

Proteômica: metodologias e aplicações no estudo de doenças humanas

EDUARDO BUZOLIN BARBOSA¹, ALESSANDRA VIDOTTO², GIOVANA MUSSI POLACHINI², TIAGO HENRIQUE³,
ALESSANDRA BERNADETE TROVÓ DE MARQUI⁴, ELOIZA HELENA TAJARA⁵

¹Aluno da Graduação em Medicina, Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (FAMERP), São José do Rio Preto, SP, Brasil

²Doutorado em Ciências da Saúde; Pós-doutorado, FAMERP, São José do Rio Preto, SP, Brasil

³Mestrado em Ciências da Saúde; Doutorado, FAMERP, São José do Rio Preto, SP, Brasil

⁴Doutorado; Professor Adjunto, Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Uberaba, MG, Brasil

⁵Livre-docente; Professora Adjunta, FAMERP, São José do Rio Preto, SP, Brasil

RESUMO

A abordagem proteômica tem permitido estudos em larga escala da expressão proteica em diferentes tecidos e fluidos corporais, em condições e/ou momentos distintos. O recente progresso de metodologias nessa área tem aberto novas oportunidades para obtenção de informações relevantes sobre processos normais e anormais que ocorrem no organismo humano. No presente artigo, é feita uma revisão das principais técnicas proteômicas e de suas aplicações no estudo de doenças humanas.

Unitermos: Proteômica; neoplasias; eletroforese em gel de poliacrilamida; espectrometria de massas; doença.

©2012 Elsevier Editora Ltda. Todos os direitos reservados.

SUMMARY

Proteomics: methodologies and applications to the study of human diseases

Proteomic approach has allowed large-scale studies of protein expression in different tissues and body fluids in discrete conditions and/or time points. Recent advances of methodologies in this field have opened new opportunities to obtain relevant information on normal and abnormal processes occurring in the human body. In the current report, the main proteomics techniques and their application to human disease study are reviewed.

Keywords: Proteomics; neoplasms; polyacrylamide gel electrophoresis; mass spectrometry; diseases.

©2012 Elsevier Editora Ltda. All rights reserved.

Trabalho realizado na Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (FAMERP), São José do Rio Preto, SP, Brasil

Artigo recebido: 11/10/2011
Aceito para publicação: 20/01/2012

Suporte Financeiro:
FAPESP – CNPq – CAPES

Correspondência para:
Eloiza Helena Tajara
Av. Brig. Faria Lima, 5416
São José do Rio Preto, SP, Brasil
CEP: 15090-000
tajara@famerp.br

Conflito de interesse: Não há.

INTRODUÇÃO

Na busca de marcadores moleculares que auxiliem no diagnóstico precoce e no tratamento de várias doenças humanas, incluindo câncer, muitos estudos têm focado em alterações nos genes, seus transcritos e produtos proteicos envolvidos em processos celulares importantes.

As abordagens metodológicas recentes que permitem uma análise ampla da expressão gênica incluem a técnica de microarranjos de cDNA¹, a análise seriada da expressão gênica/SAGE² e as técnicas de sequenciamento em larga escala utilizando equipamentos de última geração³. O estudo da expressão gênica com tais técnicas permite obter um perfil molecular e fornece oportunidades para identificação de importantes alterações que ocorrem no nível de RNA. Entretanto, a análise dos transcritos é prejudicada pela sua susceptibilidade à degradação e pela falta de concordância entre sua concentração e a de proteína⁴. Além disso, informações sobre processos que modulam a função e a atividade proteica, como modificações pós-traducionais, interações proteína-proteína, transporte e degradação, são perdidas na análise de RNA⁵. Por esse motivo, para entendimento dos mecanismos envolvidos em doenças humanas com consequentes benefícios para os pacientes, é importante que em paralelo aos dados derivados do genoma e aos dados clínicos sejam também obtidas informações sobre as diferenças proteicas entre tecidos e/ou fluidos corporais normais e alterados.

Para identificar e entender essas diferenças é fundamental conhecer o conjunto de proteínas codificadas pelo genoma e definido como proteoma⁶. Na verdade, o proteoma não é apenas a soma dos produtos traduzidos a partir das sequências genômicas, mas inclui também proteínas resultantes de processos pós-transcricionais e pós-traducionais, bem como complexos formados por essas biomoléculas⁷. Além de sua grande complexidade, o proteoma é dinâmico e seu perfil se altera de acordo com o *status* fisiológico e as fases da diferenciação celular. Algumas estimativas sugerem que mais de um milhão de diferentes tipos de proteínas estão presentes nas células, nos tecidos e nos fluidos corporais em condições e/ou momentos distintos⁸. O termo proteômica refere-se ao estudo do conjunto dessas moléculas, que são responsáveis direta ou indiretamente pelo controle de todos ou quase todos os processos biológicos. Como bem definido por Valledor e Jorriñ⁹, a proteômica estuda de forma descritiva e quantitativa desde o conjunto de proteínas de uma organela subcelular até aquelas de um ecossistema, suas variações na população, mudanças em resposta a um ambiente ou decorrentes do desenvolvimento normal ou alterado, e modificações e interações com outras proteínas.

METODOLOGIA EM PROTEÔMICA

Muitas das técnicas empregadas em proteômica têm como foco a identificação de biomarcadores, mas são limitadas

nas aplicações médicas diretas. Outras têm potencial para automatização e utilização na rotina clínica com propósitos diagnósticos e permitem a análise de muitos tipos de amostras e de alterações no padrão de expressão proteica associadas a uma doença. De maneira geral, as metodologias empregadas em proteômica (Figura 1) podem ser classificadas nos tipos *bottom-up* ou *top-down*.

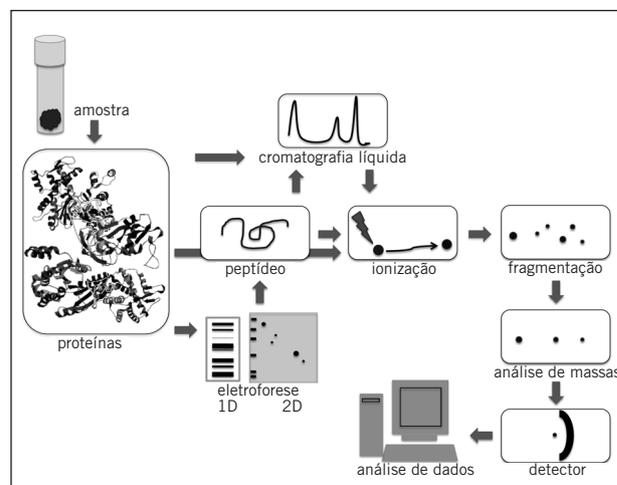


Figura 1 – Diferentes metodologias podem ser combinadas em estudos proteômicos. As metodologias mais comumente utilizadas envolvem extração de proteínas da amostra, separação por eletroforese uni (1-DE) ou bidimensional (2-DE) e/ou por cromatografia líquida, ionização, fragmentação, análise e detecção de peptídeos e análise de dados.

O primeiro, também denominado *shotgun*⁷, inclui separação por cromatografia líquida dos peptídeos obtidos após digestão triptica de soluções proteicas complexas, seguida de análise por espectrometria de massas (MS). O *top-down*, ao contrário, é um processo no qual as proteínas intactas (e não os peptídeos) são submetidas à análise por MS. As abordagens *bottom-up* possuem muitas vantagens, como sensibilidade e reprodutibilidade, mesmo para proteomas complexos como os de soro e lisados celulares. Entretanto, as respostas obtidas são fragmentos de um todo e, embora seja possível a identificação de uma proteína com base em alguns peptídeos, as modificações pós-traducionais não são reconhecidas. Além disso, um peptídeo pode ser perdido durante a cromatografia ou não gerar espectros de massas adequados. Por esse motivo, a proteômica *top-down* tem recebido recentemente grande atenção da comunidade científica¹⁰.

A combinação dessas abordagens com outros processos, como fracionamento subcelular ou imunoprecipitação de proteínas, pode ser bastante efetiva para enriquecimento da amostra com compostos de baixa abundância ou de organelas celulares de interesse¹¹. As amostras frescas compreendem a primeira escolha nesses estudos, mas em função das dificuldades na sua obtenção, particularmente em doenças raras, alguns métodos têm sido desenvolvidos para espécimes emblocados em parafina¹².

SEPARAÇÃO DE PROTEÍNAS POR ELETROFORESE UNI E BIDIMENSIONAL

Para separação de proteínas por eletroforese uni (1-DE) e bidimensional (2-DE), as moléculas devem ser inicialmente isoladas de materiais biológicos, tais como tecidos e fluidos corporais. A extração adequada de proteínas é fundamental para obtenção de bons resultados eletroforéticos. Em função da variedade de tipos e origens de amostras biológicas, o procedimento de extração necessita de otimização individual. Na maioria dos casos, as proteínas precisam ser solubilizadas, desagregadas, desnaturadas e submetidas a tratamento com agentes redutores de pontes dissulfeto¹³.

Na eletroforese bidimensional usual, as proteínas são separadas em duas etapas consecutivas. Na primeira, denominada focalização isoeletrica (IEF), as moléculas migram em gel de poli(acrilamida) com gradiente de pH imobilizado¹⁴ ou gerado por tampões anfotéricos¹⁵ até atingirem um ponto (pH) no qual sua carga é igual a zero (ponto isoeletrico ou pI). Na segunda etapa, as proteínas são submetidas a uma eletroforese com direção perpendicular à IEF em gel de poli(acrilamida) contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), e então separadas de acordo com sua massa molecular. Essa segunda etapa é similar a uma eletroforese 1-D, na qual as moléculas são diretamente aplicadas no gel SDS-PAGE e separadas de acordo com seu tamanho.

Para tornar visíveis as bandas ou *spots* proteicos (no caso de 1-DE e 2-DE, respectivamente), os géis são corados com Azul de Coomassie, nitrato de prata ou outros corantes comerciais. No caso de géis 2-DE, podem ser visualizados de 100 a 2.000 pontos (*spots*), cada um contendo uma ou algumas proteínas, e algumas modificações pós-traducionais são facilmente detectadas na forma de trens de *spots* alinhados no eixo vertical ou horizontal. Após digitalização das imagens dos géis e com a utilização de ferramentas de informática, o material de fundo ou *background* é subtraído, os *spots* comparados e os dados normalizados e analisados estatisticamente para quantificação de volumes proteicos ou intensidades¹⁶. Um protocolo mais simples é empregado para géis 1-DE, cujas bandas de interesse ou corridas inteiras são cortadas em fatias e analisadas¹⁷. As proteínas presentes nessas fatias ou nos *spots* de géis 2-DE são digeridas em peptídeos pela tripsina, que cliva após resíduos de arginina ou lisina.

Muitas alterações já foram feitas no protocolo original de 2-DE. Uma das mais recentes e populares é a ligação das proteínas a corantes fluorescentes de cianina reativos com resíduos de lisina ou cisteína. Essa marcação deu origem à técnica *Fluorescent 2-D Differential In-Gel Electrophoresis* (2-D DIGE)¹⁸, que permite a análise no mesmo gel de duas amostras proteicas marcadas com fluorocromos diferentes reduzindo a variação intergéis e melhorando a eficiência e a acurácia do método.

Embora capaz de gerar muitas informações, as técnicas de eletroforese 1-D e 2-D possuem limitações. Uma das mais importantes é a presença de algumas proteínas em concentrações elevadas, especialmente em certos fluidos corporais, o que dificulta a migração eletroforética das menos abundantes. Outra limitação é a dificuldade na extração de proteínas intactas do gel para posterior análise *top-down*, mas algumas tentativas têm sido feitas para contornar esse problema¹⁰.

FRACIONAMENTO DE PEPTÍDEOS POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA E IDENTIFICAÇÃO POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS

Para reduzir a complexidade de amostras ou para complementar a separação de proteínas e peptídeos por eletroforese, vários tipos de cromatografia são utilizados. Na cromatografia líquida (LC), o analito é dissolvido em uma fase líquida sem interagir quimicamente com ela, e percola uma fase estacionária geralmente empacotada em uma¹⁹ ou em várias colunas com diferentes fases estacionárias, como o MudPIT – *Multi-dimensional Protein Identification Technology*^{20,21}.

Embora caracterizados por massa molecular (e pI no caso de 2-DE) e purificados ou fracionados por cromatografia, os analitos necessitam de identificação, o que pode ser realizado por espectrometria de massas²². A técnica consiste basicamente na ionização de um composto e na avaliação da razão massa/carga (m/z) dos íons. O equipamento utilizado compreende uma fonte de ionização, um ou mais analisadores de massas e um detector. O primeiro componente é utilizado para gerar íons peptídicos ou proteicos, geralmente transferindo prótons (H^+) para as moléculas sem alterar sua estrutura química. O íon é acelerado por campo elétrico e separado por m/z no analisador de massas, ou então é selecionado de acordo com uma m/z previamente determinada e fragmentado em um processo denominado *em tandem* (MS2 ou MS/MS). Finalmente, os íons passam pelo detector, que é conectado a um computador com programas para análise de dados¹⁹.

MÉTODOS DE IONIZAÇÃO

Atualmente, existem dois métodos principais de ionização utilizados em proteômica, o MALDI (*Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization*) e o ESI (*Electrospray Ionization*), o primeiro empregado para amostras em estado sólido e o segundo para amostras em estado líquido (Figura 2). No método MALDI, os peptídeos são cocristalizados com uma matriz orgânica, geralmente ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico. Após bombardeamento por laser, a matriz sublima e seus íons transferem a carga para os analitos, resultando na formação de íons peptídicos²³. Uma variante do MALDI denominada SELDI (*Surface-Enhanced Laser Desorption/Ionization*) é geralmente empregada para análise do proteoma de baixo peso molecular e utiliza várias matrizes ou chips que exploram as características

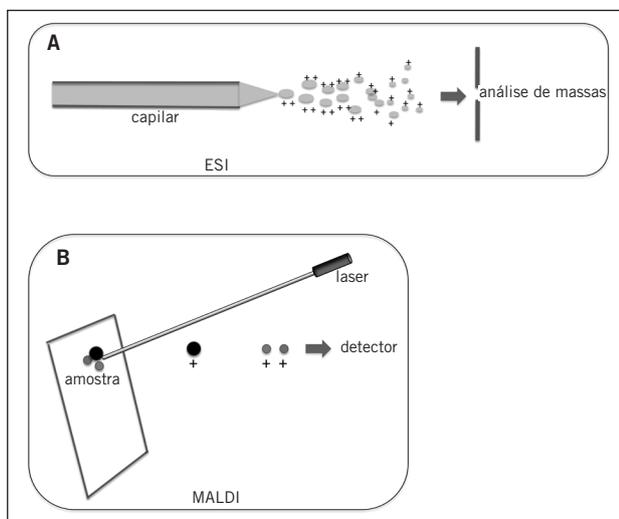


Figura 2 – Métodos de ionização. **(A)** Método ESI: a solução aquosa contendo o analito é forçada a atravessar uma agulha capilar e é ejetada como um aerosol de gotas altamente carregadas que, após evaporação do solvente, geram formas ionizadas do analito. **(B)** Método MALDI: os peptídeos são cocrystalizados com uma matriz orgânica e, após bombardeamento por laser, são ionizados.

cromatográficas e biofísicas das diferentes proteínas. Esses chips podem apresentar superfícies hidrofóbicas, de troca iônica ou com íons metálicos imobilizados, ou mesmo anticorpos, receptores, enzimas e ligantes com alta afinidade por proteínas específicas²⁴. Assim, após a lavagem dos compostos não ligados, uma matriz é colocada sobre o chip e os espectros são obtidos por ionização com laser. Outra variante do MALDI é o IMS (*Imaging Mass Spectrometry*), que permite a obtenção de dados de massas de peptídeos e proteínas diretamente de seções de tecidos biológicos. Esse método oferece importantes vantagens em relação à análise por imuno-histoquímica, incluindo rapidez e independência do uso de anticorpos²⁵.

No ESI, diferentemente do MALDI, uma solução aquosa com o analito é forçada a atravessar uma agulha capilar submetida à alta voltagem. A solução é ejetada como um aerosol de gotas altamente carregadas que, após evaporação do solvente por um fluxo de gás inerte aquecido, geram formas ionizadas do analito²⁶.

TIPOS DE ANALISADORES

Independentemente do método de ionização, a massa molecular dos íons é avaliada em um analisador após passagem por uma câmara de vácuo. Os tipos mais comuns de analisadores são o TOF (*Time Of Flight*), o quadrupolo e o *ion trap*¹⁹.

Nos analisadores TOF, os íons resultantes da primeira fase são acelerados por um potencial entre dois eletrodos e atravessam um tubo de vácuo com velocidade inversamente proporcional à sua massa. Quando os íons atingem o detector, o tempo decorrido entre a ionização e a detecção é utilizado para derivar o valor m/z . Na verdade,

o detector converte o sinal da passagem do íon em sinal analógico, que é lido e interpretado por uma estação de trabalho. O resultado final é um gráfico de m/z versus intensidade (contagem de íons), comumente referido como espectro MS²⁷. Os sinais gerados são comparados com informações disponíveis em bancos de dados como o MASCOT²⁸ e o SEQUEST²⁹, o que permite identificar a proteína de interesse.

Uma das limitações do sistema MALDI-TOF é a dificuldade de detecção de proteínas de baixo peso molecular que geram, por causa dessa característica, poucos peptídeos. O sistema também não é capaz de detectar mais de um componente de uma mistura. Para melhorar o desempenho, os analisadores TOF podem ser combinados com analisadores quadrupolos (Qs), que apresentam um conjunto de quatro eletrodos em bastão e funcionam como filtros de massas. Entre esses eletrodos, um campo elétrico assegura que somente íons de uma determinada razão m/z sigam a trajetória ao detector enquanto os demais são desviados³⁰.

Os analisadores do tipo *ion trap* ou armadilha de íons (IT) filtram e aprisionam em um campo elétrico tridimensional íons de interesse, que são gradualmente liberados em ordem de m/z crescente³¹. Os FT-ICRs (*Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance*) são *ion traps* com um campo magnético adicional, que força os íons a exibirem um movimento circular com ciclos de alta frequência. O analisador determina a razão m/z a partir da frequência do movimento ciclotrônico utilizando a transformação de Fourier¹⁹. O *orbitrap* é outro tipo de analisador IT no qual os íons oscilam ao longo e ao redor de um eletrodo em forma de espiral. A frequência dessa oscilação é proporcional à raiz quadrada da razão massa/carga e pode ser determinada com alta precisão^{32,33}. Essa tecnologia migrou para sistemas híbridos de dois espectrômetros de massas independentes que reúnem, por exemplo, um *ion trap* e um *orbitrap* ou um *ion trap* e um FT-ICR.

IDENTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS

Após a determinação da m/z do peptídeo intacto, pode ser realizado o seu sequenciamento por meio de um segundo evento MS conforme referido acima: os peptídeos mais abundantes são especificamente selecionados e submetidos à fragmentação por colisão com um gás inerte (CID – dissociação induzida por colisão) ou por transferência de elétrons (ETD), esse último com a vantagem de preservar as modificações pós-traducionais da proteína em análises do tipo *top-down*. A fragmentação do peptídeo parental ocorre predominantemente ao longo de seu esqueleto, em geral entre o oxigênio da carbonil e o nitrogênio da amida, gerando dois grupamentos de íons denominados y e b. O espectro MS/MS resultante é na realidade uma lista de razões m/z para fragmentos distintos cujas diferenças em massa correspondem a um único aminoácido. A avaliação desses fragmentos com tamanhos crescentes a

partir do N terminal (série de íons b) ou C terminal (série de íons y) permite a dedução da sequência do peptídeo. Com os resultados de vários desses peptídeos, a proteína é identificada³³.

MÉTODOS QUANTITATIVOS

Nos últimos anos, vários métodos de quantificação absoluta e relativa de proteínas em amostras avaliadas por MS têm sido desenvolvidos. Originalmente, a única plataforma disponível era o gel 2-DE, uma técnica que apesar das limitações permite avaliar algumas centenas ou milhares de *spots* proteicos⁹. Mais recentemente, alguns métodos utilizam marcação de proteínas ou peptídeos por isótopos ou outros reagentes identificáveis por MS, como *linkers* com isótopos pesados no caso do ICAT (*Isotope-Coded Affinity Tag*)³⁴, tags isobáricas no iTRAQ (*Isobaric Tags for Relative and Absolute Quantification*)³⁵ e incorporação *in vivo* de aminoácidos contendo isótopos não radioativos no SILAC (*Stable Isotope Labeling with Amino acids in Cell Culture*)³⁶. Em resumo, duas amostras a serem comparadas são covalentemente modificadas por isótopos (por exemplo, ¹H versus ²H, ¹²C versus ¹³C) e as diferenças nas quantidades das proteínas são determinadas pela razão de intensidades dos peptídeos diferencialmente marcados.

Métodos de quantificação livre de marcação também já foram desenvolvidos graças aos progressos tecnológicos em sistemas de cromatografia líquida e espectrometria de massas bem como em ferramentas de bioinformática para interpretação dos dados³⁷. Por exemplo, a intensidade dos picos de espectros de massa gerados por íons peptídicos está correlacionada com a abundância da proteína. O mesmo foi observado em relação à contagem de espectros MS/MS, como revisto por Old *et al.*³⁸.

APLICAÇÕES NO ESTUDO DE DOENÇAS HUMANAS

Embora a fração do proteoma, que pode ser identificada utilizando as abordagens acima descritas, venha crescendo gradativamente, a análise ainda permanece incompleta mesmo em células mais simples, sobretudo em relação a proteínas de baixa abundância (como receptores, transdutores de sinal e reguladores), básicas e hidrofóbicas, de membrana ou com massa molecular acima de 150 kDa ou abaixo de 10 kDa³⁹. Esse quadro deve mudar porque as metodologias e as tecnologias nessa área têm progredido muito nos últimos anos e alcançado níveis elevados de resolução e potencial de aplicação. Como bem colocado por Walsh *et al.*⁴⁰, a proteômica tem caminhado da pergunta “o que?” para questões que envolvem “quando, onde, como e quanto?”.

Entretanto, quais são os benefícios dos estudos proteômicos para o controle de doenças humanas? A literatura sobre esse assunto é extensa e muitos dados relevantes já foram obtidos, incluindo a caracterização, embora parcial, das proteínas de diferentes tecidos e condições e de subproteomas como o de fosfoproteínas⁴¹ e o de glicoproteínas⁴².

Biomarcadores específicos e sensíveis, contudo, não são facilmente identificados por abordagens proteômicas. É o que revelam, por exemplo, os dados obtidos em câncer de cabeça e pescoço, mama, cólon e ovário⁴³⁻⁴⁵, que, apesar de serem condições diferentes, mostram alterações similares. Apenas um teste de triagem (OVA1) desenvolvido com a metodologia SELDI-TOF para câncer de ovário foi aprovado^{46,47}.

Os tecidos afetados na maioria das doenças humanas não são de fácil acesso e dificilmente serão utilizados para análise de rotina. Uma de suas principais limitações é a heterogeneidade celular, que pode levar a resultados imprecisos se uma avaliação histopatológica detalhada não for realizada. A microdissecação por *laser* supera essa dificuldade, mas gera número reduzido de células e introduz um manuseio extra da amostra. Ao contrário, os fluidos corporais apresentam características que superam essas limitações e são adequados para o desenvolvimento de ferramentas diagnósticas e prognósticas pouco ou menos invasivas. Além disso, são especialmente apropriados quando um monitoramento longitudinal é necessário³². O PSA (*prostate specific antigen*) em câncer de próstata e o receptor tirosina quinase CD340 em câncer de mama são bons exemplos de que proteínas liberadas no sangue por tecidos doentes podem ser indicadores de uma enfermidade quando em concentrações alteradas⁴⁸. Entretanto, existem vários desafios técnicos para utilização desses materiais biológicos, sendo os mais importantes sua complexidade, a característica dinâmica da composição proteica e a necessidade de análise de um grande número de pacientes para determinar a variabilidade intra e interindividual de um marcador potencial. Além disso, para desenvolvimento de testes clínicos, dificilmente um marcador isolado terá sensibilidade e especificidade suficientes para predições ou diagnósticos; provavelmente, serão necessários painéis de proteínas associadas a condições específicas.

Vários fluidos corporais órgãos-específicos já foram caracterizados com perspectivas para utilização clínica, como urina para a doença de Anderson-Fabry⁴⁹, líquido cerebrospinal para as escleroses múltipla⁵⁰ e lateral amiotrófica⁵¹ e para as doenças de Alzheimer⁵², Creutzfeldt-Jakob⁵³ e Parkinson⁵⁴, lavado broncoalveolar para doença pulmonar obstrutiva crônica⁵⁵, líquido sinovial para osteoartrite⁵⁶, lágrima para ceratocone⁵⁷ e aspirado mamilar para câncer de mama⁵⁸.

FLUIDOS CORPORAIS: SALIVA

A saliva é um material biológico bem estudado por abordagens proteômicas. Composta de uma mistura de componentes secretados pelas glândulas salivares e derivados do sangue, ela é provavelmente o fluido mais acessível do nosso organismo⁵⁹. Possui um importante papel na manutenção da saúde oral participando de processos como remineralização do esmalte dentário, defesa contra

micro-organismos, lubrificação, digestão, modulação de pH e paladar⁵⁹⁻⁶². Esses atributos são decorrentes das características de seus componentes, que incluem proteínas, hormônios, pequenas moléculas como ureia, e eletrólitos como cálcio, bicarbonato, fosfato e fluoreto⁵⁹. As proteínas salivares têm sido estudadas por técnicas bioquímicas tradicionais e proteômicas e centenas delas já foram identificadas tanto na saliva total como em secreções de glândulas individuais, embora aquelas expressas em baixos níveis certamente não foram ainda detectadas^{57,63-89}.

O grande interesse na saliva como fluido para diagnóstico tem levado à padronização de processos de coleta e armazenamento⁹⁰ principalmente porque vários fatores afetam seu fluxo e composição. Entre esses fatores estão *status* fisiológico, medicação, alimentação, odores, ritmo circadiano, sexo, idade e a própria constituição do sangue e o grau de atividade das glândulas salivares^{91,92}. Por esse motivo, os parâmetros fluxo e composição salivar têm sido explorados no monitoramento de níveis de hormônio⁹³ e drogas⁹⁴, exposição a poluentes ambientais⁹⁵ e infecciosos⁹⁶ e monitoramento de doenças, incluindo periodontite⁹⁷, *diabetes mellitus*⁹⁸, fibrose cística⁹⁹, síndrome de Sjögren¹⁰⁰, doenças da glândula salivar¹⁰¹ e câncer de mama^{102,103}, ovário¹⁰⁴ e oral^{105,106}. Em relação a esse último tipo de câncer, o sítio anatômico oferece à saliva uma importante vantagem em relação a outros fluidos, além da característica não invasiva e da compatibilidade com abordagens proteômicas. Pelo fato de estar em contato com o tecido afetado e, portanto, de receber proteínas secretadas ou derivadas de células mortas, seu potencial vai desde a utilização para detecção precoce¹⁰⁷ até predição de agressividade e prognóstico¹⁰⁸.

Embora muitos estudos tenham identificado biomarcadores salivares em doenças locais e sistêmicas, sua validação em grupos amostrais grandes não está disponível e resultados de diferentes autores sobre a mesma doença mostram resultados conflitantes¹⁰⁹. Apesar disso, algumas associações interessantes têm sido referidas. Por exemplo, níveis elevados de transferrina foram observados em pacientes com carcinoma oral e correlacionados com tamanho e estágio do tumor. Os ensaios por ELISA foram altamente específicos e sensíveis para detecção precoce desse carcinoma, o que torna a transferrina um marcador promissor¹¹⁰. Essa proteína é essencial para células com taxas elevadas de proliferação e está envolvida em síntese de DNA e vias de transdução de sinais mitogênicos¹¹¹.

Em relação ao potencial de predição de resposta à terapia, recentemente Vidotto *et al.*¹¹² observaram que os níveis de algumas proteínas salivares em pacientes com carcinoma de cabeça e pescoço reverterem para um padrão similar ao observado em indivíduos saudáveis após o tratamento. Entre elas estão duas proteínas (PLUNC e ZN-alfa-2-GP) relacionadas com inflamação, um processo frequente nesses tumores.

FLUIDOS CORPORAIS: SORO/PLASMA

Embora a saliva e outros fluidos corporais permitam a obtenção de dados relevantes por análises proteômicas, principalmente no caso de doenças que afetam tecidos e órgãos específicos, não existem dúvidas de que o soro e o plasma são muito mais abrangentes. Essas frações sanguíneas estão entre as fontes mais importantes de marcadores biológicos e podem fornecer informações bastante ricas sobre processos fisiológicos e patológicos¹¹³. Sua análise para propósitos diagnósticos é bem conhecida e as duas frações são similares em composição. Entretanto, o plasma parece ser mais estável que o soro e mais apropriado para avaliação de proteínas de baixo peso molecular. Por outro lado, o soro é o material de escolha para vários testes porque os anticoagulantes do plasma interferem com alguns métodos empregados⁴⁴.

Somente 22 proteínas compõem mais de 95% do proteoma do soro/plasma, como albumina, transferrina, haptoglobina, imunoglobulinas e lipoproteínas. Muitas proteínas celulares, ao contrário, caem na circulação em níveis muito reduzidos¹¹⁴. Por exemplo, a albumina está presente no sangue em concentração milimolar (10^{-3}) enquanto outras, como as citocinas, possuem atividade em concentrações entre 10^{-12} mol e 10^{-9} mol¹¹⁵. É esse menor grupo que certamente inclui os biomarcadores de doenças¹¹⁶ cuja detecção, infelizmente, sofre interferência das proteínas muito abundantes. Como revisto por Kawashima *et al.*¹¹⁷, são utilizados vários métodos de depleção que, entretanto, resultam muitas vezes na remoção de proteínas de baixo peso molecular (Figura 3).

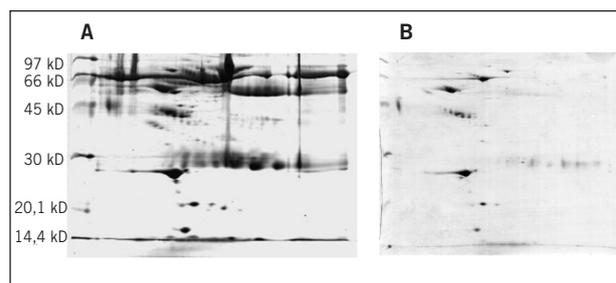


Figura 3 – Géis resultantes de eletroforese 2-D de proteínas de soro de pacientes com neurofibromatose. (A) Sem e (B) com depleção das proteínas mais abundantes.

Schiess *et al.*⁴⁸, comparando marcadores conhecidos com proteínas identificadas por abordagens proteômicas, observaram concentrações plasmáticas com ordens de grandeza muito diferentes. Enquanto os níveis de marcadores como PSA e CD340 estão na faixa de pg a ng/mL, os níveis de proteínas plasmáticas clássicas são da ordem de μ g a mg/mL. Esses dados mostram a necessidade de avanços na tecnologia para que os limites de detecção atinjam valores menores de concentração¹¹⁴. Para vencer essas dificuldades, recentemente têm sido utilizadas as medidas por SRM (*Selected Reaction Monitoring*) em espectrometria de

massas, que focam conjuntos de proteínas selecionadas *a priori* e que têm gerado dados muito consistentes^{118,119}, especialmente quando a depleção de componentes abundantes e o fracionamento são combinados¹²⁰.

Apesar dessas limitações, muitos dados já foram obtidos em soro/plasma de pacientes com diabetes^{121,122}, doenças autoimunes¹²³, cardíacas¹²⁴ e infecciosas¹²⁵, doenças de Parkinson¹²⁶ e Alzheimer⁵², endometriose¹²⁷, tumores de bexiga¹²⁸, cabeça e pescoço¹²⁹⁻¹³², cólon^{133,134}, esôfago¹³⁵, estômago¹³⁶, fígado^{137,138}, mama^{139,140}, pâncreas^{141,142}, próstata^{143,144}, pulmão^{145,146}, rim¹⁴⁷⁻¹⁴⁹, e também de gestantes com fetos portadores de síndrome de Down¹⁵⁰.

Embora o número de publicações seja elevado, apenas um teste de triagem desenvolvido a partir de abordagens proteômicas em soro foi aprovado (OVA1). O teste analisa um painel de proteínas (CA125, transtirretina ou pré-albumina, apolipoproteína A1, beta-2-microglobulina e transferrina) e, quando combinado com avaliação clínica e por imagem, possui uma sensibilidade maior que 90% para avaliação pré-cirúrgica do risco de câncer de ovário^{46,47}.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Muitos fatores afetam os resultados de análises proteômicas, especialmente no caso de fluidos corporais. Entre eles estão características do próprio paciente e do ambiente^{44,151}. Na fase pré-analítica, o processamento do material introduz outras variáveis, como método de coleta, tipo de armazenamento e tratamentos iniciais da amostra. Da mesma forma, produtos de degradação proteolítica gerados na fase analítica influenciam os resultados, se inibidores eficientes de proteases não forem utilizados. A degradação por catabolismo é igualmente importante¹⁵², embora nem sempre os fragmentos de baixo peso molecular sejam inespecíficos, como aqueles derivados da transtirretina¹⁵³ e da osteopontina¹⁵⁴.

O lado clínico dos estudos proteômicos também enfrenta alguns desafios. Um deles é a análise prospectiva de populações representativas e bem caracterizadas para obtenção de poder estatístico e para que sejam superadas as limitações resultantes da variabilidade individual e do processamento de material biológico.

Apesar desses desafios, não existem dúvidas de que os resultados de abordagens proteômicas são potencialmente úteis em diversas áreas da pesquisa clínica, entre elas, diagnóstico, monitoramento de resposta à terapia, predição de desfecho clínico, classificação de subtipos de doenças, determinação de riscos, caracterização de vias metabólicas, quantificação de biomarcadores e geração de alvos terapêuticos⁴⁰.

Nos últimos anos, muitas questões biológicas importantes têm sido respondidas pela proteômica e centenas de biomarcadores candidatos foram descobertos. Entretanto, poucos desses marcadores têm ultrapassado a fase de identificação. Sua aplicação com sucesso na prática clínica

dependerá de plataformas sensíveis, desenvolvimento de painéis de proteínas e estudos colaborativos que incluam médicos, epidemiologistas, biólogos moleculares e bioinformatas, com uma questão clínica relevante e com parâmetros bem definidos de recrutamento e caracterização de pacientes e amostras.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), o Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelas bolsas e auxílios de pesquisa recebidos. Os autores também agradecem à equipe do GENCAPO (*Head and Neck Genome Project*) pelas valiosas discussões que motivaram a redação do presente trabalho.

REFERÊNCIAS

- DeRisi J, Penland L, Brown PO, Bittner ML, Meltzer PS, Ray M *et al*. Use of a cDNA microarray to analyse gene expression patterns in human cancer. *Nat Genet*. 1996;14(4):457-60.
- Velculescu VE, Zhang L, Vogelstein B, Kinzler KW. Serial analysis of gene expression. *Science*. 1995;270(5235):484-7.
- Fullwood MJ, Wei CL, Liu ET, Ruan Y. Next-generation DNA sequencing of paired-end tags (PET) for transcriptome and genome analyses. *Genome Res*. 2009;19(4):521-32.
- Gygi SP, Rochon Y, Franz BR, Aebersold R. Correlation between protein and mRNA abundance in yeast. *Mol Cell Biol*. 1999;19(3):1720-30.
- Gstaiger M, Aebersold R. Applying mass spectrometry-based proteomics to genomics and network biology. *Nat Rev Genet*. 2009;10(9):617-27.
- Wilkins MR, Sanchez JC, Gooley AA, Appel RD, Humphrey-Smith I, Hochstrasser DF *et al*. Progress with proteome projects: why all proteins expressed by a genome should be identified and how to do it. *Biotechnol Genet Eng Rev*. 1996;13:19-50.
- Ahrens CH, Brunner E, Qeli E, Basler K, Aebersold R. Generating and navigating proteome maps using mass spectrometry. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2010;11(11):789-801.
- Jensen ON. Modification-specific proteomics: characterization of post-translational modifications by mass spectrometry. *Curr Opin Chem Biol*. 2004;8(1):33-41.
- Valledor L, Jorrián J. Back to the basics: maximizing the information obtained by quantitative two dimensional gel electrophoresis analyses by an appropriate experimental design and statistical analyses. *J Proteomics*. 2011;74(1):1-18.
- Armirotti A, Damonte G. Achievements and perspectives of top-down proteomics. *Proteomics*. 2010;10(20):3566-76.
- Kosako H, Nagano K. Quantitative phosphoproteomics strategies for understanding protein kinase-mediated signal transduction pathways. *Expert Rev Proteomics*. 2011;8(1):81-94.
- Nirmalan NJ, Hughes C, Peng J, McKenna T, Langridge J, Cairns DA *et al*. Initial development and validation of a novel extraction method for quantitative mining of the formalin-fixed, paraffin-embedded tissue proteome for biomarker investigations. *J Proteome Res*. 2011;10(2):896-906.
- de Marqui AB, Vidotto A, Polachini GM, Bellato CM, Cabral H, Leopoldino AM *et al*. Solubilization of proteins from human lymph node tissue and two-dimensional gel storage. *J Biochem Mol Biol*. 2006;39(2):216-22.
- Bjellqvist B, Ek K, Righetti PG, Gianazza E, Gorg A, Westermeier R *et al*. Isoelectric focusing in immobilized pH gradients: principle, methodology and some applications. *J Biochem Biophys Methods*. 1982;6(4):317-39.
- O'Farrell PH. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J Biol Chem*. 1975;250(10):4007-21.
- Dowsey AW, Dunn MJ, Yang GZ. The role of bioinformatics in two-dimensional gel electrophoresis. *Proteomics*. 2003;3(8):1567-96.
- Rezaul K, Wu L, Mayya V, Hwang SI, Han D. A systematic characterization of mitochondrial proteome from human T leukemia cells. *Mol Cell Proteomics*. 2005;4(2):169-81.
- Unlu M, Morgan ME, Minden JS. Difference gel electrophoresis: a single gel method for detecting changes in protein extracts. *Electrophoresis*. 1997;18(11):2071-7.
- May C, Brosseron F, Chartowski P, Schumbrutzki C, Schoenebeck B, Marcus K. Instruments and methods in proteomics. *Methods Mol Biol*. 2011;696:3-26.
- Schirmer EC, Yates JR, 3rd, Gerace L. MudPIT: A powerful proteomics tool for discovery. *Discov Med*. 2003;3(18):38-9.

21. Washburn MP, Wolters D, Yates JR, 3rd. Large-scale analysis of the yeast proteome by multidimensional protein identification technology. *Nat Biotechnol.* 2001;19(3):242-7.
22. Chen CH. Review of a current role of mass spectrometry for proteome research. *Anal Chim Acta.* 2008;624(1):16-36.
23. Zaluzeck EJ, Gage DA, Watson JT. Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry: applications in peptide and protein characterization. *Protein Expr Purif.* 1995;6(2):109-23.
24. Tang N, Tornatore P, Weinberger SR. Current developments in SELDI affinity technology. *Mass Spectrom Rev.* 2004;23(1):34-44.
25. Gustafsson JO, Oehler MK, Ruzsiewicz A, McColl SR, Hoffmann P. MALDI Imaging Mass Spectrometry (MALDI-IMS)-Application of Spatial Proteomics for Ovarian Cancer Classification and Diagnosis. *Int J Mol Sci.* 2011;12(1):773-94.
26. Nguyen S, Fenn JB. Gas-phase ions of solute species from charged droplets of solutions. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2007;104(4):1111-7.
27. Wollnik H. TOF-MS. *Mass Spectrom Rev.* 1993;12(1):89-114.
28. Perkins DN, Pappin DJ, Creasy DM, Cottrell JS. Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. *Electrophoresis* 1999;20(18):3551-67.
29. Eng JK, McCormack AL, Yates JRI. An approach to correlate tandem mass spectral data of peptides with amino acid sequences in a protein database. *Am Soc Mass Spectrom* 1994;5(976-989).
30. Chernushevich IV, Loboda AV, Thomson BA. An introduction to quadrupole-time-of-flight mass spectrometry. *J Mass Spectrom* 2001;36(8):849-65.
31. Wang Y, Franzen J, Wanczek KP. The non-linear resonance ion trap. Part 2. A general theoretical analysis. *Int J Mass Spectrom Ion Processes.* 1993;124(1):125-44.
32. Hu Q, Noll RJ, Li H, Makarov A, Hardman M, Graham Cooks R. The Orbitrap: a new mass spectrometer. *J Mass Spectrom.* 2005;40(4):430-43.
33. Walther TC, Mann M. Mass spectrometry-based proteomics in cell biology. *J Cell Biol.* 2010;190(4):491-500.
34. Gygi SP, Rist B, Gerber SA, Turecek F, Gelb MH, Aebersold R. Quantitative analysis of complex protein mixtures using isotope-coded affinity tags. *Nat Biotechnol.* 1999;17(10):994-9.
35. Thompson A, Schafer J, Kuhn K, Kienle S, Schwarz J, Schmidt G *et al.* Tandem mass tags: a novel quantification strategy for comparative analysis of complex protein mixtures by MS/MS. *Anal Chem.* 2003;75(8):1895-904.
36. Ong SE, Blagoev B, Kratchmarova I, Kristensen DB, Steen H, Pandey A *et al.* Stable isotope labeling by amino acids in cell culture, SILAC, as a simple and accurate approach to expression proteomics. *Mol Cell Proteomics.* 2002;1(5):376-86.
37. Piersma SR, Fiedler U, Span S, Lingnau A, Pham TV, Hoffmann S *et al.* Workflow comparison for label-free, quantitative secretome proteomics for cancer biomarker discovery: method evaluation, differential analysis, and verification in serum. *J Proteome Res.* 2010;9(4):1913-22.
38. Old WM, Meyer-Arendt K, Aveline-Wolf L, Pierce KG, Mendoza A, Sevinsky JR *et al.* Comparison of label-free methods for quantifying human proteins by shotgun proteomics. *Mol Cell Proteomics.* 2005;4(10):1487-502.
39. Fey SJ, Larsen PM. 2D or not 2D. Two-dimensional gel electrophoresis. *Curr Opin Chem Biol.* 2001;5(1):26-33.
40. Walsh GM, Rogalski JC, Klockenbusch C, Kast J. Mass spectrometry-based proteomics in biomedical research: emerging technologies and future strategies. *Expert Rev Mol Med.* 2010;12:e30.
41. Sudhir PR, Hsu CL, Wang MJ, Wang YT, Chen YJ, Sung TY *et al.* Phosphoproteomics identifies oncogenic Ras signaling targets and their involvement in lung adenocarcinomas. *PLoS One.* 2011;6(5):e20199.
42. Zeng X, Hood BL, Sun M, Conrads TP, Day RS, Weissfeld JL *et al.* Lung cancer serum biomarker discovery using glycoprotein capture and liquid chromatography mass spectrometry. *J Proteome Res.* 2010;9(12):6440-9.
43. Matta A, Ralhan R, DeSouza LV, Siu KW. Mass spectrometry-based clinical proteomics: head-and-neck cancer biomarkers and drug-targets discovery. *Mass Spectrom Rev.* 2010;29(6):945-61.
44. Huijbers A, Velstra B, Dekker TJ, Mesker WE, van der Burgt YE, Mertens BJ *et al.* Proteomic serum biomarkers and their potential application in cancer screening programs. *Int J Mol Sci.* 2010;11(11):4175-93.
45. Findeisen P, Neumaier M. Mass spectrometry based proteomics profiling as diagnostic tool in oncology: current status and future perspective. *Clin Chem Lab Med.* 2009;47(6):666-84.
46. Fung ET. A recipe for proteomics diagnostic test development: the OVA1 test, from biomarker discovery to FDA clearance. *Clin Chem.* 2010;56(2):327-9.
47. Zhang Z, Chan DW. The road from discovery to clinical diagnostics: lessons learned from the first FDA-cleared in vitro diagnostic multivariate index assay of proteomic biomarkers. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2010;19(12):2995-9.
48. Schiess R, Wollscheid B, Aebersold R. Targeted proteomic strategy for clinical biomarker discovery. *Mol Oncol.* 2009;3(1):33-44.
49. Vojtova L, Zima T, Tesar V, Michalova J, Prikrýl P, Dostalova G *et al.* Study of urinary proteomes in Anderson-Fabry disease. *Ren Fail.* 2010;32(11):1202-9.
50. Ottervald J, Franzen B, Nilsson K, Andersson LJ, Khademi M, Eriksson B *et al.* Multiple sclerosis: Identification and clinical evaluation of novel CSF biomarkers. *J Proteomics.* 2010;73(6):1117-32.
51. Zhou JY, Afjehi-Sadat L, Asress S, Duong DM, Cudkowicz M, Glass JD *et al.* Glycetin-3 is a candidate biomarker for amyotrophic lateral sclerosis: discovery by a proteomics approach. *J Proteome Res.* 2010;9(10):5133-41.
52. Blennow K, Hampel H, Weiner M, Zetterberg H. Cerebrospinal fluid and plasma biomarkers in Alzheimer disease. *Nat Rev Neurol.* 2010;6(3):131-44.
53. Steinacker P, Rist W, Swiatek-de-Lange M, Lehnert S, Jesse S, Pabst A *et al.* Ubiquitin as potential cerebrospinal fluid marker of Creutzfeldt-Jakob disease. *Proteomics.* 2010;10(1):81-9.
54. van Dijk KD, Teunissen CE, Drukarch B, Jimenez CR, Groenewegen HJ, Berendse HW *et al.* Diagnostic cerebrospinal fluid biomarkers for Parkinsons disease: a pathogenetically based approach. *Neurobiol Dis.* 2010;39(3):229-41.
55. Merkel D, Rist W, Seither P, Weith A, Lenter MC. Proteomic study of human bronchoalveolar lavage fluids from smokers with chronic obstructive pulmonary disease by combining surface-enhanced laser desorption/ionization-mass spectrometry profiling with mass spectrometric protein identification. *Proteomics.* 2005;5(11):2972-80.
56. Gobezie R, Kho A, Krastins B, Sarracino DA, Thornhill TS, Chase M *et al.* High abundance synovial fluid proteome: distinct profiles in health and osteoarthritis. *Arthritis Res Ther.* 2007;9(2):R36.
57. Lema I, Brea D, Rodriguez-Gonzalez R, Diez-Feijoo E, Sobrino T. Proteomic analysis of the tear film in patients with keratoconus. *Mol Vis* 2010;16:2055-61.
58. Pawlik TM, Fritsche H, Coombes KR, Xiao L, Krishnamurthy S, Hunt KK *et al.* Significant differences in nipple aspirate fluid protein expression between healthy women and those with breast cancer demonstrated by time-of-flight mass spectrometry. *Breast Cancer Res Treat.* 2005;89(2):149-57.
59. Dawes C. Salivary flow patterns and the health of hard and soft oral tissues. *J Am Dent Assoc.* 2008;139(Suppl):18S-24S.
60. Amaechi BT, Higham SM. In vitro remineralisation of eroded enamel lesions by saliva. *J Dent.* 2001;29(5):371-6.
61. Tabak LA. In defense of the oral cavity: the protective role of the salivary secretions. *Pediatr Dent.* 2006;28(2):110-7; discussion 92-8.
62. Suh KI, Lee JY, Chung JW, Kim YK, Kho HS. Relationship between salivary flow rate and clinical symptoms and behaviours in patients with dry mouth. *J Oral Rehabil.* 2007;34(10):739-44.
63. Musumeci V, Cherubini P, Zuppi C, Zappacosta B, Ghirlanda G, Di Salvo S. Aminotransferases and lactate dehydrogenase in saliva of diabetic patients. *J Oral Pathol Med.* 1993;22(2):73-6.
64. Hirtz C, Chevalier F, Centeno D, Egea JC, Rossignol M, Sommerer N *et al.* Complexity of the human whole saliva proteome. *J Physiol Biochem.* 2005;61(3):469-80.
65. Beeley JA, Sweeney D, Lindsay JC, Buchanan ML, Sarna L, Khoo KS. Sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis of human parotid salivary proteins. *Electrophoresis.* 1991;12(12):1032-41.
66. Beeley JA, Khoo KS. Salivary proteins in rheumatoid arthritis and Sjogrens syndrome: one-dimensional and two-dimensional electrophoretic studies. *Electrophoresis.* 1999;20(7):1652-60.
67. Denny P, Hagen FK, Hardt M, Liao L, Yan W, Arellano M *et al.* The proteomes of human parotid and submandibular/sublingual gland salivas collected as the ductal secretions. *J Proteome Res.* 2008;7(5):1994-2006.
68. Fábíán TK, Gáspár J, Fejérdy L, Kaán B, Bálint M, Csermely P *et al.* HSP-70 is present in human saliva. *Med Sci Monit.* 2003;9(1):62-5.
69. Fang X, Yang L, Wang W, Song T, Lee CS, DeVoe DL *et al.* Comparison of electrokinetics-based multidimensional separations coupled with electrospray ionization-tandem mass spectrometry for characterization of human salivary proteins. *Anal Chem.* 2007;79(15):5785-92.
70. Ghafouri B, Tagesson C, Lindahl M. Mapping of proteins in human saliva using two-dimensional gel electrophoresis and peptide mass fingerprinting. *Proteomics.* 2003;3(6):1003-15.
71. Guo T, Rudnick PA, Wang W, Lee CS, Devoe DL, Balgley BM. Characterization of the human salivary proteome by capillary isoelectric focusing/nanoreversed-phase liquid chromatography coupled with ESI-tandem MS. *J Proteome Res.* 2006;5(6):1469-78.
72. Hardt M, Thomas LR, Dixon SE, Newport G, Agabian N, Prakobphol A *et al.* Toward defining the human parotid gland salivary proteome and peptidome: identification and characterization using 2D SDS-PAGE, ultrafiltration, HPLC, and mass spectrometry. *Biochemistry.* 2005;44(8):2885-99.
73. Hu S, Yu T, Xie Y, Yang Y, Li Y, Zhou X *et al.* Discovery of oral fluid biomarkers for human oral cancer by mass spectrometry. *Cancer Genomics Proteomics.* 2007;4(2):55-64.
74. Hu S, Arellano M, Boontheung P, Wang J, Zhou H, Jiang J *et al.* Salivary proteomics for oral cancer biomarker discovery. *Clin Cancer Res.* 2008;14(19):6246-52.
75. Hu S, Denny P, Xie Y, Loo JA, Wolinsky LE, Li Y *et al.* Differentially expressed protein markers in human submandibular and sublingual secretions. *Int J Oncol.* 2004;25(5):1423-30.
76. Hu S, Xie Y, Ramachandran P, Ogorzalek Loo RR, Li Y, Loo JA *et al.* Large-scale identification of proteins in human salivary proteome by liquid chromatography/mass spectrometry and two-dimensional gel electrophoresis-mass spectrometry. *Proteomics.* 2005;5(6):1714-28.
77. Huang CM. Comparative proteomic analysis of human whole saliva. *Arch Oral Biol.* 2004;49(12):951-62.

78. Messina I, Cabras T, Inzitari R, Lupi A, Zuppi C, Olmi C *et al.* Characterization of the human salivary basic proline-rich protein complex by a proteomic approach. *J Proteome Res.* 2004;3(4):792-800.
79. Papale M, Pedicillo MC, Di Paolo S, Thatcher BJ, Lo Muzio L, Bufo P *et al.* Saliva analysis by surface-enhanced laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (SELDI-TOF/MS): from sample collection to data analysis. *Clin Chem Lab Med.* 2008;46(1):89-99.
80. Ramachandran P, Boontheung P, Xie Y, Sondej M, Wong DT, Loo JA. Identification of N-linked glycoproteins in human saliva by glycoprotein capture and mass spectrometry. *J Proteome Res.* 2006;5(6):1493-503.
81. Schipper R, Loof A, de Groot J, Harthoorn L, van Heerde W, Dransfield E. Salivary protein/peptide profiling with SELDI-TOF-MS. *Ann NY Acad Sci.* 2007;1098:498-503.
82. Todd AL, Ng WY, Lee YS, Loke KY, Thai AC. Evidence of autoantibodies to glutamic acid decarboxylase in oral fluid of type 1 diabetic patients. *Diabetes Res Clin Pract.* 2002;57(3):171-7.
83. Vitorino R, Lobo MJ, Ferrer-Correia AJ, Dubin JR, Tomer KB, Domingues PM *et al.* Identification of human whole saliva protein components using proteomics. *Proteomics.* 2004;4(4):1109-15.
84. Walz A, Stuhler K, Wattenberg A, Hawranke E, Meyer HE, Schmalz G *et al.* Proteome analysis of glandular parotid and submandibular-sublingual saliva in comparison to whole human saliva by two-dimensional gel electrophoresis. *Proteomics.* 2006;6(5):1631-9.
85. Wilmarth PA, Riviere MA, Rustvold DL, Lauten JD, Madden TE, David LL. Two-dimensional liquid chromatography study of the human whole saliva proteome. *J Proteome Res.* 2004;3(5):1017-23.
86. Xie H, Rhodus NL, Griffin RJ, Carlis JV, Griffin TJ. A catalogue of human saliva proteins identified by free flow electrophoresis-based peptide separation and tandem mass spectrometry. *Mol Cell Proteomics.* 2005;4(11):1826-30.
87. Yao Y, Berg EA, Costello CE, Troxler RF, Oppenheim FG. Identification of protein components in human acquired enamel pellicle and whole saliva using novel proteomics approaches. *J Biol Chem.* 2003;278(7):5300-8.
88. Salivary Proteome Knowledge Base. Disponível em: http://hspp.dent.ucla.edu/cgi-bin/hspmscgi-bin/search_pro_c.cgi.
89. Sys-BodyFluid Database. Disponível em: www.biosino.org/bodyfluid/fluid.jsp?bf=Saliva.
90. Navazesh M. Methods for collecting saliva. *Ann NY Acad Sci.* 1993;694:72-7.
91. Hardt M, Witkowska HE, Webb S, Thomas LR, Dixon SE, Hall SC *et al.* Assessing the effects of diurnal variation on the composition of human parotid saliva: quantitative analysis of native peptides using iTRAQ reagents. *Anal Chem.* 2005;77(15):4947-54.
92. Aps JK, Martens LC. Review: The physiology of saliva and transfer of drugs into saliva. *Forensic Sci Int.* 2005;150(2-3):119-31.
93. Lu Y, Bentley GR, Gann PH, Hodges KR, Chatterton RT. Salivary estradiol and progesterone levels in conception and nonconception cycles in women: evaluation of a new assay for salivary estradiol. *Fertil Steril.* 1999;71(5):863-8.
94. Maseda C, Hama K, Fukui Y, Matsubara K, Takahashi S, Akane A. Detection of delta 9-THC in saliva by capillary GC/ECD after marijuana smoking. *Forensic Sci Int.* 1986;32(4):259-66.
95. Gonzalez M, Banderas JA, Baez A, Belmont R. Salivary lead and cadmium in a young population residing in Mexico city. *Toxicol Lett.* 1997;93(1):55-64.
96. Li C, Ha T, Ferguson DA, Jr., Chi DS, Zhao R, Patel NR *et al.* A newly developed PCR assay of *H. pylori* in gastric biopsy, saliva, and feces. Evidence of high prevalence of *H. pylori* in saliva supports oral transmission. *Dig Dis Sci.* 1996;41(11):2142-9.
97. Henskens YM, Veerman EC, Mantel MS, van der Velden U, Nieuw Amerongen AV. Cystatins S and C in human whole saliva and in glandular salivas in periodontal health and disease. *J Dent Res.* 1994;73(10):1606-14.
98. Anil S, Remani P, Beena VT, Nair RG, Vijayakumar T. Immunoglobulins in the saliva of diabetic patients with periodontitis. *Ann Dent.* 1995;54(1-2):30-3.
99. Mandel ID, Kutscher A, Denning CR, Thompson RH, Jr., Zegarelli EV. Salivary studies in cystic fibrosis. *Am J Dis Child.* 1967;113(4):431-8.
100. Ben-Aryeh H, Spielman A, Szargel R, Gutman D, Scharf J, Nahir M *et al.* Sialochemistry for diagnosis of Sjogrens syndrome in xerostomic patients. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1981;52(5):487-90.
101. Armstrong D, Van Wormer D, Dimmitt S. Tissue peroxidase in the normal and neoplastic salivary gland. *J Clin Lab Anal.* 1991;5(4):293-8.
102. Jenzano JW, Courts NF, Timko DA, Lundblad RL. Levels of glandular kallikrein in whole saliva obtained from patients with solid tumors remote from the oral cavity. *J Dent Res.* 1986;65(1):67-70.
103. Streckfus C, Bigler L, Dellinger T, Dai X, Kingman A, Thigpen JT. The presence of soluble c-erbB-2 in saliva and serum among women with breast carcinoma: a preliminary study. *Clin Cancer Res.* 2000;6(6):2363-70.
104. Chen DX, Schwartz PE, Li FQ. Saliva and serum CA 125 assays for detecting malignant ovarian tumors. *Obstet Gynecol.* 1990;75(4):701-4.
105. Ohshiro K, Rosenthal DI, Koomen JM, Streckfus CF, Chambers M, Kobayashi R *et al.* Pre-analytic saliva processing affect proteomic results and biomarker screening of head and neck squamous carcinoma. *Int J Oncol.* 2007;30(3):743-9.
106. Dowling P, Wormald R, Meleady P, Henry M, Curran A, Clynes M. Analysis of the saliva proteome from patients with head and neck squamous cell carcinoma reveals differences in abundance levels of proteins associated with tumour progression and metastasis. *J Proteomics.* 2008;71(2):168-75.
107. de Jong EP, Xie H, Onsongo G, Stone MD, Chen XB, Kooren JA *et al.* Quantitative proteomics reveals myosin and actin as promising saliva biomarkers for distinguishing pre-malignant and malignant oral lesions. *PLoS One.* 2010;5(6):e11148.
108. Wu JY, Yi C, Chung HR, Wang DJ, Chang WC, Lee SY *et al.* Potential biomarkers in saliva for oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol.* 2010;46(4):226-31.
109. Castagnola M, Cabras T, Vitali A, Sanna MT, Messina I. Biotechnological implications of the salivary proteome. *Trends Biotechnol.* 2011; 29(8):409-18.
110. Jou YJ, Lin CD, Lai CH, Chen CH, Kao JY, Chen SY *et al.* Proteomic identification of salivary transferrin as a biomarker for early detection of oral cancer. *Anal Chim Acta.* 2010;681(1-2):41-8.
111. Daniels TR, Delgado T, Rodriguez JA, Helguera G, Penichet ML. The transferrin receptor part I: biology and targeting with cytotoxic antibodies for the treatment of cancer. *Clin Immunol.* 2006;121(2):144-58.
112. Vidotto A, Henrique T, Raposo LS, Maniglia JV, Tajara EH. Salivary and serum proteomics in head and neck carcinomas: before and after surgery and radiotherapy. *Cancer Biomark.* 2010; 8(2):95-107.
113. Omenn GS, States DJ, Adamski M, Blackwell TW, Menon R, Hermjakob H *et al.* Overview of the HUPO Plasma Proteome Project: results from the pilot phase with 35 collaborating laboratories and multiple analytical groups, generating a core dataset of 3020 proteins and a publicly-available database. *Proteomics.* 2005;5(13):3226-45.
114. Surinova S, Schiess R, Huttenhain R, Cerciello F, Wollscheid B, Aebersold R. On the development of plasma protein biomarkers. *J Proteome Res.* 2011;10(1):5-16.
115. Anderson NL, Anderson NG. The human plasma proteome: history, character, and diagnostic prospects. *Mol Cell Proteomics.* 2002;1(11):845-67.
116. Tirumalai RS, Chan KC, Prieto DA, Issaq HJ, Conrads TP, Veenstra TD. Characterization of the low molecular weight human serum proteome. *Mol Cell Proteomics.* 2003;2(10):1096-103.
117. Kawashima Y, Fukutomi T, Tomonaga T, Takahashi H, Nomura F, Maeda T *et al.* High-yield peptide-extraction method for the discovery of subnanomolar biomarkers from small serum samples. *J Proteome Res.* 2010;9(4):1694-705.
118. Wolf-Yadlin A, Hautaniemi S, Lauffenburger DA, White FM. Multiple reaction monitoring for robust quantitative proteomic analysis of cellular signaling networks. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2007;104(14):5860-5.
119. Picotti P, Bodenmiller B, Mueller LN, Domon B, Aebersold R. Full dynamic range proteome analysis of *S. cerevisiae* by targeted proteomics. *Cell.* 2009;138(4):795-806.
120. Keshishian H, Addona T, Burgess M, Kuhn E, Carr SA. Quantitative, multiplexed assays for low abundance proteins in plasma by targeted mass spectrometry and stable isotope dilution. *Mol Cell Proteomics.* 2007;6(12):2212-29.
121. Riaz S, Alam SS, Akhtar MW. Proteomic identification of human serum biomarkers in diabetes mellitus type 2. *J Pharm Biomed Anal.* 2010;51(5):1103-7.
122. Liu X, Feng Q, Chen Y, Zuo J, Gupta N, Chang Y *et al.* Proteomics-based identification of differentially-expressed proteins including galectin-1 in the blood plasma of type 2 diabetic patients. *J Proteome Res.* 2009;8(3):1255-62.
123. de Seny D, Fillet M, Ribbens C, Maree R, Meuwis MA, Lutterli L *et al.* Monomeric calgranulins measured by SELDI-TOF mass spectrometry and calprotectin measured by ELISA as biomarkers in arthritis. *Clin Chem.* 2008;54(6):1066-75.
124. Kiernan UA, Nedelkov D, Nelson RW. Multiplexed mass spectrometric immunoassay in biomarker research: a novel approach to the determination of a myocardial infarct. *J Proteome Res.* 2006;5(11):2928-34.
125. He QY, Lau GK, Zhou Y, Yuen ST, Lin MC, Kung HF *et al.* Serum biomarkers of hepatitis B virus infected liver inflammation: a proteomic study. *Proteomics.* 2003;3(5):666-74.
126. Zhao X, Xiao WZ, Pu XP, Zhong LJ. Proteome analysis of the sera from Chinese Parkinsons disease patients. *Neurosci Lett.* 2010;479(2):175-9.
127. Seeber B, Sammel MD, Fan X, Gerton GL, Shaunik A, Chittams J *et al.* Proteomic analysis of serum yields six candidate proteins that are differentially regulated in a subset of women with endometriosis. *Fertil Steril.* 2010;93(7):2137-44.
128. Minami S, Sato Y, Matsumoto T, Kagayama T, Kawashima Y, Yoshio K *et al.* Proteomic study of sera from patients with bladder cancer: usefulness of S100A8 and S100A9 proteins. *Cancer Genomics Proteomics.* 2010;7(4):181-9.
129. Freed GL, Cazares LH, Fichandler CE, Fuller TW, Sawyer CA, Stack BC, Jr. *et al.* Differential capture of serum proteins for expression profiling and biomarker discovery in pre- and posttreatment head and neck cancer samples. *Laryngoscope.* 2008;118(1):61-8.
130. Lai CH, Chang NW, Lin CF, Lin CD, Lin YJ, Wan L *et al.* Proteomics-based identification of haptoglobin as a novel plasma biomarker in oral squamous cell carcinoma. *Clin Chim Acta.* 2010;411(13-14):984-91.
131. Wei YS, Zheng YH, Liang WB, Zhang JY, Yang ZH, Lv ML *et al.* Identification of serum biomarkers for nasopharyngeal carcinoma by proteomic analysis. *Cancer.* 2008;112(3):544-51.

132. Cheng AJ, Chen LC, Chien KY, Chen YJ, Chang JT, Wang HM *et al.* Oral cancer plasma tumor marker identified with bead-based affinity-fractionated proteomic technology. *Clin Chem.* 2005;51(12):2236-44.
133. Ransohoff DF, Martin C, Wiggins WS, Hitt BA, Keku TO, Galanko JA *et al.* Assessment of serum proteomics to detect large colon adenomas. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2008;17(8):2188-93.
134. Gemoll T, Roblick UJ, Auer G, Jornvall H, Habermann JK. SELDI-TOF serum proteomics and colorectal cancer: a current overview. *Arch Physiol Biochem.* 2010;116(4-5):188-96.
135. Liu WL, Zhang G, Wang JY, Cao JY, Guo XZ, Xu LH *et al.* Proteomics-based identification of autoantibody against CDC25B as a novel serum marker in esophageal squamous cell carcinoma. *Biochem Biophys Res Commun.* 2008;375(3):440-5.
136. Chong PK, Lee H, Loh MC, Choong LY, Lin Q, So JB *et al.* Upregulation of plasma C9 protein in gastric cancer patients. *Proteomics.* 2010;10(18):3210-21.
137. Sun Y, Zang Z, Xu X, Zhang Z, Zhong L, Zan W *et al.* Differential proteomics identification of HSP90 as potential serum biomarker in hepatocellular carcinoma by two-dimensional electrophoresis and mass spectrometry. *Int J Mol Sci.* 2010;11(4):1423-33.
138. Feng JT, Liu YK, Song HY, Dai Z, Qin LX, Almofti MR *et al.* Heat-shock protein 27: a potential biomarker for hepatocellular carcinoma identified by serum proteome analysis. *Proteomics.* 2005;5(17):4581-8.
139. Hamrita B, Chahed K, Trimeche M, Guillier CL, Hammann P, Chaieb A *et al.* Proteomics-based identification of alpha1-antitrypsin and haptoglobin precursors as novel serum markers in infiltrating ductal breast carcinomas. *Clin Chim Acta.* 2009;404(2):111-8.
140. Goncalves A, Esterni B, Bertucci F, Sauvan R, Chabannon C, Cubizolles M *et al.* Postoperative serum proteomic profiles may predict metastatic relapse in high-risk primary breast cancer patients receiving adjuvant chemotherapy. *Oncogene.* 2006;25(7):981-9.
141. Rong Y, Jin D, Hou C, Hu J, Wu W, Ni X *et al.* Proteomics analysis of serum protein profiling in pancreatic cancer patients by DIGE: up-regulation of mannose-binding lectin 2 and myosin light chain kinase 2. *BMC Gastroenterol.* 2010;10:68.
142. Xue A, Scarlett CJ, Chung L, Butturini G, Scarpa A, Gandy R, *et al.* Discovery of serum biomarkers for pancreatic adenocarcinoma using proteomic analysis. *Br J Cancer.* 2010;103(3):391-400.
143. Al-Ruwaili JA, Larkin SE, Zeidan BA, Taylor MG, Adra CN, Aukim-Hastie CL *et al.* Discovery of serum protein biomarkers for prostate cancer progression by proteomic analysis. *Cancer Genomics Proteomics.* 2010;7(2):93-103.
144. Byrne JC, Downes MR, ODonoghue N, O'Keane C, O'Neill A, Fan Y *et al.* 2D-DIGE as a strategy to identify serum markers for the progression of prostate cancer. *J Proteome Res.* 2009;8(2):942-57.
145. Bharti A, Ma PC, Maulik G, Singh R, Khan E, Skarin AT *et al.* Haptoglobin alpha-subunit and hepatocyte growth factor can potentially serve as serum tumor biomarkers in small cell lung cancer. *Anticancer Res.* 2004;24(2C):1031-8.
146. Shevchenko VE, Arnotskaya NE, Zaridze DG. Detection of lung cancer using plasma protein profiling by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Eur J Mass Spectrom (Chichester, Eng)* 2010;16(4):539-49.
147. Hara T, Honda K, Ono M, Naito K, Hirohashi S, Yamada T. Identification of 2 serum biomarkers of renal cell carcinoma by surface enhanced laser desorption/ionization mass spectrometry. *J Urol.* 2005;174(4 Pt 1):1213-7.
148. Sarkissian G, Fergelot P, Lamy PJ, Patard JJ, Culine S, Jouin P *et al.* Identification of pro-MMP-7 as a serum marker for renal cell carcinoma by use of proteomic analysis. *Clin Chem.* 2008;54(3):574-81.
149. Vermaat JS, van der Tweel I, Mehra N, Sleijfer S, Haanen JB, Roodhart JM *et al.* Two-protein signature of novel serological markers apolipoprotein-A2 and serum amyloid alpha predicts prognosis in patients with metastatic renal cell cancer and improves the currently used prognostic survival models. *Ann Oncol.* 2010;21(7):1472-81.
150. Kolla V, Jenö P, Moes S, Terçanlı S, Lapaire O, Choolani M *et al.* Quantitative proteomics analysis of maternal plasma in Down syndrome pregnancies using isobaric tagging reagent (iTRAQ). *J Biomed Biotechnol.* 2010;2010:952047.
151. Hawkridge AM, Muddiman DC. Mass spectrometry-based biomarker discovery: toward a global proteome index of individuality. *Annu Rev Anal Chem. (Palo Alto Calif)* 2009;2:265-77.
152. Apweiler R, Aslanidis C, Deufel T, Gerstner A, Hansen J, Hochstrasser D *et al.* Approaching clinical proteomics: current state and future fields of application in fluid proteomics. *Clin Chem Lab Med.* 2009;47(6):724-44.
153. Zhang Z, Bast RC Jr, Yu Y, Li J, Sokoll LJ, Rai AJ *et al.* Three biomarkers identified from serum proteomic analysis for the detection of early stage ovarian cancer. *Cancer Res.* 2004;64(16):5882-90.
154. Ye B, Skates S, Mok SC, Horick NK, Rosenberg HF, Vitonis A *et al.* Proteomic-based discovery and characterization of glycosylated eosinophil-derived neurotoxin and COOH-terminal osteopontin fragments for ovarian cancer in urine. *Clin Cancer Res.* 2006;12(2):432-41.