/F		biópsia	imunohist química			x		20145620

<i>UniProtKB AC</i>	Nome da proteína	SM/SL	Saliva Total	Mucosa	Língua	Saúde	Patologia (MeSH)	Quantificação	Faixa Etária	Gênero	Hábitos Sociais	Método de Recolha	Método de Análise	Tipo de estudo	Modificações pós-tradução	Biomarcador	OralCard	Referência
P01037	Cystatin-SN		x				68009062						<i>surface enhanced laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (SELDI-TOF)</i>	proteómica		x	20052393	19896329
P01037	Cystatin-SN		x				68009062						<i>surface enhanced laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (SELDI-TOF)</i>	proteómica		x	20585025	19896329
P01037	Cystatin-SN		x				68009062						<i>surface enhanced laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (SELDI-TOF)</i>	proteómica		x	21794177	19896329
P01037	Cystatin-SN		x				68009062						<i>surface enhanced laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (SELDI-TOF)</i>	proteómica		x	20215060	19896329

<i>UniProtKB AC</i>	Nome da proteína	SM/SL	Saliva Total	Mucosa	Língua	Saúde	Patologia (MeSH)	Quantificação	Faixa Etária	Género	Hábitos Sociais	Método de Recolha	Método de Análise	Tipo de estudo	Modificações pós-tradução	Biomarcador	OralCard	Referência
													<i>spectrometry (SELDI-TOF)</i>					
P01037	Cystatin-SN		x				68009062						<i>surface enhanced laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (SELDI-TOF)</i>	proteómica		x	17436266	19896329
P01037	Cystatin-SN		x				68009062						<i>surface enhanced laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (SELDI-TOF)</i>	proteómica		x	19253063	19896329
P01037	Cystatin-SN		x				68009062						<i>surface enhanced laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (SELDI-TOF)</i>	proteómica		x	15386514	19896329
P01037	Cystatin-SN		x				68009062						<i>surface enhanced</i>	proteómica		x	15473691	19896329

<i>UniProtKB AC</i>	Nome da proteína	SM/SL	Saliva Total	Mucosa	Língua	Saúde	Patologia (MeSH)	Quantificação	Faixa Etária	Gênero	Hábitos Sociais	Método de Recolha	Método de Análise	Tipo de estudo	Modificações pós-tradução	Biomarcador	OralCard	Referência
													<i>laser desorption /ionization time-of-flight mass spectrometry (SELDI-TOF)</i>					
P01037	Cystatin-SN		x				68009062						<i>surface enhanced laser desorption /ionization time-of-flight mass spectrometry (SELDI-TOF)</i>	proteómica		x	15485636	19896329
P01037	Cystatin-SN		x				68009062						<i>surface enhanced laser desorption /ionization time-of-flight mass spectrometry (SELDI-TOF)</i>	proteómica		x	15800970	19896329
P01037	Cystatin-SN		x				68009062						<i>surface enhanced laser desorption /ionization time-of-flight mass spectrometry</i>	proteómica		x	16103422	19896329

<i>UniProtKB AC</i>	Nome da proteína	SM/SL	Saliva Total	Mucosa	Língua	Saúde	Patologia (MeSH)	Quantificação	Faixa Etária	Gênero	Hábitos Sociais	Método de Recolha	Método de Análise	Tipo de estudo	Modificações pós-tradução	Biomarcador	OralCard	Referência
													<i>(SELDI-TOF)</i>					
P01037	Cystatin-SN		x				68009062						<i>surface enhanced laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (SELDI-TOF)</i>	proteómica		x	16402355	19896329
P01037	Cystatin-SN		x				68009062						<i>surface enhanced laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (SELDI-TOF)</i>	proteómica		x	17614365	19896329
P01037	Cystatin-SN		x				68009062						<i>surface enhanced laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (SELDI-TOF)</i>	proteómica		x	18361515	19896329
P01037	Cystatin-SN		x				68009062						<i>surface enhanced laser desorption</i>	proteómica		x	18434574	19896329

<i>UniProtKB AC</i>	Nome da proteína	SM/SL	Saliva Total	Mucosa	Língua	Saúde	Patologia (MeSH)	Quantificação	Faixa Etária	Género	Hábitos Sociais	Método de Recolha	Método de Análise	Tipo de estudo	Modificações pós-tradução	Biomarcador	OralCard	Referência
													<i>/ionization time-of-flight mass spectrometry (SELDI-TOF)</i>					
P01037	Cystatin-SN		x				68009062						<i>surface enhanced laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (SELDI-TOF)</i>	proteómica		x	19470415	19896329
P01037	Cystatin-SN		x				68009062						<i>surface enhanced laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (SELDI-TOF)</i>	proteómica		x	19898684	19896329
P01040	Cystatin-A	x		x		x	68009062	diminuida				biópsia	<i>espectometria de massa</i>	proteómica		x	20052393	16819514
P01040	Cystatin-A	x		x		x	68009062	diminuida				biópsia	<i>espectometria de massa</i>	proteómica		x	19118452	16819514
P01040	Cystatin-A	x		x		x	68009062	diminuida				biópsia	<i>espectometria de massa</i>	proteómica		x	21794177	16819514
P01040	Cystatin-A	x		x		x	68009062	diminuida				biópsia	<i>espectometria de massa</i>	proteómica		x	19253063	16819514

UniProtKB AC	Nome da proteína	SM/SL	Saliva Total	Mucosa	Língua	Saúde	Patologia (MeSH)	Quantificação	Faixa Etária	Género	Hábitos Sociais	Método de Recolha	Método de Análise	Tipo de estudo	Modificações pós-tradução	Biomarcador	OralCard	Referência
													<i>tria de massa</i>					
P01040	Cystatin-A	x		x		x	68009062	diminuída				biópsia	<i>espectometria de massa</i>	proteómica		x	15386514	16819514
P01040	Cystatin-A	x		x		x	68009062	diminuída				biópsia	<i>espectometria de massa</i>	proteómica		x	15485636	16819514
P01040	Cystatin-A	x		x		x	68009062	diminuída				biópsia	<i>espectometria de massa</i>	proteómica		x	16103422	16819514
P01040	Cystatin-A	x		x		x	68009062	diminuída				biópsia	<i>espectometria de massa</i>	proteómica		x	18361515	16819514
P01040	Cystatin-A	x		x		x	68009062	diminuída				biópsia	<i>espectometria de massa</i>	proteómica		x	18434574	16819514
P01040	Cystatin-A	x		x		x	68009062	diminuída				biópsia	<i>espectometria de massa</i>	proteómica		x	19364392	16819514
P01040	Cystatin-A	x		x		x	68009062	diminuída				biópsia	<i>espectometria de massa</i>	proteómica		x	20943598	16819514
P01584	Interleukin -1 beta		x			x	68009062	aumentada	32-79				<i>Multianalyte Profiling (xMAP)/E LISA</i>				21109482	19193200
P01100	Proto-oncogene c-Fos			x		x	68009062	aumentada				biópsia	imunohistoquímica					16050486
P02462	Collagen alpha-1(IV) chain			x		x	68009062	diminuída				biópsia	imunohistoquímica					16050486
P04083	Annexin A1			x			68009062	diminuída				biópsia	<i>electroforese 2D/espectometria de</i>	proteómica		x	20052393	19691830

<i>UniProtKB AC</i>	Nome da proteína	SM/SL	Saliva Total	Mucosa	Língua	Saúde	Patologia (MeSH)	Quantificação	Faixa Etária	Género	Hábitos Sociais	Método de Recolha	Método de Análise	Tipo de estudo	Modificações pós-tradução	Biomarcador	OralCard	Referência
													<i>massa</i>					
P04083	Annexin A1			x			68009062	diminuída				biópsia	<i>electroforese 2D/ espectometria de massa</i>	proteómica		x	19118452	19691830
P04083	Annexin A1			x			68009062	diminuída				biópsia	<i>electroforese 2D/ espectometria de massa</i>	proteómica		x	20205380	19691830
P04083	Annexin A1			x			68009062	diminuída				biópsia	<i>electroforese 2D/ espectometria de massa</i>	proteómica		x	21794177	19691830
P04083	Annexin A1			x			68009062	diminuída				biópsia	<i>electroforese 2D/ espectometria de massa</i>	proteómica		x	19364392	19691830
P04083	Annexin A1			x			68009062	diminuída				biópsia	<i>electroforese 2D/ espectometria de massa</i>	proteómica		x	16568407	19691830
P04083	Annexin A1			x			68009062	diminuída				biópsia	<i>electroforese 2D/ espectometria de massa</i>	proteómica		x	18829504	19691830
P04083	Annexin A1			x			68009062	diminuída				biópsia	<i>electroforese 2D/ espectometria de massa</i>	proteómica		x	19253063	19691830
P04083	Annexin A1			x			68009062	diminuída				biópsia	<i>electroforese 2D/ espectometria de massa</i>	proteómica		x	15473691	19691830

<i>UniProtKB AC</i>	Nome da proteína	SM/SL	Saliva Total	Mucosa	Língua	Saúde	Patologia (MeSH)	Quantificação	Faixa Etária	Género	Hábitos Sociais	Método de Recolha	Método de Análise	Tipo de estudo	Modificações pós-tradução	Biomarcador	OralCard	Referência
													<i>tria de massa</i>					
P04083	Annexin A1			x			68009062	diminuída				biópsia	<i>electroforese 2D/ espectometria de massa</i>	proteómica		x	15800970	19691830
P04083	Annexin A1			x			68009062	diminuída				biópsia	<i>electroforese 2D/ espectometria de massa</i>	proteómica		x	16103422	19691830
P04083	Annexin A1			x			68009062	diminuída				biópsia	<i>electroforese 2D/ espectometria de massa</i>	proteómica		x	17614365	19691830
P04083	Annexin A1			x			68009062	diminuída				biópsia	<i>electroforese 2D/ espectometria de massa</i>	proteómica		x	18361515	19691830
P04083	Annexin A1			x			68009062	diminuída				biópsia	<i>electroforese 2D/ espectometria de massa</i>	proteómica		x	19199708	19691830
P04083	Annexin A1			x			68009062	diminuída				biópsia	<i>electroforese 2D/ espectometria de massa</i>	proteómica		x	19297561	19691830
P05109	Protein S100-A8			x			68009062	aumentada				biópsia	<i>electroforese 2D/ espectometria de massa</i>	proteómica		x	20052393	19691830
P05109	Protein S100-A8			x			68009062	aumentada				biópsia	<i>electroforese 2D/</i>	proteómica		x	17722226	19691830

<i>UniProtKB AC</i>	Nome da proteína	SM/SL	Saliva Total	Mucosa	Língua	Saúde	Patologia (MeSH)	Quantificação	Faixa Etária	Género	Hábitos Sociais	Método de Recolha	Método de Análise	Tipo de estudo	Modificações pós-tradução	Biomarcador	OralCard	Referência
													<i>espectometria de massa</i>					
P05109	Protein S100-A8			x			68009062	aumentada				biópsia	<i>electroforese 2D/ espectometria de massa</i>	proteómica		x	20585025	19691830
P05109	Protein S100-A8			x			68009062	aumentada				biópsia	<i>electroforese 2D/ espectometria de massa</i>	proteómica		x	20149214	19691830
P05109	Protein S100-A8			x			68009062	aumentada				biópsia	<i>electroforese 2D/ espectometria de massa</i>	proteómica		x	21794177	19691830
P05109	Protein S100-A8			x			68009062	aumentada				biópsia	<i>electroforese 2D/ espectometria de massa</i>	proteómica		x	18939961	19691830
P05109	Protein S100-A8			x			68009062	aumentada				biópsia	<i>electroforese 2D/ espectometria de massa</i>	proteómica		x	17968930	19691830
P05109	Protein S100-A8			x			68009062	aumentada				biópsia	<i>electroforese 2D/ espectometria de massa</i>	proteómica		x	19364392	19691830
P05109	Protein S100-A8			x			68009062	aumentada				biópsia	<i>electroforese 2D/ espectometria de massa</i>	proteómica		x	21035601	19691830
P05109	Protein			x			68009062	aumentada				biópsia	<i>electrofore</i>	proteómica		x	18829504	19691830

UniProtKB AC	Nome da proteína	SM/SL	Saliva Total	Mucosa	Língua	Saúde	Patologia (MeSH)	Quantificação	Faixa Etária	Género	Hábitos Sociais	Método de Recolha	Método de Análise	Tipo de estudo	Modificações pós-tradução	Biomarcador	OralCard	Referência
	S100-A8												<i>se 2D/ espectometria de massa</i>					
P05231	Interleukin -6		x			x	68009062	aumentada	49,3			<i>drooling method</i>	<i>RT-PCR/ELISA</i>			x		15313862
P05412	Transcription factor AP-1			x		x	68009062	aumentada				biópsia	imunohistoquímica					16050486
P05787	Keratin, type II cytoskeletal 8			x			68009062	aumentada				biópsia	imunohistoquímica			x	20205380	18803884
P05787	Keratin, type II cytoskeletal 8			x			68009062	aumentada				biópsia	imunohistoquímica			x	19364392	18803884
P05787	Keratin, type II cytoskeletal 8			x			68009062	aumentada				biópsia	imunohistoquímica			x	17614365	18803884
P06756	Integrin alpha-V			x			68009062	aumentada				biópsia	imunofluorescência			x		10780523
P08107	Heat shock 70 kDa protein 1A/1B			x			68009062	aumentada				biópsia	<i>electroforese 2D/ espectometria de massa</i>	proteómica		x	21794177	19691830
P08107	Heat shock 70 kDa protein 1A/1B			x			68009062	aumentada				biópsia	<i>electroforese 2D/ espectometria de massa</i>	proteómica		x	19364392	19691830
P08107	Heat shock 70 kDa protein 1A/1B			x			68009062	aumentada				biópsia	<i>electroforese 2D/ espectometria de massa</i>	proteómica		x	18829504	19691830

UniProtKB AC	Nome da proteína	SM/SL	Saliva Total	Mucosa	Língua	Saúde	Patologia (MeSH)	Quantificação	Faixa Etária	Género	Hábitos Sociais	Método de Recolha	Método de Análise	Tipo de estudo	Modificações pós-tradução	Biomarcador	OralCard	Referência
P08107	Heat shock 70 kDa protein 1A/1B			x			68009062	aumentada				biópsia	<i>electroforese 2D/ espectometria de massa</i>	proteómica		x	19297561	19691830
P08107	Heat shock 70 kDa protein 1A/1B			x			68009062	aumentada				biópsia	<i>electroforese 2D/ espectometria de massa</i>	proteómica		x	15800970	19691830
P08107	Heat shock 70 kDa protein 1A/1B			x			68009062	aumentada				biópsia	<i>electroforese 2D/ espectometria de massa</i>	proteómica		x	16103422	19691830
P08107	Heat shock 70 kDa protein 1A/1B			x			68009062	aumentada				biópsia	<i>electroforese 2D/ espectometria de massa</i>	proteómica		x	17614365	19691830
P08107	Heat shock 70 kDa protein 1A/1B			x			68009062	aumentada				biópsia	<i>electroforese 2D/ espectometria de massa</i>	proteómica		x	18361515	19691830
P08107	Heat shock 70 kDa protein 1A/1B			x			68009062	aumentada				biópsia	<i>electroforese 2D/ espectometria de massa</i>	proteómica		x	19199708	19691830
P08238	Heat shock protein HSP 90-beta			x			68009062	aumentada				biópsia	<i>electroforese 2D/ espectometria de massa</i>	proteómica		x	19118452	19691830
P08238	Heat shock protein HSP 90-			x			68009062	aumentada				biópsia	<i>electroforese 2D/ espectometria de</i>	proteómica		x	17614365	19691830

<i>UniProtKB AC</i>	Nome da proteína	SM/SL	Saliva Total	Mucosa	Língua	Saúde	Patologia (MeSH)	Quantificação	Faixa Etária	Género	Hábitos Sociais	Método de Recolha	Método de Análise	Tipo de estudo	Modificações pós-tradução	Biomarcador	OralCard	Referência
	beta												<i>massa</i>					
P08238	Heat shock protein HSP 90-beta			x			68009062	aumentada				biópsia	<i>electroforese 2D/ espectometria de massa</i>	proteómica		x	18361515	19691830
P08238	Heat shock protein HSP 90-beta			x			68009062	aumentada				biópsia	<i>electroforese 2D/ espectometria de massa</i>	proteómica		x	19297561	19691830
P08238	Heat shock protein HSP 90-beta			x			68009062	aumentada				biópsia	<i>electroforese 2D/ espectometria de massa</i>	proteómica		x	19364392	19691830
P08238	Heat shock protein HSP 90-beta			x			68009062	aumentada				biópsia	<i>electroforese 2D/ espectometria de massa</i>	proteómica		x	21299198	19691830
P08758	Annexin A5			x			68009062	diminuida				biópsia	<i>electroforese 2D/ espectometria de massa</i>	proteómica		x	19364392	19691830
P08758	Annexin A5			x			68009062	diminuida				biópsia	<i>electroforese 2D/ espectometria de massa</i>	proteómica		x	17614365	19691830
P08758	Annexin A5			x			68009062	diminuida				biópsia	<i>electroforese 2D/ espectometria de massa</i>	proteómica		x	18361515	19691830
P09211	Glutathione S-transferase			x			68009062	diminuida				biópsia	<i>multidimensional LC-</i>			x	20052393	18339795

UniProtKB AC	Nome da proteína	SM/SL	Saliva Total	Mucosa	Língua	Saúde	Patologia (MeSH)	Quantificação	Faixa Etária	Género	Hábitos Sociais	Método de Recolha	Método de Análise	Tipo de estudo	Modificações pós-tradução	Biomarcador	OralCard	Referência
	P												MS/MS					
P09211	Glutathion e S-transferase P			x			68009062	diminuída				biópsia	multidimensional LC-MS/MS			x	19118452	18339795
P09211	Glutathion e S-transferase P			x			68009062	diminuída				biópsia	multidimensional LC-MS/MS			x	21794177	18339795
P09211	Glutathion e S-transferase P			x			68009062	diminuída				biópsia	multidimensional LC-MS/MS			x	17436266	18339795
P09211	Glutathion e S-transferase P			x			68009062	diminuída				biópsia	multidimensional LC-MS/MS			x	19364392	18339795
P09211	Glutathion e S-transferase P			x			68009062	diminuída				biópsia	multidimensional LC-MS/MS			x	16889763	18339795
P09211	Glutathion e S-transferase P			x			68009062	diminuída				biópsia	multidimensional LC-MS/MS			x	19253063	18339795
P09211	Glutathion e S-transferase P			x			68009062	diminuída				biópsia	multidimensional LC-MS/MS			x	15386514	18339795
P09211	Glutathion e S-transferase P			x			68009062	diminuída				biópsia	multidimensional LC-MS/MS			x	15473691	18339795
P09211	Glutathion e S-transferase P			x			68009062	diminuída				biópsia	multidimensional LC-MS/MS			x	15800970	18339795
P09211	Glutathion e S-			x			68009062	diminuída				biópsia	multidimensional			x	16103422	18339795

<i>UniProtKB AC</i>	Nome da proteína	SM/SL	Saliva Total	Mucosa	Língua	Saúde	Patologia (MeSH)	Quantificação	Faixa Etária	Género	Hábitos Sociais	Método de Recolha	Método de Análise	Tipo de estudo	Modificações pós-tradução	Biomarcador	OralCard	Referência
	transferase P												<i>LC-MS/MS</i>					
P09211	Glutathion e S-transferase P			x			68009062	diminuída				biópsia	<i>multidimensional LC-MS/MS</i>			x	17614365	18339795
P09211	Glutathion e S-transferase P			x			68009062	diminuída				biópsia	<i>multidimensional LC-MS/MS</i>			x	18361515	18339795
P09211	Glutathion e S-transferase P			x			68009062	diminuída				biópsia	<i>multidimensional LC-MS/MS</i>			x	19199708	18339795
P09211	Glutathion e S-transferase P			x			68009062	diminuída				biópsia	<i>multidimensional LC-MS/MS</i>			x	19297561	18339795
P09486	SPARC			x		x	68009062	aumentada				biópsia	<i>RT-PCR</i>			x	18361515	18490578
P09486	SPARC			x		x	68009062	aumentada				biópsia	<i>RT-PCR</i>			x	19297561	18490578
P09525	Annexin A4			x			68009062	diminuída				biópsia	<i>electroforese 2D/ espectometria de massa</i>	proteómica		x	19364392	19691830
P09525	Annexin A4			x			68009062	diminuída				biópsia	<i>electroforese 2D/ espectometria de massa</i>	proteómica		x	17614365	19691830
P10145	Interleukin -8		x			x	68009062	aumentada	32-79				<i>Multianalyte Profiling (xMAP)/ELISA</i>				21109482	19193200
P10145	Interleukin -8		x			x	68009062	aumentada	49,3			<i>drooling method</i>	<i>RT-PCR, ELISA</i>			x	21109482	15313862

UniProtKB AC	Nome da proteína	SM/SL	Saliva Total	Mucosa	Língua	Saúde	Patologia (MeSH)	Quantificação	Faixa Etária	Género	Hábitos Sociais	Método de Recolha	Método de Análise	Tipo de estudo	Modificações pós-tradução	Biomarcador	OralCard	Referência
P10147	C-C motif chemokine 3			x		x	68009062	diminuída	Adultos			biópsia	microarray analysis	proteómica		x		17726464
P11802	Cyclin-dependent kinase 4			x		x	68009062	aumentada			tabbaco chewing	biópsia	imunohistológica					14672406
P11802	Cyclin-dependent kinase 4			x		x	68009062	aumentada				biópsia	imunohistológica					20618617
P12429	Annexin A3			x			68009062	diminuída				biópsia	electroforese 2D/ espectometria de massa	proteómica		x	20052393	19691830
P12429	Annexin A3			x			68009062	diminuída				biópsia	electroforese 2D/ espectometria de massa	proteómica		x	19118452	19691830
P12429	Annexin A3			x			68009062	diminuída				biópsia	electroforese 2D/ espectometria de massa	proteómica		x	20205380	19691830
P12429	Annexin A3			x			68009062	diminuída				biópsia	electroforese 2D/ espectometria de massa	proteómica		x	21794177	19691830
P12830	Cadherin-1			x			68009062	diminuída				biópsia	imunohistológica				17614365	16505783
P12830	Cadherin-1			x			68009062	diminuída				biópsia	imunohistológica				18361515	16505783
P13500	C-C motif chemokine 2			x			68009062					biópsia	imunohistológica					20544025
P13501	C-C motif chemokine 5			x		x	68009062	diminuída	Adultos			biópsia	microarray analysis	proteómica		x		17726464

UniProtKB AC	Nome da proteína	SM/SL	Saliva Total	Mucosa	Língua	Saúde	Patologia (MeSH)	Quantificação	Faixa Etária	Gênero	Hábitos Sociais	Método de Recolha	Método de Análise	Tipo de estudo	Modificações pós-tradução	Biomarcador	OralCard	Referência
P13645	Keratin, type I cytoskeletal 10			x		x	68009062		Adultos			biópsia	hibridização <i>in situ</i> /imunohistoquímica				16402355	11287279
P13645	Keratin, type I cytoskeletal 10			x		x	68009062		Adultos			biópsia	hibridização <i>in situ</i> /imunohistoquímica				17614365	11287279
P13645	Keratin, type I cytoskeletal 10			x		x	68009062		Adultos			biópsia	hibridização <i>in situ</i> /imunohistoquímica				18361515	11287279
P13645	Keratin, type I cytoskeletal 10			x		x	68009062		Adultos			biópsia	hibridização <i>in situ</i> /imunohistoquímica				19199708	11287279
P13645	Keratin, type I cytoskeletal 10			x		x	68009062		Adultos			biópsia	hibridização <i>in situ</i> /imunohistoquímica				19297561	11287279
P13646	Keratin, type I cytoskeletal 13			x		x	68009062		Adultos			biópsia	hibridização <i>in situ</i> /imunohistoquímica				21142092	11287279
P13646	Keratin, type I cytoskeletal 13			x		x	68009062		Adultos			biópsia	hibridização <i>in situ</i> /imunohistoquímica				19253063	11287279
P13646	Keratin, type I cytoskeletal 13			x		x	68009062		Adultos			biópsia	hibridização <i>in situ</i> /imunohistoquímica				16103422	11287279

UniProtKB AC	Nome da proteína	SM/SL	Saliva Total	Mucosa	Língua	Saúde	Patologia (MeSH)	Quantificação	Faixa Etária	Género	Hábitos Sociais	Método de Recolha	Método de Análise	Tipo de estudo	Modificações pós-tradução	Biomarcador	OralCard	Referência
													ca					
P13646	Keratin, type I cytoskeletal 13			x		x	68009062		Adultos			biópsia	hibridização <i>in situ</i> /imunohistoquímica				17614365	11287279
P13646	Keratin, type I cytoskeletal 13			x		x	68009062		Adultos			biópsia	hibridização <i>in situ</i> /imunohistoquímica				18361515	11287279
P13646	Keratin, type I cytoskeletal 13			x		x	68009062		Adultos			biópsia	hibridização <i>in situ</i> /imunohistoquímica				19199708	11287279
P13646	Keratin, type I cytoskeletal 13			x		x	68009062		Adultos			biópsia	hibridização <i>in situ</i> /imunohistoquímica				19364392	11287279
P13646	Keratin, type I cytoskeletal 13			x		x	68009062		Adultos			biópsia	hibridização <i>in situ</i> /imunohistoquímica				20052393	11287279
P13646	Keratin, type I cytoskeletal 13			x		x	68009062		Adultos			biópsia	hibridização <i>in situ</i> /imunohistoquímica				20205380	11287279
P13646	Keratin, type I cytoskeletal 13			x		x	68009062		Adultos			biópsia	hibridização <i>in situ</i> /imunohistoquímica				21794177	11287279
P13646	Keratin, type I cytoskeletal 13			x		x	68009062		Adultos			biópsia	hibridização <i>in situ</i> /imunohistoquímica				19297561	11287279

UniProtKB AC	Nome da proteína	SM/SL	Saliva Total	Mucosa	Língua	Saúde	Patologia (MeSH)	Quantificação	Faixa Etária	Género	Hábitos Sociais	Método de Recolha	Método de Análise	Tipo de estudo	Modificações pós-tradução	Biomarcador	OralCard	Referência
	al 13												histoquímica					
P13646	Keratin, type I cytoskeletal 13			x		x	68009062		Adultos			biópsia	hibridização <i>in situ</i> /imunohistoquímica				19522851	11287279
P13928	Annexin A8			x			68009062	aumentada				biópsia	<i>electroforese 2D/espectrometria de massa</i>	proteómica		x	17614365	19691830
P16070	CD44 antigen		x			x	68009062	aumentada			tabagismo	bochecho oral	ELISA			x	19199708	17627000
P16070	CD44 antigen			x		x	68009062	diminuída				biópsia	imunohistoquímica					18852874
P16144	Integrin beta-4			x		x	68009062					biópsia	imunofluorescência			x	19364392	10780523
P18827	Syndecan-1			x		x	68009062	diminuída	Adultos			biópsia	imunohistoquímica					17473685
P19013	Keratin, type II cytoskeletal 4			x		x	68009062		Adultos			biópsia	hibridização <i>in situ</i> /imunohistoquímica				20205380	11287279
P19013	Keratin, type II cytoskeletal 4			x		x	68009062		Adultos			biópsia	hibridização <i>in situ</i> /imunohistoquímica				19297561	11287279
P19013	Keratin, type II cytoskeletal 4			x		x	68009062		Adultos			biópsia	hibridização <i>in situ</i> /imunohistoquímica				19522851	11287279
P19013	Keratin, type II cytoskeletal 4			x		x	68009062		Adultos			biópsia	hibridização <i>in situ</i> /imunohistoquímica				19253063	11287279

UniProtKB AC	Nome da proteína	SM/SL	Saliva Total	Mucosa	Língua	Saúde	Patologia (MeSH)	Quantificação	Faixa Etária	Género	Hábitos Sociais	Método de Recolha	Método de Análise	Tipo de estudo	Modificações pós-tradução	Biomarcador	OralCard	Referência
													ca					
P19013	Keratin, type II cytoskeletal 4			x		x	68009062		Adultos			biópsia	hibridização <i>in situ</i> /imunohistoquímica				15800970	11287279
P22223	Cadherin-3			x		x	68009062	aumentada				biópsia	imunohistoquímica					19887755
P23219	Prostaglandin G/H synthase 1			x		x	68009062	diminuída				biópsia	<i>western blot</i> /imunohistochemistry/TUNEL					15743693
P23677	Inositoltrisphosphate 3-kinase A			x		x	68009062	aumentada				biópsia	<i>electrophoresis 2D</i>			x		16525636
P24385	G1/S-specific cyclin-D1			x		x	68009062	aumentada				biópsia	imunohistoquímica					16050486
P24821	Tenascin			x		x	68009062	aumentada		M/F		biópsia	<i>RT-PCR</i>	proteómica		x		18490578
P29034	Protein S100-A2			x			68009062	aumentada				biópsia	<i>multidimensional LC-MS/MS</i>	proteómica		x	19118452	18339795
P29034	Protein S100-A2			x			68009062	aumentada				biópsia	<i>multidimensional LC-MS/MS</i>	proteómica		x	21794177	18339795
P29034	Protein S100-A2			x			68009062	aumentada				biópsia	<i>multidimensional LC-MS/MS</i>	proteómica		x	19297561	18339795
P29034	Protein S100-A2			x			68009062	aumentada				biópsia	<i>multidimensional LC-MS/MS</i>	proteómica		x	17614365	18339795

<i>UniProtKB AC</i>	Nome da proteína	SM/SL	Saliva Total	Mucosa	Língua	Saúde	Patologia (MeSH)	Quantificação	Faixa Etária	Género	Hábitos Sociais	Método de Recolha	Método de Análise	Tipo de estudo	Modificações pós-tradução	Biomarcador	OralCard	Referência
P29034	Protein S100-A2			x			68009062	aumentada				biópsia	<i>multidimensional LC-MS/MS</i>	proteómica		x	18361515	18339795
P31151	Protein S100-A7			x		x	68009062	aumentada				biópsia	<i>PCR/imunohistoquímica</i>					20727496
P31151	Protein S100-A7			x			68009062	aumentada				biópsia	<i>multidimensional LC-MS/MS, imunohistoquímica</i>				21142092	18805044
P31151	Protein S100-A7			x			68009062	diminuída				biópsia	<i>electroforese 2D/espectrometria de massa</i>	proteómica		x	20052393	19691830
P31151	Protein S100-A7			x			68009062	aumentada				biópsia	<i>multidimensional LC-MS/MS, imunohistoquímica</i>				19118452	18805044
P31151	Protein S100-A7			x			68009062	diminuída				biópsia	<i>electroforese 2D/espectrometria de massa</i>	proteómica		x	17722226	19691830
P31151	Protein S100-A7			x			68009062	aumentada				biópsia	<i>multidimensional LC-MS/MS, imunohistoquímica</i>				17968930	18805044
P31151	Protein S100-A7			x			68009062	diminuída				biópsia	<i>electroforese 2D/espectrometria de</i>	proteómica		x	18939961	19691830

<i>UniProtKB AC</i>	Nome da proteína	SM/SL	Saliva Total	Mucosa	Língua	Saúde	Patologia (MeSH)	Quantificação	Faixa Etária	Género	Hábitos Sociais	Método de Recolha	Método de Análise	Tipo de estudo	Modificações pós-tradução	Biomarcador	OralCard	Referência
													<i>massa</i>					
P31151	Protein S100-A7			x			68009062	aumentada				biópsia	<i>multidimensional LC-MS/MS, imunohistoquímica</i>				15473691	18805044
P31151	Protein S100-A7			x			68009062	diminuída				biópsia	<i>electroforese 2D/espectrometria de massa</i>	proteómica		x	16103422	19691830
P31151	Protein S100-A7			x			68009062	aumentada				biópsia	<i>multidimensional LC-MS/MS, imunohistoquímica</i>				17614365	18805044
P31151	Protein S100-A7			x			68009062	diminuída				biópsia	<i>electroforese 2D/espectrometria de massa</i>	proteómica		x	18361515	19691830
P31151	Protein S100-A7			x			68009062	aumentada				biópsia	<i>multidimensional LC-MS/MS, imunohistoquímica</i>				18829504	18805044
P31151	Protein S100-A7			x			68009062	diminuída				biópsia	<i>electroforese 2D/espectrometria de massa</i>	proteómica		x	19297561	19691830
P31151	Protein S100-A7			x			68009062	aumentada				biópsia	<i>multidimensional LC-MS/MS, imunohist</i>				20943598	18805044

UniProtKB AC	Nome da proteína	SM/SL	Saliva Total	Mucosa	Língua	Saúde	Patologia (MeSH)	Quantificação	Faixa Etária	Género	Hábitos Sociais	Método de Recolha	Método de Análise	Tipo de estudo	Modificações pós-tradução	Biomarcador	OralCard	Referência
													oquímica					
P31151	Protein S100-A7			x			68009062	diminuída				biópsia	<i>electroforese 2D/ espectometria de massa</i>	proteómica		x	21299198	19691830
P31947	14-3-3 protein sigma			x		x	68009062	diminuída				biópsia	<i>espectometria de massa</i>	proteómica		x	20052393	16819514
P31947	14-3-3 protein sigma			x		x	68009062	diminuída				biópsia	<i>espectometria de massa</i>	proteómica		x	19118452	16819514
P31947	14-3-3 protein sigma			x		x	68009062	diminuída				biópsia	<i>espectometria de massa</i>	proteómica		x	19453860	16819514
P31947	14-3-3 protein sigma			x		x	68009062	diminuída				biópsia	<i>espectometria de massa</i>	proteómica		x	21794177	16819514
P31947	14-3-3 protein sigma			x		x	68009062	diminuída				biópsia	<i>espectometria de massa</i>	proteómica		x	16889763	16819514
P31947	14-3-3 protein sigma			x		x	68009062	diminuída				biópsia	<i>espectometria de massa</i>	proteómica		x	15473691	16819514
P31947	14-3-3 protein sigma			x		x	68009062	diminuída				biópsia	<i>espectometria de massa</i>	proteómica		x	15800970	16819514
P31947	14-3-3 protein sigma			x		x	68009062	diminuída				<i>brush biopsy, saliva total</i>	<i>espectometria de massa</i>	proteómica		x	16103422	16819514
P31947	14-3-3 protein sigma			x		x	68009062	diminuída				biópsia	<i>espectometria de massa</i>	proteómica		x	17614365	16819514
P31947	14-3-3 protein sigma			x		x	68009062	diminuída				biópsia	<i>espectometria de massa</i>	proteómica		x	18361515	16819514
P31947	14-3-3 protein			x		x	68009062	diminuída				biópsia	<i>espectometria de</i>	proteómica		x	19297561	16819514

UniProtKB AC	Nome da proteína	SM/SL	Saliva Total	Mucosa	Língua	Saúde	Patologia (MeSH)	Quantificação	Faixa Etária	Género	Hábitos Sociais	Método de Recolha	Método de Análise	Tipo de estudo	Modificações pós-tradução	Biomarcador	OralCard	Referência
	sigma												massa					
P31949	Protein S100-A11			x		x	68009062	diminuída				biópsia	espectometria de massa	proteómica		x	18361515	16819514
P31949	Protein S100-A11			x		x	68009062	diminuída				biópsia	espectometria de massa	proteómica		x	19199708	16819514
P31949	Protein S100-A11			x		x	68009062	diminuída				biópsia	espectometria de massa	proteómica		x	19297561	16819514
P35222	Catenin beta-1			x	x		68009062					biópsia	imunohistológica			x	17614365	21120283
P35222	Catenin beta-1			x	x		68009062					biópsia	imunohistológica			x	18361515	21120283
P35222	Catenin beta-1			x	x		68009062					biópsia	imunohistológica			x	19199708	21120283
P35222	Catenin beta-1			x	x		68009062					biópsia	imunohistológica			x	19297561	21120283
P35226	Polycomb complex protein BMI-1			x	x		68009062			M/F		biópsia	imunohistológica			x		20145620
P36952	Serpin B5			x	x		68009062	aumentada				biópsia	imunohistológica					18783348
P40763	Signal transducer and activator of transcription 3			x	x		68009062	aumentada	Adultos	M/F	tobacco chewing	biópsia	imunohistológica				17614365	12015764
P40763	Signal transducer and activator of transcription 3			x	x		68009062	aumentada	Adultos	M/F	tobacco chewing	biópsia	imunohistológica				19297561	12015764

UniProtKB AC	Nome da proteína	SM/SL	Saliva Total	Mucosa	Língua	Saúde	Patologia (MeSH)	Quantificação	Faixa Etária	Género	Hábitos Sociais	Método de Recolha	Método de Análise	Tipo de estudo	Modificações pós-tradução	Biomarcador	OralCard	Referência
P42771	Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A, isoforms 1/2/3			x			68009062			M/F		biópsia	imunohist oquímica					21359449
P46013	Antigen KI-67			x		x	68009062	aumentada				biópsia	imunohist oquímica			x	21794177	19293805
P46013	Antigen KI-67			x		x	68009062	aumentada				biópsia	imunohist oquímica			x	19297561	19088879
P48061	Stromal cell-derived factor 1			x		x	68009062	diminuída	Adultos			biópsia	<i>microarra y analysis</i>	proteómica		x		17726464
P49763	Placenta growth factor			x		x	68009062	aumentada				biópsia	imunohist oquímica			x		19293805
P49862	Kallikrein-7			x			68009062	aumentada	Adultos			biópsia	<i>RT-PCR</i> /imunohistoquímica				17614365	19085836
P49862	Kallikrein-7			x			68009062	aumentada	Adultos			biópsia	<i>RT-PCR</i> /imunohistoquímica				18361515	19085836
P55287	Cadherin-11			x		x	68009062			M/F		biópsia	<i>RT-PCR</i>	proteómica		x	18361515	18490578
P59665	Neutrophil defensin 1			x		x	68009062	aumentada				biópsia	<i>espectome tria de massa</i>	proteómica		x	20205380	16819514
P59665	Neutrophil defensin 1			x		x	68009062	aumentada				biópsia	<i>espectome tria de massa</i>	proteómica		x	20585025	16819514
P59665	Neutrophil defensin 1			x		x	68009062	aumentada				biópsia	<i>espectome tria de massa</i>	proteómica		x	21794177	16819514
P59665	Neutrophil defensin 1			x		x	68009062	aumentada				biópsia	<i>espectome tria de</i>	proteómica		x	19364392	16819514

UniProtKB AC	Nome da proteína	SM/SL	Saliva Total	Mucosa	Língua	Saúde	Patologia (MeSH)	Quantificação	Faixa Etária	Género	Hábitos Sociais	Método de Recolha	Método de Análise	Tipo de estudo	Modificações pós-tradução	Biomarcador	OralCard	Referência
													massa					
P59665	Neutrophil defensin 1			x		x	68009062	aumentada				biópsia	espectometria de massa	proteómica		x	15800970	16819514
P59665	Neutrophil defensin 1			x		x	68009062	aumentada				biópsia	espectometria de massa	proteómica		x	17614365	16819514
P59665	Neutrophil defensin 1			x		x	68009062	aumentada				biópsia	espectometria de massa	proteómica		x	18361515	16819514
P59665	Neutrophil defensin 1			x		x	68009062	aumentada				biópsia	espectometria de massa	proteómica		x	19199708	16819514
P59665	Neutrophil defensin 1			x		x	68009062	aumentada				biópsia	espectometria de massa	proteómica		x	20205380	16819514
P59666	Neutrophil defensin 3			x		x	68009062	aumentada				biópsia	espectometria de massa	proteómica		x	19118452	16819514
P59666	Neutrophil defensin 3			x		x	68009062	aumentada				biópsia	espectometria de massa	proteómica		x	20585025	16819514
P59666	Neutrophil defensin 3			x		x	68009062	aumentada				biópsia	espectometria de massa	proteómica		x	20662485	16819514
P59666	Neutrophil defensin 3			x		x	68009062	aumentada				biópsia	espectometria de massa	proteómica		x	15800970	16819514
P59666	Neutrophil defensin 3			x		x	68009062	aumentada				biópsia	espectometria de massa	proteómica		x	17614365	16819514
P59666	Neutrophil defensin 3			x		x	68009062	aumentada				biópsia	espectometria de massa	proteómica		x	18361515	16819514
P61289	Proteasom e activator complex subunit 3			x			68009062	aumentada				biópsia	electroforese 2D/ espectometria de	proteómica		x	19297561	19691830

<i>UniProtKB AC</i>	Nome da proteína	SM/SL	Saliva Total	Mucosa	Língua	Saúde	Patologia (MeSH)	Quantificação	Faixa Etária	Género	Hábitos Sociais	Método de Recolha	Método de Análise	Tipo de estudo	Modificações pós-tradução	Biomarcador	OralCard	Referência
													<i>massa</i>					
P62805	Histone H4			x		x	68009062					biópsia	<i>espectometria de massa</i>	proteómica		x	20052393	16819514
P62805	Histone H4			x		x	68009062					biópsia	<i>espectometria de massa</i>	proteómica		x	20205380	16819514
P62805	Histone H4			x		x	68009062					biópsia	<i>espectometria de massa</i>	proteómica		x	21794177	16819514
P62805	Histone H4			x		x	68009062					biópsia	<i>espectometria de massa</i>	proteómica		x	19364392	16819514
P62805	Histone H4			x		x	68009062					biópsia	<i>espectometria de massa</i>	proteómica		x	19253063	16819514
P62805	Histone H4			x		x	68009062					biópsia	<i>espectometria de massa</i>	proteómica		x	20662485	16819514
P62805	Histone H4			x		x	68009062					biópsia	<i>espectometria de massa</i>	proteómica		x	16103422	16819514
P62805	Histone H4			x		x	68009062					biópsia	<i>espectometria de massa</i>	proteómica		x	17614365	16819514
P62805	Histone H4			x		x	68009062					biópsia	<i>espectometria de massa</i>	proteómica		x	18361515	16819514
P62805	Histone H4			x		x	68009062					biópsia	<i>espectometria de massa</i>	proteómica		x	19199708	16819514
P62805	Histone H4			x		x	68009062					biópsia	<i>espectometria de massa</i>	proteómica		x	19297561	16819514
P80098	C-C motif chemokine 7			x		x	68009062	diminuída	Adultos			biópsia	<i>microarray analysis</i>	proteómica		x		17726464
P81534	Beta-			x			68009062	aumentada	Adultos			biópsia	imunofluo			x		19097930

UniProtKB AC	Nome da proteína	SM/SL	Saliva Total	Mucosa	Língua	Saúde	Patologia (MeSH)	Quantificação	Faixa Etária	Género	Hábitos Sociais	Método de Recolha	Método de Análise	Tipo de estudo	Modificações pós-tradução	Biomarcador	OralCard	Referência
	defensin 103												rescência					
Q00534	Cyclin-dependent kinase 6			x		x	68009062	aumentada				biópsia	imunohist oquímica					20618617
Q06323	Proteasom e activator complex subunit 1			x			68009062	aumentada				biópsia	<i>electrofore se 2D/ espectome tria de massa</i>	proteómica		x	19118452	19691830
Q06323	Proteasom e activator complex subunit 1			x			68009062	aumentada				biópsia	<i>electrofore se 2D/ espectome tria de massa</i>	proteómica		x	19364392	19691830
Q06323	Proteasom e activator complex subunit 1			x			68009062	aumentada				biópsia	<i>electrofore se 2D/ espectome tria de massa</i>	proteómica		x	19297561	19691830
Q08188	Protein-glutamine gamma-glutamyltr ansferase E			x		x	68009062	diminuida		M/F		biópsia	<i>RT-PCR</i>	proteómica		x	20052393	18490578
Q08188	Protein-glutamine gamma-glutamyltr ansferase E			x		x	68009062	diminuida		M/F		biópsia	<i>RT-PCR</i>	proteómica		x	19118452	18490578
Q08188	Protein-glutamine gamma-glutamyltr ansferase E			x		x	68009062	diminuida		M/F		biópsia	<i>RT-PCR</i>	proteómica		x	19522851	18490578
Q08188	Protein-			x		x	68009062	diminuida		M/F		biópsia	<i>RT-PCR</i>	proteómica		x	19253063	18490578

UniProtKB AC	Nome da proteína	SM/SL	Saliva Total	Mucosa	Língua	Saúde	Patologia (MeSH)	Quantificação	Faixa Etária	Gênero	Hábitos Sociais	Método de Recolha	Método de Análise	Tipo de estudo	Modificações pós-tradução	Biomarcador	OralCard	Referência
	glutamine gamma-glutamyltransferase E																	
Q08188	Protein-glutamine gamma-glutamyltransferase E			x		x	68009062	diminuida		M/F		biópsia	RT-PCR	proteómica		x	15800970	18490578
Q08188	Protein-glutamine gamma-glutamyltransferase E			x		x	68009062	diminuida		M/F		biópsia	RT-PCR	proteómica		x	16103422	18490578
Q08188	Protein-glutamine gamma-glutamyltransferase E			x		x	68009062	diminuida		M/F		biópsia	RT-PCR	proteómica		x	17614365	18490578
Q08188	Protein-glutamine gamma-glutamyltransferase E			x		x	68009062	diminuida		M/F		biópsia	RT-PCR	proteómica		x	18361515	18490578
Q08188	Protein-glutamine gamma-glutamyltransferase E			x		x	68009062	diminuida		M/F		biópsia	RT-PCR	proteómica		x	19199708	18490578
Q08188	Protein-glutamine gamma-glutamyltransferase E			x		x	68009062	diminuida		M/F		biópsia	RT-PCR	proteómica		x	19297561	18490578

UniProtKB AC	Nome da proteína	SM/SL	Saliva Total	Mucosa	Língua	Saúde	Patologia (MeSH)	Quantificação	Faixa Etária	Género	Hábitos Sociais	Método de Recolha	Método de Análise	Tipo de estudo	Modificações pós-tradução	Biomarcador	OralCard	Referência
	ansferase E																	
Q13233	Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 1			x			68009062	aumentada		M/F	alcooolismo/tabagismo	biópsia	hibridizaçãoin situ com fluorescência					20570883
Q14512	Fibroblast growth factor-binding protein 1			x		x	68009062	aumentada	64,2	M/F		biópsia	imunohistoquímica			x	19297561	17273738
Q15063	Periostin			x		x	68009062	aumentada		M/F		biópsia	RT-PCR	proteómica		x	19297561	18490578
Q16627	C-C motif chemokine 14			x		x	68009062	diminuída	Adultos			biópsia	microarray analysis	proteómica		x		17726464
Q16663	C-C motif chemokine 15			x		x	68009062	diminuída	Adultos			biópsia	microarray analysis	proteómica		x		17726464
Q8NEB9	Phosphatidylinositol 3-kinase catalytic subunit type 3			x		x	68009062	aumentada				biópsia	imunohistoquímica					19887755
Q96FQ6	Protein S100-A16			x			68009062					biópsia	electroforese 2D/espectometria de massa	proteómica		x	19199708	19691830
Q96FQ6	Protein S100-A16			x			68009062					biópsia	electroforese 2D/espectometria de massa	proteómica		x	19898684	19691830
Q99417	C-Myc-binding protein			x	x		68009062			M/F		biópsia	imunohistoquímica			x		20145620

UniProtKB AC	Nome da proteína	SM/SL	Saliva Total	Mucosa	Língua	Saúde	Patologia (MeSH)	Quantificação	Faixa Etária	Género	Hábitos Sociais	Método de Recolha	Método de Análise	Tipo de estudo	Modificações pós-tradução	Biomarcador	OralCard	Referência
Q99616	C-C motif chemokine 13			x			68009062	diminuída	Adultos			biópsia	microarray analysis	proteómica		x		17726464
Q9NRD5	PRKCA-binding protein			x		x	68009062	aumentada				biópsia	microarray analysis	proteómica	hipermetilação	x		17726464
Q9UL46	Proteasome activator complex subunit 2			x			68009062	aumentada				biópsia	electroforese 2D/espectrometria de massa	proteómica		x	19297561	19691830
Q9UL46	Proteasome activator complex subunit 2			x			68009062	aumentada				biópsia	electroforese 2D/espectrometria de massa	proteómica		x	19364392	19691830
Q9Y337	Kallikrein-5			x			68009062	aumentada	Adultos			biópsia	RT-PCR/imunohistoquímica				18361515	19085836
Q9Y6F9	Protein Wnt-6			x		x	68009062		Adultos			biópsia	laser capture microdissection with liquid chromatography-tandem mass spectrometry	proteómica		x		15695121
Q8NEB9	Phosphatidylinositol 3-kinase catalytic subunit type 3			x		x	68011230	aumentada				biópsia	imunohistoquímica					19887755
P05787	Keratin, type II cytoskelet			x			68011230	aumentada				biópsia	imunohistoquímica			x	18361515	18803884

UniProtKB AC	Nome da proteína	SM/SL	Saliva Total	Mucosa	Língua	Saúde	Patologia (MeSH)	Quantificação	Faixa Etária	Género	Hábitos Sociais	Método de Recolha	Método de Análise	Tipo de estudo	Modificações pós-tradução	Biomarcador	OralCard	Referência
	al 8																	
P05787	Keratin, type II cytoskelet al 8			x			68011230	aumentada				biópsia	imunohist oquímica			x	19199708	18803884
P05787	Keratin, type II cytoskelet al 8			x			68011230	aumentada				biópsia	imunohist oquímica			x	19297561	18803884
P12830	Cadherin-1			x			68011230	diminuida				biópsia	imunohist oquímica				19297561	16505783
Q99973	Telomeras e protein component 1			x		x	68011230	aumentada	19-75			biópsia	hibridizaç ão <i>in situ</i>					16505783
P06756	Integrin alpha-V			x			68011230	aumentada			tabagism o	biópsia	imunofluo rescência			x	19297561	10780523
O14713	Integrin beta-1-binding protein 1			x		x	68011230	aumentada	Adultos		tabagism o	biópsia	imunofluo rescência			x		10780523
O14735	CDP-diacylglycerol--inositol 3-phosphatidyltransferase			x		x	68011230	aumentada	29-75			biópsia	<i>western blotting, microarra y analysis, confocal laser scan microscopy, RT-PC, imuno histoquímica</i>					20426864
O14746	Telomeras e reverse transcriptase			x		x	68011230	aumentada	62,5 - 68,2	M/F		biópsia	imunohist oquímica					21359449
O14746	Telomeras e reverse transcriptase			x			68011230	aumentada	25-92	M/F		biópsia	imunohist oquímica			x		16798059

UniProtKB AC	Nome da proteína	SM/SL	Saliva Total	Mucosa	Língua	Saúde	Patologia (MeSH)	Quantificação	Faixa Etária	Género	Hábitos Sociais	Método de Recolha	Método de Análise	Tipo de estudo	Modificações pós-tradução	Biomarcador	OralCard	Referência
	se																	
O14746	Telomeras e reverse transcriptase			x		x	68011230	aumentada	42-81	M/F		biópsia	imunohist oquímica/ RT-PCR					17487355
O15392	Baculovira I IAP repeat-containing protein 5			x			68011230	aumentada		M/F		biópsia	imunohist oquímica					15927524
O15496	Group 10 secretory phospholipase A2			x		x	68011230	aumentada	Adultos			biópsia	microarra y analysis	proteómica		x		17726464
O75832	26S proteasom e non-ATPase regulatory subunit 10			x		x	68011230	aumentada				biópsia	imunohist oquímica			x		21868508
P01584	Interleukin -1 beta			x		x	68011230	diminuida				biópsia	PCR/imunohistoquímica				21109482	20727496
P00533	Epidermal growth factor receptor			x			68011230	aumentada	Adultos	M/F	alcoolis mo/tabagismo	biópsia	hibridizaç ão in situ com fluorescên cia				19297561	20570883
P04637	Cellular tumor antigen p53			x			68011230		59,6	M/F		biópsia	imunohist oquímica			x		11865002
P05109	Protein S100-A8		x	x			68011230	aumentada				exsudate, brush biopsy, saliva total	espectome tria de massa			x	15386514	21914210
P05109	Protein S100-A8		x	x			68011230	aumentada				exsudate, brush biopsy,	espectome tria de massa			x	15473691	21914210

<i>UniProtKB AC</i>	Nome da proteína	SM/SL	Saliva Total	Mucosa	Língua	Saúde	Patologia (MeSH)	Quantificação	Faixa Etária	Gênero	Hábitos Sociais	Método de Recolha	Método de Análise	Tipo de estudo	Modificações pós-tradução	Biomarcador	OralCard	Referência
												<i>saliva total</i>						
P05109	Protein S100-A8		x	x			68011230	aumentada				<i>exsudate, brush biopsy, saliva total</i>	<i>espectometria de massa</i>			x	15485636	21914210
P05109	Protein S100-A8		x	x			68011230	aumentada				<i>exsudate, brush biopsy, saliva total</i>	<i>espectometria de massa</i>			x	16103422	21914210
P05109	Protein S100-A8		x	x			68011230	aumentada				<i>exsudate, brush biopsy, saliva total</i>	<i>espectometria de massa</i>			x	16402355	21914210
P05109	Protein S100-A8		x	x			68011230	aumentada				<i>exsudate, brush biopsy, saliva total</i>	<i>espectometria de massa</i>			x	17614365	21914210
P05109	Protein S100-A8		x	x			68011230	aumentada				<i>exsudate, brush biopsy, saliva total</i>	<i>espectometria de massa</i>			x	18361515	21914210
P05109	Protein S100-A8		x	x			68011230	aumentada				<i>exsudate, brush biopsy, saliva total</i>	<i>espectometria de massa</i>			x	18434574	21914210
P05109	Protein S100-A8		x	x			68011230	aumentada				<i>exsudate, brush biopsy, saliva total</i>	<i>espectometria de massa</i>			x	19199708	21914210
P05109	Protein S100-A8		x	x			68011230	aumentada				<i>exsudate, brush biopsy, saliva total</i>	<i>espectometria de massa</i>			x	19297561	21914210
P05109	Protein S100-A8		x	x			68011230	aumentada				<i>exsudate, brush biopsy, saliva total</i>	<i>espectometria de massa</i>			x	20943598	21914210
P05412	Transcriptin factor			x		x	68011230	aumentada				biópsia	imunohist química					16050486

UniProtKB AC	Nome da proteína	SM/SL	Saliva Total	Mucosa	Língua	Saúde	Patologia (MeSH)	Quantificação	Faixa Etária	Género	Hábitos Sociais	Método de Recolha	Método de Análise	Tipo de estudo	Modificações pós-tradução	Biomarcador	OralCard	Referência
	AP-1																	
P08254	Stromelysin-1			x		x	68011230	aumentada	31-80	M/F		biópsia	<i>cDNA microarray</i>					19887755
P08727	Keratin, type I cytoskeletal 19			x		x	68011230	aumentada				biópsia	imunohistoquímica				20205380	19887755
P08727	Keratin, type I cytoskeletal 19			x		x	68011230	aumentada				biópsia	imunohistoquímica				19364392	19887755
P08727	Keratin, type I cytoskeletal 19			x		x	68011230	aumentada				biópsia	imunohistoquímica				19297561	19887755
P08727	Keratin, type I cytoskeletal 19			x		x	68011230	aumentada				biópsia	imunohistoquímica				17614365	19887755
P08727	Keratin, type I cytoskeletal 19			x		x	68011230	aumentada				biópsia	imunohistoquímica				18361515	19887755
P08727	Keratin, type I cytoskeletal 19			x		x	68011230	aumentada				biópsia	imunohistoquímica				19199708	19887755
P08758	Annexin A5			x			68011230	diminuída				biópsia	<i>electroforese 2D/espectometria de massa</i>	proteómica		x	19199708	19691830
P08758	Annexin A5			x			68011230	diminuída				biópsia	<i>electroforese 2D/espectometria de massa</i>	proteómica		x	19297561	19691830

UniProtKB AC	Nome da proteína	SM/SL	Saliva Total	Mucosa	Língua	Saúde	Patologia (MeSH)	Quantificação	Faixa Etária	Género	Hábitos Sociais	Método de Recolha	Método de Análise	Tipo de estudo	Modificações pós-tradução	Biomarcador	OralCard	Referência
P08758	Annexin A5			x			68011230	diminuída				biópsia	<i>electroforese 2D/ espectometria de massa</i>	proteómica		x	19898684	19691830
P09525	Annexin A4			x			68011230	diminuída				biópsia	<i>electroforese 2D/ espectometria de massa</i>	proteómica		x	18361515	19691830
P09525	Annexin A4			x			68011230	diminuída				biópsia	<i>electroforese 2D/ espectometria de massa</i>	proteómica		x	19199708	19691830
P09525	Annexin A4			x			68011230	diminuída				biópsia	<i>electroforese 2D/ espectometria de massa</i>	proteómica		x	19297561	19691830
P10147	C-C motif chemokine 3			x		x	68011230	diminuída	Adultos			biópsia	<i>microarray analysis</i>	proteómica		x		17726464
P01137	Transforming growth factor beta-1			x		x	68011230	aumentada				biópsia	<i>PCR/imunohistoquímica</i>					20727496
P11802	Cyclin-dependent kinase 4			x		x	68011230	aumentada				biópsia	imunohistoquímica				15800970	20618617
P12004	Proliferating cell nuclear antigen			x			68011230	aumentada	20-63	M/F	<i>areca quid chewing</i>	biópsia	imunohistoquímica				18361515	10899674
P12004	Proliferating cell nuclear antigen			x			68011230	aumentada	20-63	M/F	<i>areca quid chewing</i>	biópsia	imunohistoquímica				19297561	10899674
P12429	Annexin			x			68011230	diminuída				biópsia	<i>electroforese</i>	proteómica		x	19364392	19691830

<i>UniProtKB AC</i>	Nome da proteína	SM/SL	Saliva Total	Mucosa	Língua	Saúde	Patologia (MeSH)	Quantificação	Faixa Etária	Género	Hábitos Sociais	Método de Recolha	Método de Análise	Tipo de estudo	Modificações pós-tradução	Biomarcador	OralCard	Referência
	A3												<i>se 2D/ espectometria de massa</i>					
P12429	Annexin A3			x			68011230	diminuída				biópsia	<i>electroforese 2D/ espectometria de massa</i>	proteómica		x	19297561	19691830
P12429	Annexin A3			x			68011230	diminuída				biópsia	<i>electroforese 2D/ espectometria de massa</i>	proteómica		x	16103422	19691830
P12429	Annexin A3			x			68011230	diminuída				biópsia	<i>electroforese 2D/ espectometria de massa</i>	proteómica		x	17614365	19691830
P12429	Annexin A3			x			68011230	diminuída				biópsia	<i>electroforese 2D/ espectometria de massa</i>	proteómica		x	18361515	19691830
P12838	Neutrophil defensin 4			x		x	68011230	aumentada				biópsia	<i>PCR/imunohistoquímica</i>				20585025	20727496
P12956	X-ray repair cross-complementing protein 6		x	x		x	68011230	aumentada				<i>exsudate, brush biopsy, saliva total</i>	<i>espectometria de massa</i>			x	19118452	21914210
P12956	X-ray repair cross-complementing protein 6		x	x		x	68011230	aumentada				<i>exsudate, brush biopsy, saliva total</i>	<i>espectometria de massa</i>			x	16103422	21914210

UniProtKB AC	Nome da proteína	SM/SL	Saliva Total	Mucosa	Língua	Saúde	Patologia (MeSH)	Quantificação	Faixa Etária	Género	Hábitos Sociais	Método de Recolha	Método de Análise	Tipo de estudo	Modificações pós-tradução	Biomarcador	OralCard	Referência
P12956	X-ray repair cross-complementing protein 6		x	x		x	68011230	aumentada				<i>exsudate, brush biopsy, saliva total</i>	<i>espectometria de massa</i>			x	17614365	21914210
P12956	X-ray repair cross-complementing protein 6		x	x		x	68011230	aumentada				<i>exsudate, brush biopsy, saliva total</i>	<i>espectometria de massa</i>			x	19297561	21914210
P13010	X-ray repair cross-complementing protein 5		x	x		x	68011230	aumentada				<i>exsudate, brush biopsy, saliva total</i>	<i>espectometria de massa</i>			x	19297561	21914210
P13500	C-C motif chemokine 2			x		x	68011230	diminuída	Adultos			biópsia	<i>microarray analysis</i>	proteómica		x		17726464
P13501	C-C motif chemokine 5			x		x	68011230	diminuída	Adultos			biópsia	<i>microarray analysis</i>	proteómica		x		17726464
P13645	Keratin, type I cytoskeletal 10			x		x	68011230	aumentada	Adultos			biópsia	hibridização <i>in situ</i> /imunoquímica				20205380	11287279
P13645	Keratin, type I cytoskeletal 10			x		x	68011230	aumentada	Adultos			biópsia	hibridização <i>in situ</i> /imunoquímica				21794177	11287279
P13645	Keratin, type I cytoskeletal 10			x		x	68011230	aumentada	Adultos			biópsia	hibridização <i>in situ</i> /imunoquímica				18939961	11287279

UniProtKB AC	Nome da proteína	SM/SL	Saliva Total	Mucosa	Língua	Saúde	Patologia (MeSH)	Quantificação	Faixa Etária	Género	Hábitos Sociais	Método de Recolha	Método de Análise	Tipo de estudo	Modificações pós-tradução	Biomarcador	OralCard	Referência
P13645	Keratin, type I cytoskeletal 10			x		x	68011230	aumentada	Adultos			biópsia	hibridização <i>in situ</i> /imunohistoquímica				20662485	11287279
P13645	Keratin, type I cytoskeletal 10			x		x	68011230	aumentada	Adultos			biópsia	hibridização <i>in situ</i> /imunohistoquímica				16103422	11287279
P13646	Keratin, type I cytoskeletal 13			x	x	x	68011230	aumentada				biópsia	imunohistoquímica				21299198	19887755
P13646	Keratin, type I cytoskeletal 13			x	x	x	68011230	aumentada				biópsia	imunohistoquímica				21936497	19887755
P13928	Annexin A8			x			68011230	aumentada				biópsia	<i>electroforese 2D/ espectometria de massa</i>	proteómica		x	18361515	19691830
P13928	Annexin A8			x			68011230	aumentada				biópsia	<i>electroforese 2D/ espectometria de massa</i>	proteómica		x	19297561	19691830
P15559	NAD(P)H dehydrogenase [quinone] 1		x	x		x	68011230	aumentada				<i>exsudate, brush biopsy, saliva total</i>	<i>espectometria de massa</i>			x	16103422	21914210
P15692	Vascular endothelial growth factor A			x		x	68011230	aumentada	33-82			biópsia	imunohistoquímica					12465010
P16070	CD44 antigen			x		x	68011230	aumentada				biópsia	imunohistoquímica				19297561	18852874

UniProtKB AC	Nome da proteína	SM/SL	Saliva Total	Mucosa	Língua	Saúde	Patologia (MeSH)	Quantificação	Faixa Etária	Género	Hábitos Sociais	Método de Recolha	Método de Análise	Tipo de estudo	Modificações pós-tradução	Biomarcador	OralCard	Referência
P16070	CD44 antigen			x		x	68011230	aumentada				biópsia	imunohist oquímica				21142092	18852874
P16070	CD44 antigen			x		x	68011230	aumentada				biópsia	imunohist oquímica				18361515	18852874
P16144	Integrin beta-4			x		x	68011230				tabagism o	biópsia	imunofluo rescência			x	19297561	10780523
P16144	Integrin beta-4			x		x	68011230				tabagism o	biópsia	imunofluo rescência			x	19199708	10780523
P18827	Syndecan-1			x			68011230	diminuida				biópsia	imunohist oquímica				19297561	17473685
P19013	Keratin, type II cytoskeletal 4			x			68011230	diminuida	Adultos			biópsia	hibridizaç ão <i>in situ</i> /imuno histoquímica				16103422	11287279
P19013	Keratin, type II cytoskeletal 4			x			68011230	diminuida	Adultos			biópsia	hibridizaç ão <i>in situ</i> /imuno histoquímica				17614365	11287279
P19013	Keratin, type II cytoskeletal 4			x			68011230	diminuida	Adultos			biópsia	hibridizaç ão <i>in situ</i> /imuno histoquímica				18361515	11287279
P19013	Keratin, type II cytoskeletal 4			x			68011230	diminuida	Adultos			biópsia	hibridizaç ão <i>in situ</i> /imuno histoquímica				19199708	11287279
P23219	Prostaglandin G/H synthase 1			x		x	68011230	aumentada				biópsia	<i>western blot</i> /TUNEL/ imunohistoquímica					15743693
P24821	Tenascin			x		x	68011230	aumentada				biópsia	PCR/imunohistoquímica					20727496
P31949	Protein S100-A11			x			68011230					biópsia	<i>electroforese 2D</i> /	proteómica		x	20052393	19691830

<i>UniProtKB AC</i>	Nome da proteína	SM/SL	Saliva Total	Mucosa	Língua	Saúde	Patologia (MeSH)	Quantificação	Faixa Etária	Género	Hábitos Sociais	Método de Recolha	Método de Análise	Tipo de estudo	Modificações pós-tradução	Biomarcador	OralCard	Referência
													<i>espectometria de massa</i>					
P31949	Protein S100-A11			x			68011230					biópsia	<i>electroforese 2D/ espectometria de massa</i>	proteómica		x	19118452	19691830
P31949	Protein S100-A11			x			68011230					biópsia	<i>electroforese 2D/ espectometria de massa</i>	proteómica		x	21794177	19691830
P31949	Protein S100-A11			x			68011230					biópsia	<i>electroforese 2D/ espectometria de massa</i>	proteómica		x	19364392	19691830
P31949	Protein S100-A11			x			68011230					biópsia	<i>electroforese 2D/ espectometria de massa</i>	proteómica		x	18829504	19691830
P31949	Protein S100-A11			x			68011230					biópsia	<i>electroforese 2D/ espectometria de massa</i>	proteómica		x	17614365	19691830
P35228	Nitric oxide synthase, inducible			x		x	68011230	aumentada	33-82	M/F		biópsia	imunohistológica					12465010
P35354	Prostaglandin G/H synthase 2			x			68011230	aumentada	42-88	M/F		biópsia	PCR/imunohistológica			x		20599939
P36952	Serpin B5			x	x		68011230	aumentada				biópsia	imunohistológica				16103422	18783348
P36952	Serpin B5			x	x		68011230	aumentada				biópsia	imunohistológica				17614365	18783348

UniProtKB AC	Nome da proteína	SM/SL	Saliva Total	Mucosa	Língua	Saúde	Patologia (MeSH)	Quantificação	Faixa Etária	Género	Hábitos Sociais	Método de Recolha	Método de Análise	Tipo de estudo	Modificações pós-tradução	Biomarcador	OralCard	Referência
P36952	Serpin B5			x	x		68011230	aumentada				biópsia	imunohist oquímica				18361515	18783348
P36952	Serpin B5			x	x		68011230	aumentada				biópsia	imunohist oquímica				19297561	18783348
P36952	Serpin B5			x	x		68011230	aumentada				biópsia	imunohist oquímica				21936497	18783348
P36952	Serpin B5			x	x		68011230	aumentada				biópsia	imunohist oquímica				19118452	18783348
P42771	Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A, isoforms 1/2/3			x			68011230		26-87	M/F		biópsia	PCR-multiplex/PCR-fluorescência					12234999
P42771	Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A, isoforms 1/2/3			x	x		68011230	diminuída	Adultos			biópsia	imunohist oquímica					16799478
P46013	Antigen KI-67			x		x	68011230	aumentada				biópsia	imunohist oquímica			x	19898684	19293805
P46013	Antigen KI-67			x		x	68011230	aumentada				biópsia	imunohist oquímica			x	20943598	19088879
P48061	Stromal cell-derived factor 1			x		x	68011230	diminuída	Adultos			biópsia	microarray analysis	proteómica		x		17726464
P49736	DNA replication licensing factor MCM2			x		x	68011230	aumentada				biópsia	imunohist oquímica			x	20205380	19293805
P52272	Heterogenous nuclear ribonucleo		x	x		x	68011230					exsudate, brush biopsy, saliva total	espectometria de massa			x	17614365	21914210

UniProtKB AC	Nome da proteína	SM/SL	Saliva Total	Mucosa	Língua	Saúde	Patologia (MeSH)	Quantificação	Faixa Etária	Género	Hábitos Sociais	Método de Recolha	Método de Análise	Tipo de estudo	Modificações pós-tradução	Biomarcador	OralCard	Referência
	protein M																	
P52272	Heterogeneous nuclear ribonucleo protein M		x	x		x	68011230					<i>exsudate, brush biopsy, saliva total</i>	espectometria de massa			x	19297561	21914210
P52272	Heterogeneous nuclear ribonucleo protein M		x	x		x	68011230					<i>exsudate, brush biopsy, saliva total</i>	espectometria de massa			x	16103422	21914210
P61289	Proteasome activator complex subunit 3						68011230					biópsia	electroforese 2D/ espectometria de massa	proteómica		x	19297561	19691830
P80188	Neutrophil gelatinase-associated lipocalin		x	x		x	68011230			M/F		<i>exsudate, brush biopsy, saliva total</i>	espectometria de massa			x	20052393	21914210
P80188	Neutrophil gelatinase-associated lipocalin		x	x		x	68011230			M/F		<i>exsudate, brush biopsy, saliva total</i>	espectometria de massa			x	19118452	21914210
P80188	Neutrophil gelatinase-associated lipocalin		x	x		x	68011230			M/F		<i>exsudate, brush biopsy, saliva total</i>	espectometria de massa			x	20205380	21914210
P80188	Neutrophil gelatinase-associated lipocalin		x	x		x	68011230					<i>exsudate, brush biopsy, saliva total</i>	espectometria de massa			x	21794177	21914210
P80188	Neutrophil gelatinase-associated lipocalin		x	x		x	68011230					<i>exsudate, brush biopsy, saliva total</i>	espectometria de massa			x	19253063	21914210
P80188	Neutrophil gelatinase-associated		x	x		x	68011230					<i>exsudate, brush biopsy,</i>	espectometria de massa			x	15473691	21914210

UniProtKB AC	Nome da proteína	SM/SL	Saliva Total	Mucosa	Língua	Saúde	Patologia (MeSH)	Quantificação	Faixa Etária	Género	Hábitos Sociais	Método de Recolha	Método de Análise	Tipo de estudo	Modificações pós-tradução	Biomarcador	OralCard	Referência
	lipocalin											saliva total						
P80188	Neutrophil gelatinase-associated lipocalin		x	x		x	68011230					exsudate, brush biopsy, saliva total	espectometria de massa			x	15800970	21914210
P80188	Neutrophil gelatinase-associated lipocalin		x	x		x	68011230			M/F		exsudate, brush biopsy, saliva total	espectometria de massa			x	16103422	21914210
P80188	Neutrophil gelatinase-associated lipocalin		x	x		x	68011230					exsudate, brush biopsy, saliva total	espectometria de massa			x	16740002	21914210
P80188	Neutrophil gelatinase-associated lipocalin		x	x		x	68011230					exsudate, brush biopsy, saliva total	espectometria de massa			x	17614365	21914210
P80188	Neutrophil gelatinase-associated lipocalin		x	x		x	68011230					exsudate, brush biopsy, saliva total	espectometria de massa	proteómica		x	17623646	21914210
P80188	Neutrophil gelatinase-associated lipocalin		x	x		x	68011230					exsudate, brush biopsy, saliva total	espectometria de massa	proteómica		x	18361515	21914210
P80188	Neutrophil gelatinase-associated lipocalin		x	x		x	68011230					exsudate, brush biopsy, saliva total	espectometria de massa	proteómica		x	18434574	21914210
P80188	Neutrophil gelatinase-associated lipocalin		x	x		x	68011230					exsudate, brush biopsy, saliva total	espectometria de massa	proteómica		x	21142092	21914210
P80188	Neutrophil gelatinase-associated lipocalin		x	x		x	68011230					exsudate, brush biopsy, saliva total	espectometria de massa	proteómica		x	21936497	21914210
P80188	Neutrophil gelatinase-		x	x		x	68011230			M/F		exsudate, brush	espectometria de			x	21960768	21914210

UniProtKB AC	Nome da proteína	SM/SL	Saliva Total	Mucosa	Língua	Saúde	Patologia (MeSH)	Quantificação	Faixa Etária	Género	Hábitos Sociais	Método de Recolha	Método de Análise	Tipo de estudo	Modificações pós-tradução	Biomarcador	OralCard	Referência
	associated lipocalin											<i>biopsy, saliva total</i>	massa					
Q14512	Fibroblast growth factor-binding protein 1			x		x	68011230	aumentada	62,9	M/F		biópsia	imunohist oquímica				19297561	17273738
Q16627	C-C motif chemokine 14			x		x	68011230	diminuida	Adultos			biópsia	<i>microarra y analysis</i>	proteómica		x		17726464
Q16663	C-C motif chemokine 15			x		x	68011230	diminuida	Adultos	M/F		biópsia	<i>microarra y analysis</i>	proteómica		x		17726464
Q4L180	Filamin A-interacting protein 1-like			x		x	68011230	diminuida				biópsia	PCR/imunohistoquí mica					20727496
Q86YL7	Podoplanin			x			68011230	aumentada	Adultos	M/F		biópsia	imunohist oquímica			x		19773378
Q96FQ6	Protein S100-A16			x			68011230					biópsia	electrofore se 2D/ espectome tria de massa	proteómica		x	19297561	19691830
Q96FQ6	Protein S100-A16			x			68011230					biópsia	electrofore se 2D/ espectome tria de massa	proteómica		x	17614365	19691830
Q96FQ6	Protein S100-A16			x			68011230					biópsia	electrofore se 2D/ espectome tria de massa	proteómica		x	18361515	19691830
Q99616	C-C motif chemokine 13			x		x	68011230	diminuida				biópsia	<i>microarra y analysis</i>	proteómica		x		17726464
Q9H3D4	Tumor protein 63			x			68011230	aumentada	Adultos	M/F		biópsia	imunohist oquímica			x		19773378

UniProtKB AC	Nome da proteína	SM/SL	Saliva Total	Mucosa	Língua	Saúde	Patologia (MeSH)	Quantificação	Faixa Etária	Género	Hábitos Sociais	Método de Recolha	Método de Análise	Tipo de estudo	Modificações pós-tradução	Biomarcador	OralCard	Referência
Q9H3D4	Tumor protein 63			x		x	68011230	diminuída	42-78	M/F		biópsia	RT-PCR					17418619
Q9H3D4	Tumor protein 63			x		x	68011230	aumentada	Adultos	M/F		biópsia	imunohistológica			x		19773378
Q9UHA7	Interleukin -36 alpha		x	x		x	68011230	aumentada				<i>exsudate, brush biopsy, saliva total</i>	espectrometria de massa			x	17614365	21914210
Q9UHA7	Interleukin -36 alpha		x	x		x	68011230	aumentada				<i>exsudate, brush biopsy, saliva total</i>	espectrometria de massa			x	18361515	21914210
Q9UHA7	Interleukin -36 alpha		x	x		x	68011230	aumentada				<i>exsudate, brush biopsy, saliva total</i>	espectrometria de massa			x	21299198	21914210
Q9UL46	Proteasome activator complex subunit 2			x			68011230					biópsia	electroforese 2D/ espectrometria de massa	proteómica		x	16103422	19691830
Q9UL46	Proteasome activator complex subunit 2			x			68011230					biópsia	electroforese 2D/ espectrometria de massa	proteómica		x	17614365	19691830

