



CATÓLICA  
FACULDADE DE MEDICINA DENTÁRIA

---

UISEU

PROPOSTA DE BIOMARCADORES SALIVARES PARA LÍQUEN  
PLANO ORAL – ABORDAGEM BIOINFORMÁTICA

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

Por:  
José Pedro Figueiredo de Melo Santos

Viseu, 2020





CATÓLICA  
FACULDADE DE MEDICINA DENTÁRIA

---

VISEU

## PROPOSTA DE BIOMARCADORES SALIVARES PARA LÍQUEN PLANO ORAL – ABORDAGEM BIOINFORMÁTICA

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

Por:

José Pedro Figueiredo de Melo Santos

Orientador: Nuno Ricardo das Neves Rosa

Coorientador: Ana Cristina Esteves

Viseu, 2020



*“The great fault of all ethics hitherto has been that they believed themselves to have to deal only with the relations of man to man. In reality, however, the question is what is his attitude to the world and all life that comes within his reach”*

*Albert Schweitzer*



## *Dedicatória*

Aos meus pais, que me apoiaram incansavelmente ao longo de todo o percurso.  
Foram vocês que possibilitaram este trabalho.



## ***Agradecimentos***

### **Prof. Doutor Nuno Rosa**

Pela orientação, disponibilidade, compreensão, paciência e motivação.

Obrigado, professor.

### **Profa. Doutora Ana Cristina Esteves**

Por tudo que me ensinou sobre este tema e pela sua disponibilidade.

Obrigado, professora.

### **Laboratório SalivaTec**

Por me terem mostrado a dinâmica da ciência.

Obrigado a todos os elementos!

### **Padre António Almeida**

Por me ter ouvido e guiado quando mais precisei.

Obrigado, padre Tó Jó.

### **Miguel Matos**

Por todas as conversas, compreensão e entreaajuda.

Formar o binómio 83 contigo foi lendário.

### **Chi**

Por tudo.





## 1. Resumo

**Introdução:** o Líquen Plano é uma patologia inflamatória crónica, mucocutânea, com possível origem autoimune. As classificações clínicas de Líquen Plano Oral mais assiduamente descritas são a reticular, erosiva, bolhosa e em forma de placa. Embora a apresentação clínica faça parte do diagnóstico, é recomendado que este seja confirmado com recurso a biópsia das lesões e respetiva confirmação histológica e, por vezes, com recurso a biomarcadores. Contudo, falta desenvolver informação que auxilie na identificação de painéis de biomarcadores específicos, precoces e objetivos, bem como esclarecer os aspetos moleculares do desenvolvimento e manifestação da patologia.

**Objetivo:** desenvolvimento de uma estratégia bioinformática que permita a identificação de um conjunto de proteínas orais diferencialmente expressas em pacientes com Líquen Plano Oral, que permita propor um painel de biomarcadores salivares uteis para o diagnóstico desta doença.

**Métodos:** identificação de estudos de proteómica de saliva associados a Líquen Plano e anotação manual da informação relevante sobre as proteínas identificadas em pacientes com a patologia. Análise funcional do proteoma salivar anotado, com levantamento dos processos biológicos associados a cada proteína e associação com outras patologias, com patologias autoimunes, e com Líquen Plano. Seleção de um painel de biomarcadores salivares para o Líquen Plano Oral.

**Resultados:** os estudos identificados permitiram a anotação de 136 proteínas diferentes. Destas, 42 foram associadas a pelo menos um processo biológico relacionado com o Líquen Plano Oral, 102 já se encontravam associadas a uma ou mais patologias, das quais 53 apresentaram associação com patologias autoimunes e 10 com Líquen Plano.

**Conclusão:** foram identificadas seis proteínas que cumpriram os critérios para integrarem um painel de biomarcadores salivares para o Líquen Plano Oral: TNF- $\alpha$ , TNFR-2 (ou TNFR-1 $\beta$ ), IL-1 $\alpha$ , IL-6, fibrinogénio cadeia  $\beta$  e componente do complemento C3. Sugere-se a validação deste painel.

**Palavras-chave:** proteínas salivares; proteómica; biomarcadores; Líquen Plano Oral; bioinformática.





## 2. Abstract

**Introduction:** lichen planus is a chronic, inflammatory, mucocutaneous disease with possibly represents an autoimmune disease. The most often described clinical appearances are reticular, erosive, bullous and plaquelike. Even though clinical appearance is a part of the diagnosis, biopsy and histological confirmation, and sometimes the use of biomarkers, is recommended. Yet, there is a lack of information regarding the identification of biomarkers that are precise, early and objective, as well of an enlightenment of the molecular aspects concerning the development and manifestation of the disease.

**Objectives:** this study aims to develop a bioinformatic strategy that allows the identification of a group of protein that manifest differently in the presence of oral lichen planus, culminating with the proposal of a biomarker panel that is useful for diagnosis of oral lichen planus.

**Methods:** identification of available proteomic studies associated with lichen planus and manual compilation of relevant data about the proteins. Functional analysis of the salivary proteome featuring biologic process and known disease association screening, including association with autoimmune diseases, lichen planus and other diseases Selection of a salivary biomarker panel for oral lichen planus.

**Results:** identified studies allowed the identification of 136 non-redundant proteins, where 42 presented at least one biologic process related with de disease and 102 were related to one or more diseases, of which 53 were related to autoimmune diseases and 10 of those were had a known association with lichen planus.

**Conclusion:** 6 proteins were identified as adequate members of the salivary biomarker panel for oral lichen planus: TNF- $\alpha$ , TNFR-2 (or TNFR-1 $\beta$ ), IL-1 $\alpha$ , IL-6, fibrinogen chain  $\beta$  and complement component C3. The attempt to validate this panel is suggested.

**Keywords:** salivary proteins; proteomics; biomarkers; oral lichen planus; bioinformatics.



# Índice

1. <i>Resumo</i> .....	xi
2. <i>Abstract</i> .....	xiii
3. <i>Introdução</i> .....	1
3.1 <i>Doenças autoimunes</i> .....	1
3.2 <i>Líquen Plano</i> .....	2
3.2.1 <i>Fisiopatologia de Líquen Plano</i> .....	2
3.2.2 <i>Distúrbios psicológicos e o Líquen Plano Oral</i> .....	3
3.2.3 <i>Diagnóstico de Líquen Plano</i> .....	4
3.3 <i>Saliva como fluido de diagnóstico</i> .....	5
3.3.1 <i>O estudo do proteoma salivar</i> .....	6
3.3.2 <i>Análise funcional do proteoma salivar</i> .....	7
4. <i>Objetivos</i> .....	9
5. <i>Material e Métodos</i> .....	13
5.1 <i>Identificação de estudos de proteômica de saliva associados a Líquen Plano</i> .....	15
5.2 <i>Anotação manual da informação relevante sobre as proteínas orais identificadas em pacientes com Líquen Plano</i> .....	16
5.3 <i>Análise funcional do proteoma salivar associado a Líquen Plano para determinação de um painel de biomarcadores</i> .....	17
5.3.1 <i>Processos biológicos associados às proteínas relacionadas com Líquen Plano</i> .....	18
5.3.2 <i>Outras patologias associados às proteínas relacionadas com Líquen Plano</i> ...	18
5.4 <i>Seleção de um painel de biomarcadores salivares para Líquen Plano</i> .....	19
6. <i>Resultados</i> .....	23
6.1 <i>Identificação de estudos de proteômica de saliva associados a Líquen Plano</i> .....	25
6.2 <i>Anotação manual da informação relevante sobre as proteínas orais identificadas em pacientes com Líquen Plano</i> .....	25

6.3 <i>Análise funcional do proteoma salivar associado a Líquen Plano para determinação de um painel de biomarcadores</i> .....	43
6.3.1 <i>Processos biológicos associados às proteínas relacionadas com Líquen Plano</i> .....	43
6.3.2 <i>Outras patologias associados às proteínas relacionadas com Líquen Plano</i> ...	49
6.4 <i>Proposta de um painel de Biomarcadores para Líquen Plano Oral</i> .....	55
7. <i>Discussão</i> .....	63
7.1 <i>Associação das proteínas a processos biológicos relacionados com Líquen Plano Oral</i> .....	65
7.1.2 <i>Líquen Plano Oral e doenças autoimunes</i> .....	65
7.1.2 <i>Associação entre Líquen Plano Oral e antígenos virais</i> .....	66
7.2 <i>Discussão do painel de biomarcadores sugerido</i> .....	66
7.2.1 <i>Interferão gama</i> .....	66
7.2.2 <i>TNF-<math>\alpha</math>, TNFR-1 e TNFR-2</i> .....	68
7.2.3 <i>Interleucina 1 alfa</i> .....	70
7.2.4 <i>Interleucina 6</i> .....	71
7.2.5 <i>Fibrinogénio</i> .....	71
7.2.6 <i>Componente do complemento C3c</i> .....	72
7.2.7 <i>Proposta de painel de biomarcadores</i> .....	73
7.3 <i>Limitações</i> .....	73
8. <i>Conclusão</i> .....	75
9. <i>Bibliografia</i> .....	79

## ***Índice de figuras***

<b>Figura 1.</b> Representação da metodologia utilizada neste trabalho .....	15
<b>Figura 2.</b> Análise funcional (processo biológico) das proteínas diferencialmente expressas em líquen plano. ....	44
<b>Figura 3.</b> Resultados devolvidos pela ferramenta DAVID .....	49
<b>Figura 4.</b> Gráfico com o número de proteínas por classe de doença. ....	49
<b>Figura 5.</b> Esquema da ativação dos linfócitos T CD8+ (citotóxicos) e CD4+ ( <i>helper</i> ).....	68
<b>Figura 6.</b> Possíveis mecanismos relacionados com a apoptose. ....	69

## **Índice de tabelas**

<b>Tabela 1:</b> Anotação manual da informação relevante sobre as proteínas orais identificadas em pacientes com Líquen Plano. ....	26
<b>Tabela 2:</b> Participação das proteínas em processos biológicos relacionados com o Líquen Plano. Análise feita recorrendo à ferramenta “Retrieve/ID mapping” do Uniprot. ....	45
<b>Tabela 3:</b> Proteínas com associações conhecidas e diferentes patologias, patologias autoimunes e Líquen Plano. Análise feita recorrendo à ferramenta DAVID através das opções GAD_DISEASE (associação com líquen plano e com outras patologias) e GAD_DISEASE_CLASS (associação com doenças autoimunes). ....	50
<b>Tabela 4:</b> Determinação do score utilizando as regras e fórmula definidas no ponto 5.4 do material e métodos. ....	55







## ***Nota prévia***

Nesta dissertação aparecem, por vezes, expressões em língua Inglesa, escritas em itálico, de modo a manter a uniformização universal dos termos usados para descrever conceitos biológicos, entre culturas e línguas diferentes. A tradução destas expressões poderia distorcer o seu significado original e alterar o conceito biológico que se pretende identificar.





### **3. Introdução**



## **Introdução**

### **3.1 Doenças autoimunes**

As doenças autoimunes são patologias que resultam da perda do mecanismo de autotolerância, havendo destruição tecidual mediada por resposta imune<sup>1</sup>. Este processo pode ser mediado por autoanticorpos ou linfócitos T citotóxicos, requerendo sempre a presença de linfócitos T auxiliares, e pode afetar a nível sistémico ou um órgão específico<sup>2</sup>.

O desenvolvimento de um problema de autoimunidade pode ter início na falha dos mecanismos de autotolerância tanto a nível do timo (linfócitos T) como da medula óssea (linfócitos B)<sup>2,3</sup>. Os linfócitos maduros são posteriormente submetidos a um processo de seleção secundária, sendo alvos de um mecanismo periférico<sup>4</sup>. Embora estes erros possam estar presentes em pacientes com doença autoimune, os que ocorrem em fases mais iniciais, como a maturação dos linfócitos no timo ou na medula óssea e até no início da seleção secundária, podem não originar patologia<sup>3,4</sup>.

Os casos de autoimunidade podem surgir também devido à apresentação defeituosa de auto-antígenos. Isto pode dever-se à falta de remoção ou excesso de detritos derivados de apoptose, inflamação e reação cruzada<sup>3</sup>.

A maior parte das patologias autoimunes requer a existência de uma predisposição genética<sup>2</sup>. Adicionalmente à predisposição genética, a autoimunidade pode ser também influenciada por fatores ambientais tais como xenobióticos, a nutrição, microbiota, processos infecciosos, fumo de tabaco, fármacos, hormonas, luz ultravioleta, metais pesados, vacinas e implantes de colagénio ou silicone<sup>4</sup>.

Atualmente, o diagnóstico das doenças autoimunes pode ser feito seguindo o modelo apresentado por L. Wang e colegas<sup>4</sup>:

1. Realizar a história clínica e exame físico
2. Exames laboratoriais
  - a. Hemograma completo



- b. Análise bioquímica para teste das funções hepática, renal, tiroideia e metabolismo da glicose.
  - c. Autoanticorpos específicos ou não específicos
  - d. Outros, como proteína C-Reativa, sistema do complemento, imunoglobulinas, velocidade de sedimentação, ferritina, hormonas T3 e T4.
3. Testes adicionais e opcionais
- a. Biópsia
  - b. Teste genético para determinação da existência do alelo HLA-B27
  - c. Citocinas
  - d. Citometria de fluxo
  - e. Testes imagiológicos

Wang<sup>4</sup> avança ainda que o diagnóstico é dificultado pela falta de critérios específicos para o diagnóstico baseado em análises laboratoriais; existência de características genericamente semelhantes entre diversas patologias autoimunes (como a presença de anticorpos antimitocondriais antes do desenvolvimento de patologia, algo que pode acontecer na artrite reumatoide, esclerose múltipla e diabetes tipo I); necessidade de realização de biópsia do órgão afetado, uma vez que a concentração de autoanticorpos estará muito aumentada face à concentração obtida através de análises ao plasma; existência de vários fatores ambientais que afetam o desenvolvimento da patologia<sup>4</sup>.

Atualmente são conhecidas diversas patologias autoimunes, como diabetes tipo I, esclerose múltipla, doença intestinal inflamatória, miastenia grave<sup>2</sup>, lúpus eritematoso sistémico, artrite reumatoide<sup>1</sup> e Líquen Plano<sup>5</sup>.

### **3.2 Líquen Plano**

#### **3.2.1 Fisiopatologia de Líquen Plano**

O Líquen Plano é uma patologia inflamatória crónica<sup>6</sup>, mucocutânea<sup>7</sup> que afeta principalmente a pele e mucosa oral, mas que também pode ser detetado na região genital,

esófago e conjuntiva<sup>5</sup>. O Líquen Plano Oral é mais frequente em mulheres entre a quarta e a sétima década de vida<sup>6</sup> e, embora o fator desencadeante não seja conhecido<sup>5-7</sup>, crê-se que a cronicidade da patologia deriva de uma resposta imunológica, devendo ser considerada uma patologia autoimune mediada por linfócitos T<sup>5</sup>. As lesões liquenoides devem ser consideradas entidades diferentes das lesões de Líquen Plano, que assumem a sua própria etiologia e patogénese<sup>8</sup>.

Clinicamente, o Líquen Plano Oral surge com frequência na mucosa jugal, dorso e ventre da língua e gengiva, sendo raro surgir no palato, lábios e pavimento da boca<sup>9</sup>. As classificações clínicas mais assiduamente descritas são a reticular, erosiva, em forma de placa e bolhosa<sup>7</sup>.

A forma reticular é caracterizada pela existência das estrias de Wickham, que existem bilateralmente e surgem tendencialmente na mucosa jugal (que pode revelar-se eritematosa), embora também possam aparecer no vestíbulo, língua e gengiva. Os pacientes raramente reportam sintomas e o diagnóstico surge com o exame clínico<sup>7</sup>.

A forma erosiva surge como uma região marcadamente eritematosa na mucosa associada a ulceração de forma irregular e presença de pseudomembrana. Se a lesão não se estender além da mucosa gengival, então assume a classificação de gengivite descamativa<sup>7</sup>.

O Líquen Plano Oral em forma de placa assume um aspeto indistinguível de uma leucoplasia, revelando-se como uma mancha ou placa branca que não é removida à raspagem. É mais frequente na língua<sup>7</sup>.

A forma bolhosa é rara, sendo caracterizada pela presença de bolhas com tamanhos compreendidos entre os 4 e os 20 mm. Essas bolhas rompem frequentemente, deixando uma úlcera sobre a mucosa. É mais frequente na mucosa jugal posterior<sup>7</sup>.

### **3.2.2 Distúrbios psicológicos e o Líquen Plano Oral**

O Líquen Plano Oral já foi associado a stress, depressão e ansiedade, embora permaneça controverso. Assim, a associação não aparenta indicar que os distúrbios psicológicos estão envolvidos na etiologia do Líquen Plano Oral, mas sim que a patologia pode estar na origem desses distúrbios, uma vez que pode provocar desconforto e ansiedade relacionada com o potencial de transformação maligna. Ainda assim, admite-se

que distúrbios psicológicos pré-existent poderão promover ou agravar o Líquen Plano Oral<sup>10</sup>.

### 3.2.3 Diagnóstico de Líquen Plano

Embora a apresentação clínica faça parte do diagnóstico, é recomendado que o diagnóstico seja confirmado com recurso a biópsia das lesões e respetiva confirmação histológica<sup>10</sup> dada a possibilidade de malignização<sup>9</sup> e o facto de existirem outras patologias mucocutâneas incluídas num diagnóstico diferencial com o Líquen Plano<sup>7</sup>.

O Líquen Plano apresenta um conjunto de critérios histológicos para o seu diagnóstico<sup>7,11,12</sup>:

- Critérios essenciais:
  - Degeneração liquefativa da camada basal
  - Infiltrado linfocitário denso de linfócitos T em forma de banda
  - Maturação normal do epitélio
- Critérios não essenciais
  - Proeminências anatómicas em forma de dentes de serra
  - Corpos de Civatte
  - Hiperqueratose (orto ou paraqueratose), geralmente com espessamento da camada espinhosa do epitélio (acantose), correspondendo às estrias de *Wickham*

De Rossi e Ciarrocca<sup>7</sup> defendem que a utilização de imunofluorescência no estudo das biópsias de lesões de Líquen Plano é um auxílio para o diagnóstico diferencial. Embora Carrozzo e colegas<sup>9</sup> reconheçam o auxílio prestado nesse sentido (particularmente na forma erosiva), a equipa revela que os resultados da técnica de imunofluorescência direta geralmente são negativos, sendo necessário recorrer a outros testes imunológicos e de identificação de biomarcadores para alcançar um diagnóstico definitivo. Contudo, esses testes são dispendiosos, morosos e não se encontram amplamente disponibilizados<sup>9</sup>.

Surge então a necessidade de desenvolver uma ferramenta de diagnóstico que permita diminuir os custos associados, o tempo necessário para obter o diagnóstico, que

seja facilmente disponibilizado e que seja menos invasivo que uma biópsia. Essa ferramenta deve ainda revelar a presença de displasia, se existir.

### **3.3 Saliva como fluido de diagnóstico**

A saliva é um biofluido com origem em três glândulas salivares major (submandibular, sublingual e parótida)<sup>13-17</sup> e um número considerável de glândulas salivares minor<sup>13,16</sup>. No ambiente oral contém ainda fluido crevicular, soro, componentes derivados das mucosas e superfícies dentárias, microrganismos, restos alimentares e outras substâncias exógenas. Assim, a saliva que contacta com o meio oral é denominada inteira/completa (whole) ou mista (mixed)<sup>15</sup>.

A maioria das proteínas encontradas na saliva tem origem nas glândulas salivares. Existem proteínas que são comuns a todas as glândulas e outras que têm maior expressão em glândulas específicas<sup>14</sup>. Isto pode ser influenciado por fatores como a duração e natureza do estímulo, fluxo e ritmo circadiano<sup>18</sup>. A saliva inclui ainda proteínas plasmáticas, que alcançam este fluido através de difusão, ultrafiltração e como resultado do fluxo de fluido crevicular gengival<sup>19</sup>.

Enquanto fluido de diagnóstico, a saliva torna-se atrativa uma vez que a obtenção de amostras é relativamente fácil, rápida e económica e é aceite pelos pacientes como um método não invasivo, já que não provoca dor. Além disso, a saliva reflete o estado fisiológico e patológico do organismo<sup>16,17</sup>.

Uma outra propriedade que torna a saliva tão interessante para utilização em diagnóstico é a existência de moléculas que estão também presentes no sangue<sup>20</sup>, dando-lhe, por isso, um carácter sistémico.

Um biomarcador, idealmente, deverá ser específico para a patologia, estar presente em todos os pacientes com a patologia, isto é, apresentar elevada especificidade e sensibilidade, deverá desaparecer com o tratamento da patologia e ser detetado antes desta se manifestar clinicamente<sup>21</sup>. Embora exista alguma repetição de biomarcadores específicos entre diferentes patologias – como as metaloproteinases da matriz, que surgem tanto em casos de periodontite como na presença de doenças cardiovasculares<sup>20</sup>, a evidência sugere que os biomarcadores salivares são clinicamente úteis<sup>21</sup>. Esta especificidade pode ser aumentada se em vez de serem biomarcadores

únicos, forem avaliados para diagnóstico painéis de biomarcadores que incluam diferentes moléculas que representem de uma forma mais completa os acontecimentos moleculares decorrentes da doença.

### 3.3.1 O estudo do proteoma salivar

A utilização da saliva como fluido de diagnóstico depende da identificação de moléculas em larga escala. De forma a caracterizar funcionalmente a saliva e identificar possíveis biomarcadores de diversas patologias, torna-se necessário determinar o proteoma salivar<sup>19</sup>.

O proteoma corresponde ao “conjunto completo de proteínas encontradas em células vivas, tecidos ou organismos, representando o resultado final da tradução e transcrição de um gene e que pode espelhar não só o resultado da síntese proteica como também as modificações pós-tradução”<sup>22</sup>. Já a proteómica pode ser entendida como “o estudo da distribuição e interação das proteínas, no tempo e no espaço, numa célula, organismo ou ecossistema”<sup>22</sup>.

O estudo do proteoma pode ser feito através de eletroforese bidimensional (eletroforese 2D) e espectrometria de massa<sup>16</sup>. A eletroforese 2D é usada para separar as proteínas através do ponto isoelétrico e massas moleculares<sup>16,23</sup>; a espectrometria de massa é um processo mais complexo, que permite identificar as proteínas e avaliá-las qualitativa e quantitativamente<sup>16</sup> de forma absoluta ou relativa<sup>24</sup>.

Considera-se a abordagem “*shotgun proteomics*” ou “*bottom up proteomics*” como o principal protocolo na técnica de espectrometria de massa. Consiste na digestão enzimática das proteínas e divisão em péptidos, seguido de cromatografia líquida e obtenção de um espectro com um conjunto de massas (correspondentes aos péptidos) para comparar com bases de dados. É comum realizar uma segunda divisão, agora dos péptidos, obtendo-se os aminoácidos presentes na amostra em estudo – “*tandem MS*” ou “*MS/MS*”, cujas massas também serão comparadas com bases de dados<sup>17,22,24</sup>. Existe ainda outra abordagem, “*top down proteomics*”, em que se tenta analisar proteínas completas, o que se torna difícil<sup>17,22</sup>, já que algumas proteínas não são acessíveis nas suas formas naturais<sup>17</sup>.

O desenvolvimento da proteómica salivar é o resultado do avanço das técnicas de separação e identificação de proteínas<sup>25</sup>. Comparando as análises do proteoma do plasma e da saliva, torna-se aparente que as proteínas salivares são mais suscetíveis à degradação, que é rápida mesmo durante a recolha e manipulação de amostras<sup>23</sup>. Além disso, o volume de saliva presente no organismo é bastante inferior ao volume de sangue, adicionando outra dificuldade<sup>20</sup>. Ainda assim, a análise do proteoma salivar é de extrema importância para a apreciação de todo o potencial de diagnóstico da saliva<sup>23</sup>.

Neste sentido, a base de dados SalivaTecDB<sup>19,26</sup> adquire suma importância: é uma ferramenta que reúne a informação da anotação e caracterização de proteínas (e outras moléculas) que foram obtidas através de estudos de proteómica, com o objetivo principal de propor painéis de biomarcadores salivares. Toda a informação é disponibilizada online para a comunidade científica em <http://salivatec.viseu.ucp.pt/salivatec-db/main.php>.

### **3.3.2 Análise funcional do proteoma salivar**

Como desenvolvimento da genómica, da proteómica e da bioinformática, surgiu a capacidade de medir as alterações e de conhecer a regulação do genoma em diversas condições biológicas. Embora a investigação clássica em biologia se focasse no estudo de um número limitado de genes, atualmente os protocolos utilizados são de elevado *throughput*, capazes de gerar grandes listas de genes e seus produtos<sup>27</sup>. Atentando no caso da saliva, observa-se que o desenvolvimento dos diferentes protocolos de proteómica tem permitido um aumento exponencial de componentes proteicos identificados nesse fluido. Contudo, a informação gerada pelos diversos estudos permanece dispersa<sup>19</sup>.

As ferramentas bioinformáticas desempenham um papel importante na exploração da informação produzida, pois permitem obter relações entre sequências, estruturas e funções das proteínas, e extrair o significado biológico<sup>19</sup>. A ferramenta *DAVID*, por exemplo, permite a obtenção de significado biológico através de uma lista de genes ou proteínas de forma consistente<sup>19,28</sup>.

A *Gene Ontology* é uma base de conhecimento constituída por vocabulário dinâmico e controlado, acompanhando a evolução do conhecimento. Uma anotação GO representa uma ligação entre um produto de um gene e a sua função molecular, processo biológico ou

tipo de componente celular<sup>29</sup>:

- O processo biológico corresponde ao objetivo biológico para o qual o gene ou produto de gene contribui. Exemplos não contemplados no artigo de Ashburner e colegas, mas aplicados no contexto deste trabalho: resposta imune e resposta inflamatória.
- A função molecular corresponde à atividade bioquímica do produto de um gene; capacidade que o produto de um gene (ou complexo de produtos de um gene) potencialmente tem. Esta expressão descreve apenas o que é feito sem especificar quando e onde acontece. Exemplos: enzima, transportador ou ligando.
- O componente celular está relacionado com o local da célula onde o produto do gene se encontra ativo. Exemplos: ribossoma, proteossoma, membrana nuclear ou aparelho de Golgi.

A ontologia compreende um conjunto de termos devidamente definidos e com relações bem definidas, que reflete o conhecimento biológico e contribui para guiar a organização de nova informação. Assim, é correto afirmar que se trata de uma ferramenta importante na transformação de informação em conhecimento<sup>29</sup>. A base de dados *Uniprot* utiliza uma lista de termos selecionados que derivam do recurso *Gene Ontology* em cada um dos três domínios referidos<sup>30</sup>.

Atualmente, os avanços na compreensão da fisiopatologia do Líquen Plano ainda não permitiram esclarecer definitivamente os mecanismos moleculares envolvidos tanto no desenvolvimento da patologia em si, como no desenvolvimento das diferentes formas desta doença<sup>31</sup>. Adicionalmente, os critérios utilizados para o diagnóstico são alterados com alguma frequência<sup>11,12,32</sup> e carecem da objetividade desejável. Nesse sentido, urge desenvolver informação que auxilie na identificação de painéis de biomarcadores específicos, precoces e objetivos, bem como esclarecer os aspetos moleculares do desenvolvimento e manifestação da patologia.



## **4. Objetivos**





## **Objetivos**

Este trabalho visa o desenvolvimento de uma estratégia bioinformática que permita a identificação de um conjunto de proteínas cuja expressão seja alterada em indivíduos com Líquen Plano (comparativamente a indivíduos saudáveis), culminando com a proposta de um painel de biomarcadores salivares uteis para o diagnóstico desta patologia.





## **5. Material e Métodos**



## Material e métodos

Este trabalho consiste num estudo experimental *in silico* que utiliza uma abordagem bioinformática para analisar funcionalmente os dados moleculares obtidos na literatura científica disponíveis durante a sua realização.



## Painel de Biomarcadores

**Figura 1.** Representação da metodologia utilizada neste trabalho

### 5.1 Identificação de estudos de proteómica de saliva associados a Líquen Plano

A primeira etapa deste projeto consistiu na obtenção de dados de proteómica através de revisão da literatura. Para tal, recorreu-se à informação disponibilizada pelo motor de busca PubMed (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>).

A pesquisa foi efetuada recorrendo às expressões «*saliva*» AND «*proteomics*» sem qualquer filtro; «*salivary secretion*» com os filtros *5 years*, *humans*, e *review*; «*proteomics*» AND «*saliva*» com os filtros *humans* e *review*; «*proteomics*» AND «*diagnostic*» AND «*fluid*» com os filtros *5 years*, *humans* e *review*; «*proteomics*» com os filtros *5 years*, *humans* e *review*; «*two dimensional gel electrophoresis*» com o filtro *5 years*; «*proteomics*» AND «*dentistry*» com os filtros *5 years*, *humans* e *review*; «*mass spectrometry*» AND «*saliva*» AND «*lichen planus*» sem qualquer filtro; «*lichen planus*»[MeSH Terms] OR «*lichen planus, oral*»[MeSH Terms] com os filtros *10 years*, *humans*, *review*, *systematic review* e *meta-analysis*; «*lichen planus*»[MeSH Terms] ) AND «*oral medicine*»[All Fields], com os filtros *10 years*, *humans*, *review*, *systematic review* e *meta-analysis*; «*lichen planus*»[All

*Fields]) AND ("fibrinogen"[All Fields]) ) AND ("direct immunofluorescence"[All Fields]) sem qualquer filtro.*

Através da revisão da literatura foi possível detetar revisões sistemáticas que reportavam para trabalhos relacionados com propostas de proteínas para diagnóstico de Líquen Plano ou com uma elucidação sobre a fisiopatologia da patologia. Esses artigos foram revistos e, sempre que possível, utilizados para a obtenção de dados de quantificação de proteínas.

### **5.2 Anotação manual da informação relevante sobre as proteínas orais identificadas em pacientes com Líquen Plano**

Os artigos que descrevem conjuntos de proteínas alteradas em indivíduos com diagnóstico de Líquen Plano foram selecionados e utilizados para a anotação manual da informação considerada importante para a interpretação funcional dos resultados. Esta anotação foi utilizada para a atualização da base de dados SalivaTecDB<sup>19,26</sup>. A identificação das proteínas foi feita com a ferramenta *UniProt*<sup>30</sup>, que devolveu não só nome da proteína, como também o código de *UniProt*, nome do gene que a codifica e o organismo que a produz.

A atualização da SalivaTecDB<sup>19,26</sup> inclui a anotação do código de *UniProt*, nome da proteína e do gene, o protocolo de recolha de saliva utilizada no estudo, o tipo de controlo utilizado no estudo, o código MeSH da patologia em estudo e o seu nome, o código do artigo de onde foi retirada a informação, se a proteína já é apontada como biomarcador, dados referentes aos dadores da amostra – faixa etária, género e hábitos sociais e dados de quantificação da proteína. Um dos dados mais importantes para avaliar o potencial de uma dada molécula como biomarcador é a sua alteração em termos de quantidade na saliva de pacientes com Líquen Plano relativamente a pacientes saudáveis. Esta alteração é designada de *fold change*. O valor de *fold change* foi obtido através da análise de artigos de proteómica, quer expressos no próprio artigo, quer registando os valores de concentração das proteínas tanto para o grupo de controlo como para os grupos com patologia (onde, em vários casos, se encontravam valores de concentração discriminados pelo tipo de apresentação da patologia) e obtendo o quociente entre essas concentrações. O seu cálculo segue as seguintes premissas:

$$\text{Fold change} = \frac{\text{Quantidade da proteína na doença}}{\text{Quantidade da proteína no controlo}}$$

Posto isto, poderão verificar-se um destes dois acontecimentos:

Acontecimento a):

- $xx \geq 1$ , significa que a alteração é positiva.

Acontecimento b):

- $0 < xx < 1$ , significa que a alteração é negativa.

No caso do acontecimento a) as proteínas encontram-se aumentadas em relação ao controlo de indivíduos saudáveis. Por outro lado, para o acontecimento b) é necessário realizar o seguinte quociente para que se obtenha uma alteração com valor negativo:

$$\text{Fold change} = -\left(\frac{1}{x}\right)$$

O cálculo deste quociente permite uma melhor interpretação dos dados uma vez que uma *fold change* com valor de, por exemplo, 0,5 corresponderia a uma diminuição de 2 vezes na quantidade da respetiva proteína. Assim, a partir do quociente descrito acima, obtemos diretamente o valor de -2, tornando a interpretação de dados mais direta e facilitada.

Após registar o valor de *fold change* de cada proteína no respetivo campo, foi necessário eliminar anotações duplicadas e obter a média dos valores.

### **5.3 Análise funcional do proteoma salivar associado a Líquen Plano para determinação de um painel de biomarcadores**

Com o objetivo de realizar uma proposta de um painel de biomarcadores salivares uteis para o diagnóstico de Líquen Plano, devidamente suportado no enquadramento molecular da patologia, foi feita uma análise funcional das proteínas associadas com a doença, identificadas neste trabalho e registadas na SalivaTecDB<sup>19,26</sup>. A análise baseou-se na utilização das ferramentas bioinformáticas *Uniprot*<sup>30</sup> e *DAVID*<sup>27,28</sup>.

### **5.3.1 Processos biológicos associados às proteínas relacionadas com Líquen Plano**

Os processos biológicos conhecidos para as diferentes proteínas anotadas foram obtidos através da base de dados *Uniprot*<sup>30</sup>. Recorrendo à função “*Retrieve/ID mapping*”, é possível obter uma lista com os processos biológicos conhecidos para cada proteína, caso existam. Os processos procurados nesta lista foram todos os que estavam relacionados com a resposta imune ou processo de inflamação, bastando ter apenas um processo biológico relacionado. O cálculo do *score* contempla este parâmetro aumentando a relevância de cada proteína como biomarcador para o Líquen Plano sempre que houver uma associação positiva.

### **5.3.2 Outras patologias associadas às proteínas relacionadas com Líquen Plano**

A lista de patologias associadas às proteínas anotadas foi obtida através da ferramenta de anotação funcional da base de dados *DAVID*<sup>28</sup>, versão 6.8. Para obter a lista é necessário:

1. Inserir os códigos identificativos de *Uniprot*<sup>30</sup> no campo A, “*paste a list*”. Em alternativa, é possível selecionar um ficheiro no campo B, “*choose from a file*”;
2. Selecionar a base de dados da origem que, neste trabalho, correspondeu a *UNIPROT\_ACESSION*”;
3. Selecionar a opção “*gene list*”;
4. Submeter a lista.

Posteriormente deve ser selecionada a opção “*disease*” e analisados os resultados encontrados em “*GAD\_DISEASE*” e “*GAD\_DISEASE\_CLASS*”.

Com os resultados desta ferramenta serão criadas três tabelas – uma onde serão assinaladas as proteínas com associação conhecida a uma ou mais patologias; outra onde serão assinaladas as proteínas com associação conhecida ao Líquen Plano; finalmente, uma com as proteínas relacionadas com patologias de base imunológica.

#### **5.4 Seleção de um painel de biomarcadores salivares para Líquen Plano**

O painel de biomarcadores selecionado deve integrar um conjunto de proteínas que estejam relacionadas funcionalmente com a doença, que estejam alteradas em amostras de saliva e que no seu conjunto sejam específicas para Líquen Plano Oral (embora possam não apresentar a especificidade desejada individualmente). Para determinar quais serão as mais indicadas, é necessário classificá-las objetivamente, seguindo um método passível de ser aplicado a qualquer uma delas. Neste sentido, foi construído um *score* que é calculado utilizando os dados resultantes da anotação manual e da análise funcional das proteínas identificadas, tendo em consideração a importância relativa de cada parâmetro que é, posteriormente, traduzida numa percentagem.

Para realizar os cálculos necessários foi utilizada uma folha de *Excel* com a seguinte informação:

- A. Proteína: registo dos códigos *Uniprot* das proteínas, sem duplicados. Apenas um código por linha;
- B. *Fold change*: onde se encontram os valores médios de *fold change* associado a cada código. As proteínas que não tinham um valor associado nos respetivos artigos, mas sim uma informação sobre a variação relativa (proteína aumentada em pacientes com Líquen Plano comparativamente ao grupo de controlo) foram identificadas com o símbolo “+”; as proteínas que foram identificadas apenas em pacientes com Líquen Plano Oral (e não nos controlos) foram identificadas com o símbolo “\*”. Para facilitar a análise dos campos relacionados com a variação do *fold change*, foi utilizada uma formatação condicional, referida nos próximos passos;
- C. Apenas indicação de alterado: foram marcadas, com o algarismo “1”, todas as células associadas a códigos que apresentaram um “+” na coluna B. Para facilitar a identificação, foi utilizada uma formatação condicional personalizada, em que todas as células da coluna “B” com valores iguais a “+” seriam preenchidas com cor amarela. Este parâmetro tem uma valorização de 20% sempre que preenchido;
- D. *Fold change* 2-5: foram marcadas, com o algarismo “1”, todas as células associadas a códigos que apresentaram um valor absoluto entre 2 e 5 na coluna B. Para facilitar a identificação, foi utilizada uma formatação condicional personalizada, em que todas

- as células da coluna “B” com valores entre 2 e 5 seriam preenchidas com cor vermelha. Este parâmetro tem uma valorização de 30% sempre que preenchido;
- E. *Fold change* 5-10: foram marcadas, com o algarismo “1”, todas as células associadas a códigos que apresentaram um valor absoluto entre 5 e 10 (exclusive) na coluna B. Para facilitar a identificação, foi utilizada uma formatação condicional personalizada, em que todas as células da coluna “B” com valores entre 5 e 10 (exclusive) seriam preenchidas com cor de laranja. Este parâmetro tem uma valorização de 40%;
- F. *Fold change*  $\geq 10$  ou exclusivas do Líquen Plano Oral: foram marcadas, com o algarismo “1”, todas as células associadas a códigos que apresentaram um valor absoluto maior ou igual a 10 ou identificadas com o símbolo “\*” na coluna B. Para facilitar a identificação, foi utilizada uma formatação condicional personalizada, em que todas as células da coluna “B” com valores maior ou iguais a 10 ou com o símbolo “\*” seriam preenchidas com cor azul. Este parâmetro tem uma valorização de 50% sempre que preenchido;
- G. Participação noutras doenças (*DAVID*): foram marcadas, com o algarismo “1”, todas as células nas linhas dos códigos de proteínas que já foram associadas a alguma patologia; foram marcadas, com o algarismo “0”, todas as células nas linhas dos códigos de proteínas que ainda não foram associadas a qualquer patologia. Esta coluna foi preenchida com a informação obtida através da lista “*GAD\_DISEASE*” da ferramenta *DAVID*<sup>28</sup>. Este parâmetro subtrai 10% ao *score* da proteína sempre que preenchido;
- H. Participação em Líquen Plano (*DAVID*): foram marcadas, com o algarismo “1”, todas as células nas linhas dos códigos de proteínas que já foram associadas ao Líquen Plano. Esta coluna foi preenchida com a informação obtida através da lista “*GAD\_DISEASE*” da ferramenta *DAVID*<sup>28</sup>. Este parâmetro tem uma valorização de 20% sempre que preenchido;
- I. Participam noutras doenças autoimunes (*DAVID*): foram marcadas, com o algarismo “1”, todas as células nas linhas dos códigos de proteínas que já foram associadas a doenças autoimunes; foram marcadas, com o algarismo “0”, todas as células nas linhas dos códigos de proteínas que ainda não foram associadas a qualquer



patologia autoimune. Esta coluna foi preenchida com a informação obtida através da lista “*GAD\_DISEASE\_CLASS*” da ferramenta *DAVID*<sup>28</sup>. Este parâmetro tem uma valorização de 10% sempre que preenchido;

J. Participação em Processos Biológicos relacionados com o Líquen Plano: foram marcadas, com o algarismo “1”, todas as células nas linhas dos códigos de proteínas que revelam algum processo biológico relacionado com a possível etiologia e/ou patogénese do Líquen Plano Oral. Esta coluna foi preenchida com a informação obtida através da base de dados *Uniprot*<sup>30</sup>. Este parâmetro tem uma valorização de 20% sempre que preenchido;

K. *Score*: o resultado deste parâmetro, que estará entre 0 e 1, servirá para determinar a relevância da proteína. O *score* é obtido somando todos os parâmetros anteriores.

Para integrar o painel de biomarcadores, o *score* da proteína deverá ser igual ou superior a 0,7.

Fórmula para o cálculo do *score*:

$0,2 \times \text{indicação de alterada} + 0,3 \times \text{fold change entre 2 e 5} + 0,4 \times \text{fold change entre 5 e 10} + 0,5 \times \text{fold change} \geq 10 \text{ ou encontrada apenas em pacientes com a doença} - 0,1 \times \text{participação noutras doenças} + 0,2 \times \text{participação em líquen plano} + 0,1 \times \text{participação em doenças autoimunes} + 0,2 \times \text{participação em processos biológico relacionados com líquen plano}$





## **6. Resultados**



## Resultados

### **6.1 Identificação de estudos de proteómica de saliva associados a Líquen Plano**

A pesquisa bibliográfica permitiu a seleção de 16 artigos científicos com estudos de proteómica relativos a proteínas relacionadas com o Líquen Plano Oral, entre os quais uma revisão sistemática<sup>33</sup>. A pesquisa de artigos com dados de proteómica foi realizada até maio de 2020.

### **6.2 Anotação manual da informação relevante sobre as proteínas orais identificadas em pacientes com Líquen Plano.**

Foram anotadas 194 proteínas, correspondendo a 136 proteínas diferentes. Um dos artigos<sup>34</sup> não dava informação relevante sobre a variação da concentração das proteínas entre pacientes com Líquen Plano Oral e o grupo de controlo, mas permitiu a anotação de proteínas na folha de Excel que servirá para a atualização da SalivaTecDB<sup>19,26</sup>; outro artigo<sup>35</sup> integrava informação sobre a variação da concentração das proteínas entre os pacientes com Líquen Plano Oral e grupo de controlo, o valor de *fold change* das mesmas, uma lista com proteínas encontradas exclusivamente nos indivíduos com a patologia (6 proteínas) e outra com as proteínas detetadas exclusivamente em indivíduos saudáveis (13 proteínas); num dos trabalhos<sup>36</sup> foi dada apenas a indicação de a proteína estar aumentada (*“upregulated”*) nos pacientes com Líquen Plano Oral; os restantes artigos<sup>37,38,47–51,39–46</sup> davam as diferentes concentrações das proteínas entre indivíduos com a patologia e indivíduos saudáveis.

A tabela 1 apresenta o resultado da anotação manual da informação relevante sobre as proteínas orais identificadas em pacientes com Líquen Plano. São apenas apresentados, os campos que serão relevantes para a determinação do *score* e consequente proposta do painel de biomarcadores.



**Tabela 1:** Anotação manual da informação relevante sobre as proteínas orais identificadas em pacientes com Líquen Plano. Informação utilizada para atualização do SalivaTecDB. Legenda: UniProt KB/AC corresponde ao código identificador da proteína na base de dados Uniprot; name corresponde ao nome da proteína; no gene name está identificado o nome do gene; whole saliva identifica o tipo de saliva recolhida; control

UniProt KB/AC	Name	Gene name	Whole saliva	Control	Quant. control	Quant. condition	Quant. units	Fold Change	Inclusion Criteria	Códigos NCBI/ID
P01375	Tumor necrosis factor	TNF	x	Health	7,13		pg/ml			29383810
P05231	Interleukin-6	IL6	x	Health	14,66		pg/ml			29383810
P01584	Interleukin-1 beta	IL1B	x	Health	501,50		pg/ml			29383810
P01579	Interferon gamma	IFNG	x	Health	3,88		pg/ml			29383810
Q9H293	Interleukin-25	IL25	x	Health	40,10		pg/ml			29383810
Q9GZX6	Interleukin-22	IL22	x	Health	0,00		pg/ml			29383810
Q6EBC2	Interleukin-31	IL31	x	Health	2,44		pg/ml			29383810
P05112	Interleukin-4	IL4	x	Health	18,61		pg/ml			29383810
Q16552	Interleukin-17A	IL17A	x	Health	4,74		pg/ml			29383810
Q96PD4	Interleukin-17F	IL17F	x	Health	270,60		pg/ml			29383810
Q9HBE4	Interleukin-21	IL21	x	Health	6,89		pg/ml			29383810
P29965	CD40 ligand	CD40LG	x	Health	61,98		pg/ml			29383810
Q9NZH6	Interleukin-37	IL37	x	Health	115,30		pg/ml			29383810
P02768	Serum albumin	ALB	x	Health				3,0		29534707
P04745	Alpha-amylase 1	AMY1A; AMY1B; AMY1C	x	Health				2,1		29534707
P04406	Glyceraldehyde-3- phosphate dehydrogenase	GAPDH	x	Health				2,8		29534707



P16219	Short-chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mitochondrial	ACADS	x	Health					2,6	29534707
P01591	Immunoglobulin J chain	JCHAIN	x	Health					2,0	29534707
P80188	Neutrophil gelatinase-associated lipocalin	LCN2	x	Health					3,2	29534707
P23280	Carbonic anhydrase 6	CA6	x	Health					-1,8	29534707
P01036	Cystatin-S	CST4	x	Health					-1,6	29534707
P01037	Cystatin-SN	CST1	x	Health					-3,2	29534707
P01037	Cystatin-SN	CST1	x	Health					-1,5	29534707
P01037	Cystatin-SN	CST1	x	Health					-2,1	29534707
P01037	Cystatin-SN	CST1	x	Health					-3,4	29534707
P01037	Cystatin-SN	CST1	x	Health					-1,6	29534707
P35527	Keratin, type I cytoskeletal 9	KRT9	x					*	Exclusivamente encontrada em doentes	29534707
P02675	Fibrinogen beta chain	FGB	x					*	Exclusivamente encontrada em doentes	29534707
P01024	Complement C3	C3	x					*	Exclusivamente	29534707



									encontra da em doentes	
P00738	Haptoglobin	HP	x					*	Exclusiva mente encontra da em doentes	29534707
P63104	14-3-3 protein zeta/delta	YWHAZ	x					*	Exclusiva mente encontra da em doentes	29534707
Q96CB9	5-methylcytosine rRNA methyltransferase NSUN4	NSUN4	x					*	Exclusiva mente encontra da em doentes	29534707
P23280	Carbonic anhydrase 6	CA6	x	Health						29534707
P01037	Cystatin-SN	CST1	x	Health						29534707
P05109	Protein S100-A8	S100A8	x	Health						29534707
P12273	Prolactin-inducible protein	PIP	x	Health						29534707
Q15848	Adiponectin	ADIPOQ	x	Health	20,10	23,40	mg/ml	1,2	Reticular	26216173
Q15848	Adiponectin	ADIPOQ	x	Health	20,10	20,20	mg/ml	1,0	Non- reticular	26216173
P01876	Immunoglobulin heavy	IGHA1	x	Health	48,90	68,30	mg/l	1,4	Reticular	26216173



	constant alpha 1									
P01876	Immunoglobulin heavy constant alpha 1	IGHA1	x	Health	48,90	63,20	mg/l	1,3	Non-reticular	26216173
P05112	Interleukin-4	IL4	x	Health	19,62	20,06		1,0	Reticular	PMC39673 04
P05112	Interleukin-4	IL4	x	Health	19,62	22,32		1,1	Non-reticular	PMC39673 04
P01579	Interferon gamma	IFNG_HUMAN	x	Health	33,52	24,10		-1,4	Reticular	PMC39673 04
P01579	Interferon gamma	IFNG_HUMAN	x	Health	33,52	21,44		-1,6	Non-reticular	PMC39673 04
P22894	Neutrophil collagenase	MMP8		Health	9,69	12,78	ng/mg albumina	1,3		25839238
P08571	Monocyte differentiation antigen CD14	CD14	x	Health				+		17916440
O60603	Toll-like receptor 2	TLR2	x	Health				+		17916440
P00352	Retinal dehydrogenase 1	ALDH1A1		Health	6,62	4,16	pg/ml	-1,6	Reticular	PMC54290 99
P00352	Retinal dehydrogenase 1	ALDH1A1		Health	6,62	6,32	pg/ml	-1,0	Non-reticular	PMC54290 99
P01375	Tumor necrosis factor	TNF	x	Health	1,39	2,83	pg/ml	2,0	Reticular	PMC17815 47
P01375	Tumor necrosis factor	TNF	x	Health	1,39	3,08	pg/ml	2,2	Non-reticular	PMC17815 47
P01375	Tumor necrosis factor	TNF	x	Health	3,36	74,23	pg/ml	22,1		16075467



P05231	Interleukin-6	IL6	x	Health	2,26	148,12	pg/ml	65,5		16075467
P10145	Interleukin-8	CXCL8	x	Health	1507,20	2492,00	pg/ml	1,7		16075467
P01583	Interleukin-1 alpha	IL1A	x	Health	135,88	293,64	pg/ml	2,2		16075467
P01375	Tumor necrosis factor	TNF	x	Health	6,16	26,60	pg/ml	4,3	Reticular	18222093
P01375	Tumor necrosis factor	TNF	x	Health	6,16	33,00	pg/ml	5,4	Non-reticular	18222093
P05231	Interleukin-6	IL6	x	Health	29,90	51,15	pg/ml	1,7	Reticular	18222093
P05231	Interleukin-6	IL6	x	Health	29,90	46,10	pg/ml	1,5	Non-reticular	18222093
P10145	Interleukin-8	CXCL8	x	Health	641,46	1187,21	pg/ml	1,9	Reticular	18222093
P10145	Interleukin-8	CXCL8	x	Health	641,46	2218,98	pg/ml	3,5	Non-reticular	18222093
P01579	Interferon gamma	IFNG	x	Health	30,00	34,11	pg/ml	1,1	Reticular	18197852
P01579	Interferon gamma	IFNG	x	Health	30,00	61,90	pg/ml	2,1	Non-reticular	18197852
P05112	Interleukin-4	IL4	x	Health	10,07	10,71	pg/ml	1,1	Reticular	18197852
P05112	Interleukin-4	IL4	x	Health	10,07	12,79	pg/ml	1,3	Non-reticular	18197852
P01579	Interferon gamma	IFNG	x	Health	35,11	23,80	pg/ml	-1,5	Reticular	19370405
P01579	Interferon gamma	IFNG	x	Health	35,11	19,85	pg/ml	-1,8	Non-reticular	19370405
P05112	Interleukin-4	IL4	x	Health	19,60	19,95	pg/ml	1,0	Reticular	19370405
P05112	Interleukin-4	IL4	x	Health	19,60	23,07	pg/ml	1,2	Non-reticular	19370405
P01375	Tumor necrosis factor	TNF	x		2,95	10,97	pg/ml	3,7	Non-	16476030



									reticular	
P01583	Interleukin-1 alpha	IL1A	x		117,05	260,37	pg/ml	2,2	Non-reticular	16476030
P05231	Interleukin-6	IL6	x		1,35	74,01	pg/ml	54,8	Non-reticular	16476030
P10145	Interleukin-8	CXCL8	x		1579,00	1912,00	pg/ml	1,2	Non-reticular	16476030
P01579	Interferon gamma	IFNG	x	Health	6,41	23,95	pg/ml	3,7	Non-reticular	21403886
P01375	Tumor necrosis factor	TNF	x	Health	1,41	44,49	pg/ml	31,7	Non-reticular	21403886
P20333	Tumor necrosis factor receptor superfamily member 1B	TNFRSF1B	x	Health	45,00	350,40	pg/ml	7,8	Non-reticular	21403886
Q14116	Interleukin-18	IL18	x	Health	15,60	17,48	pg/ml	1,1	Reticular	21484426
Q14116	Interleukin-18	IL18	x	Health	15,60	21,32	pg/ml	1,4	Non-reticular	21484426
P01579	Interferon gamma	IFNG	x	Health	1,69	7,74	pg/ml	4,6	Reticular	PMC46018 77
P01579	Interferon gamma	IFNG	x	Health	1,69	8,04	pg/ml	4,8	Non-reticular	PMC46018 77
P05112	Interleukin-4	IL4	x	Health	1,58	4,58	pg/ml	2,9	Reticular	PMC46018 77
P05112	Interleukin-4	IL4	x	Health	1,58	3,88	pg/ml	2,5	Non-reticular	PMC46018 77



P05231	Interleukin-6	IL6	x	Health	4,92	20,74	pg/ml	4,2		24147842
P10145	Interleukin-8	CXCL8	x	Health	890,83	1328,37	pg/ml	1,5		24147842
Q16552	Interleukin-17A	IL17A	x	Health	39,85	40,69	pg/ml	1,0	Reticular	25644086
Q16552	Interleukin-17A	IL17A	x	Health	39,85	46,24	pg/ml	1,2	Non- reticular	25644086
Q9NPF7	Interleukin-23 subunit alpha	IL23A	x	Health	119,53	103,68	pg/ml	-1,2	Reticular	25644086
Q9NPF7	Interleukin-23 subunit alpha	IL23A	x	Health	119,53	201,54	pg/ml	1,7	Non- reticular	25644086
P01375	Tumor necrosis factor	TNF	x	Health	7,13		pg/ml			29383810
P05231	Interleukin-6	IL6	x	Health	14,66		pg/ml			29383810
P01584	Interleukin-1 beta	IL1B	x	Health	501,50		pg/ml			29383810
P01579	Interferon gamma	IFNG	x	Health	3,88		pg/ml			29383810
Q9H293	Interleukin-25	IL25	x	Health	40,10		pg/ml			29383810
Q9GZX6	Interleukin-22	IL22	x	Health	0,00		pg/ml			29383810
Q6EBC2	Interleukin-31	IL31	x	Health	2,44		pg/ml			29383810
P05112	Interleukin-4	IL4	x	Health	18,61		pg/ml			29383810
Q16552	Interleukin-17A	IL17A	x	Health	4,74		pg/ml			29383810
Q96PD4	Interleukin-17F	IL17F	x	Health	270,60		pg/ml			29383810
Q9HBE4	Interleukin-21	IL21	x	Health	6,89		pg/ml			29383810
P29965	CD40 ligand	CD40LG	x	Health	61,98		pg/ml			29383810
Q9NZH6	Interleukin-37	IL37	x	Health	115,30		pg/ml			29383810
P02768	Serum albumin	ALB	x	Health				3,0		29534707
P04745	Alpha-amylase 1	AMY1A; AMY1B; AMY1C	x	Health				2,1		29534707
P04406	Glyceraldehyde-3-	GAPDH	x	Health				2,8		29534707



	phosphate dehydrogenase										
P16219	Short-chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mitochondrial	ACADS	x	Health					2,6	29534707	
P01591	Immunoglobulin J chain	JCHAIN	x	Health					2,0	29534707	
P80188	Neutrophil gelatinase-associated lipocalin	LCN2	x	Health					3,2	29534707	
P23280	Carbonic anhydrase 6	CA6	x	Health					-1,8	29534707	
P01036	Cystatin-S	CST4	x	Health					-1,6	29534707	
P01037	Cystatin-SN	CST1	x	Health					-3,2	29534707	
P01037	Cystatin-SN	CST1	x	Health					-1,5	29534707	
P01037	Cystatin-SN	CST1	x	Health					-2,1	29534707	
P01037	Cystatin-SN	CST1	x	Health					-3,4	29534707	
P01037	Cystatin-SN	CST1	x	Health					-1,6	29534707	
P23280	Carbonic anhydrase 6	CA6	x	Health						29534707	
P01037	Cystatin-SN	CST1	x	Health						29534707	
P05109	Protein S100-A8	S100A8	x	Health						29534707	
P12273	Prolactin-inducible protein	PIP	x	Health						29534707	
Q15848	Adiponectin	ADIPOQ	x	Health	20,10	23,40	mg/ml		1,2	Reticular	29534707
Q15848	Adiponectin	ADIPOQ	x	Health	20,10	20,20	mg/ml		1,0	Non-reticular	29534707
P01876	Immunoglobulin heavy constant alpha 1	IGHA1	x	Health	48,90	68,30	mg/l		1,4	Reticular	29534707
P01876	Immunoglobulin heavy constant alpha 1	IGHA1	x	Health	48,90	63,20	mg/l		1,3	Non-reticular	29534707



P05112	Interleukin-4	IL4	x	Health	19,62	20,06		1,0	Reticular	29534707
P05112	Interleukin-4	IL4	x	Health	19,62	22,32		1,1	Non- reticular	29534707
P01579	Interferon gamma	IFNG_HUMAN	x	Health	33,52	24,10		-1,4	Reticular	26216173
P01579	Interferon gamma	IFNG_HUMAN	x	Health	33,52	21,44		-1,6	Non- reticular	26216173
P22894	Neutrophil collagenase	MMP8		Health	9,69	12,78	ng/mg albumina	1,3		26216173
P08571	Monocyte differentiation antigen CD14	CD14	x	Health				+		26216173
O60603	Toll-like receptor 2	TLR2	x	Health				+		PMC39673 04
P00352	Retinal dehydrogenase 1	ALDH1A1		Health	6,62	4,16	pg/ml	-1,6	Reticular	PMC39673 04
P00352	Retinal dehydrogenase 1	ALDH1A1		Health	6,62	6,32	pg/ml	-1,0	Non- reticular	PMC39673 04
P01375	Tumor necrosis factor	TNF	x	Health	1,39	2,83	pg/ml	2,0	Reticular	PMC39673 04
P01375	Tumor necrosis factor	TNF	x	Health	1,39	3,08	pg/ml	2,2	Non- reticular	25839238
P01375	Tumor necrosis factor	TNF	x	Health	3,36	74,23	pg/ml	22,1		17916440
P05231	Interleukin-6	IL6	x	Health	2,26	148,12	pg/ml	65,5		17916440



P10145	Interleukin-8	CXCL8	x	Health	1507,20	2492,00	pg/ml	1,7		PMC54290 99
P01583	Interleukin-1 alpha	IL1A	x	Health	135,88	293,64	pg/ml	2,2		PMC54290 99
P01375	Tumor necrosis factor	TNF	x	Health	6,16	26,60	pg/ml	4,3	Reticular	PMC17815 47
P01375	Tumor necrosis factor	TNF	x	Health	6,16	33,00	pg/ml	5,4	Non- reticular	PMC17815 47
P05231	Interleukin-6	IL6	x	Health	29,90	51,15	pg/ml	1,7	Reticular	16075467
P05231	Interleukin-6	IL6	x	Health	29,90	46,10	pg/ml	1,5	Non- reticular	16075467
P10145	Interleukin-8	CXCL8	x	Health	641,46	1187,21	pg/ml	1,9	Reticular	16075467
P04745	Alpha-amylase 1	AMY1A; AMY1B; AMY1C	x	Health						16075467
P02768	Serum albumin	ALB	x	Health						29383810
P01036	Cystatin-S	CST4	x	Health						29383810
P01037	Cystatin-SN	CST1	x	Health						29383810
E7EQB2	Lactotransferrin (Fragment)	LTF	x	Health						29383810
P06733	Alpha-enolase	ENO1	x	Health						29383810
P25311	Zinc-alpha-2-glycoprotein	AZGP1	x	Health						29383810
Q9HC84	Mucin-5B (MUC-5B)	MUC5B	x	Health						29383810
P09228	Cystatin-SA	CST2	x	Health						29383810
P01833	Polymeric immunoglobulin receptor (PIgR)	PIGR	x	Health						29383810
P22079	Lactoperoxidase (LPO)	LPO	x	Health						29383810



P01877	Immunoglobulin heavy constant alpha 2	IGHA2	x	Health						29383810
Q6NS95	IGL@ protein	IGL@	x	Health						29383810
Q9UGM3	Deleted in malignant brain tumors 1 protein (Glycoprotein 340)	DMBT1	x	Health						29383810
Q53H26	Transferrin variant (Fragment)		x	Health						29383810
B3KSI4	cDNA FLJ36348 fis, clone THYMU2007025, highly similar to TRANSKETOLASE		x	Health						29383810
Q6MZQ6	Uncharacterized protein DKFZp686G11190	DKFZp686G11190	x	Health						29383810
P06702	Protein S100-A9 (Calgranulin-B)	S100A9	x	Health						29383810
P00738	Haptoglobin (Zonulin)	HP	x	Health						29383810
P60174	Triosephosphate isomerase (TIM)	TPI1	x	Health						29383810
P28325	Cystatin-D (Cystatin-5)	CST5	x	Health						29383810
P80188	Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL)	LCN2	x	Health						29383810
B4DI39	cDNA FLJ54328, highly similar to Heat shock 70 kDa protein 1		x	Health						29383810
P05164	Myeloperoxidase (MPO)	MPO	x	Health						29383810



P68871	Hemoglobin subunit beta (Beta-globin)	HBB	x	Health						29383810
P04040	Catalase	CAT	x	Health						29383810
P12273	Prolactin-inducible protein	PIP	x	Health						29383810
P05109	Protein S100-A8 (Calgranulin-A)	S100A8	x	Health						29383810
P06870	Kallikrein-1	KLK1	x	Health						29383810
A8K486	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase		x	Health						29383810
P31025	Lipocalin-1	LCN1	x	Health						29383810
P01859	Immunoglobulin heavy constant gamma 2	IGHG2	x	Health						29383810
B4DVQ0	cDNA FLJ58286, highly similar to Actin, cytoplasmic 2		x	Health						29383810
E9PKE3	Heat shock cognate 71 kDa protein	HSPA8	x	Health						29383810
Q9UBC9	Small proline-rich protein 3	SPRR3	x	Health						29383810
P61626	Lysozyme C	LYZ	x	Health						29383810
P01591	Immunoglobulin J chain	JCHAIN	x	Health						29383810
P69905	Hemoglobin subunit alpha	HBA1; HBA2	x	Health						29383810
P01860	Immunoglobulin heavy constant gamma 3	IGHG3	x	Health						29383810
B4E216	cDNA FLJ57339, highly similar to Complement C3		x	Health						29383810



P04080	Cystatin-B (CPI-B)	CSTB	x	Health						29383810
B7Z507	cDNA FLJ51036, highly similar to Matrix metalloproteinase-9		x	Health						29383810
P10599	Thioredoxin (Trx)	TXN	x	Health						29383810
Q5JPJ9	Uncharacterized protein DKFZp686D0114	DKFZp686D0114	x	Health						29383810
B7ZLF8	Uncharacterized protein		x	Health						29383810
P61769	Beta-2-microglobulin	B2M	x	Health						29383810
P04745	Alpha-amylase 1	AMY1A; AMY1B; AMY1C	x	Health						29383810
P02768	Serum albumin	ALB	x	Health						29383810
P01036	Cystatin-S	CST4	x	Health						29383810
P01037	Cystatin-SN	CST1	x	Health						29383810
E7EQB2	Lactotransferrin (Fragment)	LTF	x	Health						29383810
P06733	Alpha-enolase	ENO1	x	Health						29383810
P25311	Zinc-alpha-2-glycoprotein	AZGP1	x	Health						29383810
Q9HC84	Mucin-5B (MUC-5B)	MUC5B	x	Health						29383810
P09228	Cystatin-SA	CST2	x	Health						29383810
P01833	Polymeric immunoglobulin receptor (PIgR)	PIGR	x	Health						29383810
P22079	Lactoperoxidase (LPO)	LPO	x	Health						29383810
P01877	Immunoglobulin heavy constant alpha 2	IGHA2	x	Health						29383810
Q6NS95	IGL@ protein	IGL@	x	Health						29383810



Q9UGM3	Deleted in malignant brain tumors 1 protein (Glycoprotein 340)	DMBT1	x	Health							29383810
Q53H26	Transferrin variant (Fragment)		x	Health							29383810
B3KSI4	cDNA FLJ36348 fis, clone THYMU2007025, highly similar to TRANSKETOLASE		x	Health							29383810
Q6MZQ6	Uncharacterized protein DKFZp686G11190	DKFZp686G11190	x	Health							29383810
P06702	Protein S100-A9 (Calgranulin-B)	S100A9	x	Health							29383810
P00738	Haptoglobin (Zonulin)	HP	x	Health							29383810
P60174	Triosephosphate isomerase (TIM)	TPI1	x	Health							29383810
P28325	Cystatin-D (Cystatin-5)	CST5	x	Health							29383810
P80188	Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL)	LCN2	x	Health							29383810
B4DI39	cDNA FLJ54328, highly similar to Heat shock 70 kDa protein 1		x	Health							29383810
P05164	Myeloperoxidase (MPO)	MPO	x	Health							29383810
P68871	Hemoglobin subunit beta (Beta-globin)	HBB	x	Health							29383810
P04040	Catalase	CAT	x	Health							29383810



P12273	Prolactin-inducible protein	PIP	x	Health						29383810
P05109	Protein S100-A8 (Calgranulin-A)	S100A8	x	Health						29383810
P06870	Kallikrein-1	KLK1	x	Health						29383810
A8K486	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase		x	Health						29383810
P31025	Lipocalin-1	LCN1	x	Health						29383810
P01859	Immunoglobulin heavy constant gamma 2	IGHG2	x	Health						29383810
B4DVQ0	cDNA FLJ58286, highly similar to Actin, cytoplasmic 2		x	Health						29383810
E9PKE3	Heat shock cognate 71 kDa protein	HSPA8	x	Health						29383810
Q9UBC9	Small proline-rich protein 3	SPRR3	x	Health						29383810
P61626	Lysozyme C	LYZ	x	Health						29383810
P01591	Immunoglobulin J chain	JCHAIN	x	Health						29383810
P69905	Hemoglobin subunit alpha	HBA1; HBA2	x	Health						29383810
P01860	Immunoglobulin heavy constant gamma 3	IGHG3	x	Health						29383810
B4E216	cDNA FLJ57339, highly similar to Complement C3		x	Health						29383810
P04080	Cystatin-B (CPI-B)	CSTB	x	Health						29383810
B7Z507	cDNA FLJ51036, highly similar to Matrix		x	Health						29383810



	metalloproteinase-9									
P10599	Thioredoxin (Trx)	TXN	x	Health						29383810
Q5JPJ9	Uncharacterized protein DKFZp686D0114	DKFZp686D0114	x	Health						29383810
B7ZLF8	Uncharacterized protein		x	Health						29383810
P61769	Beta-2-microglobulin	B2M	x	Health						29383810
B7Z4U6	cDNA FLJ55803, highly similar to Gelsolin		x	Health						29383810
I6L8B7	Fatty acid-binding protein 5	FABP5	x	Health						29383810
B3KRK8	cDNA FLJ34494 fis, clone HLUNG2005030, highly similar to VIMENTIN		x	Health						29383810
P02042	Hemoglobin subunit delta	HBD	x	Health						29383810
P31949	Protein S100-A11	S100A11	x	Health						29383810
P01034	Cystatin-C (Cystatin-3)	CST3	x	Health						29383810
P02774	Vitamin D-binding protein (DBP)	GC	x	Health						29383810
Q5H9A7	Metalloproteinase inhibitor 1	TIMP1	x	Health						29383810
Q6P5S2	Protein LEG1 homolog	LEG1	x	Health						29383810
D6REL8	Fibrinogen beta chain	FGB	x	Health						29383810
P20061	Transcobalamin-1	TCN1	x	Health						29383810
P02814	Submaxillary gland androgen-regulated protein 3B	SMR3B	x	Health						29383810
K7EQ48	Glucose-6-phosphate	GPI	x	Health						29383810



UNIVERSIDADE  
CATOLICA  
PORTUGUESA

UISEU

Proposta de biomarcadores salivares para Líquen Plano Oral – abordagem  
bioinformática

---

	isomerase (Fragment)									
O75594	Peptidoglycan recognition protein 1	PGLYRP1	x	Health						29383810
P22528	Cornifin-B	SPRR1B	x	Health						29383810

### **6.3 Análise funcional do proteoma salivar associado a Líquen Plano para determinação de um painel de biomarcadores**

#### **6.3.1 Processos biológicos associados às proteínas relacionadas com Líquen Plano**

A tabela 2 reflete os resultados da análise funcional (processos biológicos) das proteínas salivares de indivíduos com Líquen Plano, obtida através da base de dados UniProt<sup>30</sup> (secção 5.3.1). Das proteínas analisadas, 25 não possuem informação associada relativamente ao processo biológico em que estão envolvidas. Dentro das restantes 111 proteínas, 47 apresentavam pelo menos um processo biológico que aparenta estar relacionado com o desenvolvimento de Líquen Plano. O processo que mais vezes se verificou foi *inflammatory response* (GO:0006954), que se encontra associado a 22 proteínas, seguido de *innate immune response* (GO:0045087) e *cytokine-mediated signaling pathway* (GO:0019221), ambas com associadas a 17 proteínas. Esta informação pode ser observada na figura 2.

Os processos biológicos selecionados, dada a sua relação com a resposta imune e inflamatória, foram:

- *Regulation of cytokine production* [GO:0001817]
- *Antigen processing and presentation of endogenous peptide antigen via MHC class Ib* [GO:0002476]
- *Immune response* [GO:0006955]
- *Innate immune response* [GO:0045087]
- *Inflammatory response* [GO:0006954]
- *Regulation of immune system process* [GO:0002682]
- *Chronic inflammatory response* [GO:0002544]
- *Antigen processing and presentation* [GO:0019882]
- *Cellular response to interleukin-6* [GO:0071354]
- *Tumor necrosis factor-mediated signaling pathway* [GO:0033209]
- *Negative regulation of immune response* [GO:0050777]
- *Cytokine-mediated signaling pathway* [GO:0019221]

- *Adaptive immune response* [GO:0002250]
- *Immune system process* [GO:0002376]
- *Positive regulation of interleukin-6 production* [GO:0032755]
- *Inflammatory response to antigenic stimulus* [GO:0002437]



**Figura 2.** Análise funcional (processo biológico) das proteínas diferencialmente expressas em líquen plano.

**Tabela 2:** Participação das proteínas em processos biológicos relacionados com o Líquen Plano. Análise feita recorrendo à ferramenta “Retrieve/ID mapping” do Uniprot.

<b>Código Uniprot</b>	<b>Nome da proteína</b>	<b>Processo Biológico</b>
B4E216	cDNA FLJ57339, highly similar to Complement C3	Inflammatory response [GO:0006954]
E7EQB2	Lactotransferrin (Fragment)	Regulation of cytokine production [GO:0001817]
O60603	Toll-like receptor 2	Immune response [GO:0006955] Inflammatory response [GO:0006954] Positive regulation of interleukin-6 production [GO:0032755] Innate immune response [GO:0045087]
O75594	Peptidoglycan recognition protein 1	Innate immune response [GO:0045087]
P01024	Complement C3	Immune response [GO:0006955] Inflammatory response [GO:0006954]
P01375	Tumor necrosis factor (TNF-alpha)	Inflammatory response [GO:0006954] Positive regulation of interleukin-6 production [GO:0032755] Cytokine-mediated signaling pathway [GO:0019221] Tumor necrosis factor-mediated signaling pathway [GO:0033209]
P01579	Interferon gamma (IFN-gamma)	Adaptive immune response [GO:0002250]
P01583	Interleukin-1 alpha (IL-1 alpha)	Inflammatory response [GO:0006954] Inflammatory response to antigenic stimulus [GO:0002437] Cytokine-mediated signaling pathway [GO:0019221]
P01584	Interleukin-1 beta (IL-1 beta)	Inflammatory response [GO:0006954] Positive regulation of interleukin-6 production [GO:0032755] Inflammatory response to antigenic stimulus [GO:0002437] Cytokine-mediated signaling pathway [GO:0019221]
P01591	Immunoglobulin J chain (Joining chain of multimeric IgA and IgM)	Adaptive immune response [GO:0002250] Innate immune response [GO:0045087]



P01859	Immunoglobulin constant gamma 2 heavy	Innate immune response [GO:0045087]
P01859	Immunoglobulin constant gamma 3 heavy	Innate immune response [GO:0045087]
P01876	Immunoglobulin constant alpha 1 heavy	Immune response [GO:0006955] Innate immune response [GO:0045087]
P01877	Immunoglobulin constant alpha 2 heavy	Immune response [GO:0006955] Innate immune response [GO:0045087]
P02675	Fibrinogen beta chain	Adaptive immune response [GO:0002250] Innate immune response [GO:0045087]
P02679	Fibrinogen gamma chain	Cellular response to interleukin-6 [GO:0071354]
P02763	Alpha-1-acid glycoprotein 1	Inflammatory response [GO:0006954] Regulation of immune system process [GO:0002682]
P05109	Protein S100-A8	Chronic inflammatory response [GO:0002544] Inflammatory response [GO:0006954] Innate immune response [GO:0045087]
P05112	Interleukin-4 (IL-4)	Immune response [GO:0006955] Cytokine-mediated signaling pathway [GO:0019221]
P05231	Interleukin-6 (IL-6)	Inflammatory response [GO:0006954] Positive regulation of interleukin-6 production [GO:0032755] Cytokine-mediated signaling pathway [GO:0019221]
P06702	Protein S100-A9 (Calgranulin-B)	Inflammatory response [GO:0006954] Innate immune response [GO:0045087]
P07602	Prosaposin	Antigen processing and presentation [GO:0019882]
P08571	Monocyte differentiation antigen CD14	Inflammatory response [GO:0006954] Innate immune response [GO:0045087]
P10145	Interleukin-8 (IL-8)	Immune response [GO:0006955] Cytokine-mediated signaling pathway [GO:0019221] Inflammatory response [GO:0006954]
P12273	Prolactin-inducible protein	Regulation of immune system process [GO:0002682]
P18510	Interleukin-1 receptor antagonist protein (IL-1RN)	Immune response [GO:0006955]; Inflammatory response [GO:0006954]



		<i>Inflammatory response to antigenic stimulus [GO:0002437]</i> <i>Cytokine-mediated signaling pathway [GO:0019221]</i>
P20333	<i>Tumor necrosis factor receptor superfamily member 1B (TNF-R2)</i>	<i>Inflammatory response [GO:0006954]</i> <i>Cytokine-mediated signaling pathway [GO:0019221]</i> <i>Tumor necrosis factor-mediated signaling pathway [GO:0033209]</i>
P22894	<i>Neutrophil collagenase (MMP-8)</i>	<i>Positive regulation of interleukin-6 production [GO:0032755]</i>
P25311	<i>Zinc-alpha-2-glycoprotein</i>	<i>Antigen processing and presentation of endogenous peptide antigen via MHC class Ib [GO:0002476]</i>
P29965	<i>CD40 ligand (CD40-L)</i>	<i>Inflammatory response [GO:0006954]</i> <i>Tumor necrosis factor-mediated signaling pathway [GO:0033209]</i>
P31151	<i>Protein S100-A7</i>	<i>Innate immune response [GO:0045087]</i>
P54108	<i>Cysteine-rich secretory protein 3</i>	<i>Innate immune response [GO:0045087]</i>
P59665	<i>Neutrophil defensin 1 (HNP-1)</i>	<i>Immune response [GO:0006955]</i>
P61626	<i>Lysozyme C</i>	<i>Inflammatory response [GO:0006954]</i>
P61769	<i>Beta-2-microglobulin [Cleaved into:Beta-2-microglobulin form pl 5.3]</i>	<i>Innate immune response [GO:0045087]</i>
P62328	<i>Thymosin beta-4 (T beta-4)</i>	<i>Tumor necrosis factor-mediated signaling pathway [GO:0033209]</i>
P63104	<i>14-3-3 protein zeta/delta</i>	<i>Cytokine-mediated signaling pathway [GO:0019221]</i> <i>Cytokine-mediated signaling pathway [GO:0019221]</i>
P80188	<i>Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL)</i>	<i>Innate immune response [GO:0045087]</i> <i>Cytokine-mediated signaling pathway [GO:0019221]</i>
Q14116	<i>Interleukin-18 (IL-18)</i>	<i>Inflammatory response [GO:0006954]</i> <i>Cytokine-mediated signaling pathway [GO:0019221]</i>
Q16552	<i>Interleukin-17A (IL-17)</i>	<i>Immune response [GO:0006955]</i> <i>Inflammatory response [GO:0006954]</i> <i>Cytokine-mediated signaling pathway [GO:0019221]</i>



Q6EBC2	Interleukin-31 (IL-31)	Immune system process [GO:0002376] Cytokine-mediated signaling pathway [GO:0019221]
Q96PD4	Interleukin-17F (IL-17F)	Inflammatory response [GO:0006954] Cytokine-mediated signaling pathway [GO:0019221]
Q9GZX6	Interleukin-22 (IL-22)	Inflammatory response [GO:0006954] Cytokine-mediated signaling pathway [GO:0019221]
Q9H293	Interleukin-25 (IL-25)	Inflammatory response to antigenic stimulus [GO:0002437]
Q9HBE4	Interleukin-21 (IL-21)	Immune response [GO:0006955]
Q9NPF7	Interleukin-23 subunit alpha (IL-23 subunit alpha)	Inflammatory response [GO:0006954] Cytokine-mediated signaling pathway [GO:0019221] Innate immune response [GO:0045087]
Q9NQ38	Serine protease inhibitor Kazal-type 5	Negative regulation of immune response [GO:0050777]
Q9NZH6	Interleukin-37 (IL-37)	Immune response [GO:0006955]; Inflammatory response [GO:0006954] Inflammatory response to antigenic stimulus [GO:0002437] Cytokine-mediated signaling pathway [GO:0019221]
Q9UGM3	Deleted in malignant brain tumors 1 protein (Glycoprotein 340)	Innate immune response [GO:0045087]

### 6.3.2 Outras patologias associados às proteínas relacionadas com Líquen Plano

Através da análise com a ferramenta DAVID<sup>28</sup> constatou-se que, dentro do conjunto de proteínas anotadas, 114 apresentavam identificadores DAVID válidos, como pode ser verificado na figura 3. Dentro dessas, 102 já se encontravam associadas a uma ou mais patologias, onde 53 apresentam associação com patologias autoimunes, como pode ser observado na figura 4. Ainda dentro das 102 proteínas, apenas 10 estão relacionadas com a patologia Líquen Plano.

As tabelas 3 e 4 representam, respetivamente, as tabelas construídas em Excel para facilitar a visualização das proteínas que podem ou não estar associadas a uma patologia e associadas a patologias autoimunes.

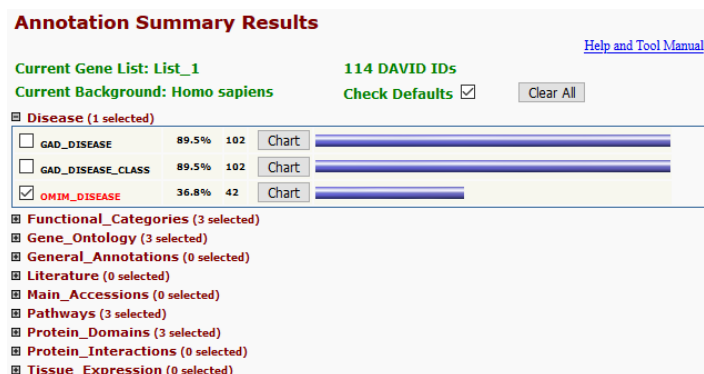


Figura 3. Resultados devolvidos pela ferramenta DAVID

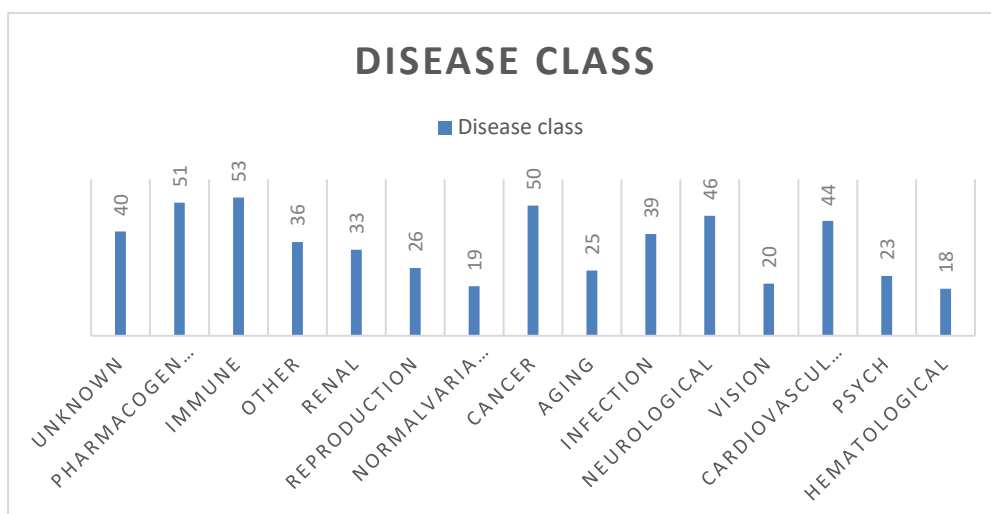


Figura 4. Gráfico com o número de proteínas por classe de doença.

**Tabela 3:** Proteínas com associações conhecidas e diferentes patologias, patologias autoimunes e Líquen Plano. Análise feita recorrendo à ferramenta DAVID através das opções GAD\_DISEASE (associação com líquen plano e com outras patologias) e GAD\_DISEASE\_CLASS (associação com doenças autoimunes).

UniprotKB/AC	Nome da proteína (e gene)	Associação a outras patologias	Associação a doenças autoimunes	Associação a Líquen Plano
A0A024RC30	Desmoglein 3(DSG3)	x	x	
A0A0A0MRQ5	Peroxiredoxin 1(PRD1)	x		
A8K2U0	Alpha-2-macroglobulin like 1 (A2ML1)	x		
B7Z4U6	Gelsolin (GSN)	x		
D6CHE9	Proteinase 3 (PRTN3)	x		
E7EQB2	Lactotransferrin (LTF)	x	x	
E7EUT5	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)	x		
E9PKE3	Heat shock protein family A (Hsp70) member 8(HSPA8)	x	x	
E9PKG6	Nucleobindin 2(NUCB2)	x		
F8W696	Apolipoprotein A1(APOA1)	x	x	
F8WD96	Cathepsin D(CTSD)	x	x	
G3V2V8	NPC intracellular cholesterol transporter 2(NPC2)	x		
H0YDX6	CD44 molecule (CD44)	x	x	
H0YGX7	Rho GDP dissociation inhibitor beta (ARHGDI1)	x		
I6L8B7	Fatty acid binding protein 5(FABP5)	x		
K7EQ48	Glucose-6-phosphate isomerase (GPI)	x		
O60603	Toll like receptor 2(TLR2)	x	x	
O75594	Peptidoglycan recognition protein 1(PGLYRP1)	x		
P00352	Aldehyde dehydrogenase 1 family member A1(ALDH1A1)	x		
P00441	Superoxide dismutase 1,	x	x	



	<i>soluble (SOD1)</i>			
P00738	<i>Haptoglobin (HP)</i>	x	x	
P01024	<i>Complement C3(C3)</i>	x	x	
P01034	<i>Cystatin C(CST3)</i>	x		
P01037	<i>Cystatin SN(CST1)</i>	x		
P01040	<i>Cystatin A(CSTA)</i>	x	x	
P01375	<i>Tumor necrosis factor (TNF)</i>	x	x	x
P01579	<i>Interferon gamma (IFNG)</i>	x	x	x
P01583	<i>Interleukin 1 alpha (IL1A)</i>	x	x	x
P01584	<i>Interleukin 1 beta (IL1B)</i>	x	x	x
P01833	<i>Polymeric immunoglobulin receptor(PIGR)</i>	x		
P01859	<i>Immunoglobulin heavy constant gamma 2 (G2m marker) (IGHG2)</i>	x	x	
P01860	<i>Immunoglobulin heavy constant gamma 3 (G3m marker) (IGHG3)</i>	x	x	
P02042	<i>Hemoglobin subunit delta (HBD)</i>	x	x	
P02675	<i>Fibrinogen beta chain (FGB)</i>	x		
P02679	<i>Fibrinogen gamma chain(FGG)</i>	x	x	
P02763	<i>Orosomuroid 1(ORM1)</i>	x		
P02768	<i>Albumin(ALB)</i>	x		
P02774	<i>GC, vitamin D binding protein(GC)</i>	x		
P04040	<i>Catalase(CAT)</i>	x	x	
P04080	<i>Cystatin B(CSTB)</i>	x	x	
P04745	<i>Amylase, alpha 1A (salivary)(AMY1A)</i>	x		
P05109	<i>S100 calcium binding protein A8(S100A8)</i>	x		
P05112	<i>Interleukin 4(IL4)</i>	x	x	x
P05164	<i>Myeloperoxidase(MPO)</i>	x	x	
P05231	<i>Interleukin 6(IL6)</i>	x	x	x
P06702	<i>S100 calcium binding protein A9(S100A9)</i>	x	x	
P06733	<i>Enolase 1(ENO1)</i>	x	x	



P06870	<i>Kallikrein 1(KLK1)</i>	x		
P07108	<i>Diazepam binding inhibitor, acyl-coa binding protein(DBI)</i>	x	x	
P07602	<i>Prosaposin(PSAP)</i>	x		
P08571	<i>CD14 molecule(CD14)</i>	x		
P09228	<i>Cystatin SA(CST2)</i>	x	x	
P10145	<i>C-X-C motif chemokine ligand 8(CXCL8)</i>	x	x	x
P10153	<i>Ribonuclease A family member 2(RNASE2)</i>	x	x	
P10599	<i>Thioredoxin(TXN)</i>	x	x	
P11021	<i>Heat shock protein family A (Hsp70) member 5(HSPA5)</i>	x	x	
P12273	<i>Prolactin induced protein(PIP)</i>	x		
P16219	<i>Acyl-coa dehydrogenase, C-2 to C-3 short chain(ACADS)</i>	x	x	
P18510	<i>Interleukin 1 receptor antagonist(IL1RN)</i>	x		x
P20061	<i>Transcobalamin 1(TCN1)</i>	x	x	
P20333	<i>TNF receptor superfamily member 1B(TNFRSF1B)</i>	x		x
P22079	<i>Lactoperoxidase(LPO)</i>	x	x	
P22528	<i>Small proline rich protein 1B(SPRR1B)</i>	x		
P22894	<i>Matrix metalloproteinase 8(MMP8)</i>	x	x	
P23280	<i>Carbonic anhydrase 6(CA6)</i>	x		
P27482	<i>Calmodulin like 3(CALML3)</i>	x		
P28325	<i>Cystatin D(CST5)</i>	x		
P29965	<i>CD40 ligand(CD40LG)</i>	x		
P30086	<i>Phosphatidylethanolamine binding protein 1(PEBP1)</i>	x	x	
P31025	<i>Lipocalin 1(LCN1)</i>	x		
P31151	<i>S100 calcium binding protein A7(S100A7)</i>	x		
P31949	<i>S100 calcium binding protein A11(S100A11)</i>	x	x	
P59665	<i>Defensin alpha 1(DEFA1)</i>	x		



P60174	<i>Triosephosphate isomerase 1(TPI1)</i>	x		
P61626	<i>Lysozyme(LYZ)</i>	x		
P61769	<i>Beta-2-microglobulin(B2M)</i>	x		
P62328	<i>Thymosin beta 4, X-linked(TMSB4X)</i>	x	x	
P63104	<i>Tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein zeta(YWHAZ)</i>	x		
P68871	<i>Hemoglobin subunit beta(HBB)</i>	x		
P69905	<i>Hemoglobin subunit alpha 1(HBA1)</i>	x		
P80188	<i>Lipocalin 2(LCN2)</i>	x	x	
Q07654	<i>Trefoil factor 3(TFF3)</i>	x		
Q08188	<i>Transglutaminase 3(TGM3)</i>	x		
Q0QF37	<i>Malate dehydrogenase 2(MDH2)</i>	x		
Q14116	<i>Interleukin 18(IL18)</i>	x		x
Q14508	<i>WAP four-disulfide core domain 2(WFDC2)</i>	x	x	
Q15848	<i>Adiponectin, C1Q and collagen domain containing(ADIPOQ)</i>	x		
Q16552	<i>Interleukin 17A(IL17A)</i>	x	x	
Q5H9A7	<i>TIMP metalloproteinase inhibitor 1(TIMPI)</i>	x	x	
Q6EBC2	<i>Interleukin 31(IL31)</i>	x	x	
Q96CB9	<i>NOP2/Sun RNA methyltransferase family member 4(NSUN4)</i>	x	x	
Q96PD4	<i>Interleukin 17F(IL17F)</i>	x		
Q9BS19	<i>Hemopexin(HPX)</i>	x	x	
Q9GZX6	<i>Interleukin 22(IL22)</i>	x		
Q9H293	<i>Interleukin 25(IL25)</i>	x	x	
Q9HBE4	<i>Interleukin 21(IL21)</i>	x	x	
Q9HC84	<i>Mucin 5B, oligomeric mucus/gel-forming(MUC5B)</i>	x	x	



---

Q9NPF7	<i>Interleukin 23 subunit alpha(IL23A)</i>	x		
Q9NQ38	<i>Serine peptidase inhibitor, Kazal type 5(SPINK5)</i>	x	x	
Q9NZH6	<i>Interleukin 37(IL37)</i>	x	x	
Q9UGM3	<i>Deleted in malignant brain tumors 1(DMBT1)</i>	x	x	

#### 6.4 Proposta de um painel de Biomarcadores para Líquen Plano Oral

Da ponderação dos diversos fatores considerados para classificar as proteínas anotadas no Líquen Plano, foi calculado um *score* que serviu de base para a proposta de um painel de biomarcadores salivares para esta doença (Material e Métodos - 5.4). Os valores do *score* obtidos variaram entre -0,1 e 0,9, como pode ser visto na tabela 4. As proteínas que obtiveram valores de *score* que entram no conjunto ideal de resultados para integrar uma proteína no painel de biomarcadores, o intervalo entre 0,7 e 1, foram:

1. *TNF- $\alpha$*  (P01375) com um *score* de 0,9
2. *IL-6* (P05231) com um *score* de 0,9
3. *TNFR1- $\beta$*  (que admite o nome *TNFR-2*, código P20333) com um *score* de 0,8
4. *IL-1 $\alpha$*  (P01583) com um *score* de 0,7
5. *Fibrinogénio cadeia  $\beta$*  (P02675) com um *score* de 0,7
6. *Componente do complemento C3* (P01024) com um *score* de 0,7

**Tabela 4:** Determinação do *score* utilizando as regras e fórmula definidas no ponto 5.4 do material e métodos. As células foram selecionadas com o algarismo 1 após converter as dualidades “pertence/não pertence” e “participa/não participa” para o binário 0 (vazio) e 1, de forma a possibilitar o cálculo final do *score*. As proteínas escolhidas para integrar o painel de biomarcadores para Líquen Plano Oral têm o seu nome com cor azul e respetivo *score* com cor vermelha.

	Fold Change (FG)	Apenas indicação alterado	FG entre 2 e 5	FG entre 5 e 10	FG $\geq 10$ ou exclusivas	Participa noutras doenças	Participa no Líquen Plano	Participa em doenças AI	Participa em processos biológicos	Score
Tumor necrosis factor (TNF- $\alpha$ )	10,20				1	1	1	1	1	0,9
Interleukin-6 (IL-6)	25,57				1	1	1	1	1	0,9
Tumor necrosis factor receptor superfamily member 1B (TNF-R2)	7,79			1		1	1	1	1	0,8
Complement C3	*				1	1		1	1	0,7
Interleukin-1 alpha (IL-1)	2,19		1			1	1	1	1	0,7



alpha)										
Fibrinogen beta chain	*				1	1		1	1	0,7
14-3-3 protein zeta/delta (Protein kinase C inhibitor protein 1) (KCIP-1)	*				1	1			1	0,6
Haptoglobin (Zonulin) [Cleaved into: Haptoglobin alpha chain; Haptoglobin beta chain]	*				1	1		1		0,5
Immunoglobulin J chain	2,00		1						1	0,5
Keratin, type I cytoskeletal 9	*				1					0,5
Interleukin-23 subunit alpha (IL-23-A)	-3,75		1			1		1	1	0,5
Toll-like receptor 2 (EC 3.2.2.6)	+	1				1		1	1	0,4
Interferon gamma (IFN-gamma)	1,12					1	1	1	1	0,4
Interleukin-1 beta (IL-1 beta)						1	1	1	1	0,4
Interleukin-4 (IL-4)	1,51					1	1	1	1	0,4
Monocyte differentiation antigen CD14	+	1				1		1	1	0,4
Interleukin-8 (IL-8)	1,93					1	1	1	1	0,4
Interleukin-1 receptor antagonist protein						1	1	1	1	0,4
Neutrophil gelatinase-associated lipocalin	3,20		1			1			1	0,4
Interleukin-18 (IL-18)	1,24					1	1	1	1	0,4
5-methylcytosine rRNA methyltransferase NSUN4	*				1	1				0,4
Immunoglobulin heavy constant alpha 1	1,34							1	1	0,3
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	2,80		1							0,3
cDNA FLJ57339, highly similar to Complement C3									1	0,2
Lactotransferrin (Fragment)						1		1	1	0,2
Cystatin-SN	-2,36		1			1				0,2



Immunoglobulin heavy constant gamma 2					1		1	1	0,2
Immunoglobulin heavy constant gamma 3					1		1	1	0,2
Immunoglobulin heavy constant alpha 2								1	0,2
Albumin	3,00		1		1				0,2
Catalase					1		1	1	0,2
Alpha-amylase 1	2,10		1		1				0,2
Protein S100-A8					1		1	1	0,2
Protein S100-A9					1		1	1	0,2
Short-chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mitochondrial	2,60		1		1				0,2
Zinc-alpha-2-glycoprotein								1	0,2
CD40 ligand (CD40-L)					1		1	1	0,2
Protein S100-A7					1		1	1	0,2
Cysteine-rich secretory protein 3								1	0,2
Beta-2-microglobulin					1		1	1	0,2
Interleukin-17A (IL-17)	1,09				1		1	1	0,2
Interleukin-31 (IL-31)					1		1	1	0,2
Interleukin-17F (IL-17F)					1		1	1	0,2
Interleukin-22 (IL-22)					1		1	1	0,2
Interleukin-25					1		1	1	0,2
Interleukin-21 (IL-21)					1		1	1	0,2
Serine protease inhibitor Kazal-type 5					1		1	1	0,2
Interleukin-37 (IL-37)					1		1	1	0,2
Deleted in malignant brain tumors 1 protein					1		1	1	0,2
Peroxiredoxin-1					1				-0,1
Alpha-2-macroglobulin-like protein 1					1				-0,1
cDNA FLJ55803, highly similar to Gelsolin					1				-0,1
Proteinase 3					1				-0,1
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase					1				-0,1



Nucleobindin-2						1				-0,1
NPC intracellular cholesterol transporter 2 (Fragment)						1				-0,1
Rho GDP-dissociation inhibitor 2 (Fragment)						1				-0,1
Fatty acid-binding protein 5						1				-0,1
Glucose-6-phosphate isomerase (Fragment)						1				-0,1
Peptidoglycan recognition protein 1						1		1		0,1
Retinal dehydrogenase	-1,32					1				-0,1
Cystatin-C						1				-0,1
Polymeric immunoglobulin receptor						1				-0,1
Hemoglobin subunit delta						1				-0,1
Fibrinogen gamma chain						1		1		0,1
Alpha-1-acid glycoprotein 1						1		1		0,1
Cystatin-B						1				-0,1
Alpha-enolase						1				-0,1
Acyl-CoA-binding protein						1				-0,1
Prosaposin						1		1		0,1
Endoplasmic reticulum chaperone BiP						1				-0,1
Transcobalamin-1						1				-0,1
Lactoperoxidase						1				-0,1
Neutrophil collagenase	1,32					1		1		0,1
Carbonic anhydrase 6	-1,80					1				-0,1
Calmodulin-like protein 3						1				-0,1
Cystatin-D (Cystatin-5)						1				-0,1
Phosphatidylethanolamine-binding protein 1						1				-0,1
Lipocalin-1						1				-0,1
Protein S100-A11						1				-0,1
Neutrophil defensin 1						1		1		0,1
Triosephosphate isomerase						1				-0,1
Lysozyme C						1		1		0,1
Thymosin beta-4						1		1		0,1



Hemoglobin subunit beta						1				-0,1
Trefoil factor 3						1				-0,1
Protein-glutamine gamma-glutamyltransferase E						1				-0,1
Malate dehydrogenase		1				1				-0,1
WAP four-disulfide core domain protein 2						1				-0,1
Epididymis secretory sperm binding protein						1				-0,1
Mucin-5B						1				-0,1
Desmoglein 3						1		1		0
Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase										0
cDNA FLJ34494 fis, clone HLUNG2005030, highly similar to VIMENTIN										0
cDNA FLJ36348 fis, clone THYMU2007025, highly similar to TRANSKETOLASE										0
cDNA FLJ54328, highly similar to Heat shock 70 kDa protein 1										0
cDNA FLJ53509, highly similar to Galectin-3-binding protein										0
cDNA FLJ51983, highly similar to Phosphoglycerate mutase 1										0
Adenylyl cyclase-associated protein										0
cDNA FLJ51275										0
cDNA FLJ58286, highly similar to Actin, cytoplasmic 2										0
cDNA FLJ54228, highly similar to Leucine-rich alpha-2-glycoprotein										0
cDNA FLJ53435, highly similar to Ezrin										0



cDNA FLJ51036, highly similar to Matrix metalloproteinase-9										0
cDNA FLJ58075, highly similar to Ceruloplasmin										0
Uncharacterized protein										0
Fibrinogen beta chain										0
Beta-2-glycoprotein I (Fragment)										0
Heat shock cognate 71 kDa protein						1		1		0
Apolipoprotein A-I						1		1		0
Cathepsin D						1		1		0
CD44 antigen (Fragment)						1		1		0
Coronin										0
Alpha-1B-glycoprotein (Fragment)										0
Superoxide dismutase						1		1		0
Cystatin-S	-1,60									0
Cystatin-A						1		1		0
Vitamin D-binding protein						1		1		0
Submaxillary gland androgen-regulated protein 3B										0
Myeloperoxidase						1		1		0
Kallikrein-1						1		1		0
Cystatin-SA						1		1		0
Non-secretory ribonuclease						1		1		0
Thioredoxin						1		1		0
Prolactin-inducible protein						1		1		0
Cornifin-B						1		1		0
Hemoglobin subunit alpha						1		1		0
Adiponectin	1,08					1		1		0
Transferrin variant (Fragment)										0
Calmodulin-like skin protein variant (Fragment)										0
Metalloproteinase inhibitor						1		1		0



---

1										
Uncharacterized protein DKFZp686D0114										0
Uncharacterized protein DKFZp686G11190										0
IGL@ protein										0
Protein LEG1 homolog										0
Small proline-rich protein 3										0





## **7. Discussão**



## **Discussão**

### **7.1 Associação das proteínas a processos biológicos relacionados com Líquen Plano Oral**

Para o cálculo do *score* de cada proteína, foi necessário identificar quais apresentavam processos biológicos que podem ser relacionados com a etiologia do Líquen Plano. Embora a causa da patologia permaneça desconhecida<sup>52</sup>, a evidência sugere que os mecanismos imunológicos, particularmente os mecanismos de imunidade celular, são cruciais para a patogénese desta doença<sup>5</sup>. O Líquen Plano Oral é então classificado como uma patologia inflamatória, crónica, mediada por linfócitos T<sup>53</sup>, cuja resolução espontânea é incomum<sup>31</sup>. O antigénio que pode despoletar o Líquen Plano é desconhecido, podendo ser um auto-peptídeo. Porém; existem controvérsias relativamente à possibilidade de serem apresentados 1 ou 2 antigénios.

#### **7.1.2 Líquen Plano Oral e doenças autoimunes**

Atentando novamente no cálculo do *score*, verifica-se que a presença de associação entre uma proteína a patologias autoimunes contribui positivamente para a relevância dessa proteína como biomarcador. Vários autores encontraram associações positivas ou coocorrência entre a presença do Líquen Plano Oral e outras patologias autoimunes:

- Likar-Manookin e colaboradores<sup>54</sup> detetaram uma associação entre o Líquen Plano Oral e Síndrome de Sjögren primário;
- Quiao e colaboradores<sup>55</sup> reportaram um caso onde se verificou a coocorrência de Líquen Plano Oral, miastenia grave, vitiligo e alopecia areata.
- Vajaito e colaboradores<sup>56</sup> reportaram um caso onde o paciente manifestava, simultaneamente, Líquen Plano Oral, vitiligo e psoríase;

Apesar de a lista se estender, López-Jornet<sup>57</sup> afirmou que ainda não existia uma hipótese que explicasse a coexistência de Líquen Plano Oral e outras doenças autoimunes. Em contraste, Wu e colaboradores já recomendam um despiste de patologias da tiroide, sobretudo Tiroidite de Hashimoto, em pacientes com Líquen Plano Oral<sup>58</sup>.

Apesar de alguma controvérsia, a associação entre o Líquen Plano Oral e doenças

autoimunes parece ser relevante parece ser relevante e, como tal, esta relação foi considerada para cálculo do *score* de biomarcador. Contudo, a sua ponderação foi mantida em 10% no cálculo do *score* para manter alguma prudência.

### **7.1.2 Associação entre Líquen Plano Oral e antigénios virais**

Nesta metodologia foi escolhido não considerar a resposta imune a antigénios virais como um processo biológico relacionado com o Líquen Plano Oral, dada a variação existente entre os relatos da associação do Líquen Plano Oral e a infeção pelo vírus da Hepatite C e pelo vírus do Papiloma Humano, assim como a falha em obter uma associação com outros vírus.

Muita da investigação realizada sobre a relação entre o Líquen Plano Oral e patologias sistémicas tem sido dirigida ao vírus da Hepatite C<sup>59-62</sup>. Um fator relevante que rapidamente se destaca neste assunto é o facto de a coexistência existir e ser relevante em países do sudeste asiático e sul da Europa, mas perder relevância no caso da Europa central. Existe ainda uma meta-análise, realizada por Lodi e colaboradores<sup>62</sup>, que confirma uma associação entre infeção pelo vírus da Hepatite C e o Líquen Plano, onde é também referido que pacientes com Líquen Plano apresentam um risco 5 vezes superior de se apresentar seropositivos para Hepatite C comparativamente ao grupo controlo. Contudo, este risco deixa de ser significativo para os pacientes que apresentam Líquen Plano Oral.

O vírus do Papiloma Humano revelou uma variação geográfica relativamente à associação com o Líquen Plano Oral, dependendo também da forma clínica deste e dos genótipos do vírus<sup>63</sup>.

Outros vírus, como os Herpes Vírus e HIV, falharam em obter associação relevante com<sup>64</sup>.

## **7.2 Discussão do painel de biomarcadores sugerido**

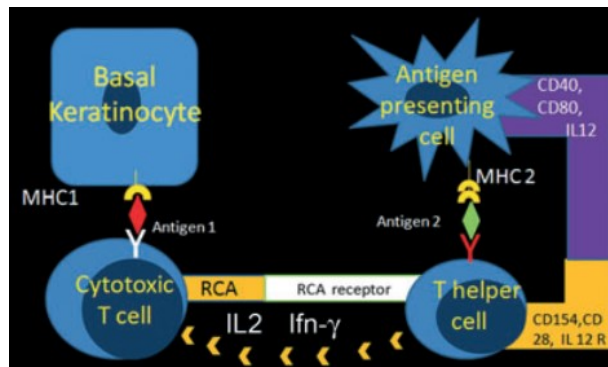
### **7.2.1 Interferão gama**

O interferão gama (IFN- $\gamma$ ), apesar de detetado, não se revelou como proteína ideal para integrar um painel de biomarcadores salivar para o Líquen Plano Oral (*score* = 0,4). Esperava-se que esta citocina alcançasse um *score* mais relevante dado que é uma citocina produzida por linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> (entre outras células)<sup>65,66</sup>, correspondendo a um dos

mais importantes mediadores de resposta imune e inflamatória<sup>66,67</sup>. Ainda assim, a informação existente sobre a concentração do IFN- $\gamma$  já era inconsistente: enquanto autores, como Liu e colaboradores<sup>45</sup>, obtiveram valores diminuídos de concentração de IFN- $\gamma$  em pacientes com Líquen Plano, quando comparado com pessoas saudáveis, indo ao encontro dos resultados obtidos nesta dissertação, Tao e colaboradores<sup>44</sup> revelaram resultados onde a concentração de IFN- $\gamma$  em pacientes com Líquen Plano erosivo é significativamente maior do que nos pacientes com Líquen Plano reticular ou no grupo de controlo (indivíduos saudáveis)<sup>44,66</sup>. Ghallab e colaboradores<sup>47</sup> também detetaram valores mais elevados de concentração de IFN- $\gamma$  em pacientes com Líquen Plano erosivo quando comparado com o grupo de controlo (pacientes saudáveis). Sugere-se que a diferença encontrada entre o resultado obtido nesta investigação e nos trabalhos de Tao<sup>44</sup> e Ghallab<sup>47</sup> surja do facto de estes autores terem utilizado valores exclusivos de pacientes com Líquen Plano erosivo enquanto que neste trabalho não houve diferenciação entre as diversas apresentações clínicas.

Outro argumento que torna os resultados do IFN- $\gamma$  inesperados está relacionado com o desenvolvimento da patologia. Como pode ser visto na figura 5, a ativação dos linfócitos T citotóxicos CD8<sup>+</sup> pode ser feita diretamente pelo contacto com um antígeno apresentado pelos queratinócitos numa molécula MHC classe I<sup>68,69</sup>, ou pelas citocinas libertadas pelos linfócitos T CD4<sup>+</sup> aquando da ativação pelo antígeno apresentado pela molécula MHC classe II dos queratinócitos ou células de Langerhans<sup>5</sup>, ou pela interleucina 2 libertada pela célula apresentadora do antígeno<sup>69</sup>. As citocinas descritas para esta sinalização são a IL-2 e IFN- $\gamma$ <sup>69,70</sup>.

Neste trabalho, o valor de *fold change* (1,12) do IFN- $\gamma$  não atingiu sequer o primeiro patamar de valorização (é inferior a 2 e não há indicação de alterado ou de ser exclusivo em pacientes com Líquen Plano Oral). Dada a sua potencial importância no desenvolvimento do Líquen Plano Oral, e considerando a inconsistência dos resultados na evidência científica, sugere-se que a principal razão para o *score* diminuído (0,4) resulte da relação desta citocina com várias outras doenças, o que lhe retira especificidade.



**Figura 5.** Esquema da ativação dos linfócitos T CD8+ (citotóxicos) e CD4+ (*helper*). Adaptado de Roopashree<sup>69</sup>.

### 7.2.2 TNF- $\alpha$ , TNFR-1 e TNFR-2

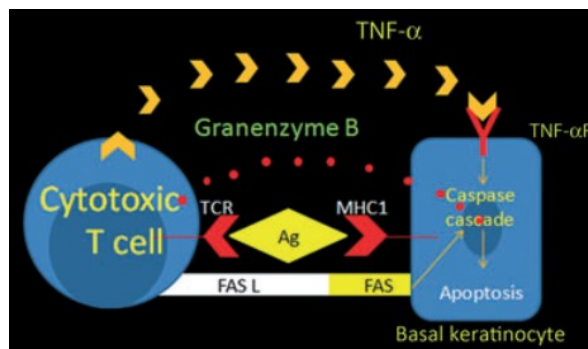
Tanto o TNF- $\alpha$  como o TNFR-2 são sugeridos neste trabalho como componentes relevantes de um painel de biomarcadores de Líquen Plano Oral, dado o *score* elevado que alcançaram (0,9 e 0,8, respetivamente). Estes valores são consistentes com a literatura atual, primeiramente porque diferentes tipos de células têm sido identificados como as fontes de TNF- $\alpha$  nas lesões de Líquen Plano Oral, incluindo queratinócitos e linfócitos T CD4<sup>+</sup> <sup>66</sup>, mas também porque outros autores obtiveram um resultado semelhante ao deste trabalho:

- Ghallab<sup>47</sup> obteve um resultado semelhante ao deste trabalho, tendo reportado uma diferença significativa entre a concentração de TNFR-2 na saliva de pacientes com Líquen Plano Oral erosivo e pacientes saudáveis.
- Vários autores detetaram valores significativamente aumentados da concentração desta citocina na saliva de pacientes com Líquen Plano Oral <sup>41-43,47</sup>.
- Voltando a atenção para o soro, os resultados seguem a mesma tendência que os resultados obtidos a partir da saliva quando o protocolo inclui a realização do método ELISA <sup>66,71-73</sup>.
- Comparando com os queratinócitos da gengiva não inflamada e gengiva com inflamação crónica, os queratinócitos das lesões de Líquen Plano Oral produzem uma quantidade maior de TNF- $\alpha$  <sup>66,74,75</sup>.

Considere-se agora uma hipótese da fisiopatologia da doença, relativa à morte dos queratinócitos como resultado do processo de apoptose. Segundo Roopashree<sup>69</sup>, os possíveis mecanismos relacionados com a apoptose são:

1. Ligação do Fator de Necrose Tumoral Alfa (TNF- $\alpha$ ) ao recetor TNF- $\alpha$  Receptor 1 (TNFR-1)
2. Ligação do Ligante Fas ao seu recetor na superfície do queratinócito.
3. Entrada de Granzima B no queratinócito através de poros formados por Perforina.

Pode ser visto um esquema dos possíveis mecanismos na figura 6.



**Figura 6.** Possíveis mecanismos relacionados com a apoptose. Adaptado de Roopashree<sup>69</sup>

A apoptose é observada como um fenómeno de citotoxicidade mediada pelo TNF- $\alpha$  através da via de sinalização do TNFR-1, enquanto que o TNFR-2 não se revela suficiente para estimular esse fenómeno<sup>47</sup> sendo responsável por qualquer função relacionada com a sobrevivência de linfócitos T<sup>76</sup>. Embora esta informação possa pôr em causa e exigir alguma ponderação sobre o valor de *score* obtido pelo TNFR-2 (0,8), já se constatou que um elevado número de células apresenta simultaneamente os dois recetores, havendo a necessidade de colaboração entre ambos para desencadear apoptose mediada por TNF- $\alpha$ . Também já foi reportado que o TNFR-2 apresenta um papel importante na apoptose induzida pelo TNFR-1<sup>77</sup>.

Embora Roopashree<sup>69</sup> refira uma ligação entre o TNF- $\alpha$  e TNFR-1, neste trabalho o TNFR-2 assumiu uma importância maior, pelo que poderá existir uma relação sinérgica entre o TNFR-1 e o TNFR-2 que ainda não foi explorada no caso do Líquen Plano Oral.

Finalmente, já foram detetados vários defeitos na via de sinalização do TNF- $\alpha$  que

envolvem o TNFR-2 e o NF- $\kappa$ B em linfócitos T autorreativos em patologias autoimunes, como a doença de Crohn, síndrome de Sjögren, esclerose múltipla, lúpus sistémico eritematoso, espondilite anquilosante e diabetes tipo I<sup>76</sup>. Este aspeto podia retirar especificidade à proteína quando utilizada isoladamente, mas esta mantém a sua relevância enquanto parte de um painel de biomarcadores salivares para o Líquen Plano Oral.

### 7.2.3 Interleucina 1 alfa

A expressão “interleucina 1” é um nome genérico atribuído a duas proteínas diferentes, que são a interleucina 1 alfa e a interleucina 1 beta<sup>66</sup>. Neste trabalho, a IL-1 $\alpha$  obteve um *score* de 0,7, um valor expectável que acompanha a relevância que adquire na literatura e que também pode resultar da sua relação com queratinócitos. dada a importância que estes aparentam ter na patogénese do Líquen Plano Oral.

Embora seja composta por duas subunidades, estas sinalizam através do mesmo recetor e desempenham funções biológicas idênticas<sup>66</sup>: a IL-1 $\beta$  é produzida principalmente por monócitos e macrófagos e circula de forma sistémica; a IL-1 $\alpha$  está geralmente associada à membrana plasmática da célula que a produz, sendo altamente expressa pelos queratinócitos e células endoteliais atuando sobretudo localmente<sup>78</sup>, o que poderá contribuir para o facto de esta subunidade se ter destacado.

A capacidade de ativar diversos tipos de células, como linfócitos T, e estimular a produção de outras citocinas, como TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8 e a si mesma<sup>66</sup> também pode ser um fator que contribui para o resultado que qualifica a proteína como ideal para integrar o painel de biomarcadores salivares para o Líquen Plano Oral.

Rhodus e colaboradores<sup>42,46</sup> detetaram uma concentração significativamente superior de IL-1 $\alpha$  na saliva de pacientes com Líquen Plano Oral quando comparado com o grupo de controlo. Num dos trabalhos<sup>46</sup>, detetaram que a concentração da IL-1 $\alpha$  diminuiu após tratamento com dexametasona tópica e sugeriram que esta interleucina pode estar mais associada ao desenvolvimento dos sintomas do Líquen Plano erosivo. Os resultados obtidos nestas investigações corroboram e são potenciados pelo *score* de 0,7 atribuído à proteína.

### 7.2.4 Interleucina 6

A interleucina 6 obteve um *score* de 0,9, o que a torna num dos mais relevantes elementos do painel de biomarcadores. Isto é algo que não surge como uma surpresa dada a sua participação na resposta imune e inflamatória<sup>66</sup>, que estão relacionadas com o Líquen Plano Oral<sup>5</sup>. Capaz de regular os linfócitos T CD4<sup>+</sup> <sup>42</sup>, a interleucina revela-se essencial em transformar a resposta imune de um estado de tolerância para um estado de inflamação ativa<sup>66</sup>.

O resultado obtido com a metodologia adotada nesta dissertação vai ao encontro dos resultados relatados na literatura: esta tem sido encontrada em maior quantidade nos pacientes com Líquen Plano Oral do que nos pacientes saudáveis, não só nos tecidos lesionados<sup>66,79</sup>, como também em amostras de saliva total não estimulada<sup>42,43,46,50,66,80</sup>.

Embora Sun<sup>81</sup> tenha proposto que o nível serológico de interleucina 8 seja um melhor marcador mais sensível do que o nível serológico interleucina 6 para a monitorização da atividade do Líquen Plano, neste trabalho a interleucina 6 apresentou um *score* consideravelmente maior que a interleucina 8 (0,9 vs 0,4, respetivamente), revelando-se mais relevante para o diagnóstico de Líquen Plano Oral. A potencial falta de especificidade desta proteína poderá ser ultrapassada pela utilização conjunta com outros biomarcadores.

### 7.2.5 Fibrinogénio

O fibrinogénio obteve um *score* de 0,7. Embora seja uma glicoproteína solúvel principalmente encontrada no plasma<sup>82</sup>, a deteção desta é mais um exemplo da presença de proteínas plasmáticas na saliva<sup>19</sup>, que reflete o estado fisiológico e patológico do organismo<sup>16,17</sup>. Mas outros fatores contribuem para a compreensão do *score* da mesma: desempenha funções na coagulação, fibrinólise, interações celulares e da matriz, neoplasia, cicatrização de feridas e resposta inflamatória<sup>83</sup> e tem vindo a ser utilizada na técnica de imunofluorescência.

Buajeeb e colaboradores<sup>84</sup> realizaram um estudo onde, numa amostra com 82 indivíduos tailandeses com Líquen Plano Oral atrófico e/ou erosivo, apenas um paciente não revelou depósitos de fibrinogénio na zona da membrana basal após imunofluorescência direta dos espécimes colhidos das lesões de Líquen Plano Oral.

Shirol e colaboradores<sup>85</sup> realizaram um estudo em que utilizaram a técnica de imunofluorescência direta para tentar obter um diagnóstico de espécimes conservados em parafina e também para estabelecer padrões de depósitos de fibrinogénio. Em 35 casos de Líquen Plano, 34 revelaram fluorescência positiva na junção dermo-epidérmica com elevada significância estatística ( $p < 0.0001$ ).

Talungchit e colaboradores<sup>35</sup> seguiram uma metodologia algo diferente daquela seguida nesta dissertação, mas que também permitiu a integração desta proteína numa proposta de painel de biomarcadores salivares para o Líquen Plano Oral.

Da perspetiva da fisiopatologia do Líquen Plano Oral, admite-se que a patologia pode provir da rutura da membrana basal e conseqüente apoptose dos queratinócitos (ou da apoptose dos queratinócitos) e conseqüente perda de manutenção da membrana basal. Admitindo que as alterações imunofluorescentes nas lesões de Líquen Plano Oral, que resultam da acumulação de fibrinogénio, podem ser uma conseqüência do dano provocado na epiderme inferior e membrana basal<sup>85</sup>, então a deteção desta proteína é relevante e poderá corroborar a hipótese da patogénese também estar relacionada com a apoptose dos queratinócitos por rutura da membrana basal.

### 7.2.6 Componente do complemento C3c

A forma C3c corresponde ao principal fragmento proteolítico do componente do complemento C3<sup>86</sup>. Esta proteína obteve um *score* de 0,7, pelo que é adequada para integrar um painel de biomarcadores, sobretudo quando se considera que já é a segunda proposta de painel de biomarcadores salivares para o Líquen Plano Oral<sup>35</sup>, tendo em conta o conhecimento do autor. A proteína desempenha um papel central na ativação do sistema de complemento, que serve de mediador local da resposta inflamatória<sup>35</sup> e contribui para a coordenação da resposta imune (além de outras funções)<sup>87</sup>. Ou seja, esta proteína está envolvida nos principais mecanismos de desenvolvimento do Líquen Plano Oral<sup>5</sup>, o que poderá justificar a sua relevância no painel de biomarcadores salivares da patologia investigada. Na literatura encontram-se investigações com resultados que também apontam para a importância do componente do complemento C3c:

Buajeeb e colaboradores<sup>84</sup> detetaram esta proteína na membrana basal de lesões de

Líquen Plano através da técnica de imunofluorescência direta.

Hashimoto e colaboradores<sup>88</sup> propuseram que a presença de depósitos de C3 granular na membrana basal pode ser uma característica de Líquen Plano Oral severo, embora os mecanismos de deposição da proteína e a sua função na patogénese do Líquen Plano Oral sejam desconhecidos.

Tendo em conta a escassa informação encontrada e os resultado obtido nesta dissertação e trabalhos anteriormente citados, sugere-se a investigação da função da proteína na fisiopatologia do Líquen Plano Oral.

### **7.2.7 Proposta de painel de biomarcadores**

Os biomarcadores podem ser divididos em três categorias<sup>89</sup>:

1. Específicos para uma patologia
2. Não específicos para uma patologia, mas que revelam uma condição anormal
3. Biomarcadores aleatórios que resultam de diversidades ou variações entre as amostras de doença e controlo, protocolo de tratamento ou plataformas de espetrometria de massa.

As proteínas identificadas como biomarcadores nesta dissertação, TNF- $\alpha$  (P01375), TNFR-1 $\beta$  (que admite o nome TNFR-2, código P20333), IL-1 $\alpha$  (P01583), IL-6 (P05231), fibrinogénio cadeia  $\beta$  (P02675) e componente do complemento C3 (P01024), são proteínas que já se encontram associadas a diversas patologias, como pode ser visto na tabela 2 do material e métodos, pelo que não são, individualmente, específicas para o Líquen Plano Oral. Contudo, a combinação de diversas proteínas para formar um painel de biomarcadores para criar uma ferramenta de diagnóstico é viável<sup>89</sup> e confere especificidade para a patologia. A utilização de um biomarcador multifatorial para o Líquen Plano Oral, como sugerido neste trabalho, não é um caso isolado e apoia a utilização de fibrinogénio e componente do complemento C3 apresentada num trabalho já publicado<sup>35</sup>.

### **7.3 Limitações**

Apesar da sistematização aplicada nas diferentes análises realizadas neste trabalho há que salientar possíveis limitações a ter em conta.

Variações na recolha de saliva podem culminar na deteção de diferentes biomarcadores. Este aspeto é mais notado quando se compara a utilização de saliva total

estimulada com não estimulada<sup>89</sup>. Embora em todos os artigos analisados para a elaboração deste trabalho tenham utilizado um protocolo de recolha de saliva não estimulada, é importante estar atento a este aspeto ao replicar o método proposto na monografia.

Outra limitação na metodologia prende-se com a falta de um padrão para os protocolos de proteómica utilizadas nos diversos estudos. Um exemplo desta limitação pode ser a menor sensibilidade do protocolo 2D-PAGE seguido de LC-MS/MS comparativamente a protocolos de MALDI-TOF LC-MS/MS ou SELDI-TOF (*Surface Enhanced Laser Desorption/Ionization*)<sup>35</sup>, já que o primeiro protocolo utiliza um gel que cuja reprodutibilidade é pobre<sup>89</sup>. Dada a escassez de literatura com técnicas de proteómica, surgiu a necessidade de integrar informação resultante de protocolos mais dirigidos, como a técnica de ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*). A utilização de protocolos ELISA limita a identificação de novas proteínas que podem ter potencial de biomarcador por não permitir uma análise do proteoma, mas sim a deteção de anticorpos específicos<sup>90</sup>.

Relativamente ao cálculo do *score*, a fórmula utilizada não replicou outra já publicada e validada. A valorização de cada critério foi escolhida através da perceção da importância que cada parâmetro tendo em conta a relevância relativa atribuída na literatura, algo que é limitado pelo facto de ainda não existir uma definição concreta da etiologia e patogénese do Líquen Plano. Por este motivo., apesar da proposta de biomarcadores apresentada neste trabalho aparentar ser a ideal, poderá carecer de aprimoramento.

Por fim, embora fosse uma característica desejável, o painel não foi elaborado de forma a dar uma resposta clara relativamente à presença de displasia e diagnóstico diferencial com reações liquenoides. Isto deve-se sobretudo à falta de comparação dos resultados do grupo de pacientes com Líquen Plano Oral sem presença de displasia com pacientes que apresentem displasia e pacientes com reações liquenoides.



## **8. Conclusão**





## **Conclusão**

Este trabalho procurou o desenvolvimento de uma estratégia bioinformática que permitisse a identificação de um conjunto de proteínas que se manifestam de forma alterada na presença de Líquen Plano, culminando com a proposta de um painel de biomarcadores salivares uteis para o diagnóstico desta patologia. Da análise realizada foram identificadas proposta de seis proteínas para serem utilizadas como um painel de biomarcadores: TNF- $\alpha$ , TNFR-2 (ou TNFR-1 $\beta$ ), IL-1 $\alpha$ , IL-6, fibrinogénio cadeia  $\beta$  e componente do complemento C3.

Tendo sido alcançado o objetivo, sugere-se para o futuro testar o painel proposto e, caso se verifique útil, sugere-se o desenvolvimento de um dispositivo de diagnóstico que seja menos invasivo e tão válido como a biópsia. Neste aspeto, sugere-se ainda que se procure averiguar a sua aplicação no diagnóstico diferencial entre lesões de Líquen Plano Oral e lesões liquenoides, e presença ou ausência de displasia, embora não tenha sido o foco do trabalho.

Propõe-se ainda que se estabeleça um padrão a utilizar nos estudos de proteómica das diversas patologias, para facilitar a replicação dos estudos, passando pela uniformização do protocolo de recolha e protocolo de proteómica.





## **9. Bibliografia**



## ***Bibliografia***

1. Zhao CN, Xu Z, Wu GC, Mao YM, Liu LN, Qian-Wu, et al. Emerging role of air pollution in autoimmune diseases. *Autoimmun Rev.* 2019;18(6):607–14.
2. Theofilopoulos AN, Kono DH, Baccala R. The multiple pathways to autoimmunity. *Nat Immunol.* 2017;18(7):716–24.
3. Suurmond J, Diamond B. Autoantibodies in Systemic Autoimmune Diseases. *J Clin Immunol.* 2015;125(6):2194–202.
4. Wang L, Wang FS, Gershwin ME. Human autoimmune diseases: A comprehensive update. *J Intern Med.* 2015;278(4):369–95.
5. Nogueira PA, Carneiro S, Ramos-e-Silva M. Oral lichen planus: An update on its pathogenesis. *Int J Dermatol.* 2015;54(9):1005–10.
6. García-Pola MJ, González-Álvarez L, Garcia-Martin JM. Tratamiento del liquen plano oral. Revisión sistemática y protocolo de actuación. *Med Clin (Barc).* 2017;149(8):351–62.
7. De Rossi SS, Ciarrocca K. Oral Lichen Planus and Lichenoid Mucositis. *Dent Clin North Am.* 2014;58(2):299–313.
8. Kamath VV, Setlur K, Yerlagudda K. Oral lichenoid lesions - a review and update. *Indian J Dermatol.* 2015;60(1):102.
9. Carrozzo M, Porter S, Mercadante V, Fedele S. Oral lichen planus : A disease or a spectrum of tissue reactions ? Types , causes , diagnostic algorithms , prognosis , management strategies. *Periodontol 2000.* 2019;105–25.
10. Pippi R, Romeo U, Santoro M, Del Vecchio A, Scully C, Petti S. Psychological disorders and oral lichen planus: matched case-control study and literature review. *Oral Dis.* 2016 Apr;22(3):226–34.
11. Meij EH Van Der, Waal I Van Der. Lack of clinicopathologic correlation in the diagnosis of oral lichen planus based on the presently available diagnostic criteria and suggestions for modifications. *J Oral Pathol Med.* 2003;(1):507–12.
12. Eisenberg E. Oral lichen planus: A benign lesion. *J Oral Maxillofac Surg.*



- 2000;58(11):1278–85.
13. Do Canto AM, Müller H, De Freitas RR, Da Silva Santos PS. Oral lichen planus (OLP): Clinical and complementary diagnosis | Líquen plano oral (LPO): Diagnóstico clínico e complementar. *An Bras Dermatol.* 2010;85(5):669–75.
  14. Proctor GB. The physiology of salivary secretion. *Periodontol 2000.* 2016;70(1):11–25.
  15. Carpenter GH. The Secretion, Components, and Properties of Saliva. *Annu Rev Food Sci Technol.* 2013;4(1):267–76.
  16. Pedersen AML, Sørensen CE, Proctor GB, Carpenter GH, Ekström J. Salivary secretion in health and disease. Vol. 45, *Journal of Oral Rehabilitation.* 2018. 730–746 p.
  17. Kaczor-Urbanowicz KE, Martin Carreras-Presas C, Aro K, Tu M, Garcia-Godoy F, Wong DTW. Saliva diagnostics – Current views and directions. *Exp Biol Med.* 2017;242(5):459–72.
  18. Castagnola M, Scarano E, Passali GC, Messana I, Cabras T, Iavarone F, et al. Salivary biomarkers and proteomics: Future diagnostic and clinical utilities. *Acta Otorhinolaryngol Ital.* 2017;37(2):94–101.
  19. Jágr M, Eckhardt A, Pataridis S, Broukal Z, Dušková J, Mikšík I. Proteomics of human teeth and saliva. *Physiol Res.* 2014;63(SUPPL.).
  20. Rosa N, Correia MJ, Arrais JP, Lopes P, Melo J, Oliveira JL, et al. From the salivary proteome to the OralOme: Comprehensive molecular oral biology. *Arch Oral Biol.* 2012;57(7):853–64.
  21. Gohel V, Jones JA, Wehler CJ. Salivary biomarkers and cardiovascular disease: A systematic review. *Clin Chem Lab Med.* 2018;56(9):1432–42.
  22. Guerra ENS, Acevedo AC, Leite AF, Gozal D, Chardin H, De Luca Canto G. Diagnostic capability of salivary biomarkers in the assessment of head and neck cancer: A systematic review and meta-analysis. *Oral Oncol.* 2015;51(9):805–18.
  23. Tsiatsiani L, Heck AJR. Proteomics beyond trypsin. *FEBS J.* 2015;282(14):2612–26.
  24. Dawes C, Wong DTW. Role of Saliva and Salivary Diagnostics in the Advancement of Oral Health. *J Dent Res.* 2019;98(2):133–41.
  25. Li X, Wang W, Chen J. Recent progress in mass spectrometry proteomics for



- biomedical research. 2017;60(10):1093–113.
26. Nunes LAS, Mussavira S, Bindhu OS. Clinical and diagnostic utility of saliva as a non-invasive diagnostic fluid: a systematic review. *Biochem Medica*. 2015;25(2):177–92.
  27. Arrais JP, Rosa N, Melo J, Coelho ED, Amaral D, Correia MJ, et al. OralCard: A bioinformatic tool for the study of oral proteome. *Arch Oral Biol*. 2013;58(7):762–72.
  28. Huang DW, Sherman BT, Lempicki RA. Bioinformatics enrichment tools: Paths toward the comprehensive functional analysis of large gene lists. *Nucleic Acids Res*. 2009;37(1):1–13.
  29. Huang DW, Sherman BT, Lempicki RA. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat Protoc*. 2009;4(1):44–57.
  30. Ashburner M, Ball CA, Blake JA, Botstein D, Butler H, Cherry JM, et al. Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium. *Nat Genet*. 2000 May;25(1):25–9.
  31. Bateman A. UniProt: A worldwide hub of protein knowledge. *Nucleic Acids Res*. 2019;47(D1):D506–15.
  32. Shavit E, Klieb H, Shear NH. Oral lichen planus: a novel staging and algorithmic approach and all that is essential to know. *F1000Research*. 2020;9:1–12.
  33. Cheng Y-SL, Gould A, Kurago Z, Fantasia J, Muller S. Diagnosis of oral lichen planus: a position paper of the American Academy of Oral and Maxillofacial Pathology. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*. 2016 Sep 1;122(3):332–54.
  34. Humberto JSM, Pavanin JV, Rocha MJA da, Motta ACF. Cytokines, cortisol, and nitric oxide as salivary biomarkers in oral lichen planus: a systematic review. *Braz Oral Res*. 2018;32:e82.
  35. Souza MM, Florezi GP, Nico MMS, de Paula F, Paula FM, Lourenço S V. Salivary proteomics in lichen planus: A relationship with pathogenesis? *Oral Dis*. 2018;24(5):784–92.
  36. Talungchit S, Buajeeb W, Lerdtripop C, Surarit R, Chairatvit K, Roytrakul S, et al. Putative salivary protein biomarkers for the diagnosis of oral lichen planus: A case-control study. *BMC Oral Health*. 2018;18(1):1–14.
  37. Srinivasan M, Kodumudi KN, Zunt SL. Soluble CD14 and toll-like receptor-2 are

- potential salivary biomarkers for oral lichen planus and burning mouth syndrome. *Clin Immunol.* 2008;126(1):31–7.
38. Lopez-Jornet P, Cayuela CA, Tvarijonaviciute A, Parra-Perez F, Escribano D, Ceron J. Oral lichen planus: salival biomarkers cortisol, immunoglobulin A, adiponectin. *J Oral Pathol Med.* 2016;45(3):211–7.
  39. Liu WZ, He MJ, Long L, Mu DL, Xu MS, Xing X, et al. Interferon- $\gamma$  and interleukin-4 detected in serum and saliva from patients with oral lichen planus. *Int J Oral Sci.* 2014;6(1):22–6.
  40. Totan A, Miricescu D, Parlatescu I, Mohora M, Greabu M. Possible salivary and serum biomarkers for oral lichen planus. *Biotech Histochem.* 2015;90(7):552–8.
  41. Mansourian A, Shanbehzadeh N, Kia SJ, Moosavi MS. Increased salivary aldehyde dehydrogenase 1 in non-reticular oral lichen planus. *An Bras Dermatol.* 2017;92(2):168–71.
  42. Pezelj-Ribaric S, Prso IB, Abram M, Glazar I, Brumini G, Simunovic-Soskic M. Salivary levels of tumor necrosis factor- $\alpha$  in oral lichen planus. *Mediators Inflamm.* 2004;13(2):131–3.
  43. Rhodus NL, Cheng B, Myers S, Miller L, Ho V, Ondrey F. The feasibility of monitoring NF- $\kappa$ B associated cytokines: TNF- $\alpha$ , IL-1 $\alpha$ , IL-6, and IL-8 in whole saliva for the malignant transformation of oral lichen planus. *Mol Carcinog.* 2005;44(2):77–82.
  44. Zhang Y, Lin M, Zhang S, Wang Z, Jiang L, Shen J, et al. NF- $\kappa$ B-dependent cytokines in saliva and serum from patients with oral lichen planus: A study in an ethnic Chinese population. *Cytokine.* 2008;41(2):144–9.
  45. Tao X, Li C, Rhodus NL, Xia J, Yang X, Cheng B. Simultaneous detection of IFN- $\gamma$  and IL-4 in lesional tissues and whole unstimulated saliva from patients with oral lichen planus. *J Oral Pathol Med.* 2008;37:83–7.
  46. Liu W, Dan H, Wang Z, Jiang L, Zhou Y, Zhao M, et al. IFN-Gamma and IL-4 in Saliva of Patients with Oral Lichen Planus: A Study in an Ethnic Chinese Population. *Inflammation.* 2009;32(3):176–81.
  47. Rhodus NL, Cheng B, Bowles W, Myers S, Miller L, Ondrey F. Proinflammatory cytokine levels in saliva before and after treatment of (erosive) oral lichen planus with

- dexamethasone. *Oral Dis.* 2006;12(2):112–6.
48. Ghallab NA, El-wakeel N, Shaker OG. Levels of Salivary IFN-gamma, TNF- $\alpha$ , and TNF Receptor-2 as prognostic markers in (Erosive) Oral Lichen Planus. 2010:1–8.
49. Zhang Y, Liu W, Zhang S, Dan H, Lu R, Wang F, et al. Salivary and serum interleukin-18 in patients with oral lichen planus: A study in an ethnic Chinese population. *Inflammation.* 2012;35(2):399–404.
50. Malekzadeh H, Robati M, Yousefimanesh H, Boroujerdnia MG, Nadripour R. Salivary interferon gamma and interleukin-4 levels in patients suffering from oral lichen planus. *Cell J.* 2015;17(3):554–8.
51. Lisa Cheng Y-S, Jordan L, Gorugantula LM, Schneiderman E, Chen H-S, Rees T. Salivary Interleukin-6 and -8 in Patients With Oral Cancer and Patients With Chronic Oral Inflammatory Diseases. *J Periodontol.* 2014;85(7):956–65.
52. Wang K, Miao T, Lu W, He J, Cui B, Li J, et al. Analysis of oral microbial community and Th17-associated cytokines in saliva of patients with oral lichen planus. *Microbiol Immunol.* 2015;59(3):105–13.
53. Li C, Tang X, Zheng X, Ge S, Wen H, Lin X, et al. Global Prevalence and Incidence Estimates of Oral Lichen Planus: A Systematic Review and Meta-Analysis. *JAMA Dermatology.* 2020;156(2):172–81.
54. Bombeccari GP, Guzzi G, Tettamanti M, Giann AB, Baj A, Pallotti F, et al. Oral lichen planus and malignant transformation: A longitudinal cohort study. *Oral Surgery, Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endodontology.* 2011;112(3):328–34.
55. Likar-Manookin K, Stewart C, Al-Hashimi I, Curtis W, Berg K, Cherian K, et al. Prevalence of oral lesions of autoimmune etiology in patients with primary Sjogren's syndrome. *Oral Dis.* 2013;19(6):598–603.
56. Qiao J, Zhou G, Ding Y, Zhu D, Fang H. Multiple paraneoplastic syndromes: Myasthenia gravis, vitiligo, alopecia areata, and oral lichen planus associated with thymoma. *J Neurol Sci.* 2011;308(1–2):177–9.
57. Vajaitu C, Voiculescu VM, Draghici C, Solomon I, Lupu M. Coexistence of Psoriasis, Vitiligo and Oral Lichen Planus – a New Variant of Multiple Autoimmune Syndrome? *Maedica (Buchar).* 2018;13(4):336–9.

58. López-Jornet P, Parra-Perez F, Pons-Fuster A. Association of autoimmune diseases with oral lichen planus: a cross-sectional , clinical study. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2014;28(7):895–9.
59. Wu P, Luo S, Zhou T, Wang R, Qiu X, Yuan P, et al. Possible Mechanisms Involved in the Cooccurrence of Oral Lichen Planus and Hashimoto’s Thyroiditis. *Mediat Inflamm*. 2020;2020.
60. Cassol-Spanemberg J, Rodríguez-de Rivera-Campillo ME, Otero-Rey EM, Estrugo-Devesa A, Jané-Salas E, López-López J. Oral lichen planus and its relationship with systemic diseases. A review of evidence. *J Clin Exp Dent*. 2018;10(9):e938–44.
61. De Carli JP, Linden MSS, da Silva SO, Trentin MS, Matos F de S, Paranhos LR. Hepatitis C and oral lichen planus: evaluation of their correlation and risk factors in a longitudinal clinical study. *J Contemp Dent Pract*. 2016;17(1):27–31.
62. Carrozzo M, Scally K. Oral manifestations of hepatitis C virus infection. *World J Gastroenterol*. 2014;20(24):7534–43.
63. Lodi G, Pellicano R, Carrozzo M. Hepatitis C virus infection and lichen planus : a systematic review with meta-analysis. *Oral Dis*. 2010;16(7):601–12.
64. Ma J, Zhang J, Zhang Y, Lv T, Liu J. The Magnitude of the Association between Human Papillomavirus and Oral Lichen Planus: A Meta-Analysis. *PLoS One*. 2016 Aug 29;11(8):e0161339–e0161339.
65. Lodi G, Scully C, Carrozzo M, Griffiths M, Sugerman PB, Thongprasom K. Current controversies in oral lichen planus: Report of an international consensus meeting. Part 1. Viral infections and etiopathogenesis. *Oral Surgery, Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endodontology*. 2005;100(1):40–51.
66. Schroder K, Hertzog PJ, Ravasi T, Hume DA. Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. *J Leukoc Biol*. 2004;75(February):163–89.
67. Lu R, Zhang J, Sun W, Du G, Zhou G. Inflammation-related cytokines in oral lichen planus: An overview. *J Oral Pathol Med*. 2015;44(1):1–14.
68. Hu X, Ivashkiv LB. Cross-regulation of Signaling Pathways by Interferon- $\gamma$ : Implications for Immune Responses and Autoimmune Diseases. *Immunity*. 2009;31(4):539–50.



69. Sugerman PB, Savage NW, Walsh LJ, Zhao ZZ, Zhou XJ, Khan A, et al. The pathogenesis of oral lichen planus. *Crit Rev Oral Biol Med*. 2002;13(4):350–65.
70. Roopashree MR, Gondhalekar R V., Shashikanth MC, George J, Thippeswamy SH, Shukla A. Pathogenesis of oral lichen planus - a review. *J Oral Pathol Med*. 2010;39(10):729–34.
71. Sugerman PB, Satterwhite K, Bigby M. Autocytotoxic T-cell clones in lichen planus. *Br J Dermatol*. 2000;142(3):449–56.
72. Karagouni EE, Dotsika EN, Sklavounou A. Alteration in peripheral blood mononuclear cell function and serum cytokines in oral lichen planus. *J Oral Pathol Med*. 1994;23(1):28–35.
73. Zhou Z, Wei B, Shi P. Osteopontin expression in oral lichen planus. *J Oral Pathol Med*. 2008;37:94–8.
74. Yamamoto T, Yoneda K, Ueta E. Serum cytokines , interleukin-2 receptor , and soluble intercellular adhesion molecule-I in oral disorders. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 1994;78:727–35.
75. Yamamoto T, Osaki T, Yoneda K, Ueta E. Cytokine production by keratinocytes and mononuclear infiltrates in oral lichen planus. *J Oral Pathol Med*. 1994;23:309–15.
76. Yamamoto T, Osaki T. Characteristic cytokines generated by keratinocytes and mononuclear infiltrates in oral lichen planus.pdf. *J Invest Dermatol*. 1995;104(5):784–8.
77. Faustman D, Davis M. TNF receptor 2 pathway : drug target for autoimmune diseases. *Nat Rev Drug Discov*. 2010;9(6):482–93.
78. Idriss HT, Naismith JH. TNF $\alpha$  and the TNF receptor superfamily: Structure-function relationship(s). *Microsc Res Tech*. 2000;50(3):184–95.
79. Sims JE, Smith DE. The IL-1 family: regulators of immunity. *Nat Rev Immunol*. 2010;10(2):89–102.
80. Gu GM, Martin MD, Darveau RP, Truelove E, Epstein J. Oral and serum IL-6 levels in oral lichen planus patients. *Oral Surgery, Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endodontology*. 2004;98(6):673–8.
81. Abdel-Haq A, Kusnierz-Cabala B, Darczuk D, Sobuta E, Dumnicka P, Wojas-Pelc A, et



- al. Interleukin-6 and neopterin levels in the serum and saliva of patients with Lichen Planus and oral Lichen Planus. *J Oral Pathol Med.* 2014;43(10):734–9.
82. Sun A, Wang JT, Chia JS, Chiang CP. Serum interleukin- 8 level is a more sensitive marker than serum interleukin- 6 level in monitoring the disease activity of oral lichen planus. *Br J Dermatol.* 2005;152:1187–92.
83. Kamath S, Lip GYH. Fibrinogen: biochemistry, epidemiology and determinants. *QJM.* 2003;96(10):711–29.
84. Cappelletti RM. Fibrinogen and fibrin: Structure and functional aspects. *J Thromb Haemost.* 2005;3(8):1894–904.
85. Buajeeb W, Okuma N, Thanakun S, Laothumthut T. Direct immunofluorescence in oral lichen planus. *J Clin Diagnostic Res.* 2015;9(8):ZC34–7.
86. Shirol PD, Naik V, Kale A. Fibrinogen demonstration in oral lichen planus: an immunofluorescence study on archival tissues. *J Contemp Dent Pr.* 2015;16(10):824–8.
87. Janssen BJC, Huizinga EG, Raaijmakers HCA, Roos A, Daha MR, Nilsson-Ekdahl K, et al. Structures of complement component C3 provide insights into the function and evolution of immunity. *Nature.* 2005;437(7058):505–11.
88. Ricklin D, Reis ES, Mastellos DC, Gros P, Lambris JD. Complement component C3 – The “Swiss Army Knife” of innate immunity and host defense. *Immunol Rev.* 2016;274(1):33–58.
89. Hashimoto T, Fukuda A, Himejima A, Morita S, Tsuruta D, Koga H, et al. Ten cases of severe oral lichen planus showing granular C3 deposition in oral mucosal basement membrane zone. *Eur J Dermatology.* 2015;25(6):539–47.
90. Al-tarawneh SK, Border MB, Dibble CF, Bencharit S. Defining Salivary Biomarkers Using Mass Spectrometry- Based Proteomics: A Systematic Review. *OMICS.* 2011;15(6):353–61.
91. The enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Bull World Health Organ.* 1976;54(2):129–39.