

# UNIVERSIDADE CATÓLICA DE BRASÍLIA

PRÓ-REITORIA DE GRADUAÇÃO  
TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

## *Ciências Genômicas e Biotecnologia*

**ANÁLISE PROTEÔMICA COMPARATIVA DE PLASMA  
HUMANO DE PACIENTES COM E SEM CÂNCER DE  
LARINGE**

Autora: Clarissa Pedrosa da Costa Gomes

Orientador: Prof. Dr. Octávio Luiz Franco

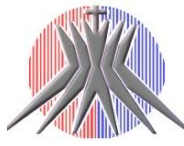
BRASÍLIA

2009

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.



**UNIVERSIDADE CATÓLICA DE BRASÍLIA – UCB**

**Programa de Pós-Graduação "*Stricto Sensu*" em  
Ciências Genômicas e Biotecnologia**

**Centro de Análises Proteômicas e Bioquímicas**



# **ANÁLISE PROTEÔMICA COMPARATIVA DE PLASMA HUMANO DE PACIENTES COM E SEM CÂNCER DE LARINGE**

**Aluna: Clarissa Pedrosa da C. Gomes**

**Orientador: Prof. Dr. Octávio L. Franco**

**Brasília, fevereiro de 2009.**

**CLARISSA PEDROSA DA COSTA GOMES**

**ANÁLISE PROTEÔMICA COMPARATIVA DE PLASMA DE PACIENTES COM E  
SEM CÂNCER DE LARINGE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Strictu Sensu* em Ciências Genômicas e Biotecnologia da Universidade Católica de Brasília, como requisito para obtenção do Título de Mestre em Ciências Genômicas e Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Octávio Luiz Franco

Co-orientador: Prof. Dr. Rinaldo Wellerson Pereira

Brasília  
2009





Dissertação de autoria de Clarissa Pedrosa da Costa Gomes, intitulada “Análise proteômica comparativa de plasma humano de pacientes com e sem câncer de laringe”, apresentada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências Genômicas e Biotecnologia da Universidade Católica de Brasília, em março de 2009, defendida e aprovada pela banca examinadora abaixo assinada:

---

Prof. Dr. Octávio Luiz Franco  
Orientador  
Universidade Católica de Brasília – UCB

---

Prof. Dr. Rinaldo Wellerson Pereira  
Examinador interno  
Universidade Católica de Brasília – UCB

---

Dr. Granville Garcia de Oliveira  
Examinador externo  
Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa)

Brasília  
2009

## AGRADECIMENTOS

Quero agradecer aqui às pessoas que me deram assistência valiosa durante todo esse curso de mestrado. Assistência é um termo inadequado para toda a paciência, tempo e conhecimento que colegas e amigos forneceram generosamente. O incentivo do meu orientador, Prof. Dr. Octávio Luiz Franco, foi fundamental para embarcar neste projeto. Por ter conduzido com o equilíbrio necessário o desenvolvimento deste e por ter oferecido maravilhosas oportunidades, a ele sou muito grata. Agradeço especialmente à Luciana Ramalho de Farias, como amiga e colaboradora, por ter me ensinado os princípios e as técnicas proteômicas necessárias para desenvolver este projeto e, de certa forma, por ter me auxiliado na escolha do grupo CAPB e do Octávio como base e orientador nesses dois últimos anos.

Por toda a paciência, dedicação, carinho e bom humor, sou grata à querida Mirna Freire e ao Bruno Pires, alunos de iniciação científica que se tornaram meu braço direito durante esse período. Gostaria também de agradecer ao Dr. Thales Rocha pela valiosa colaboração, ensinamentos e inspiração não apenas no âmbito profissional, mas também em lições de vida. Agradeço especialmente à Dra. Ângela Mehta e ao Érico Rosas Vasconcelos pelo grande auxílio em etapas cruciais deste trabalho. Por ter fornecido instalações e auxílio preciosos na Universidade Médica de Viena, agradeço ao Dr. Gert Lubec.

Aos colegas e amigos do CAPB que ajudaram e apoiaram nas fases mais diversas deste projeto, em especial, ao Bernardo Petriz, Simone Maria Neto, Elizabete Souza, Caroline Donzelly e Jackeline Leite. Meus agradecimentos ao Prof. Dr. Ruy Caldas e Dra. Fátima Grossi de Sá. Ao Prof. Dr. Rinaldo Pereira e Dr. Granville Garcia de Oliveira, sou grata por compartilharem seu conhecimento e fazerem parte da banca, contribuindo para enriquecer este trabalho. À Capes e UCB, agradeço pelo suporte financeiro.

Como não poderia deixar de ser, meus agradecimentos ao meu amor, Marco Antonio Abreu, por sua compreensão, apoio, admiração, amor e ajuda. Finalmente e principalmente, gostaria de agradecer aos meus pais, Candido Alberto e Lucia Georgette, por me ensinarem a apreciar a beleza do mundo e das pessoas à minha volta, olhando para estes sempre com os olhos e o coração abertos. Obrigada por todo o amor, compreensão, apoio, suporte, incentivo e exemplos que sempre me deram.

## RESUMO

O câncer de laringe é uma doença significativa em todo o mundo, cuja incidência continua aumentando, especialmente devido ao elevado consumo de tabaco e álcool, mostrando um claro efeito sinérgico. O diagnóstico desta doença costuma ser feito em estádios avançados, sendo associado a baixas taxas de sobrevivência. Portanto, tem sido crucial a busca por métodos moleculares de detecção em estádios iniciais da doença. Este trabalho teve três objetivos principais: comparar plasmas sanguíneos de fumantes saudáveis e com câncer de laringe por meio de eletroforese bidimensional para buscar biomarcadores, definir técnicas de separação protéica de plasma humano sem utilizar gel de poliacrilamida e verificar a diferença de concentração de elementos-traço em proteínas específicas de pacientes com e sem câncer. Perfis de géis bidimensionais foram obtidos e comparados usando o *software* BioNumerics. Em todos os perfis, foram observados mais de 50 *spots* proteicos entre pH 4-10 e massa molecular de 10-60 kDa. Poucas diferenças foram encontradas entre os pacientes com câncer e os fumantes saudáveis. No entanto, o aparecimento de três *spots* entre pI 7.2 and 7.6 e massas moleculares de 20.3, 42.5 e 44.8 kDa apenas em géis de pacientes com câncer de laringe sugere a expressão de proteínas que podem ser tanto uma resposta do organismo causada pelo câncer quanto expressas por este a fim de ajudar no desenvolvimento da doença. Estas foram identificadas por espectrometria de massa como componentes do sistema imune, reforçando a importância da resposta imune como alvo para compreensão e tratamento do câncer de laringe. O teste de novas metodologias livres de géis de poliacrilamida foram feitos combinando a focalização isoeletrica líquida e a cromatografia líquida de alta pressão. Estas mostraram capacidade de fracionar proteínas com padrão semelhante à separação já estabelecida em géis. Finalmente, foi detectada a presença de elementos-traço por espectrometria de massa com fonte de plasma induzido em proteínas isoladas pela primeira técnica utilizada de plasmas de pacientes com e sem câncer de laringe. Dois elementos traço, Pb e Cr, conhecidos por serem carcinogênicos e que se encontram no tabaco foram observados em todas as proteínas analisadas. Uma vez que há vários estudos indicando o papel de elementos-traço em processos biológicos, é possível inferir que estes tenham efeito direto ou indireto no processo de carcinogênese, podendo ser crucial para o desenvolvimento desta doença.

**Palavras-chave:** câncer de laringe; proteômica; sistema imune; plasma; 2D-PAGE.

## ABSTRACT

Laryngeal cancer is a significant disease worldwide which incidence remains increasing, especially due to elevated tobacco and alcohol consumption, which have a synergistic effect. Diagnosis is usually done at advanced-stages, which is associated with poorer survival rates. Therefore, the search for a screening method has been crucial. This work had three main objectives: to compare plasmas of healthy smokers and patients with laryngeal cancer by two dimensional electrophoresis in order to search for biomarkers, to define plasma protein separation techniques without using polyacrylamide gels, and to determine the concentration of trace elements in specific proteins of patients with and without laryngeal cancer. Two dimensional gel profiles were obtained and compared against each other using the BioNumerics software. In all profiles, over 50 protein spots were observed around pH 4-10 from molecular weight of 10-60 kDa. Few differences were found among the cancer and control patients. However, the appearance of three spots gathered between pI 7.2 and 7.6 and molecular weights of 20.3, 42.5 and 44.8 kDa in gels only from patients with cancer suggests the expression of proteins either caused by the cancer or maybe that aids in the disease development. These were identified by mass spectrometry as immune system components, reinforcing the importance of the immune response as target in the understanding and treatment of laryngeal cancer. Experiments to test the methods free from polyacrylamide gels were done by combining liquid isoelectric focusing and high performance liquid chromatography. These showed the ability to fractionate proteins with the same pattern as two dimensional electrophoresis. Finally, the presence of trace elements in specific proteins of patients with and without cancer separated by the first technique used was determined by inductively coupled plasma mass spectrometry. Two elements, Pb and Cr, known to be carcinogenic and present in tobacco were observed in all ten proteins analyzed. Once there are many studies indicating the role of trace elements in biological processes, it is possible to infer that these have direct or indirect effect in the carcinogenesis progress, and might be crucial to the development of this disease.

**Key words:** laryngeal cancer; proteomics; 2D PAGE; immune system; human plasma.

## SUMÁRIO

1. Introdução	1
1.1. Câncer	1
1.1.1. O que é câncer?	1
1.1.2. Epidemiologia	3
1.1.3. Etiologia	5
1.1.4. Mecanismos moleculares do desenvolvimento de carcinomas	7
1.1.5. Detecção de tumores	10
1.1.6. Classificação de tumores malignos	11
1.2. Câncer de laringe	13
1.2.1. Definição e anatomia do órgão	13
1.2.2. Epidemiologia	14
1.2.3. Etiologia	16
1.2.4. Sintomas, diagnóstico e tratamento	17
1.3. Sistema imune	18
1.3.1. Sistema complemento	21
1.3.2. Imunologia do câncer	23
1.4. Proteômica	26
1.4.1. Métodos proteômicos	26
1.4.2. Proteômica de câncer	29
1.4.3. Metaloproteômica	30
1.4.4. Proteômica de plasma sanguíneo	32
2. Objetivos	34
2.1. Objetivos específicos	34
3. Material e métodos	35
3.1. <i>In gel</i>	35
3.1.1. Descrição das amostras de plasma	35
3.1.2. Extração de plasma	35
3.1.3. Quantificação de proteínas	36

3.1.4. Preparação da amostra	36
3.1.5. SDS-PAGE	36
3.1.6. Focalização isoeletrica	37
3.1.7. 2D-PAGE	37
3.1.8. Análise das imagens	38
3.1.9. Preparação dos <i>spots</i> para análises de espectrometria de massa	39
3.1.10. Espectrometria de massa	40
3.1.10.1. Análises <i>in silico</i> e busca em bancos de dados	41
3.2. <i>Gel free</i>	43
3.2.1. Preparação da amostra	43
3.2.2. Focalização isoeletrica líquida	43
3.2.3. Cromatografia líquida de alta pressão	44
3.3. Análise por ICP-MS	46
4. Resultados e discussão	48
4.1. <i>In gel</i>	48
4.1.1. <i>Spots</i> comuns entre amostras com câncer e normais	56
4.1.2. <i>Spots</i> diferenciais das amostras com câncer	58
4.2. <i>Gel free</i>	60
4.3. Metaloproteômica	69
5. Conclusões	77
6. Perspectivas	78
Referências	79
Anexo I – Aprovação do comitê de ética	104
Anexo II – Artigos publicados e submetidos durante o mestrado	105
Anexo III – Artigo pronto para submissão	134

## LISTA DE FIGURAS

<i>Figura 1</i>	Número aproximado de casos novos e de mortes por câncer em 2002 e estimativa para 2020.	1
<i>Figura 2</i>	Comparação entre os tipos mais comuns de câncer em países mais e menos desenvolvidos em 2000, separado por sexo. NHL = Non-Hodking Lymphoma.	3
<i>Figura 3</i>	Tipos de câncer mais incidentes na população brasileira estimados para 2008, exceto câncer de pele não-melanoma.	4
<i>Figura 4</i>	Aumento multiplicativo no risco relativo de câncer de laringe consequente do consumo de álcool e cigarro (as cores representam aproximadamente a progressão da duplicação do risco ao aumento da exposição).	7
<i>Figura 5</i>	Imagem de ressonância magnética da cabeça e pescoço, secção sagital. (1) Cavidade nasal, (2) nasofaringe, (3) faringe, (4) laringe, (5) língua, (6) coluna vertebral, (7) medula espinhal, (8) epiglote, (9) cartilagem cricóide, (10) membrana cricotraqueal, (11) traquéia.	14
<i>Figura 6</i>	Taxa de incidência de câncer de laringe padronizada por idade. Dados mostrados por 100,000 para cada sexo.	15
<i>Figura 7</i>	Resposta imune humoral mediada por anticorpos secretados por plasmócitos.	19
<i>Figura 8</i>	Resposta imune humoral primária e secundária.	20
<i>Figura 9</i>	Visão esquemática da cascata do complemento. As três vias de ativação são iniciadas por diferentes fatores, que levam à mesma atividade enzimática, com suas três principais consequências.	22
<i>Figura 10</i>	Consequências da ativação do sistema complemento.	23
<i>Figura 11</i>	Modelo da função de células da imunidade inata e adquirida durante inflamação associada ao desenvolvimento do câncer.	24
<i>Figura 12</i>	Métodos de ionização para peptídeos. (A) MALDI e (B) ESI.	27
<i>Figura 13</i>	Analisador de massa do tipo TOF, onde íons são acelerados e separados ao longo de um tubo de acordo com sua velocidade, refletidos e detectados.	28



<i>Figura 14</i>	Fluxograma das estratégias de execução das análises proteômicas <i>in gel</i> .	42
<i>Figura 15</i>	Fluxograma das estratégias de execução das análises proteômicas <i>gel free</i> .	45
<i>Figura 16</i>	Fluxograma das estratégias de execução das análises de elementos traço por ICP-MS.	47
<i>Figura 17</i>	SDS-PAGE 12,5% com 50 µg de cada amostra com câncer de laringe (LSCC 1, 2 e 4) e sem câncer (C – controle 5, 6, 7, 8, 9 e 10). MM = marcador molecular.	49
<i>Figura 18</i>	Géis bidimensionais escolhidos como referência do grupo de amostras com câncer (A) e do grupo de amostras controle (B). As proteínas identificadas estão circuladas.	50
<i>Figura 19</i>	Imagem gerada pelo BioNumerics da sobreposição dos géis de referência com câncer (em azul) e sem câncer (em laranja).	51
<i>Figura 20</i>	2D-PAGE de pacientes com câncer ilustrando proteínas diferenciais indicadas por setas.	52
<i>Figura 21</i>	Histograma de <i>spots</i> seqüenciados isolados de amostras com e sem câncer.	53
<i>Figura 22</i>	Valor de correlação obtido comparando réplicas técnicas de amostras com câncer. Nos eixos x e y, valores do volume dos <i>spots</i> do plasma de um mesmo paciente. O $R^2$ representa o valor da linha de tendência para os <i>spots</i> .	54
<i>Figura 23</i>	Valor de correlação obtido comparando réplicas técnicas de amostras sem câncer. Nos eixos x e y, valores do volume dos <i>spots</i> do plasma de um mesmo paciente. O $R^2$ representa o valor da linha de tendência para os <i>spots</i> .	54
<i>Figura 24</i>	Cromatograma da HPLC de plasma de pessoa saudável não fumante. Fração de pI 3-4 separada por LIEF. A linha tracejada corresponde ao gradiente linear de acetonitrila (0-100%).	60
<i>Figura 25</i>	Cromatograma da HPLC de plasma de pessoa saudável não fumante. Fração de pI 4-5 separada por LIEF. A linha tracejada corresponde ao gradiente linear de acetonitrila (0-100%).	61
<i>Figura 26</i>	Cromatograma da HPLC de plasma de pessoa saudável não fumante.	61

- Fração de pI 5-6 separada por LIEF. A linha tracejada corresponde ao gradiente linear de acetonitrila (0-100%).
- Figura 27* Cromatograma da HPLC de plasma de pessoa saudável não fumante. 62  
Fração de pI 6-7 separada por LIEF. A linha tracejada corresponde ao gradiente linear de acetonitrila (0-100%).
- Figura 28* Cromatograma da HPLC de plasma de pessoa saudável não fumante. 62  
Fração de pI 7-10 separada por LIEF. A linha tracejada corresponde ao gradiente linear de acetonitrila (0-100%).
- Figura 29* da HPLC de plasma de fumante saudável. Fração de pI 3-4 separada 63  
por LIEF. A linha tracejada corresponde ao gradiente linear de acetonitrila (0-100%).
- Figura 30* Cromatograma da HPLC de plasma de fumante saudável. Fração de pI 63  
4-5 separada por LIEF. A linha tracejada corresponde ao gradiente linear de acetonitrila (0-100%).
- Figura 31* Cromatograma da HPLC de plasma de fumante saudável. Fração de pI 64  
5-6 separada por LIEF. A linha tracejada corresponde ao gradiente linear de acetonitrila (0-100%).
- Figura 32* Cromatograma da HPLC de plasma de fumante saudável. Fração de pI 64  
6-7 separada por LIEF. A linha tracejada corresponde ao gradiente linear de acetonitrila (0-100%).
- Figura 33* Cromatograma da HPLC de plasma de fumante saudável. Fração de pI 65  
7-10 separada por LIEF. A linha tracejada corresponde ao gradiente linear de acetonitrila (0-100%).
- Figura 34* Cromatograma da HPLC de plasma de paciente com câncer. Fração de 66  
pI 3-4 separada por LIEF. A linha tracejada corresponde ao gradiente linear de acetonitrila (0-100%).
- Figura 35* Cromatograma da HPLC de plasma de paciente com câncer. Fração de 66  
pI 4-5 separada por LIEF. A linha tracejada corresponde ao gradiente linear de acetonitrila (0-100%).
- Figura 36* Cromatograma da HPLC de plasma de paciente com câncer. Fração de 67  
pI 5-6 separada por LIEF. A linha tracejada corresponde ao gradiente linear de acetonitrila (0-100%).
- Figura 37* Cromatograma da HPLC de plasma de paciente com câncer. Fração de 67

- pI 6-7 separada por LIEF. A linha tracejada corresponde ao gradiente linear de acetonitrila (0-100%).
- Figura 38* Cromatograma da HPLC de plasma de paciente com câncer. Fração de pI 7-10 separada por LIEF. A linha tracejada corresponde ao gradiente linear de acetonitrila (0-100%). 68
- Figura 39* Média de Cr nos *spots* diferenciais (1, 2 e 3) de amostras de pacientes com câncer. 70
- Figura 40* Média de Pb nos *spots* diferenciais (1, 2 e 3) de amostras de pacientes com câncer. 70
- Figura 41* Média de cromo (Cr) em pacientes saudáveis e com câncer em cada *spot* controle removido de gel bidimensional. 71
- Figura 42* Média de chumbo (Pb) em pacientes saudáveis e com câncer em cada *spot* controle removido de gel bidimensional. 72

**LISTA DE TABELAS**

<i>Tabela 1</i>	Tipos de câncer cuja incidência é aumentada pelo fumo.	6
<i>Tabela 2</i>	Definições usadas pelo sistema TNM de classificação para tumores malignos.	12
<i>Tabela 3</i>	Tabela com números, características, número de acesso no UniProt e indentificações dos <i>spots</i> . MOWSE <i>score</i> é baseado no número das massas peptídicas sequenciadas com suas correspondentes no banco de dados (MASCOT, <a href="http://www.matrixscience.com/help/scoring-help.html">http://www.matrixscience.com/help/scoring-help.html</a> ). O modo de sequenciamento <i>de novo</i> foi por meio de MALDI-TOF e o CID por LC-ESI-MS.	55
<i>Tabela 4</i>	Agentes cancerígenos no tabaco e na sua fumaça.	75

**ABREVIATURAS E DEFINIÇÕES**

%	<i>Porcentagem</i>
µg	<i>Microgramas</i>
µL	<i>Microlitros</i>
µm	<i>Micrometro</i>
AGP	<i>Alpha-1-acid glycoprotein</i>
AJCCS	<i>American Joint Committee for Cancer Staging</i>
apoA-I	<i>Apoproteína A-I</i>
APS	<i>Ammonium persulfate</i>
BSA	<i>Bovine serum albumin</i>
CDK	<i>Cyclin-dependent kinase</i>
CHAPS	<i>3-[(3-Cholamidopropyl)-Dimethylammonio]-1-Propane Sulfonate</i>
cm	<i>Centímetros</i>
DTT	<i>Dithiothreitol</i>
EGFR	<i>Epithelial growth factor receptor</i>
g	<i>Gramas</i>
h	<i>Horas</i>
HBV	<i>Vírus da hepatite B</i>
HCV	<i>Vírus da hepatite C</i>
HDL	<i>High density lipoprotein</i>
HNSCC	<i>Head and Neck Squamous Cell Carcinoma</i>
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
HPT	<i>Haptoglobina</i>
HPV	<i>Papilomavirus humano</i>
Hz	<i>Hertz</i>
ICP-MS	<i>Inductively coupled plasma mass spectrometry</i>
Ig	<i>Imunoglobulina</i>
INCA	<i>Instituto Nacional de Câncer</i>
IPG	<i>Immobilized pH Gradient</i>
kDa	<i>Kilodaltons</i>
LCAT	<i>Lecithin:cholesterol acyltransferase</i>
LC-ESI	<i>Liquid Chromatography-Electrospray Ionization</i>

LIEF	<i>Liquid Isoelectric Focusing</i>
LSCC	<i>Laryngeal Squamous Cell Carcinoma</i>
M	<i>Molar</i>
m/z	<i>Razão entre massa e carga</i>
MAC	<i>Membrane attack complex</i>
MALDI-TOF	<i>Matrix assisted laser desorption/ionization-time of flight</i>
MDSC	<i>Myeloid derived suppressor cell</i>
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i>
min	<i>Minutos</i>
mL	<i>Mililitros</i>
Mm	<i>Milímetros</i>
mM	<i>Milimolar</i>
MS	<i>Mass spectrometry</i>
MW	<i>Molecular weight</i>
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NK	<i>Natural killers</i>
nm	<i>Nanometros</i>
° C	<i>Graus Celsius</i>
OMS	<i>Organização Mundial da Saúde</i>
PMF	<i>Peptide mass fingerprinting</i>
PTM	<i>Post translational modification</i>
SDS	<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>
SDS-PAGE	<i>Sodium Dodecyl Sulfate Poly-acrylamide Gel Electrophoresis</i>
TCA	<i>Ácido tricloroacético</i>
TEMED	<i>N, N, N', N'-tetramethylethylenediamine</i>
TFA	<i>Trifluoroacetic acid</i>
TNF	<i>Tumor necrosis factor</i>
UICC	<i>Union Internationale Contre le Cancer</i>
V	<i>Volts</i>
W	<i>Watts</i>
x g	<i>Força em “g” equivalente à aceleração da gravidade na superfície da Terra</i>

# 1 Introdução

## 1.1 Câncer

### 1.1.1 O que é câncer?

Câncer pode ser definido como um distúrbio nos processos que controlam proliferação, diferenciação e morte celular, afetando indivíduos de todos os grupos de idade em populações do mundo inteiro. A causa de uma em cada oito mortes se deve a essa doença, sendo que, em 2007, de um total de 58 milhões de mortes ocorridas no mundo, o câncer foi responsável por 7,6 milhões (GARCIA et al., 2007; SAÚDE, 2007). Em 2002, houve aproximadamente 10 milhões de novos casos de câncer no mundo, seis milhões de mortes e 24 milhões de pessoas vivendo com câncer (PARKIN et al., 2005). Estima-se que, em 2020, os números aumentarão para cerca de 15 milhões de novos casos, resultando em 12 milhões de mortes (Figura 1).



**Figura 1.** Número aproximado de casos novos e de mortes por câncer em 2002 e estimativa para 2020. Fonte: Azevedo *et al.*, 2006.

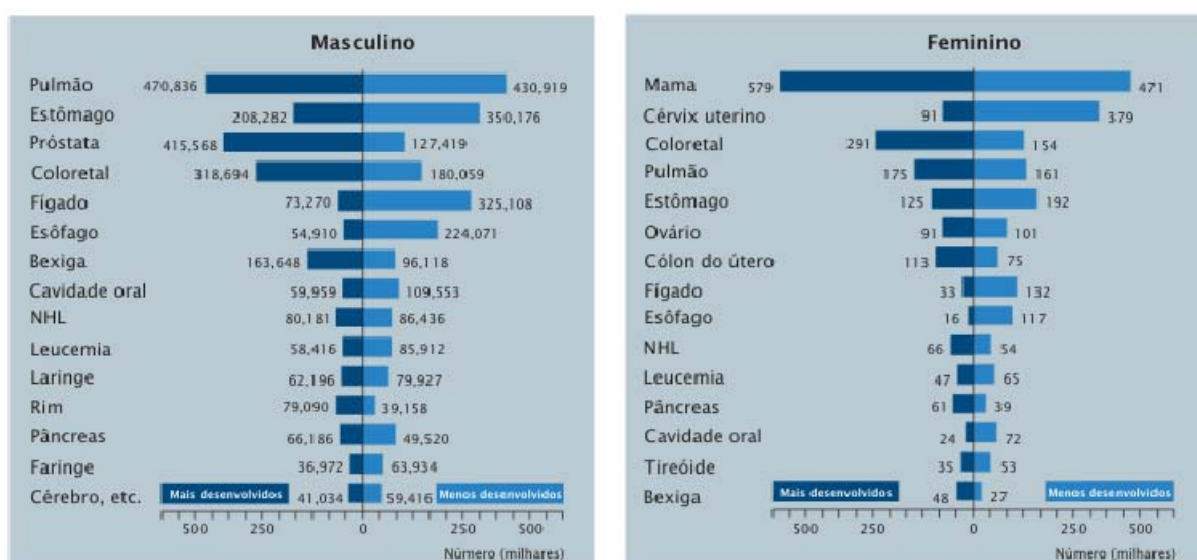
O câncer é caracterizado por alterações na expressão de múltiplos genes, levando à desregulação do ciclo normal de divisão e diferenciação celular. O resultado é um desequilíbrio na replicação e morte celular que favorece o crescimento de uma população de células (RUDDON, 2007). As características que diferenciam um tumor maligno de um benigno consistem nos níveis de diferenciação, taxa de crescimento, invasão local e capacidade de espalhar-se para outras partes do corpo, sendo este último conhecido por metástase. Tumores, também chamados de neoplasmas, benignos são normalmente compostos de células diferenciadas que se assemelham às células do tecido de origem, crescem e permanecem no lugar originado sem ter a capacidade de se infiltrar, invadir ou sofrer metástase (RUDDON, 2007). Normalmente, neoplasmas benignos não causam morte a não ser que interfiram com funções vitais devido à sua localização. Por exemplo, um tumor benigno que cresce na cavidade craniana pode comprimir as estruturas cerebrais levando, eventualmente, à morte (PORTH, 2007).

Por outro lado, neoplasmas malignos, ou cânceres, são caracterizados pela falta de diferenciação celular, alta taxa de crescimento, tendência invasiva e destrutiva a tecidos adjacentes, espalhando-se para sítios distantes e levando à morte do organismo caso este não receba tratamento adequado (PORTH, 2007). Câncer é o resultado de uma série de modificações genéticas que leva ao crescimento desregulado de uma célula, que a partir deste ponto, é denominada maligna (SCULLY *et al.*, 2000). Algumas dessas mutações podem ser herdadas, mas a maioria é adquirida após o nascimento, sendo estas, chamadas somáticas. Mutações que afetam proto-oncogenes, genes supressores de tumor ou enzimas de correção de DNA podem levar à transformação neoplásica (RUDDON, 2007). Os proto-oncogenes, quando ativados, levam à proliferação celular desregulada. Genes supressores de tumor, ao serem inativados ou suprimidos, geram a incapacidade da célula de checar pontos que controlam proliferação e diferenciação celular (SCULLY *et al.*, 2000; STEWART e KLEIHUES, 2003; RUDDON, 2007). Apesar de várias modificações serem necessárias para o desenvolvimento de um tumor, não se sabe se a ordem com que elas ocorrem tem influência, mas, de qualquer modo, o acúmulo de eventos é mais importante do que a ordem em que eles acontecem (MACDONALD *et al.*, 2004).



## 1.1.2 Epidemiologia

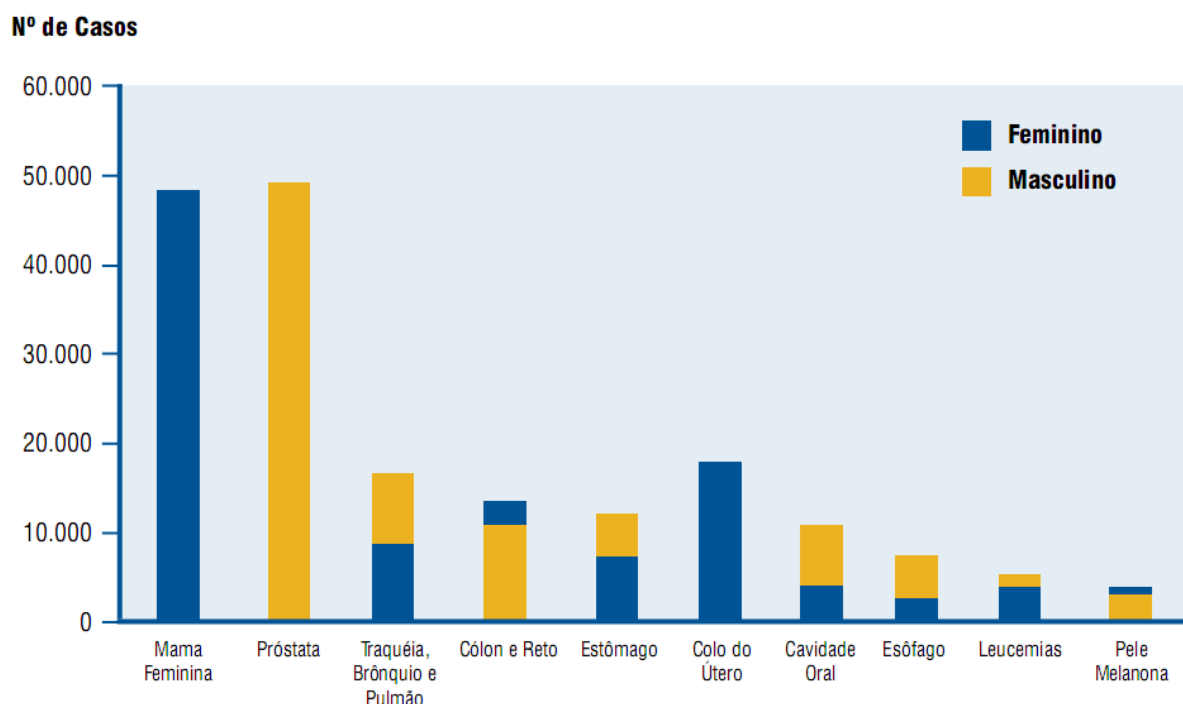
O câncer é uma das principais causas de morte no mundo e a distribuição dessa doença não é homogênea entre os países desenvolvidos e em desenvolvimento, sendo que tipos particulares de câncer exibem diferentes padrões de distribuição (Figura 2). Várias dessas diferenças se devem a fatores etiológicos, por exemplo, populações de países subdesenvolvidos são mais vulneráveis a tumores associados a agentes infecciosos. Por outro lado, em países desenvolvidos, outros tipos são mais incidentes devido ao estilo de vida (STEWART e KLEIHUES, 2003).



**Figura 2.** Comparação entre os tipos mais comuns de câncer em países mais e menos desenvolvidos em 2000, separado por sexo. NHL = Non-Hodking Lymphoma. Fonte: Stewart e Kleihues, 2003.

No Brasil, o número de mortes por câncer aumentou 24,7% entre homens e 18,6% entre mulheres no período de 1979 a 2004. De um modo geral, esse aumento é devido ao impacto da globalização econômica sobre as sociedades, redefinindo padrões de trabalho, nutrição e consumo. Simultaneamente, a melhoria das condições de vida dos indivíduos resulta no aumento da expectativa de vida e, conseqüentemente, eleva o número de idosos e a incidência de doenças, inclusive o câncer (AZEVEDO *et al.*, 2006). Em 2005, o câncer foi responsável pela morte de aproximadamente 190.000 pessoas no Brasil, sendo que 113.000 destas apresentavam-se com menos de 70 anos de idade. De acordo com o Instituto Nacional de Câncer (INCA), as estimativas para o ano de 2008 são de 466.730 novos casos de câncer. Os tipos mais incidentes, com exceção do câncer de pele não-melanoma, serão os cânceres de

próstata e de pulmão nos homens, e os de mama e de colo do útero nas mulheres (Figura 3). Este perfil acompanha os mesmos padrões observados no mundo, entretanto, o câncer de maior mortalidade em homens atualmente é o de vias aéreas inferiores e, em mulheres, o de mama (SAÚDE, 2007). A expectativa de distribuição dos novos casos de câncer, em 2008, entre os sexos masculino e feminino são de 231.860 para o primeiro e 234.870 para o último. Estima-se que o câncer de pele do tipo não-melanoma será o mais incidente na população brasileira, correspondendo a 115 mil novos casos, seguido pelos tumores de próstata (49 mil), mama feminina (49 mil), pulmão (27 mil), cólon e reto (27 mil), estômago (22 mil) e colo do útero (19 mil). Quanto à distribuição geográfica dos casos novos, esta é heterogênea entre os estados e as capitais do Brasil. De um modo geral, as regiões Sul e Sudeste apresentam as maiores taxas, enquanto as regiões Norte e Nordeste, as menores. A região Centro-Oeste apresenta taxas intermediárias (SAÚDE, 2007).



**Figura 3.** Tipos de câncer mais incidentes na população brasileira estimados para 2008, exceto câncer de pele não-melanoma.

Fonte: Saúde, 2007.

### 1.1.3 Etiologia

Em muitos casos, as causas do câncer não estão claramente definidas, mas é sabido que tanto fatores externos quanto internos têm influência direta no desenvolvimento de tumores. Apesar de poder ocorrer em qualquer grupo de idade, o câncer é normalmente considerado uma doença do envelhecimento. Tumores em qualquer lugar do corpo são diagnosticados em média aos 67 anos, enquanto que 76% de todos os cânceres são diagnosticados a partir dos 55 anos (RUDDON, 2007).

A informação sobre as causas do câncer provém de pesquisas dos padrões da doença em populações humanas e, também, da indução de tumores em cobaias após serem tratadas com agentes carcinogênicos (STEWART e KLEIHUES, 2003; RUDDON, 2007). Os dois modelos de estudo sobre carcinogênese historicamente mais significativos são de indução de câncer de pele em camundongos (modelo de “pintar a pele”) e a indução de câncer de fígado em ratos (BERENBLUM, 1981; WEINSTEIN, 1988; RUDDON, 2007). Entre os agentes carcinogênicos, estão tabaco, amianto, aflatoxinas e radiação ultravioleta (STEWART e KLEIHUES, 2003). Cerca de 20% dos casos de câncer estão associados com infecções crônicas, sendo mais significativas as causadas pelos vírus da hepatite B e C (HBV, HCV) (ZUR HAUSEN, 1991; GICHNER, 1995), papilomavirus (HPV) (MUÑOZ, 2000) e da bactéria *Helicobacter pylori* (FORMAN *et al.*, 1991; UEMURA *et al.*, 2001). Além disso, é cada vez maior o reconhecimento do papel dos fatores ambientais associados ao estilo de vida, incluindo alimentação, atividade física e consumo de álcool e fumo no desenvolvimento do câncer. Suscetibilidade genética, hormônios e mecanismos imunológicos também podem alterar significativamente os riscos dos fatores externos (STEWART e KLEIHUES, 2003).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) classificou o tabaco como o maior agente cancerígeno possível de prevenção de morte. O consumo de tabaco causa, além do câncer de pulmão, tumores na laringe, pâncreas, rins e bexiga (Tabela 1). Este, quando consumido concomitantemente com álcool, aumenta a incidência de carcinomas da cavidade oral e do esôfago. Na maioria dos países desenvolvidos, o tabaco é responsável por até 30% do aparecimento dos tumores malignos (STEWART e KLEIHUES, 2003).

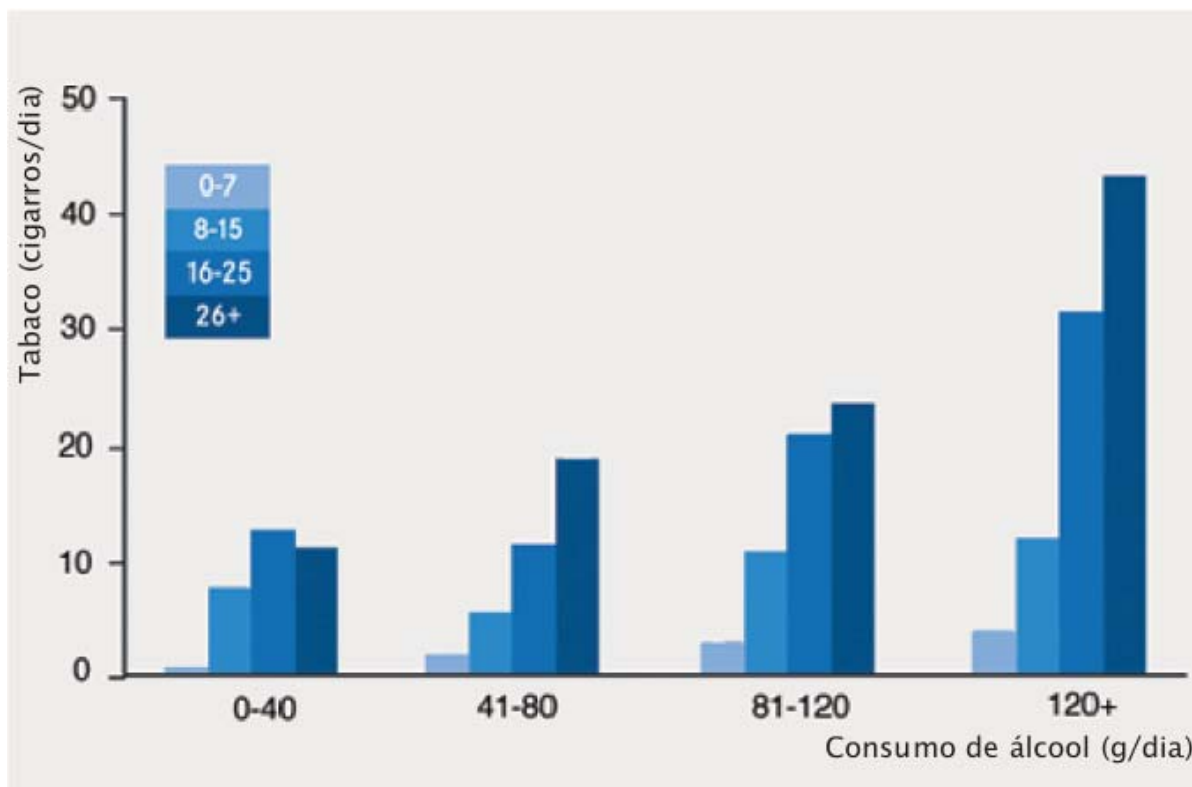
**Tabela 1.** Tipos de câncer cuja incidência é aumentada pelo fumo.

Cânceres positivamente associados com fumo	Sexo	Mortalidade padronizada por 100,000/ano		Risco relativo	Risco absoluto de excesso por 100,000/ano	Proporção atribuída (%) <sup>*</sup>
		Não fumante	Fumante			
Câncer de pulmão	M	24	537	22.4	513	87
	F	18	213	11.9	195	77
Câncer do aparelho respiratório	M	1	27	24.5	26	89
	F	2	10	5.6	8	58
Câncer de bexiga e órgãos urinários	M	18	53	2.9	35	36
	F	8	21	2.6	13	32
Câncer pancreático	M	18	38	2.1	20	25
	F	16	37	2.3	21	29
Câncer do esôfago	M	9	68	7.6	59	66
	F	4	41	10.3	37	74
Câncer renal	M	8	23	3	15	37
	F	6	8	1.4	2	11

Estudo americano de câncer. Homens e mulheres com 35 anos ou mais. \*Proporção atribuída é a proporção de mortes causadas pela doença especificada, assumindo que 30% da população são fumantes e que todo o risco em excesso para os fumantes se deve ao fumo.

Fonte: Stewart e Kleihues, 2003.

O consumo concomitante de bebidas alcoólicas e tabaco mostra uma forte interação sinérgica na etiologia de cânceres da cavidade oral, faringe, laringe e esôfago. O risco para consumidores excessivos de ambos os produtos tende a aumentar de forma multiplicativa ao invés de aditiva. Assim, o risco para estes é maior do que o produto dos riscos atribuídos respectivamente a consumidores excessivos de álcool e de tabaco separadamente (Figura 4) (BLOT *et al.*, 1988; MERLETTI *et al.*, 1989; FRANCESCHI *et al.*, 1990; STEWART e KLEIHUES, 2003).



**Figura 4.** Aumento multiplicativo no risco relativo de câncer de laringe conseqüente do consumo de álcool e cigarro (as cores representam aproximadamente a progressão da duplicação do risco ao aumento da exposição). Fonte: Barnes *et al.*, 2005.

## 1.1.4 Mecanismos moleculares do desenvolvimento de carcinomas

Pesquisas usando modelos de estudo (camundongos e ratos) sobre desenvolvimento de tumores mostram evidências de transformações malignas que ocorrem em etapas específicas do ciclo celular. A maior parte dos agentes carcinogênicos danifica o DNA, tendo oncogenes e genes supressores de tumor como alvo, levando à ativação dos primeiros e à inativação dos segundos (STEWART e KLEIHUES, 2003; RUDDON, 2007). Desta forma, foram designados três estágios no desenvolvimento de um câncer: iniciação, que corresponde ao dano e ao subsequente potencial de divisão das células expostas; progressão, que denota múltiplos ciclos de replicação celular da célula iniciada tornando-se autônoma em crescimento; e metástase, que é o espalhamento das células malignas para outros locais além daquele de origem (STEWART e KLEIHUES, 2003).

Alguns genes e as mudanças correspondentes causadas por eles são comuns para vários tipos de tumor. No entanto, cada tipo de câncer tem um conjunto de alterações genéticas específicas. Existe uma heterogeneidade clara entre tumores do mesmo tipo, ou seja, não necessariamente todos os tumores exibem as mesmas mudanças gênicas estabelecidas para o tipo de câncer em questão. O surgimento de uma população de células malignas deve-se ao efeito cumulativo de várias mudanças gênicas. Os genes designados como oncogenes e supressores de tumor têm sido identificados em termos de sua função biológica. Eles estão entre os genes que facilitam a transmissão de sinais que controlam o crescimento da célula, mediam a divisão, diferenciação ou morte celular e que estão envolvidos em processos de reparo de DNA e outros que mantêm a integridade da informação genética (STEWART e KLEIHUES, 2003). Assim, as alterações gênicas que levam ao desenvolvimento do câncer incluem a ativação de oncogenes e/ou inativação de genes supressores de tumor (RODENHUIS e SLEBOS, 1992).

Proto-oncogenes são genes normais que, ao sofrerem mutação, se tornam oncogenes. Esses dois termos costumam ser usados de modo intercambiável. Tais genes são ativados por agentes carcinogênicos por meio de diversos mecanismos, como substituição de bases no DNA (mutações pontuais), translocação cromossômica (rearranjo de partes entre cromossomos diferentes) e amplificação gênica (que corresponde a um aumento no número de cópias de um gene resultante da replicação redundante de uma mesma seqüência de DNA) (SCULLY *et al.*, 2000). Acredita-se que oncogenes estão envolvidos em funções celulares básicas relacionadas ao controle de proliferação e diferenciação celular. Assim, mutações em um desses genes resultam na sua ativação anormal, promovendo o crescimento celular e levando à transformação maligna. A presença de pelo menos um oncogene tem sido confirmada na maioria dos tumores já estudados (MACDONALD *et al.*, 2004). Exemplos de oncogenes mais comuns são *ras* (BOS, 1989), *myc* (HANN e EISENMAN, 1984), *src* (WASILENKO *et al.*, 1991) e *bcl-2* (REED, 1994).

Alterações frequentemente encontradas em tumores humanos e modelos animais são mutações nos oncogenes da família *ras* (RODENHUIS e SLEBOS, 1992). Os três tipos mais comuns envolvidos em neoplasmas humanos são H-*ras*, K-*ras* e N-*ras*, que codificam proteínas similares de 21 kDa, que se ligam a GTP/GDP (BOS, 1989). Essas proteínas podem ter dois estados: ativo, quando o GTP está ligado a ela, e inativo, após o GTP ter sido hidrolisado para GDP. A proteína *ras* é estimulada por fatores de crescimento, levando ao desprendimento da molécula de GDP e sua ligação à molécula de GTP. Com isso, a *ras* ativada gera uma cascata de efetores que, por sua vez, pode ativar fatores de transcrição

estimulando a expressão gênica e a proliferação celular (RUDDON, 2007). Mutações desse gene previnem que este seja inativado, ou seja, que ele se ligue ao GDP (BOS, 1989). Apesar de mutações nos genes da família *ras* serem encontradas em uma variedade de tipos de câncer, a incidência de tais mutações varia muito. Por exemplo, as incidências mais altas são encontradas em carcinomas do pâncreas (90%), cólon e tireóide (50%) e pulmão (30%) (BOS, 1989; RODENHUIS e SLEBOS, 1992; RUDDON, 2007).

Além de *ras*, existe a família *myc*, cujo papel é essencial na diferenciação e proliferação celular (RUDDON, 2007), sendo que seus membros mais estudados são *c-myc*, *N-myc* e *L-myc* (RYAN e BIRNIE, 1996). Alterações nesses genes podem ser causadas por translocação cromossômica, amplificação, inserção e deleção (HANN e EISENMAN, 1984). A expressão da *c-myc* é mais alta em células que estão sofrendo proliferação e diminui quando células entram na fase de diferenciação. Portanto, pode ser necessária a regulação de sua expressão para que a divisão celular cesse e a célula comece a se diferenciar (RUDDON, 2007). Apesar da sua conhecida ação como fator de transcrição, também há observações do *myc* como indutor de apoptose (RYAN e BIRNIE, 1996). Tal paradoxal habilidade consiste na capacidade da proteína de estimular a proliferação da morte celular. As *myc* mantêm a capacidade de estimular a proliferação e de ativar a via apoptótica induzida pela p53 (RUDDON, 2007).

Uma terceira classe gênica consiste nas *src*. Genes desta família podem agir em várias vias de transdução de sinal que facilitam ou modulam a proliferação, sobrevivência e adesão celular, metástase e tráfico intracelular (RUDDON, 2007). O produto deste gene é uma tirosina quinase que traduz sinais nos processos mencionados acima. A regulação do *src* é feita por mecanismos como fosforilação e interação entre dois domínios homólogos específicos das proteínas desta família, chamados SH2 e SH3 (MACDONALD *et al.*, 2004).

Finalmente, o proto-oncogene *bcl-2*, acrônimo de *B-cell lymphoma* (linfoma das células B), onde foi primeiramente identificado, é ativado por translocação cromossômica (REED, 1994). Quando mutado, sua ação é inibir a apoptose, levando a um acúmulo de alterações gênicas que são propagadas pela divisão celular e contribuem para o desenvolvimento de tumor (SINICROPE *et al.*, 1995). A superexpressão de *bcl-2* tem sido observada em várias alterações associadas a apoptose, incluindo geração de radicais livres de oxigênio, mudanças na membrana plasmática, alterações na distribuição de íons ( $\text{Ca}^+$  e  $\text{H}^+$ ), ativação de caspases e perda do potencial transmembrânico mitocondrial (KROEMER, 1997). Apesar de ter como função principal a inibição de apoptose de linfócitos, o *bcl-2* já foi

encontrado em outros tecidos, como epitélio gastrointestinal, pele e sistema nervoso, sugerindo uma maior importância para este gene (RUDDON, 2007).

O outro grupo de genes que tem papel importante no processo cancerígeno consiste na classe de genes supressores de tumor (MURAKAMI *et al.*, 1991; HUANG *et al.*, 1992). Estes, ao serem perdidos ou inativados, acabam viabilizando o desenvolvimento de tumores. Seus produtos podem agir de diferentes maneiras, já que alguns são encontrados no núcleo e atuam como fatores de transcrição, outros ocorrem na membrana celular e agem em transdução de sinal ou adesão celular, e ainda outros estão envolvidos no reparo do DNA (RUDDON, 2007). Entre os genes supressores de tumor encontram-se *rb* (tem papel na inibição do progresso do ciclo celular), *p53* (gene onde mais mutações são registradas em carcinomas, pode induzir apoptose ou apenas impedir a proliferação e transformação da célula quando seu DNA sofre danos) e *BCRA1* e *BCRA2* (envolvidos em vias de reparo do DNA observadas principalmente em câncer de mama e de ovário) (STEWART e KLEIHUES, 2003; MACDONALD *et al.*, 2004; RUDDON, 2007).

Além das causas de câncer já mencionadas, é importante citar aqueles tumores causados por herança genética. Fatores genéticos que são determinantes primários do desenvolvimento de câncer correspondem a 5 a 10% dos pacientes (MACDONALD *et al.*, 2004). Normalmente, os defeitos herdados que levam ao câncer são causados por deficiências nas vias de reparo de DNA, alterações em enzimas que metabolizam drogas e toxinas ambientais e polimorfismos em genes que regulam a utilização de certos nutrientes essenciais como ácido fólico (RUDDON, 2007).

## 1.1.5 Detecção de tumores

Os métodos usados no diagnóstico e na classificação do câncer são determinados basicamente pela localização e tipo de tumor. Vários recursos para detectar um câncer estão disponíveis, como raio-X, endoscopia, ultra-som, ressonância magnética, tomografia computadorizada e exames de sangue e urina com marcadores específicos (BARNES *et al.*, 2005). Além disso, os marcadores moleculares, ou biomarcadores, são antígenos expressos pelo tumor ou substâncias liberadas por células normais do organismo em resposta ao câncer, que podem ser usados tanto para diagnóstico quanto para monitorar o progresso da doença, prevenir que esta retorne e verificar a eficácia do tratamento utilizado. Os marcadores mais



utilizados na prática clínica são as glicoproteínas antígeno próstata-específico (PSA), amplamente usado em pacientes homens para detectar câncer de próstata (STAMEY *et al.*, 1987; RAO *et al.*, 2008), CA-125 para câncer de ovário (BAST *et al.*, 1981; JANKOVIC e MILUTINOVIC, 2008) e antígeno carcinoembrionário (CEA) para monitorar a progressão e a resposta à terapia em pacientes com câncer colorretal (GOLD e FREEDMAN, 1965; DIAMANDIS, 2003; HAMDAM, 2007).

A maioria destes marcadores está em níveis elevados em tumores benignos e quase nenhum se encontra acima da média específica de cada marcador nos estádios iniciais de tumores malignos. Portanto, o valor dos marcadores encontrados até hoje é limitado, mas quase todos mostram uma associação com o curso clínico da doença, sendo seu uso de grande importância. Como o diagnóstico em estádios iniciais do câncer leva a tratamentos com melhores resultados, a busca por estes tem sido bastante intensa (PORTH, 2007; DAOUD, 2008).

## 1.1.6 Classificação de tumores malignos

Tumores malignos podem ser classificados em carcinomas ou sarcomas. Os primeiros possuem origem epitelial e os últimos, origem mesenquimal. A maioria surge de tecido epitelial, onde aqueles derivados de tecido estratificado escamoso são designados carcinomas de células escamosas. A determinação do local e origem de um neoplasma é importante por várias razões. Ao saber a localização de um tumor é possível inferir, por exemplo, sobre seu curso, a probabilidade e a rota de um espalhamento metastático, os efeitos deste em funções orgânicas e o tipo de tratamento utilizado para ter maior eficácia. O local de um tumor primário também pode determinar o modo de metástase e os órgãos alvo. Este critério é de extrema importância para definir o prognóstico do paciente (RUDDON, 2007).

Além destes critérios, uma linguagem padrão para descrever o alcance da doença a fim de auxiliar oncologistas no planejamento do tratamento e fornecer categorias para estimar o prognóstico foi estabelecida por duas agências: *Union Internationale Contre le Cancer* (UICC) e *American Joint Committee for Cancer Staging and End Results Reporting* (AJCCS) da Organização Mundial da Saúde (OMS). Ambas usam o sistema TNM de classificação para tumores malignos (RUDDON, 2007). Este sistema foi desenvolvido por Pierre Denoix entre 1943 e 1952. A UICC nomeou um Comitê de Nomenclatura e Estatística de Tumores em

1950 e adotou as definições gerais de extensão local dos tumores malignos sugeridas pela AJCCS como base para seu trabalho na classificação do estágio clínico. Por meio de publicações traduzidas para diversas línguas, o objetivo da UICC é alcançar o consenso na classificação da extensão anatômica do câncer (SOBIN e WITTEKIND, 2002).

O sistema TNM classifica a doença em estádios, avaliando três componentes: T define a extensão do tumor primário (em tamanho e local), N corresponde ao envolvimento de linfonodos regionais e M, a presença ou ausência de metástase. A definição do alcance da doença por estas categorias é chamada estadiamento (SOBIN e WITTEKIND, 2002; PORTH, 2007; RUDDON, 2007). Utiliza-se a adição de números a estes três componentes para indicar a extensão da doença maligna. As definições gerais usadas estão representadas na tabela 2.

**Tabela 2.** Definições usadas pelo sistema TNM de classificação para tumores malignos.

<b>T - Tumor Primário</b>	<b>N - Linfonodos Regionais</b>	<b>M - Metástase à Distância</b>
T0 – Não há evidência de tumor primário	N0 – Ausência de metástase em linfonodos regionais	M0 – Ausência de metástase à distância
T1, T2, T3, T4 – Tamanho crescente e/ou extensão local do tumor primário	N1, N2, N3 – Comprometimento crescente dos linfonodos regionais	M1 – Metástase à distância

Fonte: adaptado de Sobin e Wittekind, 2002.

Deste modo, temos uma generalização útil:

- **Estádio I** ( $T_1 N_0 M_0$ ) – Tumor primário está limitado ao órgão de origem. Não há evidência de extensão nodal ou vascular. O tumor pode ser removido por cirurgia.
- **Estádio II** ( $T_2 N_1 M_0$ ) – Tumor primário se estendeu para o tecido ao redor e linfonodos. O tumor é operável, mas, devido à extensão, pode não ser completamente removível por cirurgia.
- **Estádio III** ( $T_3 N_2 M_0$ ) – Tumor primário é grande e com estruturas fixadas. Linfonodos mais próximos estão envolvidos, podendo ter mais de 3 cm de diâmetro e fixados no tecido. Normalmente, o tumor não é removível por cirurgia, sendo que parte dele é deixada no local.

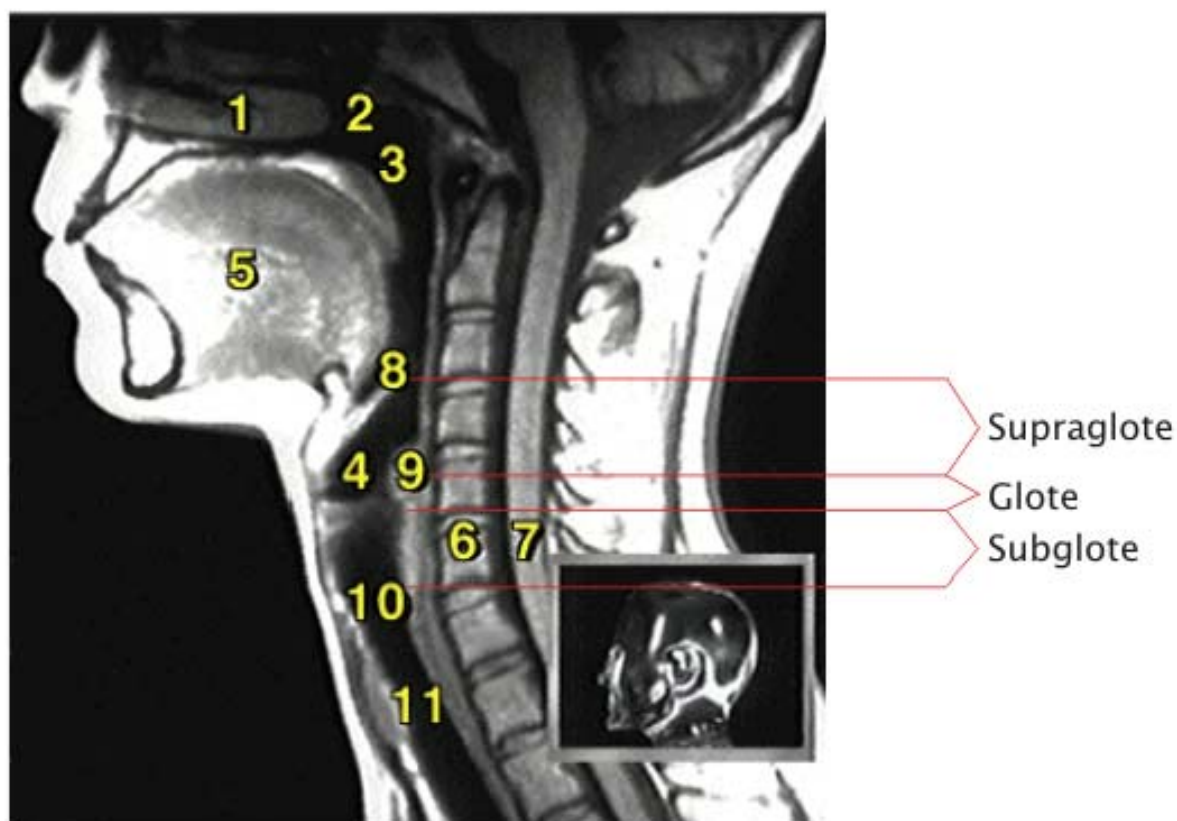
- **Estádio IV** (T<sub>4</sub> N<sub>3</sub> M<sub>+</sub>) – Tumor primário extenso, podendo ter mais de 10 cm de diâmetro. Tecidos profundos e ao redor já foram invadidos e linfonodos estão amplamente envolvidos. Há evidência de metástase à distância.

A classificação TNM, acoplada a outros métodos diagnósticos já mencionados, leva a uma melhor definição do status de um neoplasma, auxiliando a direção de um tratamento (PORTH, 2007; RUDDON, 2007).

## 1.2 Câncer de laringe

### 1.2.1 Definição e anatomia do órgão

A laringe é um órgão com funções de deglutição, respiração e fonação, composto por cartilagens, ligamentos, músculos e membrana mucosa que guarda a entrada para a traqueia, brônquios e pulmões e contém as cordas vocais. Ela começa na ponta da epiglote e se estende até a cartilagem cricóide (BARNES *et al.*, 2005). A laringe está dividida em três compartimentos (supraglote, glote e subglote), que formam a base para classificar tumores neste órgão (Figura 5). Tal separação é feita porque o risco de metástase associado a cada local é diferente, resultante da anatomia vascular e linfática distinta (KUFE *et al.*, 2003). O crescimento e o espalhamento de cânceres de laringe são determinados pelo local de origem e barreiras anatômicas dos diferentes compartimentos (BARNES *et al.*, 2005).



**Figura 5.** Imagem de ressonância magnética da cabeça e pescoço, secção sagital. (1) Cavidade nasal, (2) nasofaringe, (3) faringe, (4) laringe, (5) língua, (6) coluna vertebral, (7) medula espinhal, (8) epiglote, (9) cartilagem cricóide, (10) membrana cricotraqueal, (11) traquéia.

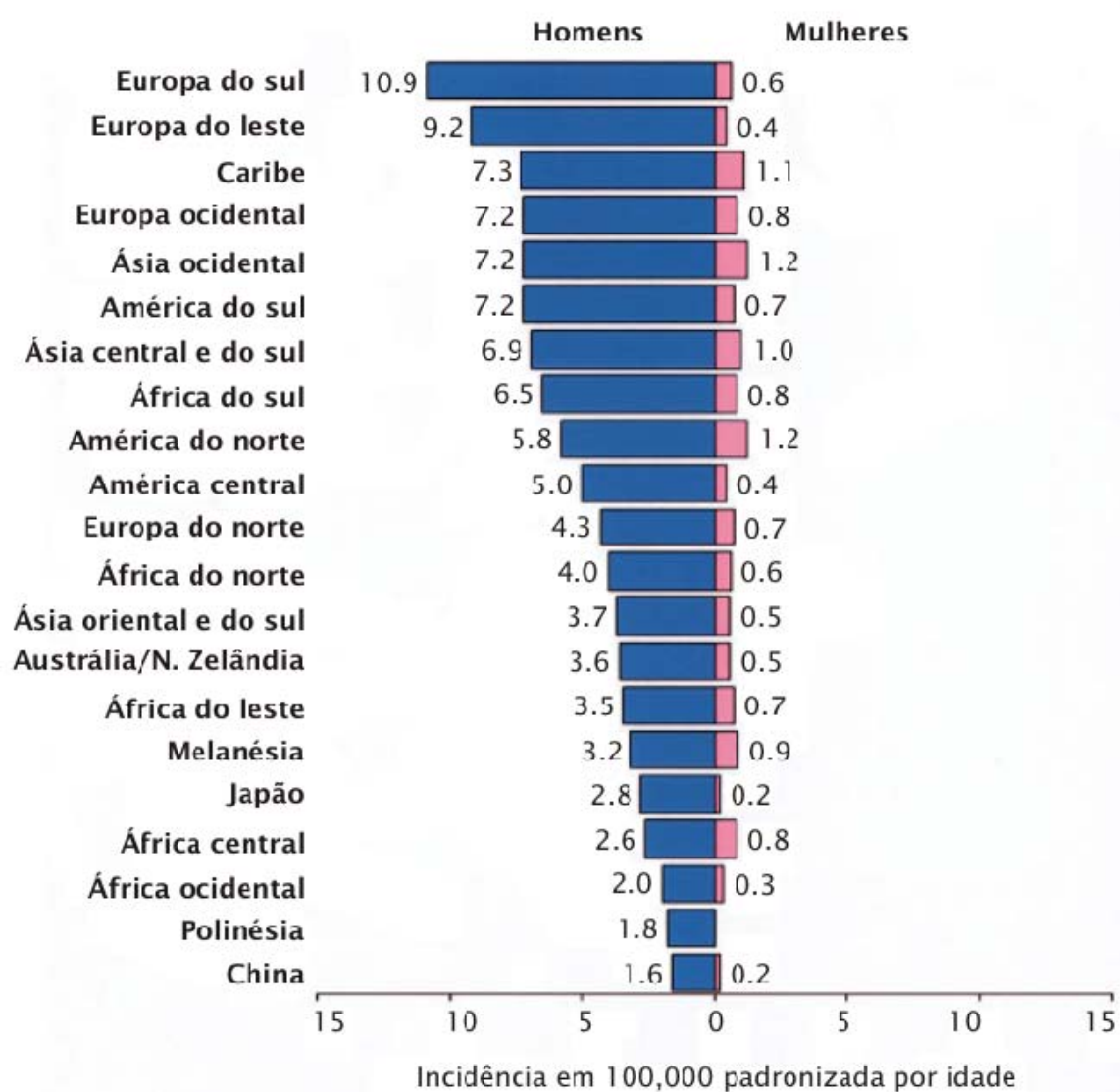
Fonte: adaptado de The Anatomy Project (PROJECT, 1997).

## 1.2.2 Epidemiologia

O câncer de laringe é considerado uma doença significativa em todo o mundo e é o segundo tipo de tumor mais comum do aparelho respiratório depois do câncer de pulmão (CATTARUZZA *et al.*, 1996). O principal tipo de neoplasia que afeta esse órgão é o carcinoma das células do epitélio escamoso ou pavimentoso (*squamous cell carcinoma – SCC*), correspondendo a 90% de todos os males que afetam a laringe (BARNES *et al.*, 2005). O SCC da laringe (LSCC) corresponde a 95% dos casos de câncer de laringe e é mais comum em homens que em mulheres (STEWART e KLEIHUES, 2003), com uma proporção de 7:1 (PARKIN *et al.*, 2005). Sua incidência é maior na Europa central e do sul, Uruguai, sul do Brasil e Argentina, sendo mais comum em áreas urbanas. Na Ásia ocidental, o câncer de laringe corresponde a 4.7% dos tumores em homens (Figura 6) (STEWART e KLEIHUES, 2003; PARKIN *et al.*, 2005). No entanto, aumenta cada vez mais em ambos os sexos devido

ao maior consumo de tabaco e álcool, que têm efeito sinérgico (STEWART e KLEIHUES, 2003). Este fator está claramente relacionado com a doença, sendo assim, possível ser reduzida com mudanças de hábitos (CATTARUZZA *et al.*, 1996; BARNES *et al.*, 2005).

Este tipo de câncer responde por cerca de um terço dos tumores da cabeça e pescoço nos países desenvolvidos (KUFÉ *et al.*, 2003) e a sobrevivência relativa de pacientes com câncer de laringe varia entre 60 e 70% na Europa e América do Norte, no entanto, é mais baixa em países em desenvolvimento (PARKIN *et al.*, 2005).



**Figura 6.** Taxa de incidência de câncer de laringe padronizada por idade. Dados mostrados por 100,000 para cada sexo.

Fonte: Parkin *et al.*, 2005.

### 1.2.3 Etiologia

Diferentes genótipos do papilomavírus humano (HPV) estão envolvidos na maioria dos SCCs do cérvix uterino, sendo um fator necessário, mas não suficiente para o desenvolvimento destes tumores. Alguns estudos mostraram que o HPV pode também ter um papel etiológico no LSCC. Em certos cânceres de laringe, foram registradas sequências de DNA de HPV integradas ao genoma do hospedeiro (CATTARUZZA *et al.*, 1996). Os carcinomas de laringe associados ao vírus têm os genótipos de HPV de alto risco, onde o HPV-16 é o mais frequente. No entanto, os dados sobre essa relação ainda estão incompletos. Outra comum causa do câncer de laringe é relacionada à exposição a materiais perigosos como amianto e pó de cimento, afetando frequentemente pessoas que trabalham em indústrias (CATTARUZZA *et al.*, 1996; GALE *et al.*, 2008). Entretanto, o tabaco consumido concomitantemente com o álcool é considerado há décadas como o maior causador de câncer de laringe. Várias pesquisas mostraram que o consumo de álcool e tabaco combinado apresenta um efeito sinérgico, sendo que o risco é aumentado de maneira multiplicativa ao invés de aditiva (Figura 4) (OLSEN *et al.*, 1985; MERLETTI *et al.*, 1989; FRANCESCHI *et al.*, 1990; CATTARUZZA *et al.*, 1996; ALTIERI *et al.*, 2002; TALAMINI *et al.*, 2002; BARNES *et al.*, 2005).

Inúmeras mudanças genéticas críticas para o progresso de SCC de cabeça e pescoço (*head and neck squamous cell carcinoma* – HNSCC), do qual o câncer de laringe faz parte, foram descritas, desde lesões pré-neoplásicas (também chamadas de carcinoma *in situ*, aquele que ainda não invadiu tecidos epiteliais mais profundos ou não se espalhou para outras partes do corpo) até tumores invasivos (ou lesões invasivas, que correspondem àquelas que se espalham para tecidos diferentes de onde foram originadas). Isto permitiu o delineamento de um modelo molecular de progressão da doença (CALIFANO *et al.*, 1996; FORASTIERE *et al.*, 2001). Para a formação do HNSCC, três alterações gênicas são necessárias: mutação da proteína supressora de tumor p53; inativação do p16, um inibidor da quinase ciclina-dependente (*cyclin-dependent kinase* – CDK), e superexpressão do receptor do fator de crescimento epitelial (*epithelial growth factor receptor* – EGFR) em 40%, 70% e 90% de todos os tumores orais, respectivamente (FORASTIERE *et al.*, 2001; CHIN *et al.*, 2004; BARNES *et al.*, 2005). Aproximadamente metade dos casos de HNSCC apresentou mutações no gene p53, cuja inativação torna o tumor mais resistente à radioterapia (KOCH *et al.*, 1996; MAO *et al.*, 2004) e resulta na progressão de lesões pré-invasivas para invasivas

(FORASTIERE *et al.*, 2001; BARNES *et al.*, 2005). Além do EGFR, o gene da ciclina D1, que ativa o ciclo de progressão celular, também é frequentemente superexpresso em estádios iniciais de cânceres de cabeça e pescoço (MAO *et al.*, 2004).

## 1.2.4 Sintomas, diagnóstico e tratamento

De uma maneira geral, concorda-se que, quanto mais cedo o diagnóstico, maior a taxa de sobrevivência e de preservação da laringe. Os tumores diagnosticados em estádios iniciais costumam ser aqueles que surgem na glote (BARNES *et al.*, 2005). Isso acontece porque qualquer mudança na corda vocal gera sintomas como rouquidão ou disfonia. Neoplasmas na supraglote não apresentam sintomas cedo durante seu desenvolvimento. O primeiro sintoma de um câncer neste local é de garganta inflamada, disfagia (dificuldade de deglutição), otalgia (dor de ouvido) ou desenvolvimento de uma massa no pescoço correspondente a metástase. Comprometimento da passagem da via aérea também pode ser um sintoma em estágio inicial de câncer da subglote (KUFÉ *et al.*, 2003).

Os métodos modernos para diagnóstico clínico do câncer de laringe incluem a laringoscopia direta ou por fibra ótica, tomografia computadorizada e ressonância magnética. Mesmo com estes recursos e avaliação clínica precisa, costuma ser feita uma estimativa errônea (para menos) da extensão do tumor em 30 a 40% dos casos (KUFÉ *et al.*, 2003).

De um modo geral, devido aos poucos sinais e sintomas da doença em estádios iniciais, esse tipo de tumor costuma ser descoberto apenas em estádios avançados da doença. Nestes casos, tratamentos mais severos são necessários, o que frequentemente deixa os pacientes desfigurados, com efeitos colaterais debilitantes, fala e deglutição prejudicadas, além de uma diminuição na qualidade de vida (WADSWORTH, SOMERS, CAZARES *et al.*, 2004; GOURIN *et al.*, 2006). Por estas razões, a mortalidade relacionada à doença e ao tratamento é alta e as estatísticas têm se mantido as mesmas ao longo das últimas décadas (FORASTIERE *et al.*, 2001; MAO *et al.*, 2004; SEWELL *et al.*, 2007). Ainda não foi desenvolvido nenhum exame de detecção para o câncer de laringe, sendo a análise clínica combinada com exames de imagens os únicos meios de diagnóstico (WADSWORTH, SOMERS, STACK *et al.*, 2004).

Apesar de avanços substanciais nos últimos 15 anos no tratamento de HNSCC, especialmente a cirurgia reconstrutiva e plástica ou radioterapia para a doença nos estádios

iniciais e novas estratégias terapêuticas para tumores em estádios avançados e metastáticos, o prognóstico geral para estes cânceres continua não satisfatório (HASS *et al.*, 2008). As opções mais comuns para tratamento de LSCC são cirurgia, radioterapia, quimioterapia, ou uma combinação destas. A radioterapia é utilizada em mais de 70% dos pacientes, seguida pela cirurgia em 55% e quimioterapia em 10% dos casos. Em estádios iniciais do LSCC, apenas uma opção costuma ser adequada para o tratamento em 85 a 98% dos pacientes. Para os estádios mais avançados, como III e IV, a abordagem de tratamento é baseada na combinação de cirurgia e quimio ou radioterapia (ALMADORI *et al.*, 2005).

## 1.3 Sistema imune

A principal função do sistema imune é a defesa e vigilância do organismo. Ele deve reconhecer e erradicar, se possível, patógenos e células aberrantes, deixando células normais intactas. Consequentemente, o sistema imune deve incorporar um programa que facilite a eliminação de patógenos, assim como um programa suicida seguro para remoção de clones auto-reativos que têm o potencial de atacar tecidos normais. A auto-tolerância e a remoção de linfócitos autoreativos é essencial para a função normal do sistema imune (LOS e WALCZAK, 2002).

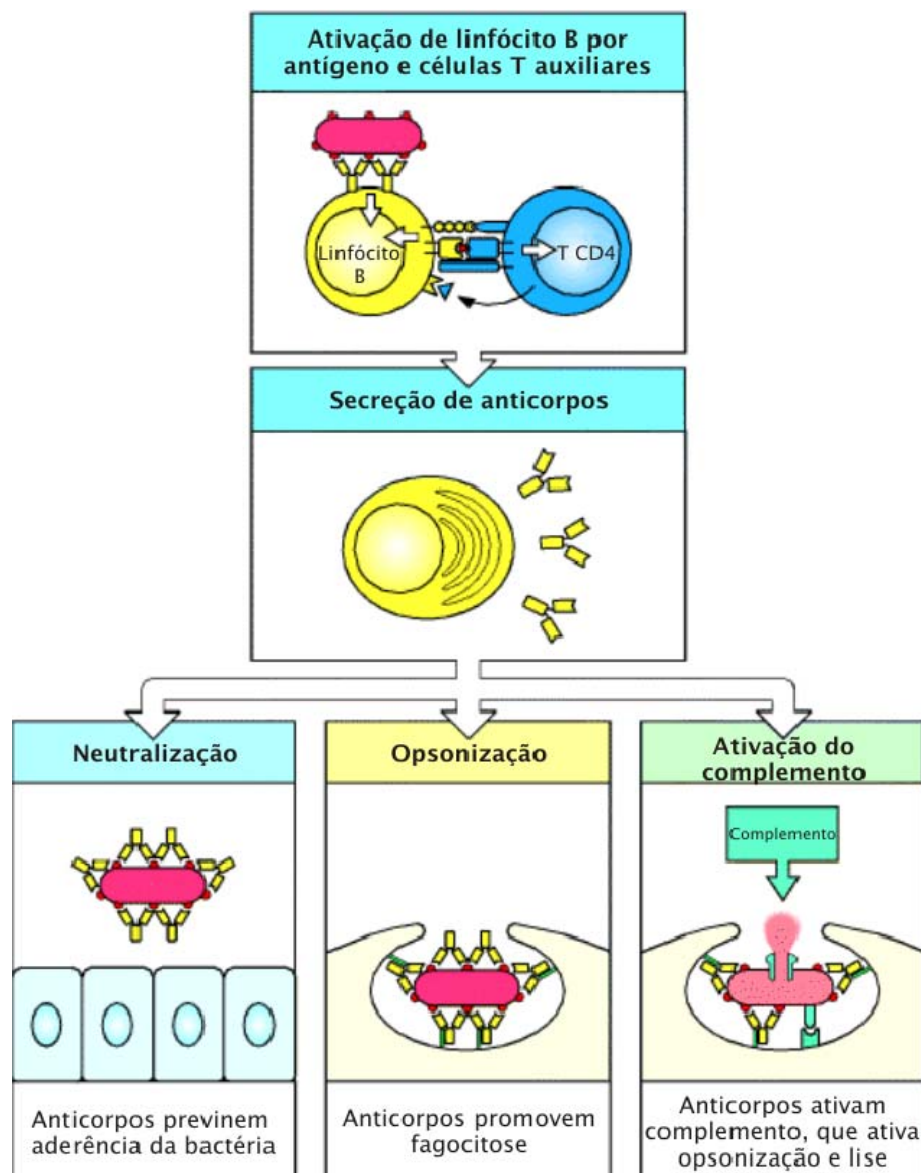
As células do sistema imune são originadas na medula óssea e consistem nos macrófagos, granulócitos (neutrófilos, eosinófilos e basófilos), mastócitos, células dendríticas, linfócitos T e B e células exterminadoras naturais (*natural killers* – NKs). Outros componentes do sistema imune são citocinas (interleucinas, interferon gamma e fator de necrose tumoral – TNF) e anticorpos (imunoglobulinas – Ig). Além disso, o sistema imune inato é considerado como a linha de frente de defesa do organismo (JANEWAY, 2001). Fazem parte dele a barreira epitelial que reveste o corpo, células fagocíticas (principalmente macrófagos e neutrófilos), NKs, proteínas plasmáticas (como do sistema complemento) e citocinas.

A imunidade humoral consiste de mediadores solúveis como complemento (não específico) e anticorpos (específicos) que neutralizam, opsonizam ou matam patógenos



(RICH, 2005). Ela envolve a produção de anticorpos por plasmócitos (linfócitos B), que defendem o organismo principalmente contra bactérias e suas toxinas e vírus.

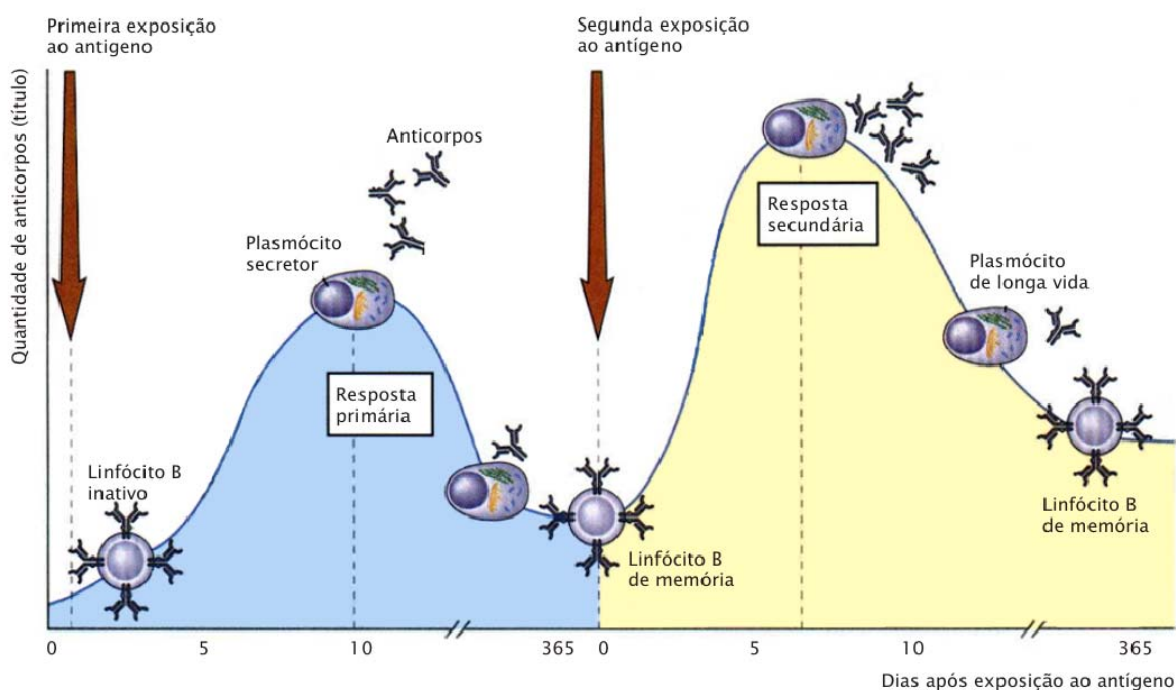
Os anticorpos têm três funções na proteção contra patógenos. A mais simples é a neutralização, onde eles se ligam ao antígeno, bloqueando seu acesso a células. Como bactérias são capazes de se multiplicar fora das células, a neutralização não é suficiente, necessitando da opsonização. Nesta, os anticorpos revestem a bactéria e permitem que uma célula fagocítica a ingira e destrua. A terceira função dos anticorpos é a ativação do sistema complemento, cujos componentes formam poros na superfície da bactéria, levando-a à sua destruição (Figura 7) (JANEWAY, 2001).



**Figura 7.** Resposta imune humoral mediada por anticorpos secretados por plasmócitos.

Fonte: Janeway, 2001.

Podem ocorrer dois tipos de resposta no desenvolvimento da imunidade humoral: primária e secundária. A resposta imune primária ocorre assim que o antígeno é introduzido no organismo. Nesta resposta, há um período de latência antes que os linfócitos B sejam ativados para proliferar e secretar anticorpos, além de se tornarem células de memória. É comum que a recuperação de várias doenças infecciosas ocorra durante a resposta primária quando a concentração de anticorpos está atingindo o seu pico. A resposta secundária, ou de memória, ocorre durante exposições secundárias ou subsequentes ao mesmo antígeno. Nesta resposta, o aumento na concentração de anticorpos ocorre mais rapidamente porque já existem células de memória disponíveis para este antígeno (Figura 8) (PORTH, 2007).

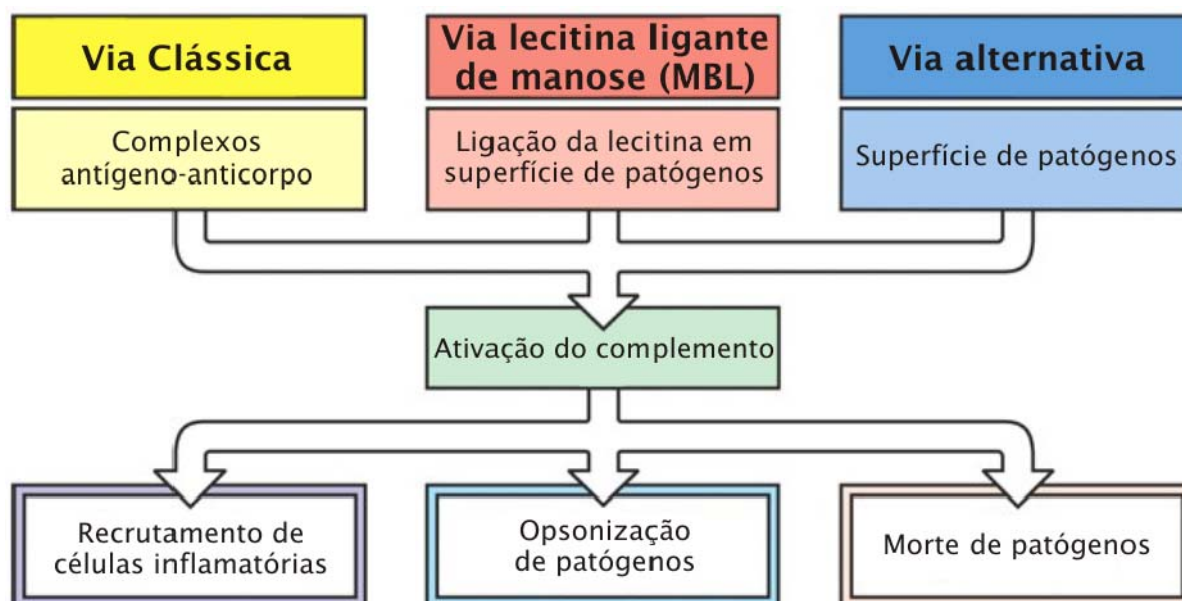


**Figura 8.** Resposta imune humoral primária e secundária.  
Fonte: Adaptado de Porth, 2007.

### 1.3.1 Sistema complemento

O sistema complemento é uma rede complexa de proteínas solúveis e associadas a membranas que formam uma resposta altamente regulada e direcionada contra agentes infecciosos ou câncer (MONK *et al.*, 2007) e consiste em um único grupo de 30 proteínas que circulam no sangue (TORTORA *et al.*, 2004) como precursores inativos (PORTH, 2007). Para ocorrer a ativação deste sistema, as proteínas são clivadas em uma determinada sequência, agindo em cascata, onde uma reação ativa a outra, que ativa uma terceira e assim por diante (TORTORA *et al.*, 2004; PORTH, 2007). As proteínas são denominadas C1 a C9 (na ordem em que foram descobertas) e seus produtos são proteínas ativadas indicadas pelas letras *a* para o fragmento menor e *b* para o fragmento maior (TORTORA *et al.*, 2004).

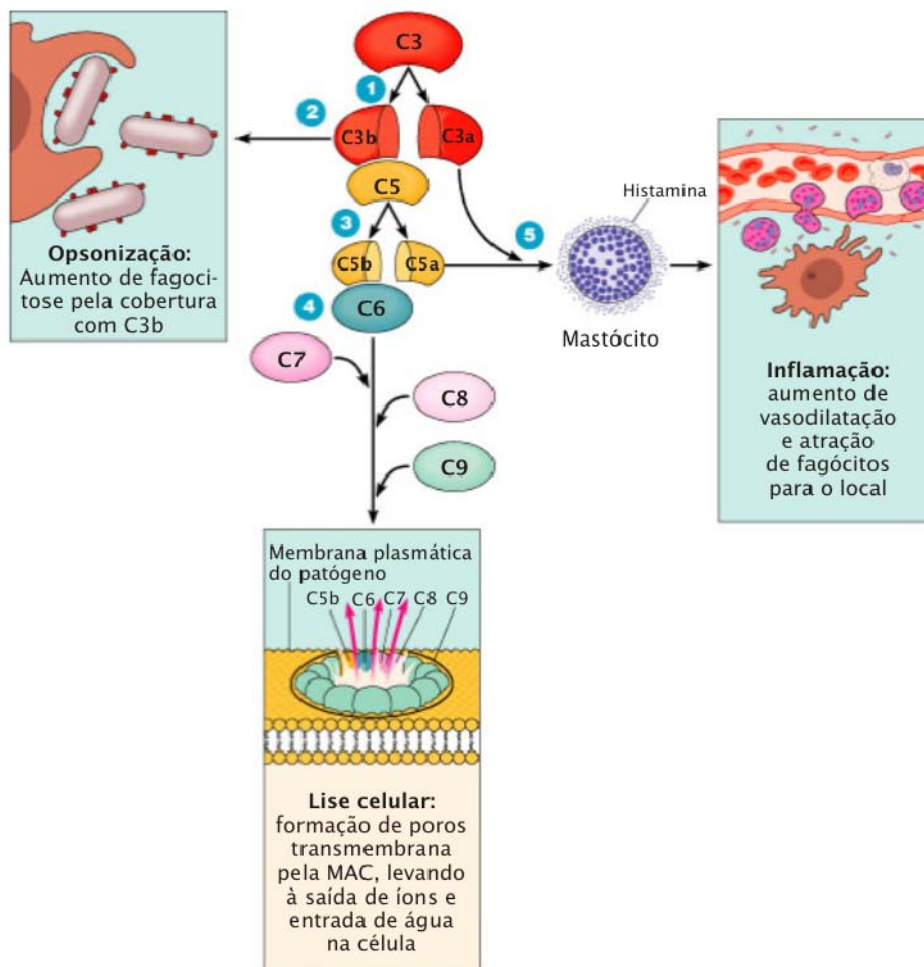
A cascata inflamatória do complemento tem três atividades principais: (1) defesa contra infecções de microorganismos, ao promover fagocitose do patógeno; (2) fazer uma ponte entre a imunidade inata e adaptativa; e (3) descartar complexos imunes e produtos da resposta inflamatória para proteção e recuperação do organismo (GASQUE, 2004). Existem três mecanismos distintos para a ativação do complemento. A via clássica é ativada por complexos antígeno-anticorpo. A ativação do complemento pela via alternativa se inicia diretamente por moléculas na superfície da célula-alvo. A via lecitina ligante de manose (MBL) é iniciada pela ligação da MBL a estruturas contendo manose presentes na superfície de bactérias e fungos (GUO e WARD, 2005). Todas as vias convergem para a geração da mesma enzima chave, chamada C3 convertase, principal ponto de amplificação da cascata (Figura 9) (PORTH, 2007). Quando o sistema complemento é ativado em sítios inapropriados ou por um período muito extenso, ele é capaz de provocar danos a tecidos do organismo, causando fenômenos autoimunes como degeneração do sistema nervoso central (GASQUE, 2004), lúpus eritematoso sistêmico, artrite e aterosclerose (KIM *et al.*, 2005). Para evitar esta tendência, as células do organismo são protegidas por várias moléculas regulatórias (inibidoras do complemento), que inibem a formação de enzimas que, por sua vez, clivam a proteína C3 (GASQUE, 2004).



**Figura 9.** Visão esquemática da cascata do complemento. As três vias de ativação são iniciadas por diferentes fatores que levam à mesma atividade enzimática, e suas três principais consequências.

Fonte: Janeway, 2001.

A ativação da via clássica é iniciada pela ligação do primeiro componente do complemento (C1) a complexos antígeno-anticorpo na superfície de células alvo. Esta ligação resulta na ativação do C4 e C2. O fragmento C4b liga-se à superfície celular, então o C2b liga-se à C4b, formando a C3 convertase que, por sua vez, ativa o componente C3 (CAMPBELL *et al.*, 1980). O fragmento C3b gerado combina-se com a C3 convertase, originando a C5 convertase, que cliva o C5. O fragmento C5b liga-se ao C6 e C7 para aderirem à membrana da célula alvo. Em seguida, o C8 e várias moléculas C9 formam o complexo de ataque à membrana (MAC). Esta cria poros inseridos na membrana, permitindo a entrada de água e saída de íons, levando à lise da célula (Figura 10) (TORTORA *et al.*, 2004). As anafilatoxinas C3a, C4a e C5a liberadas são moléculas inflamatórias importantes (GASQUE, 2004) que podem ligar-se a mastócitos e basófilos para liberarem histamina e outras substâncias que aumentam a vasodilatação. A C5a também recruta fagócitos para o local da infecção (ERDEI *et al.*, 2004; GUO e WARD, 2005; KIM *et al.*, 2005).



**Figura 10.** Consequências da ativação do sistema complemento.  
Fonte: Tortora *et al.*, 2002.

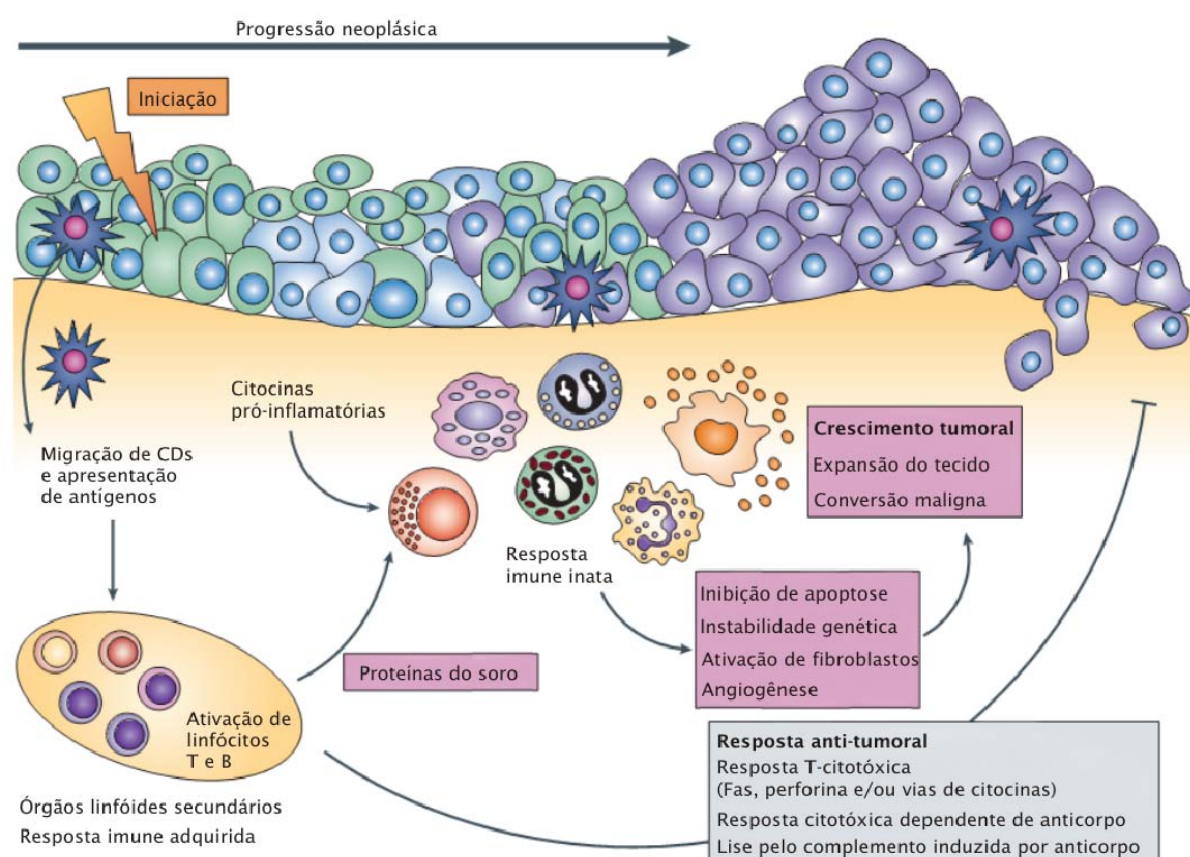
## 1.3.2 Imunologia do câncer

A imunologia do câncer encontra-se entre duas grandes e complexas disciplinas, a pesquisa sobre câncer e a imunologia, e pode-se pensar nela como duas áreas: o uso do câncer como modelo para testar princípios imunológicos e o uso da imunologia como ferramenta para entender e tratar o câncer (SOGN, 1998).

Sabe-se que o sistema imune responde a tumores, mesmo que em uma magnitude bem menor, comparada a sua resposta a agentes infecciosos (ANDERSON e LABAER, 2005). Desde os primeiros experimentos em 1950 de Macfarlane Burnet, envolvendo tumores e resposta imune, foram identificados muitos antígenos tumorais reconhecidos por linfócitos (CHIPLUNKAR, 2001). Existem estudos recentes que contrariam a visão amplamente aceita



da resposta imune combater o tumor (WILLIAMS, 1996; HOUGHTON *et al.*, 2001; KIM *et al.*, 2005; VARELA *et al.*, 2008), ao mostrarem que ela contribui para seu crescimento (HAHNE *et al.*, 1996; GORTER e MERI, 1999; DE VISSER *et al.*, 2006). A idéia de que o sistema imune monta um ataque contra o câncer é oposta à idéia que reações inflamatórias persistentes facilitam o desenvolvimento do tumor. Normalmente, o sistema imune do paciente falha na eliminação do tumor (MARKIEWSKI *et al.*, 2008). Além do mais, mecanismos de supressão de tumores podem variar. Hahne *et al.* (1996) observou que células de melanoma possuem na sua superfície uma molécula (Apo-1 ou Fas) que induz células imunes a sofrerem apoptose (HAHNE *et al.*, 1996; WILLIAMS, 1996). Outro exemplo de supressão imune é a tolerância a células T CD8+ induzida por células supressoras derivadas de mielóide (*myeloid derived suppressor cells* - MDSCs) (MARKIEWSKI *et al.*, 2008). Recentemente, Markiweski *et al.* (2008) demonstraram que o sistema complemento contribui para os mecanismos promotores do crescimento do câncer. Neste estudo, a deficiência de proteínas do complemento C3, C4 ou receptor de C5a está associada a um ritmo mais lento no crescimento do tumor.



**Figura 11.** Modelo da função de células da imunidade inata e adquirida durante inflamação associada ao desenvolvimento do câncer.  
Fonte: de Visser *et al.*, 2006.

Portanto, estudos clínicos e experimentais indicam que a imunidade inata e adquirida são significantes, apesar de às vezes paradoxais, na determinação da tumorigênese. Antígenos presentes em tecidos neoplásicos recentes são transportados para órgãos linfóides por células dendríticas (CDs) que ativam respostas imunes adquiridas, resultando em efeitos tanto promotores de tumor quanto antitumorais. Ainda não são conhecidas as vias que regulam o tráfico de CDs durante estádios iniciais do câncer e a natureza dos antígenos. Ativação de linfócitos B e respostas imunes humorais resultam na ativação crônica de células da imunidade inata em tecidos cancerígenos. Estas células ativadas, como mastócitos, granulócitos e macrófagos, promovem o desenvolvimento do tumor pela liberação de moléculas que modulam a expressão gênica em células neoplásicas iniciadas, culminando em uma progressão alterada do ciclo celular e aumento da capacidade de sobrevivência. Células inflamatórias têm influência positiva no desenvolvimento angiogênico ao produzirem mediadores pro-angiogênicos e proteases extracelulares. Tecidos onde estas vias se encontram cronicamente ativas exibem um aumento no risco de desenvolvimento do tumor. Ao contrário deste efeito, a ativação da imunidade adquirida também induz respostas antitumorais por meio de células T CD8<sup>+</sup> e produção de anticorpos que induzem à lise mediada pelo sistema complemento (Figura 11) (DE VISSER *et al.*, 2006).

No HNSCC, ocorre uma variedade de anormalidades imunológicas cujas relações de causa e efeito não são claras. A imunidade humoral e celular tem implicações importantes para o prognóstico da doença e sua terapia. A imunidade celular está correlacionada com tumores em estágio avançado, recorrência em curto prazo e baixa taxa de sobrevivência. Na imunidade humoral, níveis elevados de IgA, IgM e complexos imunes no soro sugerem estágio avançado do HNSCC e prognóstico ruim (KUFÉ *et al.*, 2003).

A falta de consenso entre estas pesquisas não é específica do câncer de laringe, mas inclui todos os tipos de câncer. A identificação de antígenos envolvidos na imunologia de câncer por técnicas proteômicas pode ajudar a esclarecer a reação do organismo ao tumor (KOLCH *et al.*, 2005). Dada esta função paradoxical do sistema imune em diferentes modelos, não existe uma clara compreensão sobre a resposta imune no LSCC.

## 1.4 Proteômica

Após o sequenciamento do genoma humano, que identificou apenas entre 20.000 e 25.000 genes (LEVY *et al.*, 2007), ficou claro que a idéia de um gene para uma função não se aplica para explicar todas as funções fisiológicas do nosso complexo organismo. Isso sugere que a transcrição alternativa e o *splicing* alternativo (GRAVELEY, 2001; JOHNSON *et al.*, 2003) permitem que cada gene humano codifique entre quatro e seis proteínas diferentes, além de ocorrerem inúmeras modificações pós-traducionais (PTMs), que adicionam diferentes funções às proteínas já traduzidas (KOLCH *et al.*, 2005; LEVY *et al.*, 2007). Com isso, os genes humanos são capazes de gerar cerca de 1 milhão de entidades funcionais no nível proteico. Portanto, o estudo do proteoma se tornou fundamental para a compreensão das funções orgânicas e descrições de doenças, assim como para descoberta de meios diagnósticos e alvos terapêuticos (KOLCH *et al.*, 2005). Deste modo, a proteômica pode ser definida como a caracterização em larga escala de proteínas expressas pelo genoma (CONRAD *et al.*, 2008).

### 1.4.1 Métodos proteômicos

O estudo de proteomas representa um grande desafio devido à alta complexidade de uma célula, do soro ou do plasma sanguíneo, que podem consistir em milhares de diferentes tipos de proteínas, necessitando de métodos sensíveis de análise (AEBERSOLD e GOODLETT, 2001; AEBERSOLD e MANN, 2003).

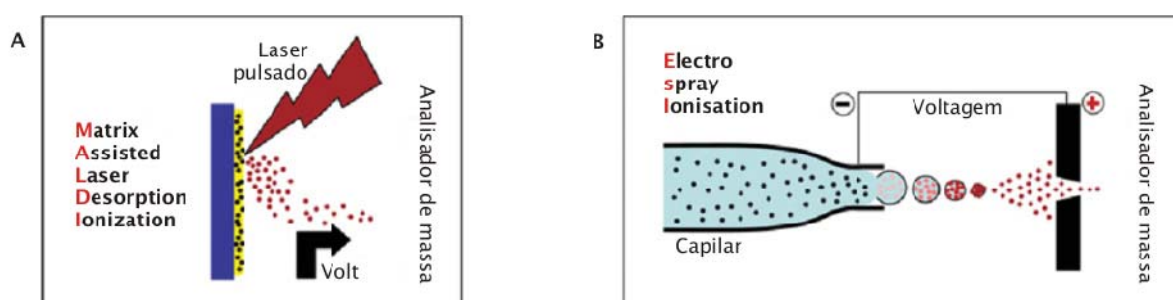
O fracionamento de proteínas é uma etapa muito importante para a análise de proteomas a fim de obter frações mais simples (HIRSCH *et al.*, 2004). Elas podem ser separadas em diferentes grupos com propriedades físicas e químicas similares, como tamanho, hidrofobicidade, carga, ponto isoelétrico ou afinidade, por técnicas como cromatografia e focalização isoelétrica (ISSAQ *et al.*, 2002).

Entre os métodos mais utilizados para separar proteínas está a eletroforese em gel, especialmente a eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida (*two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis* – 2D-PAGE) (HIRSCH *et al.*, 2004; CONRAD *et al.*, 2008). A 2D-PAGE separa proteínas desnaturadas em duas etapas chamadas primeira e segunda dimensões. A primeira dimensão separa as proteínas com base em seu pH e a



segunda dimensão as separa de acordo com suas massas moleculares por meio da eletroforese em gel. Cada gel bidimensional gera um perfil protéico visualizado como pontos que representam as proteínas e são denominados de *spots* (CONRAD *et al.*, 2008). A 2D-PAGE tem sido usada por mais de 30 anos e, mais recentemente, melhorou muito sua reprodutibilidade com a introdução de tiras de gel de poliacrilamida com gradiente de pH imobilizado, chamadas de *strips*, e da bioinformática. No entanto, esta técnica ainda apresenta inúmeras limitações, como dificuldades em detectar proteínas de baixa expressão e longo prazo para obter resultados (LI *et al.*, 2005; DAOUD, 2008).

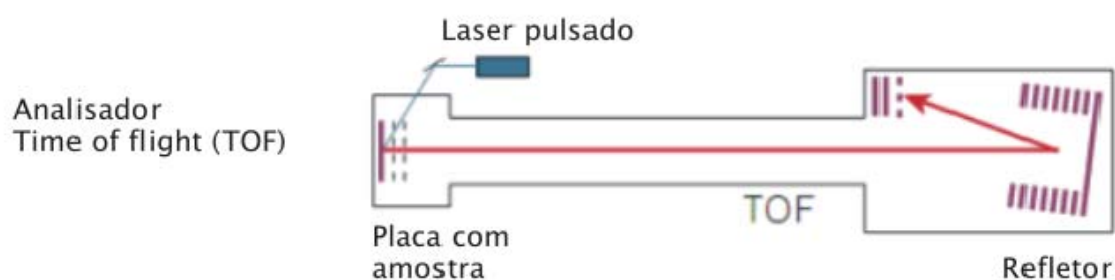
Acoplada a técnicas de separação, a espectrometria de massa (*mass spectrometry* – MS) se tornou o principal método para análise de amostras proteicas complexas (AEBERSOLD e MANN, 2003). Espectrômetros de massa analisam proteínas ou peptídeos depois de convertê-los a íons gasosos, que podem ser identificados com base na razão entre massa e carga (CONRAD *et al.*, 2008). Com o uso da digestão enzimática, é possível identificar proteínas mesmo se elas estiverem modificadas. Ao adicionar um segundo analisador de massa (*tandem mass spectrometry*/MS-MS), também é possível determinar a sequência dos aminoácidos, uma vez que peptídeos se fragmentam de modo previsível. Após a obtenção destes dados, eles são comparados com bancos de dados de proteínas (HIRSCH *et al.*, 2004). Tais estratégias costumam ser usadas em combinação para uma maior acurácia dos resultados. Atualmente, dois tipos de espectrômetro de massa são os mais utilizados para a identificação de proteínas: *matrix-assisted laser desorption/ionization* (MALDI) e *electrospray ionization* (ESI). Ambos são capazes de analisar proteínas com massa molecular a partir de 100 kDa (Figura 12) (AEBERSOLD e MANN, 2003; HIRSCH *et al.*, 2004).



**Figura 12.** Métodos de ionização para peptídeos. (A) MALDI e (B) ESI.  
Fonte: Kolch *et al.*, 2005.

Um espectrômetro de massa consiste em uma fonte de íons, um analisador de massa que mede a razão entre massa e carga ( $m/z$ ) dos analitos ionizados, e um detector que registra

o número de íons em cada valor de  $m/z$  (AEBERSOLD e MANN, 2003). O parâmetro experimental mais crítico para a identificação de proteínas é a precisão ao medir a massa dos peptídeos (AEBERSOLD e GOODLETT, 2001). Entre os tipos de analisadores de massa, está o tempo de voo (*time-of-flight* – TOF) (Figura 13), que costuma ser acoplado ao MALDI. Para análise utilizando este método, as amostras, que costumam ser proteínas separadas por 2D-PAGE submetidas a digestão triptica, são dispostas em uma placa de metal. Antes da aplicação das amostras, uma matriz é colocada na placa ou misturada à amostra. A matriz irá absorver energia de um pulso de laser e causar a ionização (formação dos íons livres na fase gasosa) dos analitos pelo MALDI. A razão  $m/z$  dos íons é, então, medida pelo TOF, onde íons com menores massas moleculares viajam mais rápido que íons com maiores massas moleculares a uma energia constante (AEBERSOLD e GOODLETT, 2001).



**Figura 13.** Analisador de massa do tipo TOF, onde íons são acelerados e separados ao longo de um tubo de acordo com sua velocidade, refletidos e detectados.

Fonte: adaptado de Aebersold & Mann, 2003.

Uma vez que a fracionamento de proteínas antes de qualquer experimento é necessária para uma análise abrangente de proteomas (MORITZ *et al.*, 2004) e a 2D-PAGE apresenta limitações principalmente para estudos de proteomas complexos, como o plasma humano, já que não detecta proteínas de baixa expressão (ZUO e SPEICHER, 2000), são requeridas técnicas alternativas a esta (KOLCH *et al.*, 2005). Alguns trabalhos têm sido feitos no desenvolvimento de técnicas de prefracionamento antes de submeter a amostra à 2D-PAGE (ZUO e SPEICHER, 2000; ZHONG *et al.*, 2008). No entanto, a maioria dos esforços é para fazer a fracionamento de proteomas sem passar por etapas em gel. Neste âmbito, técnicas como focalização isoeletrica líquida (WALL *et al.*, 2000; LI *et al.*, 2005; ZHAO *et al.*, 2009), focalização isoeletrica capilar (LEE e BALGLEY, 2009) e *free-flow electrophoresis* (MORITZ *et al.*, 2004; MORITZ *et al.*, 2005; OUVRY-PATAT *et al.*, 2008) são acopladas a

diferentes cromatografias líquidas e, então, as amostras são submetidas a MS. No entanto, nenhuma combinação destas técnicas encontra-se bem estabelecida.

## 1.4.2 Proteômica de câncer

Tem havido um aumento no número de estudos na área de proteômica de câncer a fim de obter-se conhecimento sobre a patologia e a progressão desta doença. Muito disso se deve às diferenças individuais de expressão protéica estarem fortemente relacionadas com a atividade celular. Além disso, mudanças no genoma são relativamente estáticas, enquanto que proteomas apresentam um maior dinamismo, refletindo mais precisamente as mudanças fisiológicas e patológicas de uma célula, tecido ou organismo ao longo do tempo (KOLCH *et al.*, 2005). São estas informações variantes que nos permitirão monitorar o curso de uma doença, os seus mecanismos patogênicos e a resposta à terapia. É provavelmente por meio da proteômica que isso será alcançado, uma vez que esta tecnologia permite uma visão sistêmica de perfis protéicos (KOLCH *et al.*, 2005; CONRAD *et al.*, 2008).

Avanços técnicos em separação de proteína e espectrometria de massa contribuíram para a aplicação da proteômica a estudos relevantes de doenças específicas. O papel da aplicação de técnicas proteômicas para o câncer consiste em gerar informações para melhor conhecer a patologia da doença, bem como para a descoberta de biomarcadores e para a obtenção de alvos moleculares para tratamentos (HIRSCH *et al.*, 2004; CONRAD *et al.*, 2008; DAOUD, 2008).

Entre os tipos tumorais mais estudados pela proteômica encontram-se o câncer de mama (BERTUCCI *et al.*, 2006; GAST *et al.*, 2008), pulmão (CHEN *et al.*, 2002; PATZ *et al.*, 2007), próstata (BYRNE *et al.*, 2008) e cólon (WARD *et al.*, 2006). Estudos de outros tipos de câncer, como renal, cerebral e hepático (SUN *et al.*, 2007), por exemplo, também são relatados, mas ainda em menores proporções (DAOUD, 2008).

São diversos os objetivos dos trabalhos publicados que utilizam a proteômica aplicada ao câncer. Dispondo de metodologias bem estabelecidas, como 2D-PAGE, eletroforese diferencial em gel bidimensional (*two-dimensional difference gel electrophoresis* – 2D-DIGE), MS, SELDI-TOF, cromatografia líquida (*liquid chromatography* – LC), nano-LC-ESI-MS/MS, MALDI-TOF e todas as possíveis combinações entre estas.

Muitos estudos buscam por biomarcadores para câncer colorretal (WARD *et al.*, 2006; SUN *et al.*, 2007; KIM *et al.*, 2008), de esôfago (UEMURA *et al.*, 2009), de próstata (BYRNE *et al.*, 2008) de estômago (EBERT *et al.*, 2004; LIM *et al.*, 2007; HAO *et al.*, 2008; LAM e LO, 2008), do endométrio (ZHU *et al.*, 2006), de cabeça e pescoço (WADSWORTH, SOMERS, CAZARES *et al.*, 2004; WADSWORTH, SOMERS, STACK *et al.*, 2004; GOURIN *et al.*, 2006), de mama (GAST *et al.*, 2008), de pulmões (CHEN *et al.*, 2002; HIRSCH *et al.*, 2004; CHATTERJI e BORLAK, 2009), de bexiga (MAKRIDAKIS *et al.*, 2009) e de laringe (SEWELL *et al.*, 2007; CHENG *et al.*, 2008). Apesar da quantidade de esforços, nenhum dos possíveis marcadores, até agora, se tornou suficientemente válido para uso clínico (GAST *et al.*, 2008). No entanto, pesquisas continuam a fornecer elucidções sobre os mecanismos moleculares envolvidos na carcinogênese de diversos tipos de tumor (SUN *et al.*, 2007; BYRNE *et al.*, 2008; CHEN *et al.*, 2008). Estudos que visam a elucidção do desenvolvimento da doença verificam migração celular (LU *et al.*, 2009), identificação de modificações pós-traducionais em proteínas de células cancerosas (CAO *et al.*, 2009), catalogar a diferença de expressão protéica em células metastáticas (HO *et al.*, 2009) e mapear proteomas de epitélios associados a tumores (PARK *et al.*, 2008). Ainda há outra linha de pesquisa que investiga os mecanismos de atuação de drogas em células individuais, uma vez que células aparentemente idênticas respondem de modo diferente (COHEN *et al.*, 2008; LI e ZENG, 2009) e a resposta celular a drogas em tumores (NAWARAK *et al.*, 2009).

### 1.4.3 Metaloproteômica

O termo “elementos-traço” data do século XIX e refere-se a todos os elementos presentes em fluidos e tecidos do corpo encontrados em quantidades muito pequenas. Esses elementos são classificados em essenciais e não essenciais. São essenciais aqueles que devem estar presentes em tecidos saudáveis, cuja deficiência causa problemas funcionais e cujo suplemento corrige ou previne tais mudanças (KOPPLE e MASSRY, 2004).

É sabido que vários elementos têm papel importante em sistemas biológicos, sendo que a maioria dos metais presentes em fluidos biológicos está associada a proteínas, chamadas metaloproteínas. Entre as metaloproteínas com atividade catalítica (metaloenzimas) conhecidas estão a transferrina, responsável por transportar ferro (HA-DUONG *et al.*, 2008; CHIRASANI *et al.*, 2009), a nitrogenase, que fixa nitrogênio e se liga a ferro e a molibidênio

(BURGESS e LOWE, 1996; RUBIO e LUDDEN, 2008), a carboxipeptidase, que hidrolisa ligações peptídicas no terminal carboxílico, necessitando de zinco (WILLEMSE e HENDRIKS, 2006; ROSS *et al.*, 2009), e a DNA e RNA polimerases, cuja função é sintetizar DNA e RNA, respectivamente, que também precisam de zinco para funcionamento (SCRUTTON *et al.*, 1971; TERHUNE e SANDSTEAD, 1972; AKABAYOV *et al.*, 2009). A distribuição e concentração destes elementos-traço podem fornecer informações valiosas sobre o estado de saúde e doença em indivíduos, já que muitos são considerados tóxicos ou perigosos em certas concentrações, como mercúrio, cádmio e chumbo. Portanto, é importante conhecer a concentração e a distribuição dos elementos-traço presentes em fluidos humanos, como o plasma sanguíneo (HARAGUCHI, 2004).

A espectrometria de massa com fonte de plasma induzido (*inductively coupled plasma mass spectrometry* – ICP-MS) é uma técnica analítica que permite a especiação de metais de modo bastante sensível (KOPPLE e MASSRY, 2004). Assim, é possível determinar a maior parte dos elementos em concentrações tão baixas quanto em traço. Além disso, o método tem a capacidade de discriminar entre espécies livres e ligadas a metais em amostras submetidas a métodos de fracionamento (HARAGUCHI, 2004; JAKUBOWSKI *et al.*, 2004). De modo geral, amostras submetidas ao ICP-MS são decompostas em elementos naturais em um plasma de argônio em alta temperatura, onde são analisados com base na razão entre massa e carga (KOPPLE e MASSRY, 2004).

A identificação de biomoléculas como metaloproteínas, ácidos nucleicos e metabólitos que se ligam a metais pode ser relevante na determinação de suas funções biológicas e no metabolismo. Portanto, os métodos diretos de identificação de biomoléculas (como MALDI-TOF) acoplados com ICP-MS permitem a detecção de moléculas orgânicas e elementos-traço simultaneamente (HARAGUCHI, 2004).

A aplicação da metaloproteômica no estudo do câncer pode ser valiosa e é cada vez mais estudada. Há trabalhos que usam sangue, plasma, cabelo, tecido fresco e tecido parafinado para medir a concentração de metais em pacientes com câncer e pessoas saudáveis. Pesquisas mostram que o cádmio é um agente mutagênico que, em elevadas concentrações, pode resultar em câncer de próstata, rins e pulmões (SCHRAUZER, 2000; DRASCH *et al.*, 2005). Do mesmo modo, altas quantidades de chumbo na dieta são relacionadas com câncer de estômago, intestinos, ovário, rim, pulmão, mieloma e leucemia (SCHRAUZER *et al.*, 1977; FANNING, 1988; HAYES, 1997). Alguns estudos em modelos animais, incluindo camundongos, relatam uma associação entre altas concentrações de cromo e zinco com crescimento acelerado do tumor (CZAUDERNA e ROCHALSKA, 1989; SCHRAUZER,

2006). Outros estudos mostram uma relação entre o nível de cobre e zinco no sangue e a taxa de mortalidade em câncer de mama (SINGH e GARG, 1998), cólon, reto, ovário, pulmão (DAVIES e KIRSCH, 1984), pâncreas, leucemia e bexiga (HAYES, 1997; SCHRAUZER, 2000). Ainda outras pesquisas indicam a associação do cromo com cânceres respiratórios, de pulmão e nasal (LANGARD e VIGANDER, 1983; DAVIES *et al.*, 1991; D'ERRICO *et al.*, 2009). Existem evidências de que o cromo estimula a produção de radicais de oxigênio, que danificam o DNA (CLODFELDER *et al.*, 2004; PASHA *et al.*, 2007).

Estudos utilizando ICP-MS para estimar o conteúdo de vários metais (alumínio, cálcio, cádmio, cromo, cobre, ferro, potássio, manganês, magnésio, fósforo, sódio, chumbo e zinco) em carcinoma renal e rim normal mostraram diferenças significativas para todos os elementos, sugerindo que alguns podem ter papéis importantes na patogênese desta doença (CALVO *et al.*, 2009). É sabido que, enquanto o zinco e o selênio são necessários para uma próstata saudável, o cádmio mostra efeitos tóxicos e carcinogênicos neste órgão (SARAFANOV *et al.*, 2008).

Um metal particular é o ferro, que acaba funcionando como uma faca de dois gumes, uma vez que é necessário principalmente para o transporte de oxigênio no organismo, mas cujo acúmulo excessivo induz a produção de radicais de oxigênio altamente reativos, provocando danos no tecido, seguidos de carcinogênese (TOYOKUNI, 2009). Outro elemento cujo papel é dualístico é o selênio. Muitos estudos sugerem seu papel na redução de risco de câncer, mas, ao mesmo tempo, mostram que o excesso deste na dieta pode ter efeitos tóxicos (SARAFANOV *et al.*, 2008). Assim, já foi mostrado que as propriedades benéficas do selênio são minadas pelos efeitos de metais como zinco, cromo e cádmio (SCHRAUZER, 2008).

Portanto, a determinação das concentrações de elementos-traço em amostras normais e com câncer pode auxiliar a etiologia, o diagnóstico e o prognóstico de diferentes tipos de câncer (CALVO *et al.*, 2009).

#### **1.4.4 Proteômica de plasma sanguíneo**

O foco da maioria das investigações proteômicas tem sido em fluidos corporais e tipos celulares específicos, sendo o plasma o alvo preferido. Isso se deve a este representar o mais complexo proteoma humano, já que contém proteínas de todos os tecidos do corpo (ANDERSON e ANDERSON, 2002; HIRSCH *et al.*, 2004). Proteínas podem ser secretadas

ou liberadas de células cancerígenas para a corrente sanguínea resultante de necrose ou apoptose. Com isso, o padrão de proteínas no plasma é modificado e este pode ser comparado com o plasma de pessoas saudáveis. No entanto, é um material extremamente difícil de caracterizar devido a grandes quantidades de albumina (55%), à grande diversidade de proteínas e à heterogeneidade de glicoproteínas (ANDERSON e ANDERSON, 2002). Deste modo, a proteômica requer eficientes métodos de separação protéicas, com alta sensibilidade e com um espectro mais abrangente para detectar maior número de proteínas, o que ainda é uma limitação da principal técnica utilizada na proteômica, a 2D-PAGE (KOLCH *et al.*, 2005).

Com os recentes avanços na proteômica, novas tecnologias têm o potencial de levar a um melhor entendimento da patologia de vários tipos de câncer, inclusive o de laringe, sua imunologia, diagnóstico e descoberta de drogas para tratamento (LE NAOUR, 2001; KOLCH *et al.*, 2005; CHO, 2007). Ainda há muito a ser descoberto sobre esta doença e a literatura sobre câncer de laringe é relativamente escassa. Trabalhos por Wadsworth *et al.* (WADSWORTH, SOMERS, CAZARES *et al.*, 2004; WADSWORTH, SOMERS, STACK *et al.*, 2004) e Gourin *et al.* (2006), por exemplo, utilizam soro sanguíneo para identificar proteínas com uma técnica de espectrometria de massa (SELDI-TOF). Os artigos de Sewell *et al.* (2007) e Zhou *et al.* (2008) são os únicos publicados que utilizam gel bidimensional para comparar tecidos de pacientes com câncer de laringe. O primeiro consiste em uma busca por biomarcadores potenciais para câncer de laringe usando esta técnica juntamente com MS de duas amostras de tecido cancerígeno e duas amostras de tecido normal adjacente ao tumor. Os resultados desta pesquisa mostraram a expressão alterada de várias proteínas nas amostras de câncer comparadas com os controles. O segundo trabalho, de Zhou *et al.* (2008), obteve perfis de 2D-PAGE para tecido LSCC e normal, encontrando 13 proteínas previamente identificadas com diferença de expressão (mais ou menos expressas) no tecido de câncer. Não há relatos até agora de experimentos com 2D-PAGE utilizando plasma sanguíneo, tornando o presente trabalho o primeiro a gerar perfis protéicos de plasma de pacientes com câncer de laringe.

Portanto, este trabalho visa fazer uma análise protéica comparativa a fim de buscar biomarcadores para o câncer de laringe a partir do plasma sanguíneo. Foi usada a 2D-PAGE, além de serem testadas duas técnicas de proteômica que não envolvem géis de poliacrilamida (*gel free*) para separar proteínas do plasma humano: focalização isoeletrica líquida (LIEF) e cromatografia líquida de alta performance (HPLC).

# 2 Objetivos

O principal objetivo deste trabalho é comparar plasmas sanguíneos de pessoas saudáveis e com câncer de laringe, visando à busca por marcadores moleculares diferenciais, utilizando técnicas proteômicas e metaloproteômicas.

## 2.1 Objetivos específicos

- Obter géis de poliacrilamida de amostras com e sem câncer para compará-las;
- Detectar proteínas expressas diferentemente em pacientes com e sem câncer;
- Identificar tais proteínas por espectrometria de massa;
- Definir técnicas de separação protéica de plasma humano sem utilizar gel de poliacrilamida;
- Verificar a diferença de concentração de elementos-traço em proteínas específicas de pacientes com e sem câncer;
- Testar a detecção de metais em amostras altamente purificadas.



# 3 Material e métodos

## 3.1 *In gel*

### 3.1.1 Descrição das amostras de plasma

As amostras de câncer foram provenientes de quatro pacientes com câncer de laringe do tipo SCC no mesmo estágio da doença (T2, câncer localizado), de acordo com a Classificação dos Tumores Malignos – TNM (SOBIN e WITTEKIND, 2002). Estes pacientes correspondem a quatro pessoas fumantes, entre 59 e 73 anos de idade, tanto do sexo masculino quanto feminino. As amostras controle foram obtidas de quatro fumantes sem câncer no mesmo intervalo de idade, de ambos os sexos. Todos os indivíduos tinham hábitos de consumo regular de álcool. O protocolo deste trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética da Associação de Combate ao Câncer em Goiás e todos os pacientes assinaram formulários de consentimento (Anexo I).

### 3.1.2 Extração de plasma

O plasma de pacientes com câncer de laringe e de pessoas saudias (grupo controle) foi separado por centrifugação (1.000 x g) imediatamente após a coleta sanguínea. Esta foi feita com tubo de vácuo contendo heparina sódica (Vacuette 4 mL, Greiner Bio-One, lote C070601, Rio de Janeiro, Brasil) para evitar a coagulação. Após centrifugação, a fase superior (correspondente ao plasma) foi coletada, aliquotada e armazenada a -20° C.

### 3.1.3 Quantificação de proteínas

Para a dosagem de proteínas, usou-se o *kit* colorimétrico Ensaio de proteína BCA (BioAgency, lote 070312L2, São Paulo, Brasil). A curva padrão foi feita com diferentes concentrações (de 25 a 1.440  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) de albumina de soro bovino (BSA). Para cada 1  $\mu\text{L}$  de amostra de plasma, foi adicionado 1 mL do Reagente BCA. Os tubos foram incubados por 30 min a 37 °C (banho-maria). Então, foi medida a absorvância das amostras em um espectrofotômetro a 562 nm.

### 3.1.4 Preparação da amostra

A fim de preparar o plasma para a eletroforese bidimensional, utilizou-se o *2-D Clean-Up Kit* (Amersham Biosciences, lote 0108-07, Piscataway, EUA) de acordo com o protocolo do fabricante, objetivando a remoção de interferentes da amostra (como sais, lipídeos e carboidratos). A cada amostra, foi adicionada solução precipitante, seguido por agitação no vórtex e incubação em gelo por 15 min. Adicionou-se solução co-precipitante e as amostras foram centrifugadas, coletando-se o sobrenadante. A este, foi adicionado novamente co-precipitante e incubado em gelo por 5 min. Após nova centrifugação, adicionou-se água Milli-Q ao precipitado, que foi vortexado para se dispersar. Acrescentou-se tampão de lavagem a -20° C e aditivo de lavagem. Seguido por agitação em vórtex por 30 min, centrifugou-se mais uma vez e deixou-se o precipitado secar naturalmente.

### 3.1.5 SDS-PAGE

A análise inicial do perfil de proteínas no plasma foi feita com 50  $\mu\text{g}$  de cada amostra em SDS-PAGE a 12.5% de acordo com o método de Laemmli (LAEMMLI, 1970). Mini-géis foram feitos utilizando o *Mini-Proteome* SDS-PAGE (BioRad). O gel separador foi feito com 2 mL de solução de acrilamida/bis-acrilamida 30% (29:1), 1,25 mL de tampão Tris-HCl pH 8.8 (1,5 M tris-hidroximetil-aminometano, 0,4% dodecil sulfato de sódio – SDS), 1,7 mL de água destilada, 10% de persulfato de amônio (APS) e 3  $\mu\text{L}$  de N,N,N',N'-

tetrametiletilenodiamina (TEMED). O gel de empilhamento foi manufacturado utilizando 0,42 mL de solução de acrilamida/bis-acrilamida 30% (29:1), 0,34 mL de tampão Tris-HCl pH 6.8 (1 M tris-hidroximetil-aminometano, 0,4% SDS), 1,75 mL de água destilada, 10% APS e 3  $\mu$ L de TEMED. A corrida foi realizada a 200 V e 20 mA por 1:40 h.

### 3.1.6 Focalização isoeétrica

*Strips* de gradiente de pH de 18 cm com gradiente não-linear de pH variando de 3 a 10 (GE Healthcare Life Sciences, lote 10018865, Suécia) foram usadas para a focalização isoeétrica (primeira dimensão). Quinhentos  $\mu$ g das amostras descritas acima foram ressuspendidos em solução de re-hidratação (tiouréa 2 M, uréia 7 M, 1% ditioneitol – DTT – CHAPS 2%, IPGbuffer 1%, traço de azul de bromofenol) por 11 h e aplicados em *strips* separadas. A corrida foi realizada no sistema *Ettan IPGphor 3* (GE Healthcare Life Sciences), levando o tempo total de 7:10 h. O sistema foi de 0 a 1.000 V em 2:30 h. Nas três horas seguintes, a voltagem aumentou linearmente de 1.000 até atingir a voltagem máxima de 10.000 V, ficando constante por 1:30 horas, até terminar a corrida.

### 3.1.7 2D-PAGE

A segunda dimensão foi feita em géis de eletroforese de SDS e poliacrilamida (SDS-PAGE), usando *Ettan DALTsix Electrophoresis Unit* (25.5 por 20.5 cm e 1.5 mm de espessura) (GE Healthcare Life Sciences). Os géis foram preparados com 12,5% acrilamida, 1,5 M Tris-HCl pH 8.8, 10% SDS, 10% APS, 10% TEMED e água Milli-Q. A etapa de equilíbrio das *strips*, antes de sua aplicação no gel, foi feita inicialmente incubando-as por dez min sob agitação em solução de equilíbrio (50 mM Tris-HCl pH 8.8, uréia 6 M, glicerol 30%, SDS 2%, traço de azul de bromofenol) com DTT 1%. Esta foi descartada e, em seguida, acrescentou-se solução de equilíbrio com iodoacetamida 2,5%, deixando sob agitação também por 10 min.

As *strips* foram colocadas na parte superior da cuba de eletroforese em contato com o gel de poliacrilamida. O marcador *Benchmark protein ladder* (Invitrogen) foi usado para

auxiliar a identificação da massa molecular dos *spots* nos géis. O sistema foi vedado com solução selante (tampão de corrida 1 X, agarose 0,5% e traço de azul de bromofenol).

A electroforese foi realizada a 5 W por gel *overnight* a 15° C na câmara escura usando *Ettan DALTsix Vertical System* (GE Healthcare Life Sciences). Os géis foram corados com solução Comassie blue (metanol 30%, ácido acético 10%, comassie 0,1%). No total, foram realizados 24 géis bidimensionais (replicatas técnicas), correspondentes aos quatro pacientes com câncer e quatro pacientes sem câncer (replicatas biológicas).

### 3.1.8 Análise das imagens

A digitalização das imagens foi feita utilizando um *scanner* (ImageScanner III, GE Healthcare Life Sciences) com alta resolução. As imagens digitalizadas foram salvas em modo Tiff e analisadas no *software* BioNumerics v. 4.5 (Applied-Maths). Em primeiro lugar, a calibragem com escala em cinza foi necessária para transformar níveis de cinza em valores para cada *pixel* da imagem do gel. O método de calibragem usou uma curva do próprio *software* BioNumerics.

A busca nos géis bidimensionais por pontos que representam as proteínas e são denominados de *spots* foi feita de modo automático. Após a detecção automática, foram realizadas detecções manuais de *spots* quando estes não foram reconhecidos pelo programa, ou deleções quando o programa reconhecia erroneamente manchas ou bolhas como *spots*.

Em seguida, o passo de normalização foi feito para atribuir uma identidade comum para *spots* idênticos em diferentes géis. Para tanto, um gel de referência foi construído e opções automáticas do *software* foram usadas. Para cada amostra, quando uma proteína era detectada em todas as imagens, esta era automaticamente adicionada ao gel de referência.

Os géis foram sobrepostos para a determinação das proteínas diferenciais e em comum, onde os *spots* foram encaixados de modo que ficassem alinhados ao seu respectivo segundo gel, baseando-se nos pontos de referência, que são os *spots* em comum entre as amostras. Linhas de regressão baseadas no volume relativo dos *spots* foram geradas com  $p < 0.020$  para avaliar a acurácia da sobreposição, indicando também aqueles *spots* mais discrepantes, chamados *outliers*. Para a determinação de massas moleculares e pontos isoelétricos foram utilizados marcadores de massa molecular (Benchmark protein ladder, Invitrogen MW de 10 a 220 kDa) e ponto isoelétrico (3 a 10).

*Spots* comuns a todos os géis com volumes acima de 100.000 e aqueles diferenciais em géis de pacientes com câncer, foram recortados dos géis e armazenados em tubos de 1.5 mL para serem descorados, digeridos com tripsina e utilizados nas análises de espectrometria.

### 3.1.9 Preparação dos *spots* para análises de espectrometria de massa

Para análises de espectrometria de massa, as proteínas de interesse foram descoradas, digeridas com 600 ng de tripsina e os peptídeos resultantes, purificados. Inicialmente, os *spots* selecionados foram descorados com solução descorante contendo metanol 50% e ácido acético 12%. Para tanto, os *spots* de interesse recortados dos géis foram transferidos para tubos de 1.5 mL. As proteínas dos *spots* selecionados foram digeridas com tripsina (Trypsin Gold – Promega sequencing grade, V528A), de acordo com Shevchenko *et al.* (2001) (SHEVCHENKO, 2001). Para a digestão, os *spots* descorados foram lavados três vezes com etanol 50%. Aos tubos contendo os *spots*, foram adicionados 300 µL de acetonitrila e, então, estes foram secos no concentrador a vácuo por 10 min. Posteriormente, foram adicionados 50 µL de DTT 100 mM em solução de bicarbonato de amônio (NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>) 100 mM e incubados a 56° C. Após uma hora de incubação, a solução foi removida e substituída por 50 µL de iodoacetamida 55 mM em 100 mM de NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> por 45 min em temperatura ambiente. Após a remoção do sobrenadante, os *spots* foram lavados duas vezes com 100 µL de NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> 100 mM, desidratados pela adição de 100 µL de acetonitrila e secos em um concentrador a vácuo. Em seguida, os *spots* foram re-hidratados com 50 µL da solução de tripsina (600 ng de tripsina em 50 mM de NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> e 5 mM de CaCl<sub>2</sub>). Então, o sobrenadante foi substituído pela mesma solução sem tripsina e os *spots* incubados durante 14 h a 37° C.

Após as 14 horas, os tubos contendo as proteínas digeridas com tripsina foram incubados em um sonicador por 20 min. Em seguida, foram adicionados aos tubos 40 µL de água destilada/deionizada estéril e, novamente, incubados no sonicador. Após 10 min de incubação, adicionou-se 40 µL de acetonitrila/H<sub>2</sub>O/TFA (66:33:0,1) a cada tubo, que foram incubados no sonicador mais uma vez. Passados 15 min, o sobrenadante foi coletado e transferido para outro tubo limpo. Esse mesmo procedimento de lavagem foi repetido mais uma vez. Por fim, os sobrenadantes resultantes das lavagens foram reunidos no mesmo tubo para cada amostra e concentrados a vácuo por aproximadamente 1 h.

### 3.1.10 Espectrometria de massa

Os peptídeos extraídos foram preparados para análise em um espectrômetro de massa do tipo MALDI-TOF/TOF em um Ultraflex II MALDI-TOF/TOF (Bruker Daltonics, Billerica, MA). As amostras concentradas foram ressuspendidas em 5  $\mu\text{L}$  de TFA 1%, onde 2  $\mu\text{L}$  de cada uma destas foram separados e adicionados 6  $\mu\text{L}$  de uma matriz composta por ácido sinapínico (em uma solução dissolvida de acetonitrila/TFA 0.1%; v/v). Em seguida, a solução foi homogeneizada em um vórtex e 0,5  $\mu\text{L}$  foram aplicados no Ultraflex II. As amostras foram secas em temperatura ambiente e o espectrômetro foi operado em modo linear para obtenção das massas dos fragmentos gerados pela tripsina e em modo refletido para re-fragmentação de íons para sequenciamento *de novo*. Os íons das amostras foram submetidos à irradiação automatizada, onde o *laser* foi operado com frequência de 50 Hz, com potência modulada positiva. Os espectros resultantes foram analisados manualmente, usando o programa FlexAnalysis v. 2.4 (Bruker Daltonics programs).

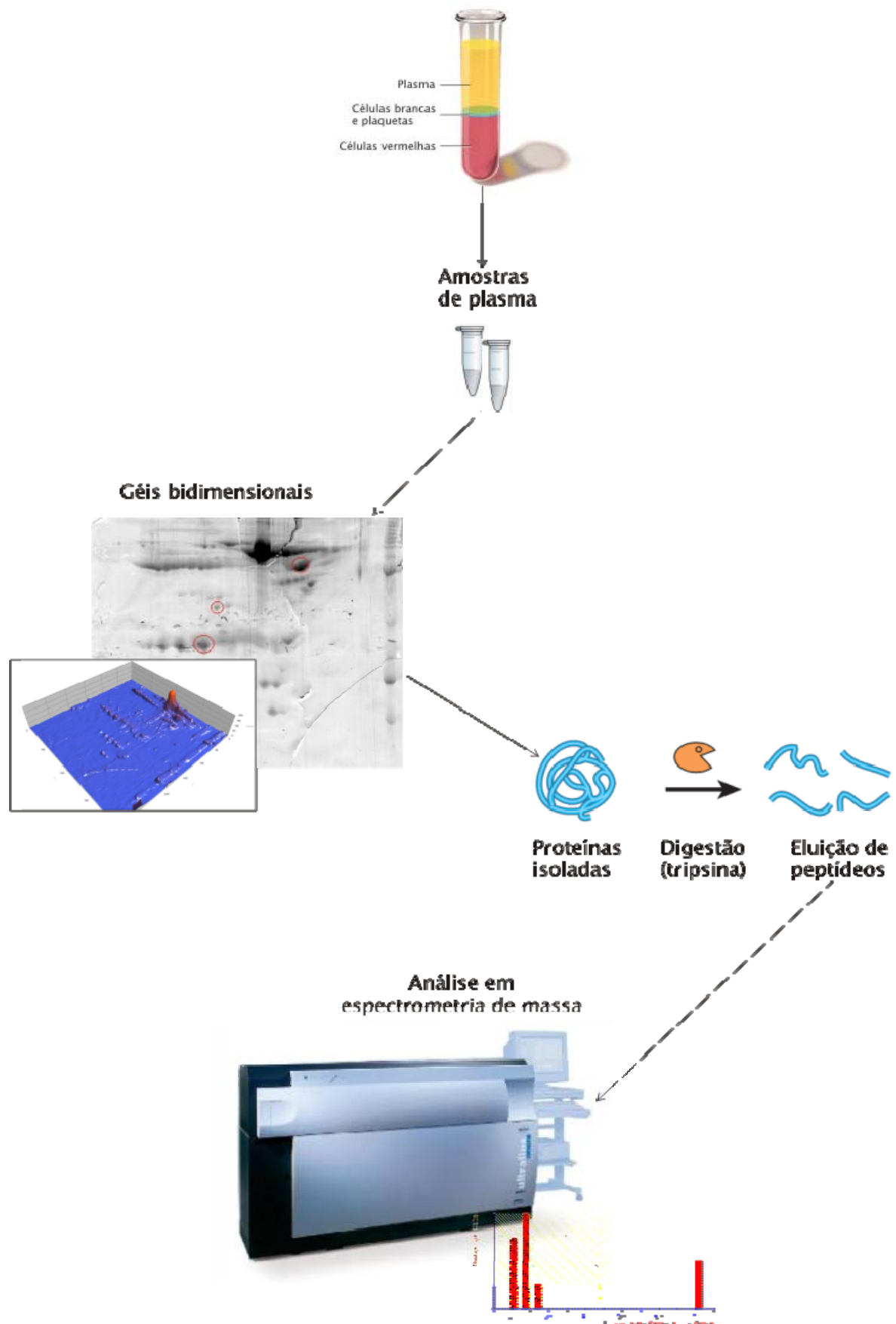
Os *spots* que não geraram resultados foram isolados novamente, digeridos da mesma forma descrita acima e analisados por nano-LC-ESI-MS/MS (YANG *et al.*, 2006). O HPLC usado foi o Ultimate 3000 system (Dionex Corporation, Sunnyvale, CA, EUA), equipado com uma coluna PepMap100 C-18 (300  $\mu\text{m}$  x 5 mm) e uma coluna analítica PepMap100 C-18 (75  $\mu\text{m}$  x 150 mm). O gradiente usado foi (A = 0.1% de ácido fórmico em água, B = 0.08% de ácido fórmico em acetonitrila) 8% a 30% B de 0 a 25 min, 80% B de 25 a 30 min, 8% B de 30 a 50 min. O fluxo foi de 300  $\text{nL}\cdot\text{min}^{-1}$ . Um HCTultra ETDII (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) foi usado para gravar o espectro peptídico no intervalo de 350-1500  $m/z$ , e o espectro MS/MS em dados adquiridos entre o intervalo de 100-2800  $m/z$ . O espectro MS foi gravado repetidamente seguido por quatro espectros de dados CID MS/MS gerados a partir dos quatro íons com maior intensidade. Uma exclusão ativa de 0.4 min após dois espectros foi usada para detectar peptídeos pouco abundantes. A energia de colisão foi definida automaticamente de acordo com o estado entre massa e carga dos peptídeos. O espectro MS/MS foi interpretado e gráficos de picos foram gerados pelo DataAnalysis 4.0 (Bruker Daltonics, Bremen, Germany).

### 3.1.10.1 Análises *in silico* e busca em bancos de dados

Os *spots* de interesse foram submetidos à análise por espectrometria de massa e identificados por *peptide mass fingerprinting* (PMF) ou por sequenciamento *de novo* (MS/MS). As massas dos peptídeos encontradas por PMF foram comparadas com o banco de dados não redundante do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), utilizando o *software* MASCOT (MASCOT v 2.1, Londres, Reino Unido). Os resultados foram avaliados de acordo com os maiores *scores* e área de cobertura, verificando-se, também, a correspondência entre massa molecular e ponto isoelétrico dos *spots* e das proteínas no banco de dados a fim de obter maior acurácia na identificação das proteínas de interesse.

O sequenciamento *de novo* foi realizado manualmente com o *software* FlexAnalysis, por meio da comparação entre as massas dos aminoácidos e as distâncias entre os picos, gerando as sequências. Foi feita, então, uma busca no banco de dados do NCBI com a ferramenta Blastp a fim de comparar a sequência do fragmento encontrado com as proteínas do banco de dados (ALTSCHUL *et al.*, 1990). Para a interpretação dos resultados, foram levados em consideração critérios como porcentagem em *score*, massa molecular e espécie à qual pertenciam as proteínas.

Os *spots* submetidos a nano-LC-ESI-MS/MS foram identificados utilizando o MASCOT 2.2.04 (Matrix Science, Londres, Reino Unido) contra o banco de dados do SwissProt. Os parâmetros para a busca foram os seguintes: enzima selecionada como tripsina com o máximo de dois sítios de clivagem; espécie limitada à humana; tolerância de massa de 0.2 Da para peptídeo; 0.2 Da para tolerância de MS/MS; modificação fixa de carbamidometil (C); e modificação variável de oxidação e fosforilação de metionina (Tyr, Thr e Ser). Identificações proteicas positivas foram baseadas em um *score* significativo de MOWSE. A identificação de proteínas e informação sobre modificações obtidas pelo MASCOT foram verificadas e filtradas manualmente.



**Figura 14.** Fluxograma das estratégias de execução das análises proteômicas *in gel*.



## 3.2 *Gel free*

Em uma tentativa de desenvolver uma nova metodologia de separação de proteínas do plasma humano, efetuaram-se experimentos para testar a combinação de duas técnicas *gel free* diferentes (LIEF e HPLC). A extração de plasma e a quantificação de proteínas foram feitas do mesmo modo que nos experimentos *in gel* descritos acima. Plasmas de três pacientes foram utilizados, sendo um de paciente com câncer e dois de pessoas saudáveis, onde uma era fumante e outra não fumante.

### 3.2.1 Preparação da amostra

Após a quantificação de proteínas no plasma, estas foram precipitadas com ácido tricloroacético (TCA). Ao acrescentar 133  $\mu\text{L}$  de TCA na amostra, esta foi incubada no congelador ( $-20^{\circ}\text{C}$ ) por 30 min. Em seguida, ela foi centrifugada por 10 min a 14.000 rpm e o sobrenadante descartado. Um mL de acetona a  $-20^{\circ}\text{C}$  foi acrescentado e a amostra foi centrifugada novamente sob as mesmas condições. Então, o sobrenadante foi descartado e a lavagem com acetona foi repetida.

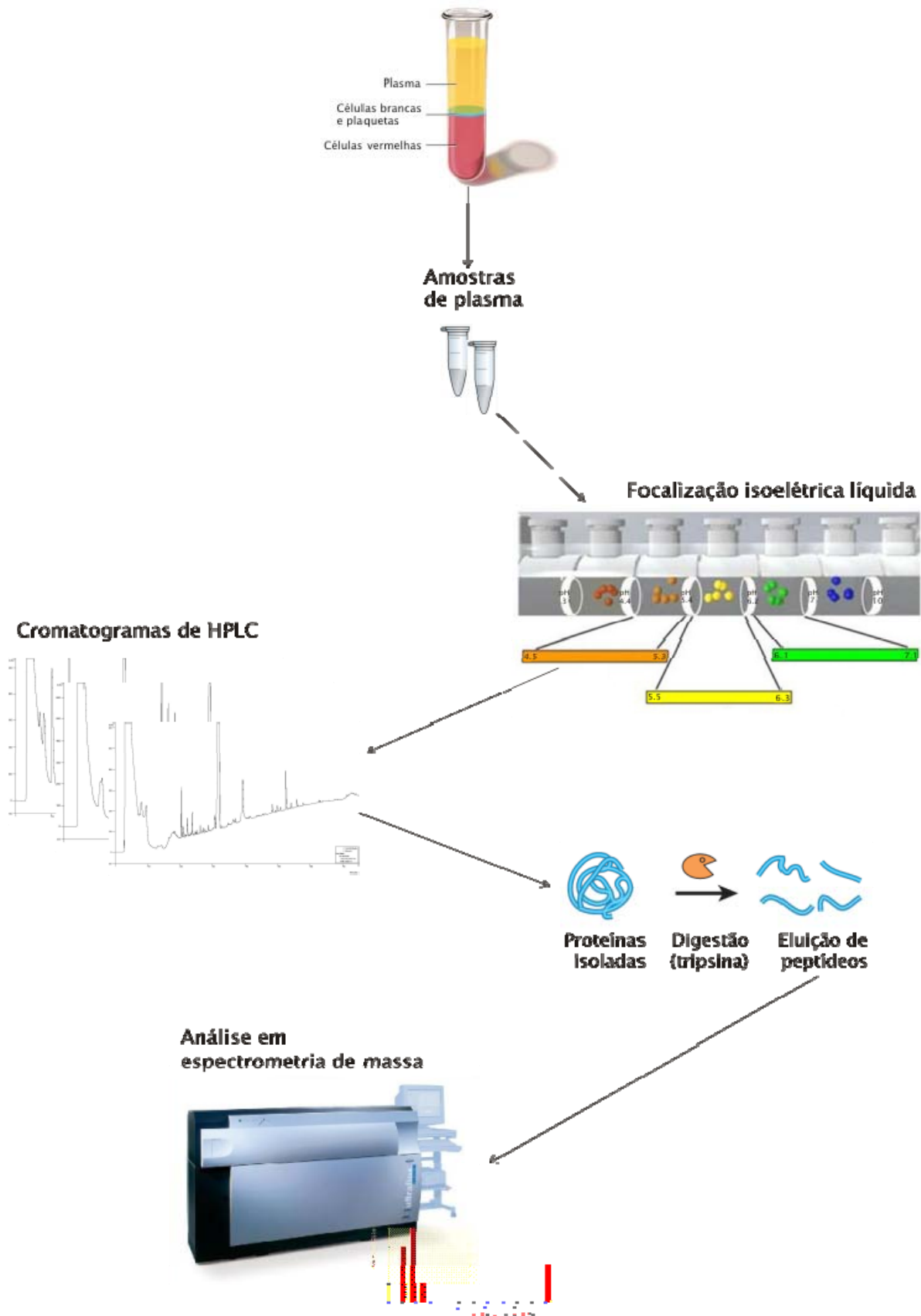
### 3.2.2 Focalização isoeletrica líquida

A amostra precipitada com TCA foi submetida à focalização por ponto isoeletrico com o *ZOOM IEF Fractionator* (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA). Para prepará-la, ao precipitado acima, foi adicionado desnaturante de IEF (7.7 M uréia, 2.2 M tiouréia, 4.4% CHAPS), coquetel inibidor de protease (4-2-aminoetil-benzeno sulfonil-fluoridro, EDTA, bestatina, pepstatina A, E-64, leupeptina) e DTT 2 M. A amostra foi sonicada em gelo por quatro min, sendo misturada a cada meio min. Foi acrescentado Tris-base 1 M à amostra e esta foi incubada por 30 min em temperatura ambiente. Em seguida, foi adicionada iodoacetamida (0,25%) para alquilação e a amostra foi incubada novamente por 30 min em temperatura ambiente. Para parar a alquilação, colocou-se DTT 2 M e incubou-se por 5 min em

temperatura ambiente. Então, a amostra foi centrifugada por 20 min a 16.000 x g. A concentração de proteína no sobrenadante foi determinada usando o *kit* colorimétrico Ensaio de proteína BCA (BioAgency, lote 070312L2, São Paulo, Brasil). Antes de aplicar no *IEF Fractionator*, misturaram-se à amostra, as seguintes soluções: *IEF Denaturant*, *ZOOM Carrier ampholytes* (pH 3-10), DTT 2 M e traço de azul de bromofenol. Foram aplicados no *ZOOM IEF Fractionator* 0,6 mg/mL de proteína. O fracionamento teve a corrente constante em 2 mA e a potência também constante em 2 W durante três etapas: (1) 100 V por 20 min; (2) 200 V por 80 min; e (3) 600 V por 80 min. Após a separação, foram coletadas as frações entre os cinco pontos isoelétricos (3-4, 4-5, 5-6, 6-7, 7-10).

### 3.2.3 Cromatografia líquida de alta pressão

As amostras de cada ponto isoelétrico foram usadas para análise em cromatografia de fase reversa HPLC (Coluna analítica C-18, Vydac). Para submeter ao HPLC, as amostras foram quantificadas e 1 mg de proteína de cada ponto isoelétrico foi usado para a corrida. Em fluxo de 1,0 mL.min<sup>-1</sup>, utilizou-se um gradiente linear de 0-100% de acetonitrila por 60 min, onde de 0-5 min passou apenas H<sub>2</sub>O, de 5-60 min passou o gradiente de acetonitrila e de 60-70 min, passou acetonitrila 100%.



**Figura 15.** Fluxograma das estratégias de execução das análises proteômicas *gel free*.

### 3.3 Análise por ICP-MS

A fim de determinar a concentração de elementos traço nas amostras de plasma com e sem câncer, foi feita uma análise por ICP-MS. As amostras separadas por LIEF e os *spots* selecionados do 2D-PAGE tripsinizados foram submetidos a este processo para medir os níveis de cálcio (Ca), cádmio (Cd), cromo (Cr), cobre (Cu), ferro (Fe), magnésio (Mg), manganês (Mn), molibidênio (Mo), selênio (Se), chumbo (Pb), cobalto (Co) e zinco (Zn). As amostras foram transferidas para tubos, onde foram diluídas com ácido nítrico concentrado em 65% e submetidas a digestão utilizando-se forno de microondas SPEX (MX 350) com 300 a 550 W de potência, sistema aberto e feixe focalizado, por 30 min, atingindo a temperatura máxima de 180° C. Após esta etapa, os digeridos ácidos foram transferidos e diluídos em água destilada/deionizada para 1:20 a fim de quantificar os metais diretamente.

A análise dos metais foi feita no ICP-MS (810-MS, Varian Mulgrave, Austrália), sendo que, para calibrar o aparelho, solução de carbono residual preparada a partir de solução de uréia (5000 mg.L<sup>-1</sup>) foi utilizada. Soluções de referência foram preparadas a partir de soluções estoque contendo 1000 mg.L<sup>-1</sup> de Ca, Cd, Cr, Cu, Fe, Mg, Mn, Mo, Se, Pb, Co e Zn.

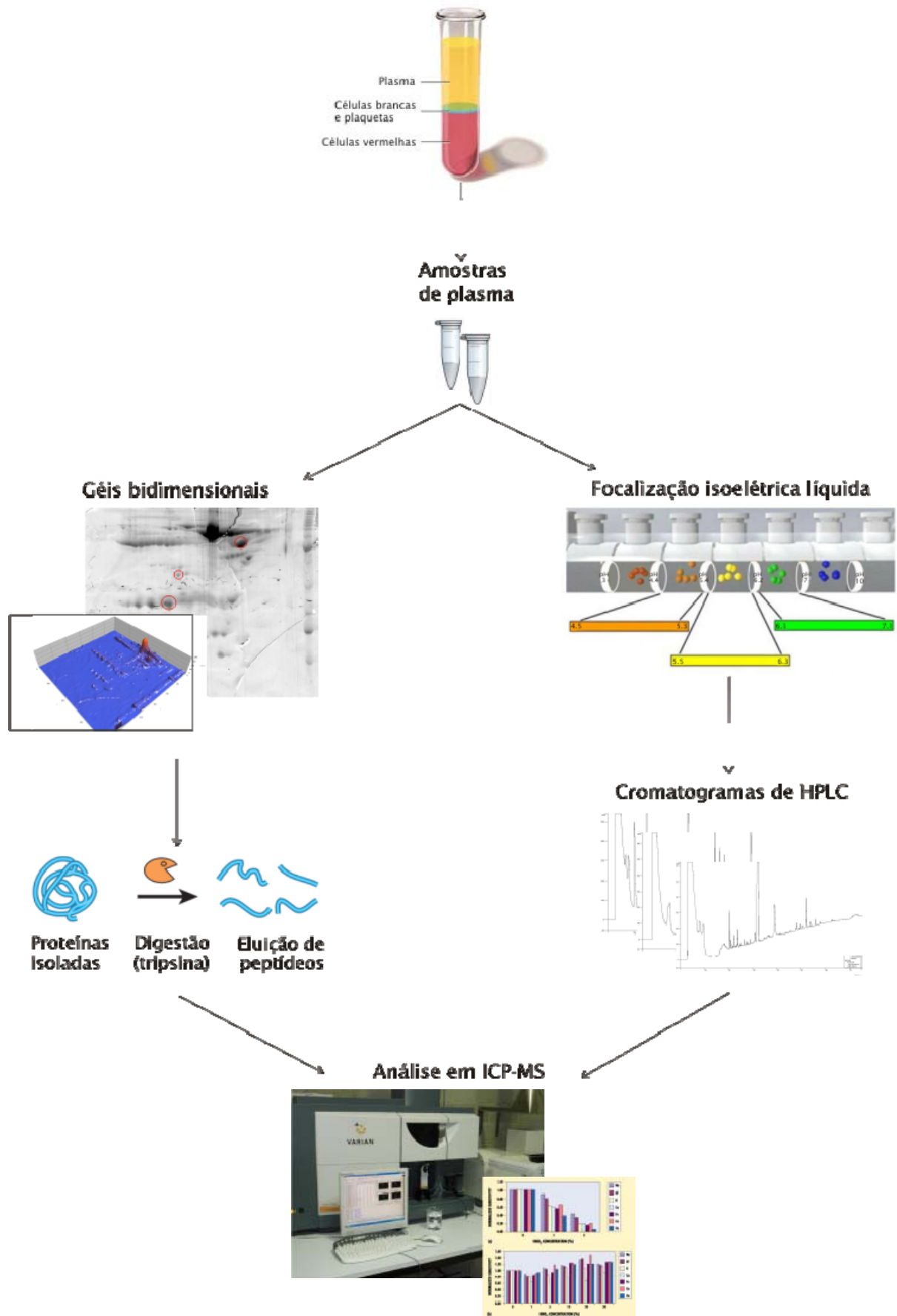
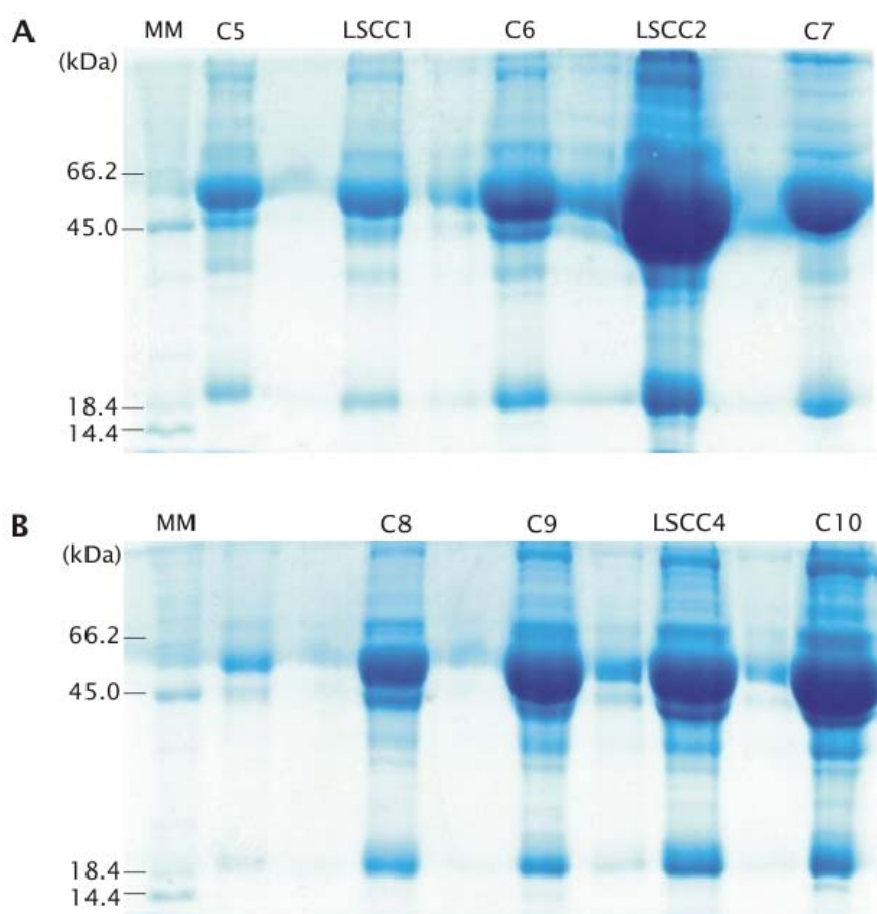


Figura 16. Fluxograma das estratégias de execução das análises de elementos traço por ICP-MS.

# 4 Resultados e discussão

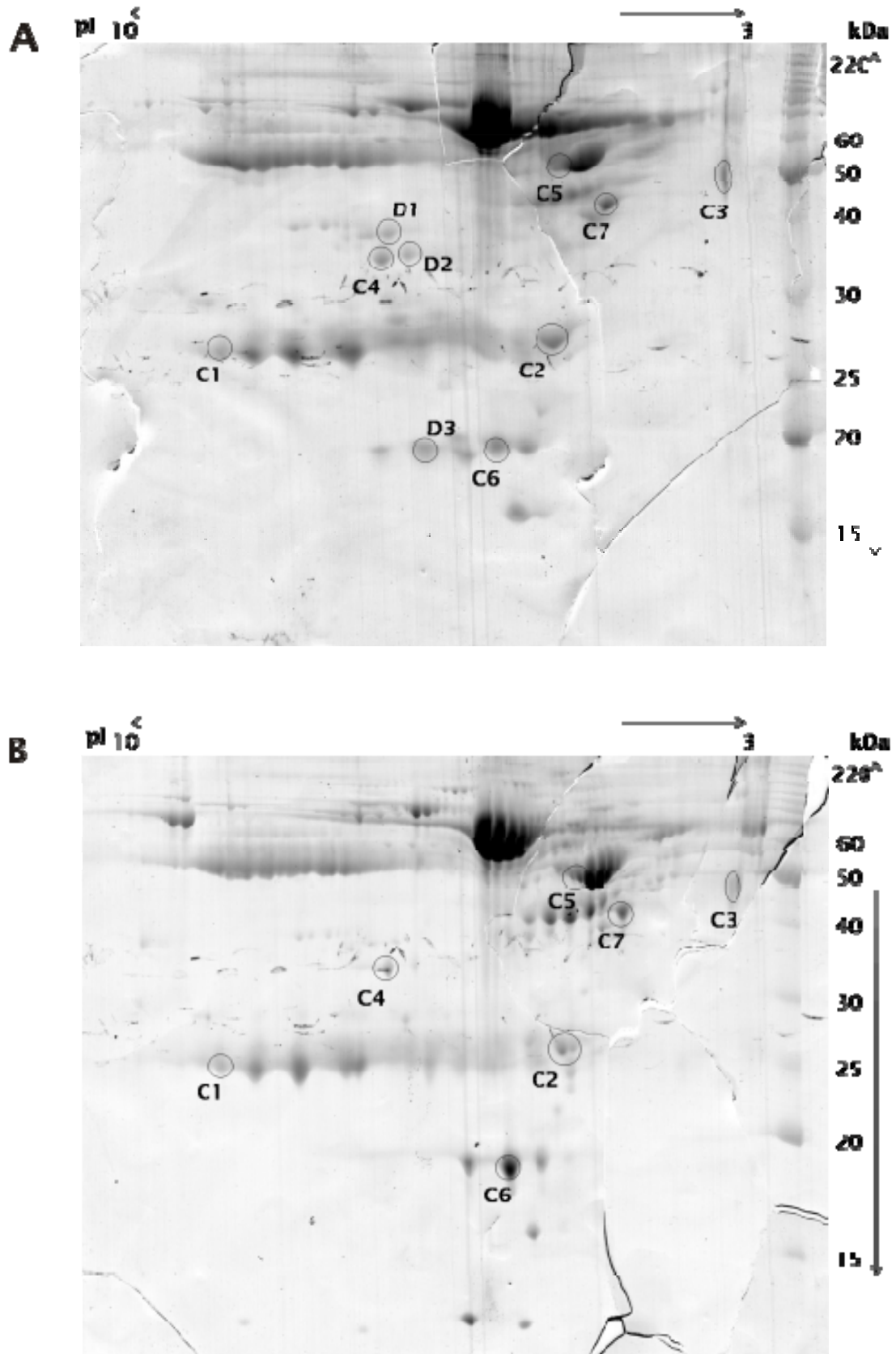
## 4.1 *In gel*

Plasmas de pacientes com LSCC e de fumantes saudáveis usados como grupo controle foram obtidos por meio de protocolo aprovado pelo Comitê de Ética da Associação de Combate ao Câncer de Goiás (Anexo I). Primeiramente, o perfil das amostras de plasma foi verificado por SDS-PAGE (Figura 17), mostrando, com este nível de separação, um padrão homogêneo entre as amostras. Para nosso conhecimento, não há relatos de géis como estes na literatura, não sendo possível compará-los com outros trabalhos. Entretanto, podemos inferir que a maior parte das proteínas, encontrada entre massa molecular de 45,0 e 66,2 kDa, corresponde a albuminas, que são as proteínas mais abundantes no plasma humano (LAWN *et al.*, 1981).



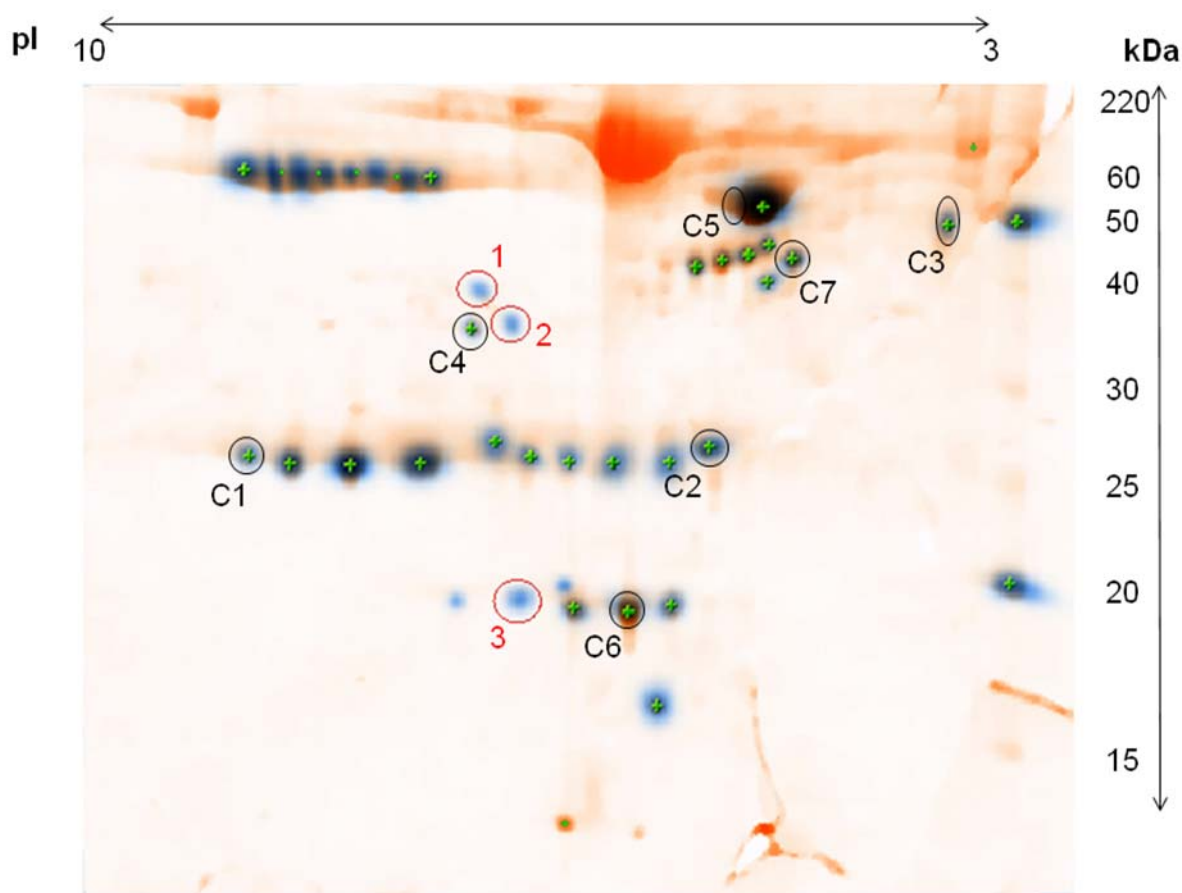
**Figura 17.** SDS-PAGE 12,5% com 50  $\mu$ g de cada amostra com câncer de laringe (LSCC 1, 2 e 4) e sem câncer (C – controle 5, 6, 7, 8, 9 e 10). MM = marcador molecular.

As análises de 2D-PAGE destas amostras foram feitas em réplicas técnicas e biológicas. Plasmas de pacientes com câncer de laringe e plasma de pessoas saudáveis foram utilizados (réplicas biológicas), sendo que, para cada amostra (paciente), três géis bidimensionais foram confeccionados (réplicas técnicas). Apesar de ter sido obtido um total de 24 géis, apenas metade foi selecionada para utilizar na análise devido à qualidade do resultado do experimento. Assim, o número de pacientes analisados foi reduzido para dois pacientes com câncer e dois fumantes saudáveis sem câncer. Na figura 18, estão representados dois géis obtidos, o primeiro de plasma de paciente com câncer (A) e o segundo sem câncer (B), sendo que estes foram escolhidos como géis de referência para cada grupo. As imagens dos géis obtidas foram comparadas umas contra as outras usando como base o volume dos *spots* com o auxílio do *software* BioNumerics (Figura 19). Após o passo de normalização, onde foram selecionados *spots* idênticos em diferentes imagens, foi possível identificar aqueles exclusivos de pacientes com câncer.



**Figura 18.** Géis bidimensionais escolhidos como referência do grupo de amostras com câncer (A) e do grupo de amostras controle (B). As proteínas identificadas por MS estão circuladas. “C” corresponde a controle e “D” a diferencial).

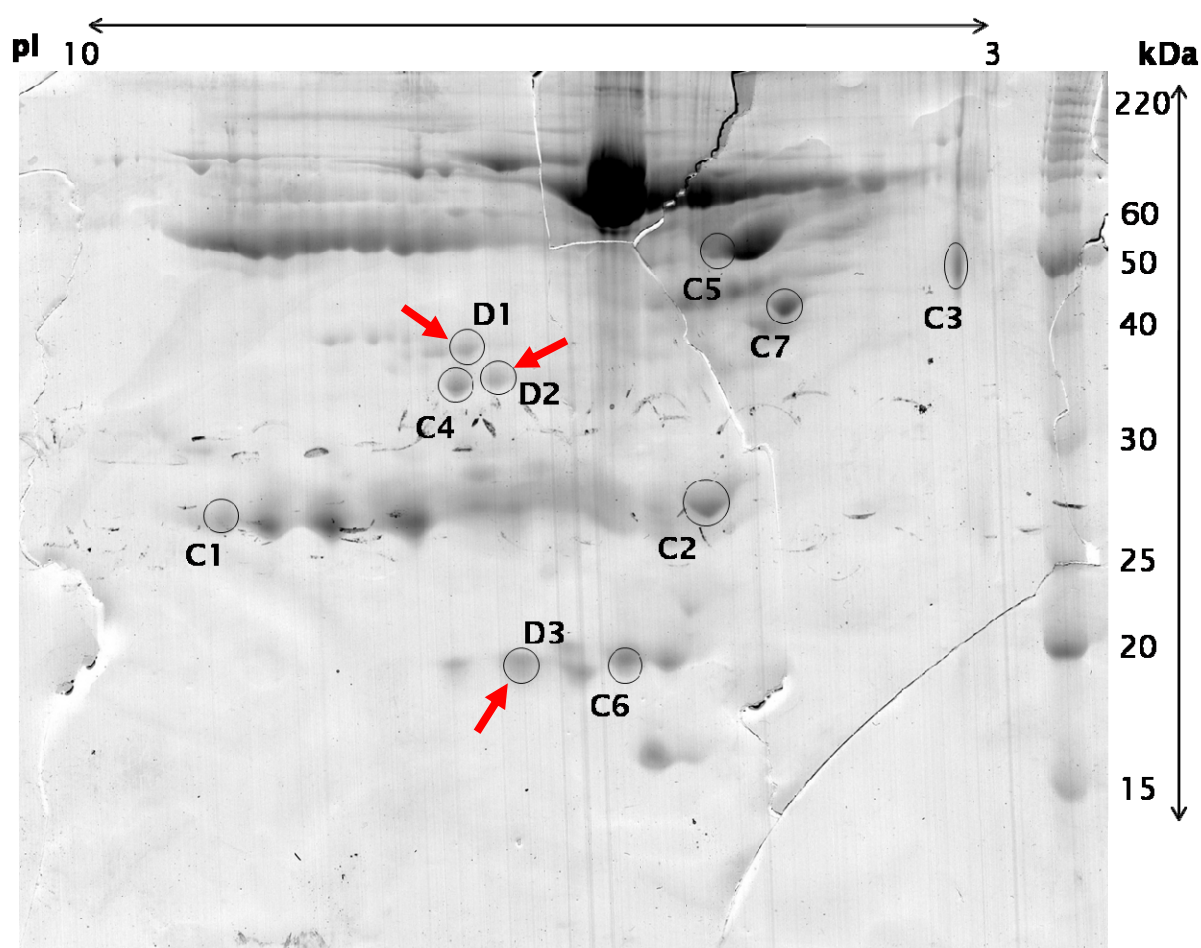




**Figura 19.** Imagem gerada pelo BioNumerics da sobreposição dos géis de referência com câncer (em azul) e sem câncer (em laranja).

Em todos os géis bidimensionais, foram detectados *spots* protéicos com massa molecular entre 10,0 e 60,0 kDa e pH na faixa de 4.0 a 10.0. Perfis de amostras controle mostraram mais de 50 *spots*, onde 34 foram considerados bem delimitados (Figura 18 B). Os perfis das amostras com câncer mostraram aproximadamente a mesma quantidade de *spots*, mas 45 foram considerados bem definidos (Figura 18 A). A maioria das proteínas foi detectada em todos os géis entre pI 4.4 e 7.0, com massa molecular por volta de 53,0 e 60,0 kDa, formando um conglomerado principalmente entre o pI 6.4. De acordo com suas características e com avaliação de gel de soro de paciente com câncer de mama no Swiss-2DPAGE do *site* ExPASy (GASTEIGER *et al.*, 2003), essas proteínas correspondem a albuminas (MINGHETTI *et al.*, 1986). A mesma semelhança foi encontrada ao comparar os perfis aqui obtidos com gel de plasma de Anderson & Anderson (1977). A similaridade entre os géis deste trabalho e os mapas disponíveis *in situ* de plasma humano e soro de câncer de mama nos permite inferir a identidade de algumas proteínas previamente identificadas, como as albuminas.

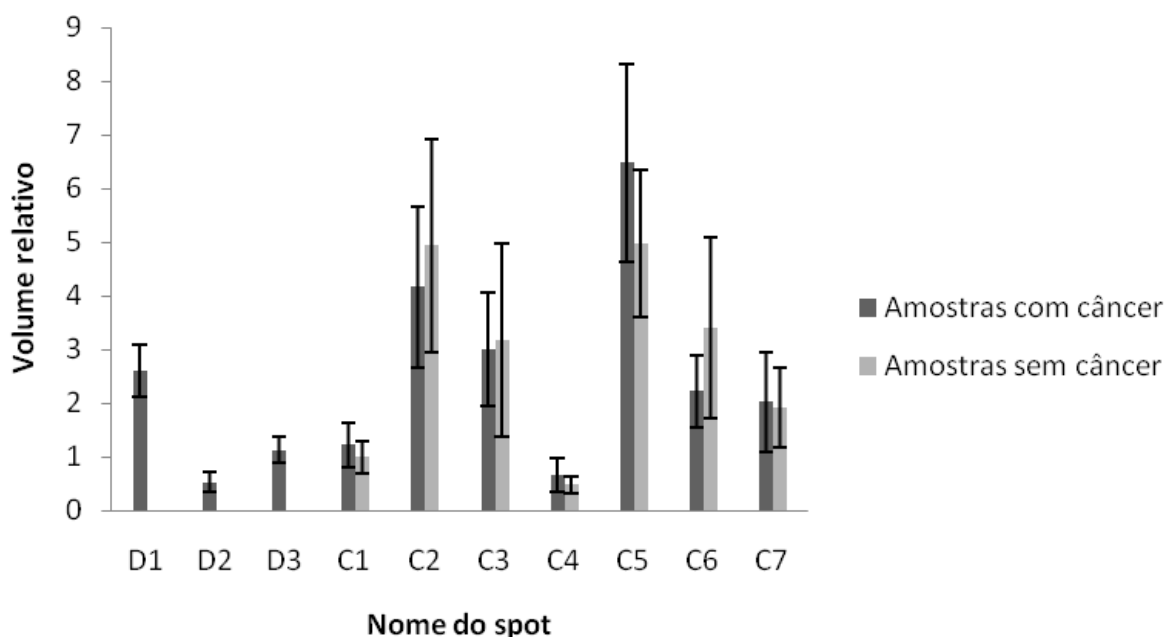
Poucas diferenças foram observadas entre os pacientes com câncer e os controles. Muitos *spots* foram encontrados diferencialmente expressos em várias amostras, mas nenhum era exclusivo de géis de amostras com câncer ou normais. No entanto, a presença de três *spots* (denominados D1, D2 e D3) entre o pI 7.2 e 7.6, com massas moleculares de 20,0, 42,0 e 44,0 kDa, apenas em géis de pacientes com câncer e em ambos os pacientes analisados, sugere a expressão de proteínas induzidas pelo câncer de laringe ou que ajudam no desenvolvimento dessa doença (Figura 20). Estes três *spots* mais outros sete que apareceram em todos os géis – chamados de C (para controle) 1 a 7 – foram tratados com tripsina e identificados por duas técnicas diferentes de espectrometria de massa.



**Figura 20.** 2D-PAGE de pacientes com câncer ilustrando proteínas diferenciais indicadas por setas.

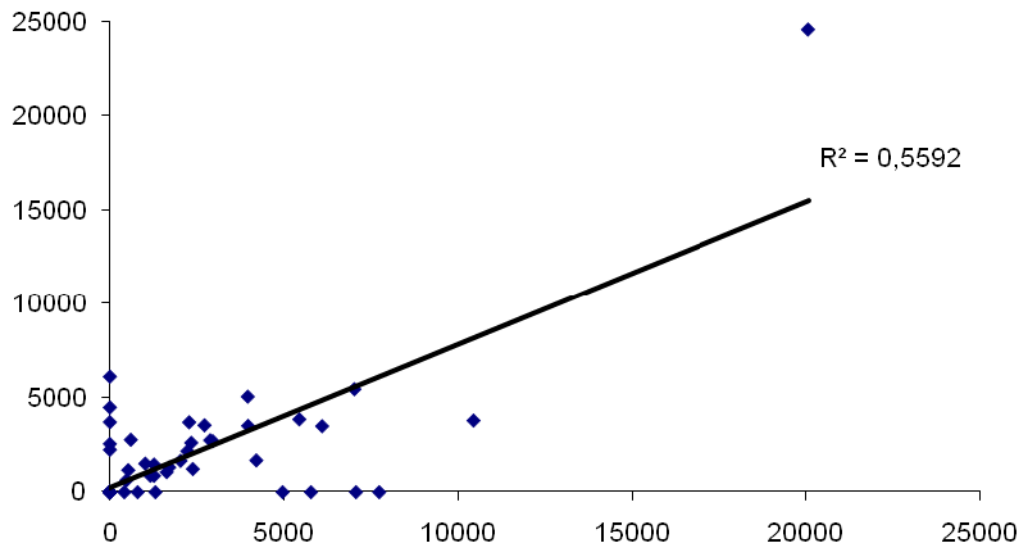
Foi feita uma comparação de expressão de proteínas usando o volume dos *spots* identificados por MS. As proteínas diferenciais aparecem apenas nos perfis com câncer e os *spots* controle aparecem em todos os pacientes, com e sem câncer, em níveis pouco diferentes. O volume relativo na figura 21 foi obtido pela média entre os pacientes, quando o *spot* estava

presente. A oscilação maior ocorre nos *spots* C2, onde há maior expressão nas amostras de pessoas sem câncer, e C5, cuja expressão é mais alta nas amostras de pacientes com câncer do que sem câncer (Figura 21).

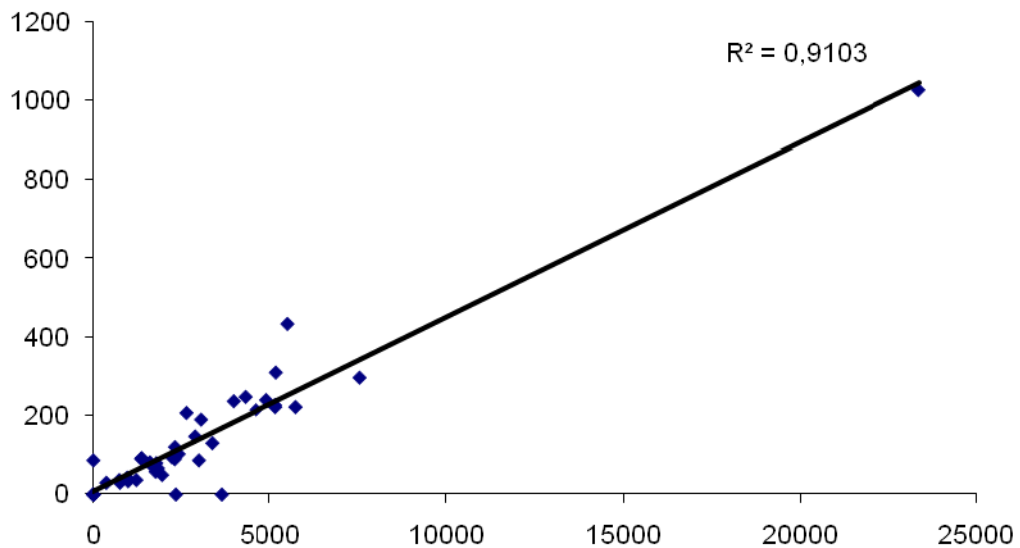


**Figura 21.** Histograma de *spots* sequenciados isolados de amostras com e sem câncer. As barras verticais correspondem ao desvio padrão.

Os dados gerados pelo BioNumerics de acordo com o volume de todos os *spots* nos géis foram combinados de par em par no Excel (Microsoft Office 2007, Microsoft Corporation, Redmond, WA, EUA) para obter valores de correlação para cada grupo e entre os grupos. A média do valor de correlação obtido para as réplicas técnicas do grupo com câncer foi 0,67 (Figura 22). Para as réplicas biológicas foi 0,55. Quanto aos valores correspondentes ao grupo sem câncer, 0,76 foi a média do valor de correlação para as réplicas técnicas (Figura 23) e 0,91 para as biológicas. Ao verificar a correlação entre amostras dos pacientes com e sem câncer, o valor médio obtido foi 0,41.



**Figura 22.** Valor de correlação obtido comparando réplicas técnicas de amostras provenientes de pacientes com câncer. Nos eixos x e y, valores do volume dos *spots* do plasma de um mesmo paciente. O  $R^2$  representa o valor da linha de tendência para os *spots*.



**Figura 23.** Valor de correlação obtido comparando réplicas técnicas de amostras de pacientes sem câncer. Nos eixos x e y, valores do volume dos *spots* do plasma de um mesmo paciente. O  $R^2$  representa o valor da linha de tendência para os *spots*.

Foi identificado por MS um total de dez *spots* (Tabela 3), incluindo os três diferenciais. Todas estas proteínas são encontradas comumente no plasma sanguíneo, sendo que seis delas correspondem a componentes do sistema imune.

**Tabela 3.** Tabela com números, características, número de acesso no UniProt e indentificações dos *spots*. MOWSE *score* é baseado no número das massas peptídicas sequenciadas com suas correspondentes no banco de dados (MASCOT, <http://www.matrixscience.com/help/scoring-help.html>). O modo de sequenciamento *de novo* foi por meio de MALDI-TOF e o CID por LC-ESI-MS.

Nº do <i>spot</i>	MOWSE <i>Score</i>	Sequência peptídica	Modo de sequenciamento	Identificação da proteína	Nº de acesso (UniProt)	pI identificado	MW (kDa) identificado
D1	220	KNQVSLTCLVKG	<i>de novo</i> /CID	Região C da cadeia da IgG	P01860	7.61	44,86
D2	294	KLGQYASPTAKR	<i>de novo</i> /CID	Componente do complemento C4a	P0C0L4	7.39	42,56
D3	422	KDSTYLSSTLTLSKA	<i>de novo</i> /CID	região C da cadeia kappa da Ig	P01834	7.28	20,34
C1	70	KSGTASVVCLLNNFYPRE	<i>de novo</i>	região C da cadeia kappa da Ig	P01834	9.7	32,23
C2	56	RTHLAPYSDEL RQ	<i>de novo</i>	proapolipoproteína A-I	P02647	5.67	32,12
C3	82	KEQLGEFYEALDCLRI	<i>de novo</i>	Precursor da alfa-1-ácido glicoproteína	P02763	3.5	49,95
C4	398	RVEYGFQVKV	<i>de novo</i> /CID	Componente do complemento C4a	P0C0L4	7.73	41,88
C5	88	KITPNLAEFASLYRQ	<i>de novo</i>	Precursor da alfa-1-antitripsina	P01009	5.22	52,32
C6	56	KLPECEADDGCPKPPEIAHGYVEHSVRY	<i>de novo</i>	Haptoglobina Hp2	P00738	6.39	20,65
C7	71	KVYAYYNLEESCTRF	<i>de novo</i>	Componente do complemento C3	P01024	4.97	47,34

## 4.1.1 Spots comuns entre amostras com câncer e normais

O *spot* C2 foi identificado como proapolipoproteína A-I, um precursor da apoproteína A-I (apoA-I). Esta se liga a lipídeos para formar lipoproteínas de alta densidade (*high density lipoproteins* – HDLs), que são relativamente abundantes em plasma. ApoA-I é um cofator da acetiltransferase lecitina-colesterol (*lecithin-cholesterol acyltransferase* – LCAT), responsável pela formação da maioria dos ésteres do HDL. Essa proteína estabiliza a estrutura do HDL e também promove efluxo de colesterol das células (BRESLOW, 1985; MCGUIRE *et al.*, 1996). As apolipoproteínas têm sido relacionadas a diversas doenças, como cardiovasculares (MCGUIRE *et al.*, 1996; MAHLEY *et al.*, 2008), Alzheimer (CORDER *et al.*, 1993; CORDER *et al.*, 1994; MAHLEY *et al.*, 2008) e arteriosclerose (DAVIGNON *et al.*, 1988; MAHLEY *et al.*, 2008). Diferenças na expressão de apolipoproteínas têm sido observadas em câncer de fígado (JIANG *et al.*, 2007) e pâncreas (CHEN *et al.*, 2007). Em soro de pacientes com câncer de pâncreas, proapolipoproteína C-II e apolipoproteína C-III<sub>1</sub> apresentam-se mais e menos expressas respectivamente, sugerindo seu uso como possíveis marcadores diagnósticos para esta doença (CHEN *et al.*, 2007). ApoA-I e apoA-II estão em valores mais baixos em soro de pacientes com câncer de fígado (JIANG *et al.*, 2007). Neste trabalho, observamos uma maior expressão da proapoA-I em pacientes com câncer.

O *spot* C3 corresponde à alfa-1-ácido glicoproteína (*alpha-1-acid glycoprotein* – AGP), também chamada de orosomucóide, que é uma proteína derivada do fígado. As concentrações de AGP aumentam de acordo com certas condições, como inflamação, gravidez, pós-cirurgia e câncer, uma vez que ela pertence às proteínas de fase aguda. Pesquisas têm demonstrado que existe uma homologia significativa entre a sequência de aminoácidos da proteína AGP e a imunoglobulina gamma (IgG) e que ela é necessária para manter a permeabilidade capilar para a homeostase (GAHMBERG e ANDERSSON, 1978; SORENSSON *et al.*, 1999). Corroborando esses resultados, Ganz e colegas (1984) também observaram que os níveis de AGP refletem atividade da doença e podem refletir a progressão do tumor. Os níveis dessa proteína no plasma de pacientes com câncer ativo de pulmão eram elevados em comparação a pacientes de câncer com o tumor em remissão (considerado inativo). Neste mesmo estudo, a normalização de AGP durante quimioterapia estava

relacionada a uma menor taxa de reincidência e maior sobrevida (GANZ *et al.*, 1984). Por outro lado, a expressão da AGP no presente trabalho mostrou-se menor entre os pacientes com câncer ao compará-la aos pacientes com câncer.

O *spot* denominado C5 foi identificado como pré-alfa-1-antitripsina, um grande inibidor de protease no plasma humano (CARLSON *et al.*, 1988; SEGELMARK *et al.*, 1995). Esta glicoproteína pertence à família serpina dos inibidores de protease e é produzida principalmente nos hepatócitos. Sua principal função é proteger tecidos de enzimas provenientes de células inflamatórias, especialmente a elastase neutrofílica (FAIRBANKS e TAVILL, 2008). A deficiência de alfa-1-antitripsina, causada pela mutação de uma única base, previne com que a proteína seja exportada do hepatócito, causando uma diminuição da sua concentração no plasma. Portanto, ela é associada com doença crônica do fígado e enfisema prematuro (CARRELL, 1986; FAIRBANKS e TAVILL, 2008), mas, na medida do nosso conhecimento, não existem pesquisas de sua relação com o câncer.

O *spot* controle C6 foi atribuído como haptoglobina (HPT), que pertence à família de proteínas de fase aguda, cuja síntese é induzida por várias citocinas durante processos inflamatórios (FIRPO *et al.*, 2008). Outra função da HPT é ligar hemoglobina livre do plasma para formar um complexo estável e, portanto, prevenir danos oxidativos ao tecido (FIRPO *et al.*, 2008; POLITICELLI *et al.*, 2008). Também tem sido demonstrado que a HPT é um fator essencial na migração celular (POLITICELLI *et al.*, 2008) e é um agente angiogênico (CID *et al.*, 1993; YE *et al.*, 2003), ativando crescimento e diferenciação celular. Esta proteína foi encontrada superexpressa em soro de pacientes com tumores de ovário e pulmão (GAS *et al.*, 2008).

Uma vez que nosso grupo controle foi representado por fumantes saudáveis, a resposta imune não foi completamente ativada por este estímulo, apesar de termos observado a expressão de algumas proteínas inflamatórias. Assim, o restante dos *spots* comuns entre pacientes com e sem câncer foram identificados como proteínas do sistema imune. O *spot* C4 corresponde ao componente do complemento C4a, o *spot* C1 à região constante (C) da cadeia da IgG (*Ig gamma-3 chain C region*) e o *spot* C7 é o componente do complemento C3.

## 4.1.2 Spots diferenciais das amostras com câncer

Os três *spots* diferenciais também fazem parte de proteínas do sistema imune, sendo que o D1 corresponde à região C da cadeia da IgG, o D2 ao componente do complemento C4a e o D3 à região C da cadeia kappa da Ig (*Ig kappa chain C region*).

O sistema complemento é um componente com papel importante na resposta inflamatória, incluindo o câncer. Por exemplo, as proteínas C3a, C4a e C5a aumentam as reações inflamatórias ao estimular a dilatação de artérias, liberar histaminas de mastócitos e basófilos e atrair neutrófilos para o local da inflamação (JANEWAY, 2001; DE VISSER *et al.*, 2006; GABRIEL, 2007). A ativação do sistema complemento pode causar a destruição do tumor ao induzir lise celular (GORTER e MERI, 1999).

Por outro lado, há estudos que contradizem esta visão comum do sistema imune responder contra o tumor, ao mostrarem evidências de que certas respostas imunes do complemento podem dar ao tumor uma vantagem de crescimento (LOVELAND e CEBON, 2008; MARKIEWSKI *et al.*, 2008). Markiewski e colegas (2008) demonstraram que o sistema complemento contribui para mecanismos que promovem o crescimento de tumores malignos. No seu estudo, a deficiência de proteínas C3, C4 ou receptor da C5a pode estar associada a uma diminuição na taxa de crescimento do tumor. Este fato foi observado em camundongos com deficiência de proteínas C4, juntamente com a deposição de C1q no tumor, indicando a ativação do complemento pela via clássica durante o desenvolvimento do câncer. Assim, eles concluem que a ativação do sistema complemento e da sinalização da C5a gera um ambiente que suprime a resposta antitumoral mediada por células T CD8<sup>+</sup> ao recrutar células supressoras de tumor (MARKIEWSKI *et al.*, 2008).

Células cancerosas podem ser vistas da perspectiva imunológica como células próprias alteradas que escaparam a mecanismos normais de regulação do crescimento. A possibilidade de respostas imunes específicas eliminarem tumores é amplamente aceita e tem sido o objeto de vários estudos (HUNG *et al.*, 1998; CHIPLUNKAR, 2001; ROSENBERG, 2001; DUNN *et al.*, 2004; WANG *et al.*, 2007; VARELA *et al.*, 2008). No trabalho de Kús *et al.* (1985), a microscopia eletrônica de carcinomas primários de laringe revelaram que estes tumores se encontram infiltrados por células da resposta imune. Estas células estão localizadas dentro e ao redor das infiltrações de tumores e são representadas por linfócitos, monócitos e



macrófagos. Estes resultados confirmam que o corpo humano, até certo ponto, é capaz de atacar tecidos malignos (KUS *et al.*, 1985). Anticorpos reativos a tumor encontrados no soro de pessoas com câncer apóiam o papel de linfócitos T e B como membros da vigilância imune contra tumores (CHIPLUNKAR, 2001; PORTH, 2007).

Quanto à expressão das imunoglobulinas presentes no sangue de pacientes com câncer de laringe, Vlock *et al.* (1993) observaram que pacientes com tumores pouco ou moderadamente diferenciados apresentavam uma concentração de anticorpos significativamente mais alta quando comparada a pacientes com tumores bem diferenciados. Neste estudo, também foi observado que pacientes com altos níveis de complexos imunes na circulação respondiam menos à quimioterapia. Não foram identificadas correlações entre os níveis destes complexos imunes e o estadiamento, local ou recorrência da doença. Estes resultados apóiam o fato de que a formação de complexos imunes associados ao tumor em pacientes com HNSCC está associada a uma diminuição da resposta à quimioterapia (VLOCK *et al.*, 1993).

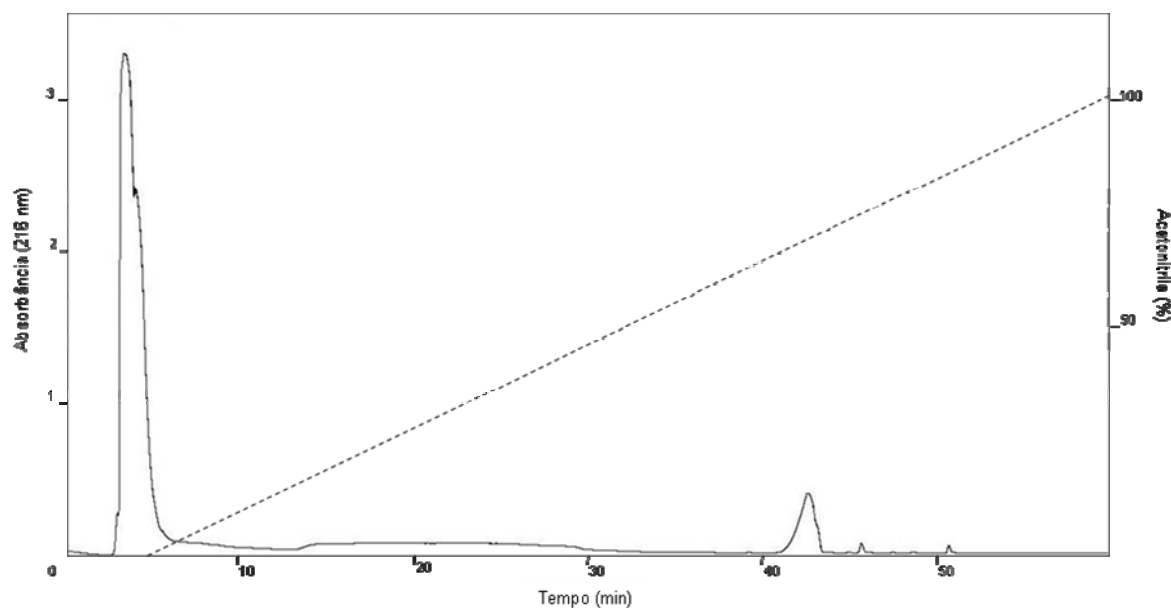
No presente estudo, foi observado que os componentes do complemento C3 e C4 estão presentes em amostras de pacientes tanto com câncer quanto sem câncer. A presença destes componentes, de acordo com Markiewski *et al.*, em pacientes fumantes saudáveis, pode contribuir para o crescimento do tumor (MARKIEWSKI *et al.*, 2008). De acordo com nossos resultados, parece que a resposta imune ativa contra o tumor foi representada pelas atividades de linfócitos T e B baseada na expressão de imunoglobulinas em amostras de pacientes com câncer.

Como existe uma heterogeneidade molecular enorme em todos os cânceres humanos e como as proteínas são os mediadores das funções celulares, o estudo de mudanças no padrão de proteínas resultantes de uma lesão patológica se mostra uma fonte em potencial para a descoberta de marcadores moleculares. Este estudo pode indicar um papel do tabaco no desenvolvimento do câncer de laringe e reforça a importância da resposta imune como alvo na compreensão e tratamento do câncer.

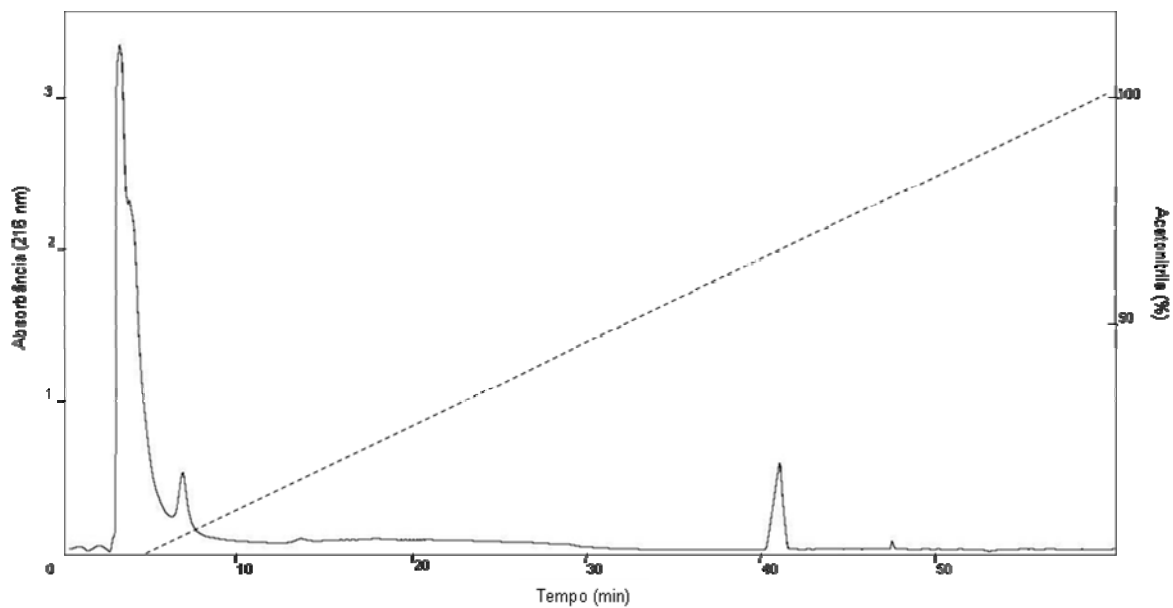
## 4.2 Gel free

Os experimentos envolvendo metodologia *gel free* para separação de proteínas do plasma sanguíneo foram realizados com plasma de um paciente com câncer de laringe e duas pessoas saudáveis, sendo uma fumante e a outra não fumante. Com a focalização isoelétrica líquida, foi possível separar as proteínas pelo seu ponto isoelétrico em uma faixa de pH entre 3 e 10, assim como nos experimentos *in gel*. Cinco frações foram obtidas para cada amostra: pHs 3-4, 4-5, 5-6, 6-7, e 7-10.

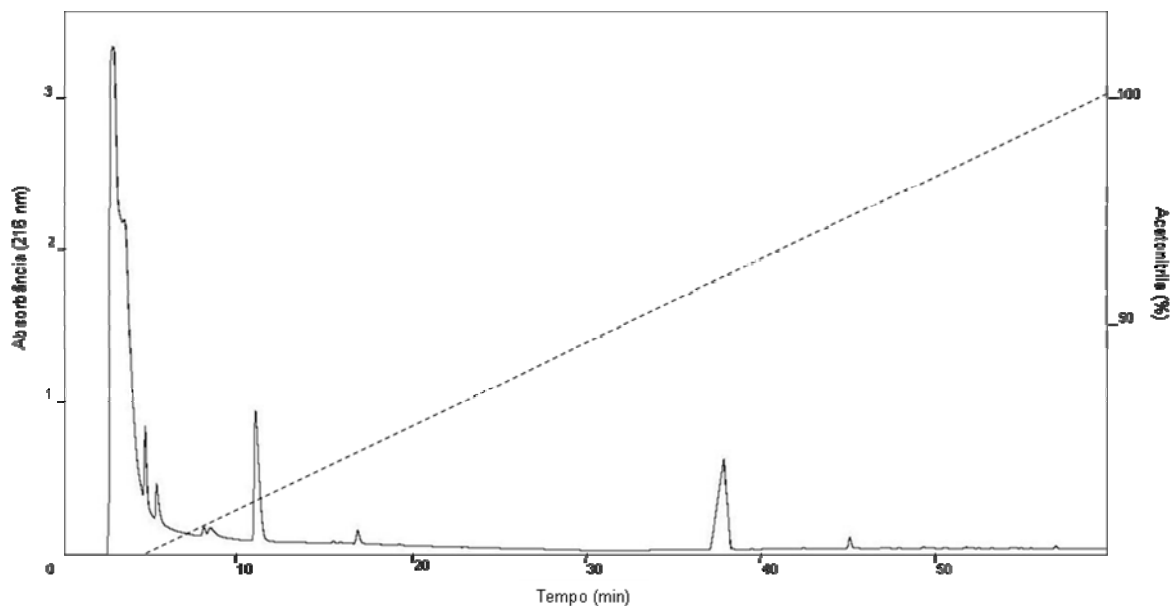
Cromatogramas das frações obtidas a partir da LIEF revelaram a separação de diversas proteínas, com padrões diferentes para cada pI em todas as amostras. As frações de pI do plasma de paciente saudável não fumante encontram-se representadas nas figuras 24 a 28.



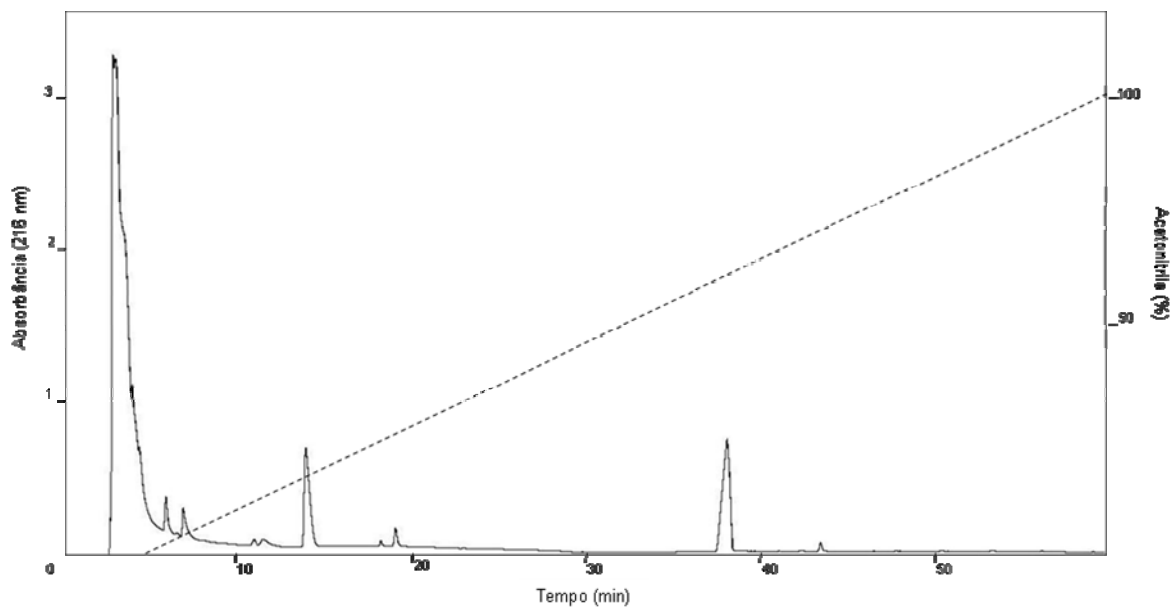
**Figura 24.** Cromatograma da HPLC de plasma de pessoa saudável não fumante. Fração de pI 3-4 separada por LIEF. A linha tracejada corresponde ao gradiente linear de acetonitrila (0-100%).



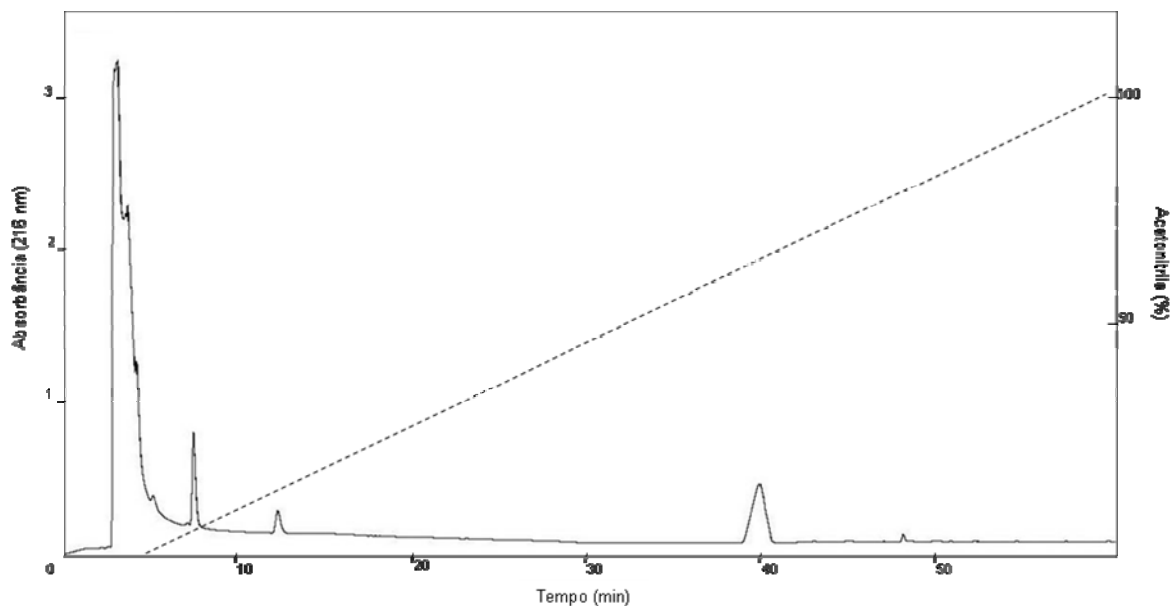
**Figura 25.** Cromatograma da HPLC de plasma de pessoa saudável não fumante. Fração de pi 4-5 separada por LIEF. A linha tracejada corresponde ao gradiente linear de acetonitrila (0-100%).



**Figura 26.** Cromatograma da HPLC de plasma de pessoa saudável não fumante. Fração de pi 5-6 separada por LIEF. A linha tracejada corresponde ao gradiente linear de acetonitrila (0-100%).

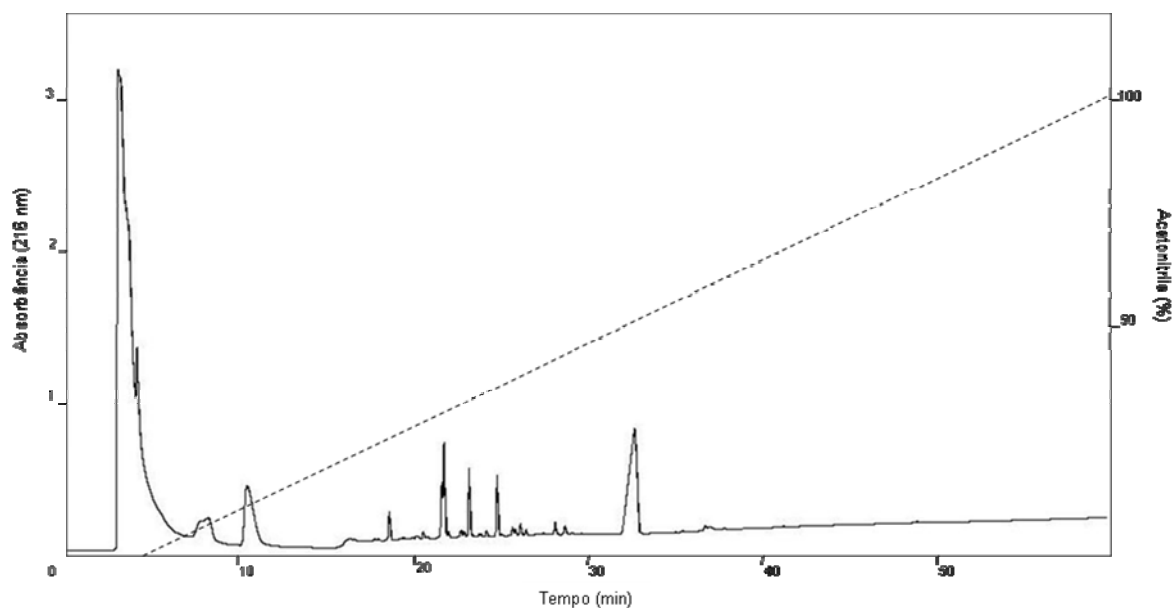


**Figura 27.** Cromatograma da HPLC de plasma de pessoa saudável não fumante. Fração de pI 6-7 separada por LIEF. A linha tracejada corresponde ao gradiente linear de acetonitrila (0-100%).

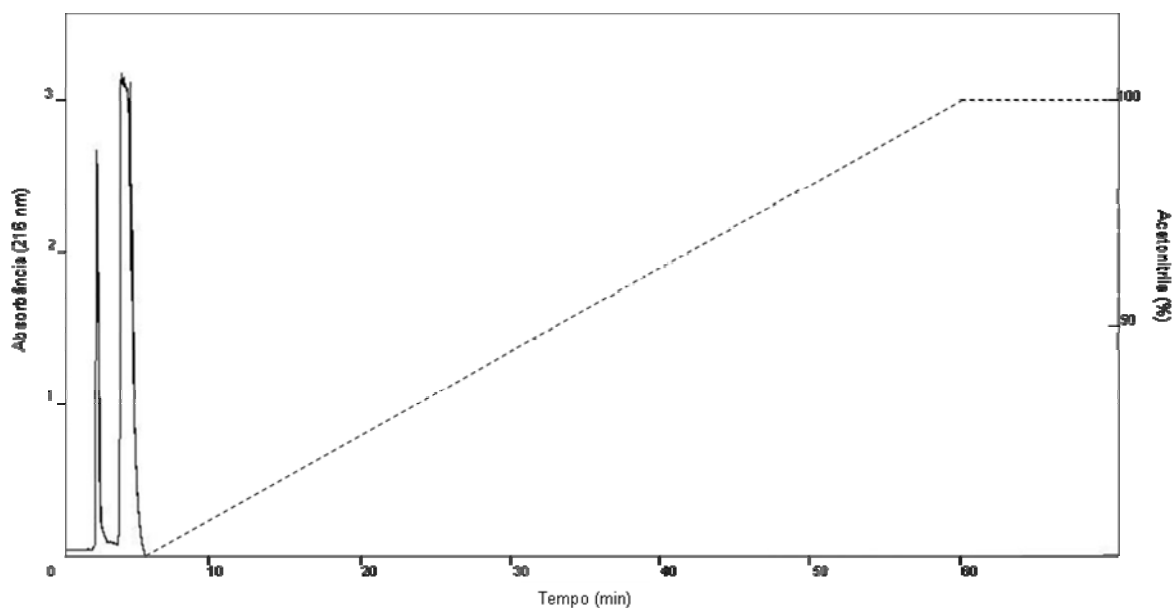


**Figura 28.** Cromatograma da HPLC de plasma de pessoa saudável não fumante. Fração de pI 7-10 separada por LIEF. A linha tracejada corresponde ao gradiente linear de acetonitrila (0-100%).

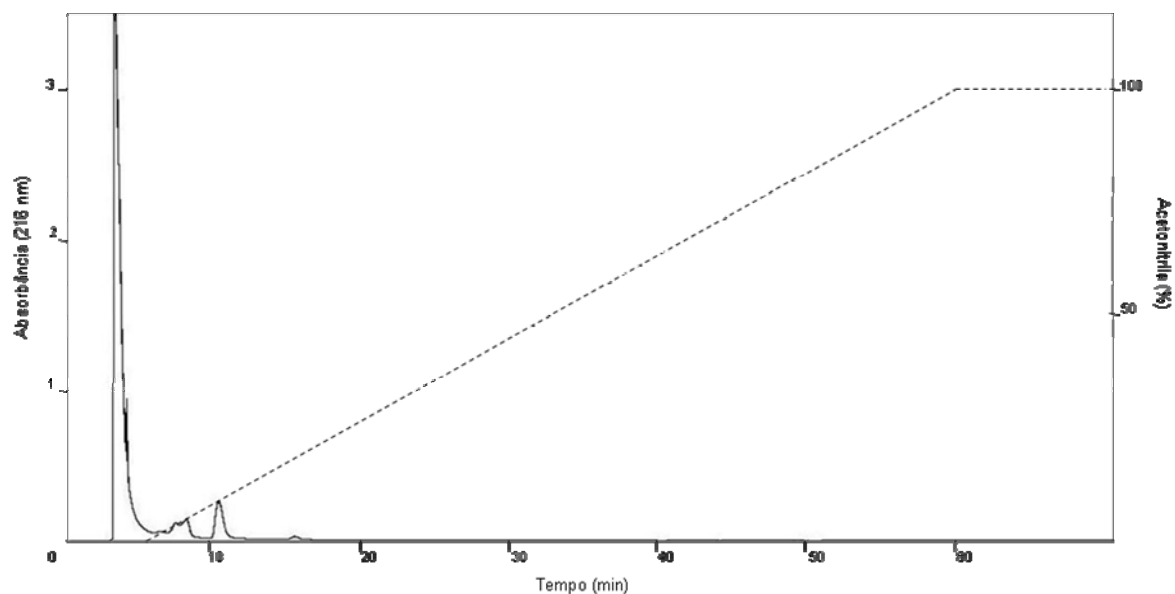
É possível observar maior quantidade de proteínas nas amostras de pI 5-6 e 6-7, especialmente se comparado com a fração 3-4. Da mesma forma, nas análises de 2D-PAGE, foram observadas proteínas entre os pIs 4.0 e 10.0, sendo que a maioria encontrava-se entre os pIs 5.0 e 7.0. Este padrão de distribuição também foi observado nos resultados de plasma de paciente saudável fumante (Figuras 29 a 33).



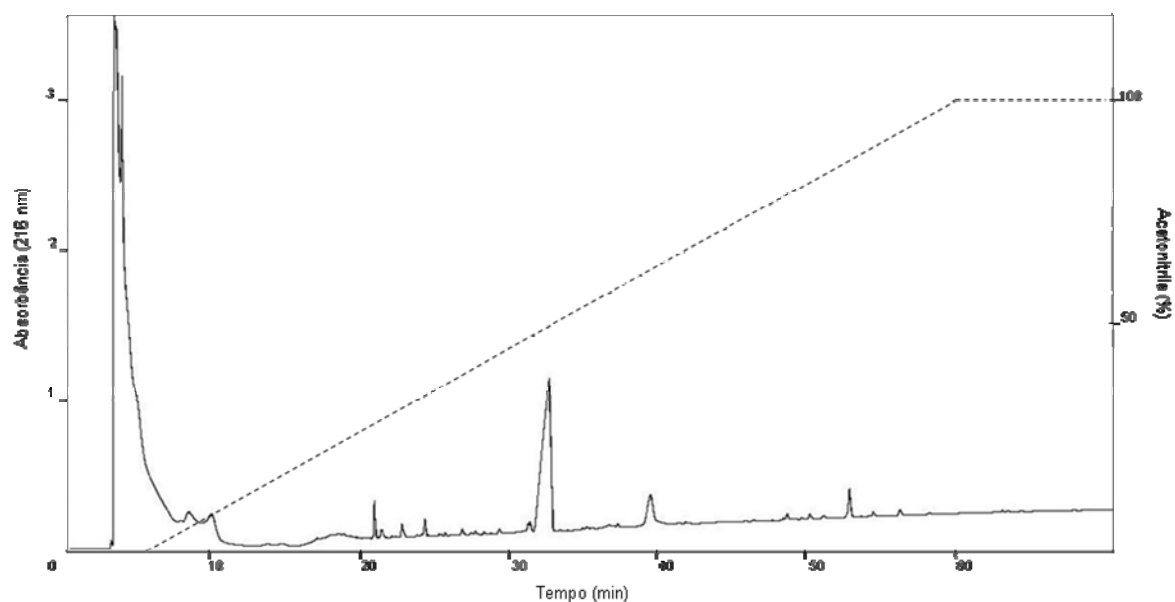
**Figura 29.** Cromatograma da HPLC de plasma de fumante saudável. Fração de pI 3-4 separada por LIEF. A linha tracejada corresponde ao gradiente linear de acetonitrila (0-100%).



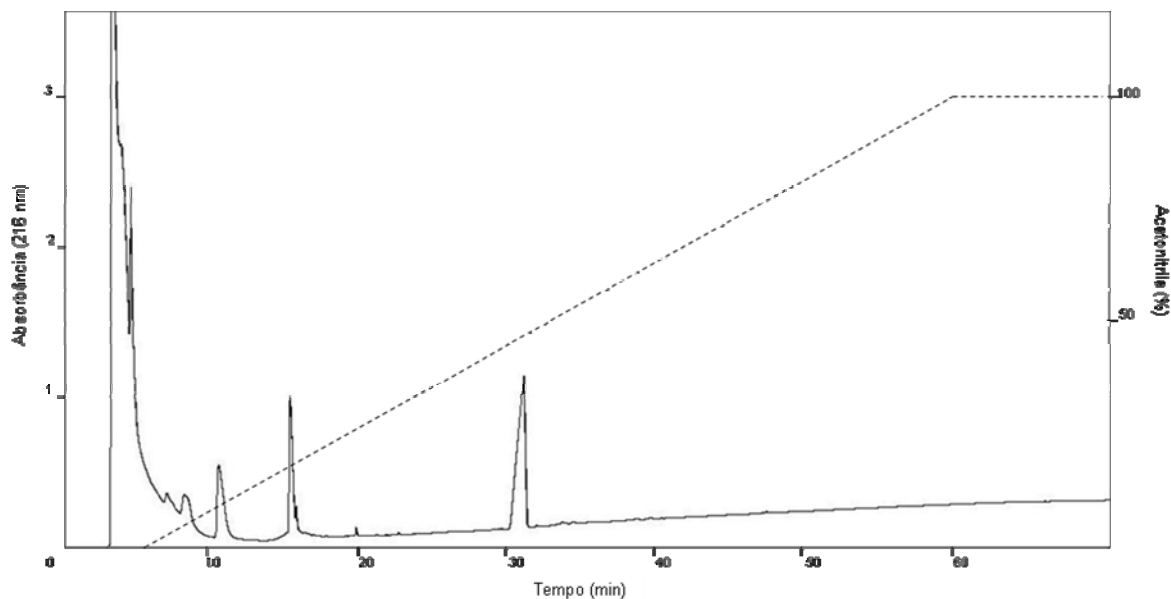
**Figura 30.** Cromatograma da HPLC de plasma de fumante saudável. Fração de pI 4-5 separada por LIEF. A linha tracejada corresponde ao gradiente linear de acetonitrila (0-100%).



**Figura 31.** Cromatograma da HPLC de plasma de fumante saudável. Fração de pI 5-6 separada por LIEF. A linha tracejada corresponde ao gradiente linear de acetonitrila (0-100%).



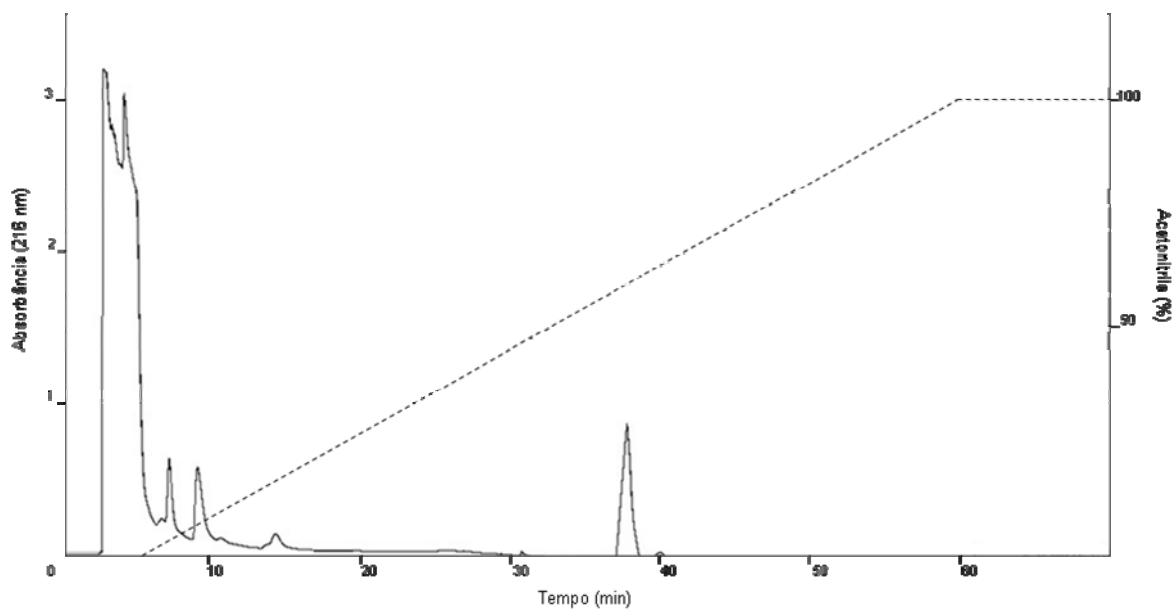
**Figura 32.** Cromatograma da HPLC de plasma de fumante saudável. Fração de pI 6-7 separada por LIEF. A linha tracejada corresponde ao gradiente linear de acetonitrila (0-100%).



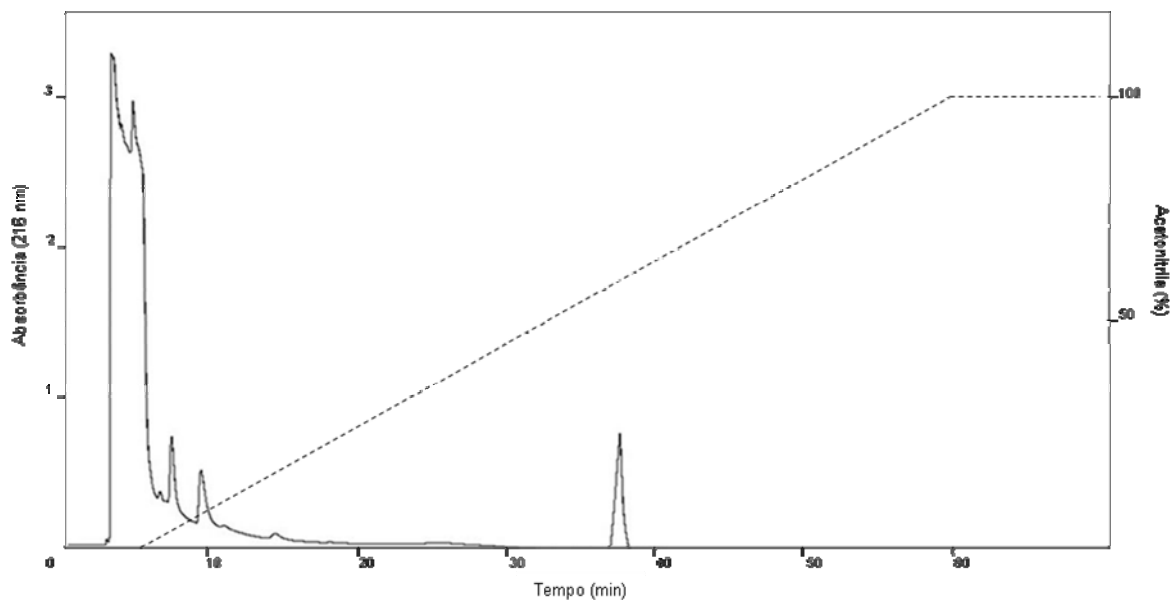
**Figura 33.** Cromatograma da HPLC de plasma de fumante saudável. Fração de pI 7-10 separada por LIEF. A linha tracejada corresponde ao gradiente linear de acetonitrila (0-100%).

Apesar de haver semelhanças entre os cromatogramas de pI 3-4, 6-7 e 7-10 de pacientes saudáveis, os resultados do paciente fumante sem câncer encontram-se diferentes para os pIs 4-5 e 5-6, onde poucos picos estão presentes em comparação com o primeiro paciente. Além disso, é importante lembrar que existem variações individuais na expressão proteica.

Os cromatogramas do paciente com câncer (Figuras 34 a 38) tiveram resultados muito parecidos entre si. Ao contrário do esperado, o padrão foi homogêneo entre os cromatogramas, onde foram observados picos no mesmo tempo em todos os pIs. No entanto, isso pode ser devido à baixa quantidade de proteínas, não tendo sido possível a detecção das mesmas por este método.

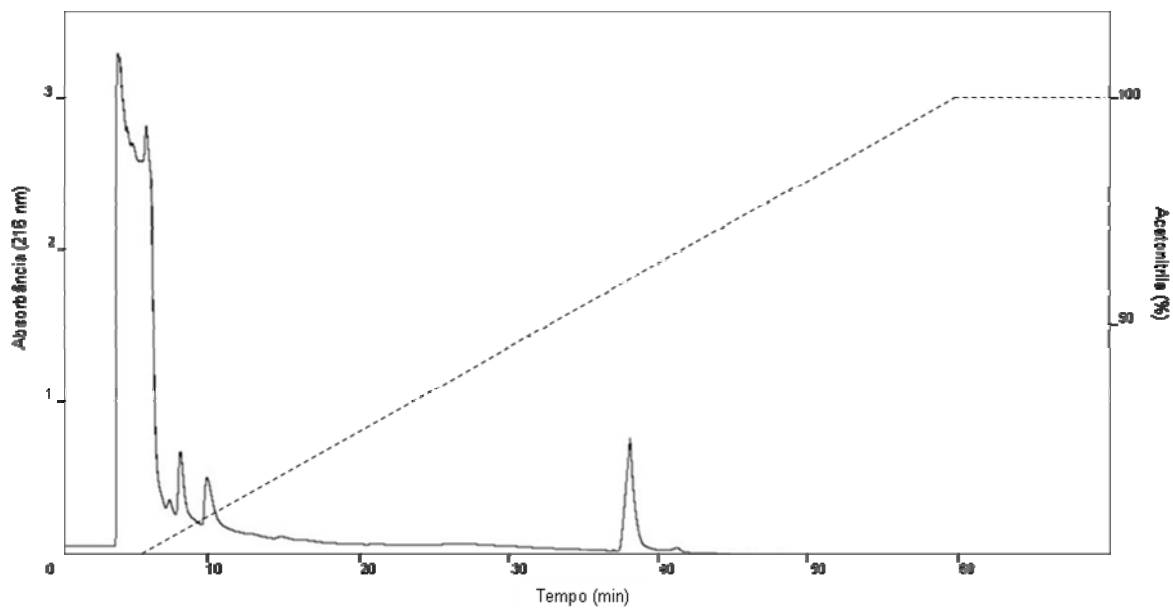


**Figura 34.** Cromatograma da HPLC de plasma de paciente com câncer. Fração de pI 3-4 separada por LIEF. A linha tracejada corresponde ao gradiente linear de acetonitrila (0-100%).

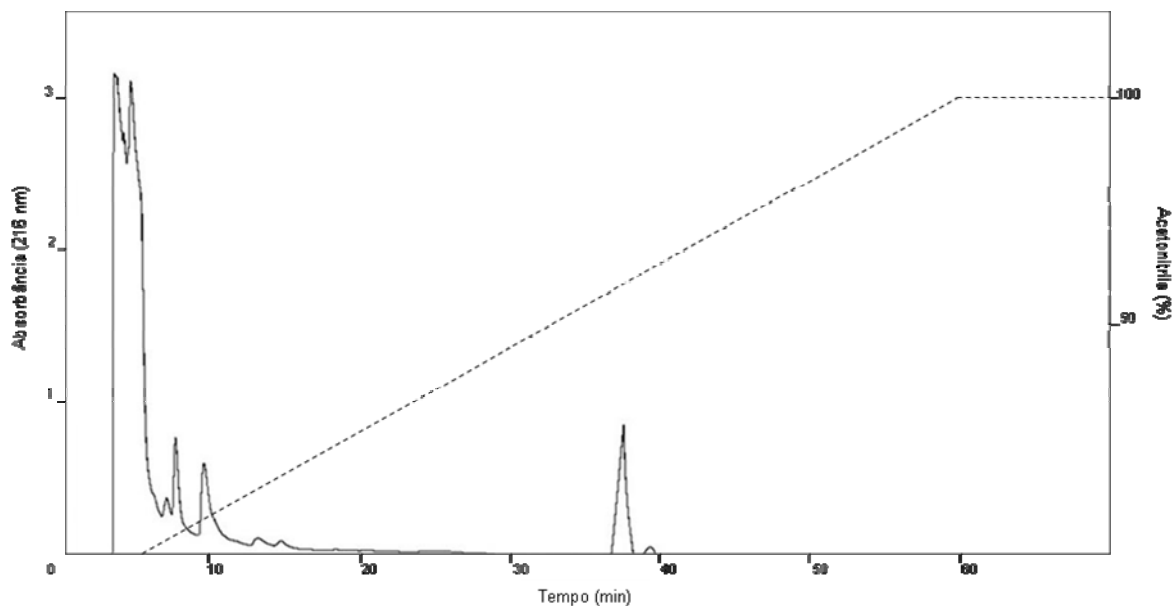


**Figura 35.** Cromatograma da HPLC de plasma de paciente com câncer. Fração de pI 4-5 separada por LIEF. A linha tracejada corresponde ao gradiente linear de acetonitrila (0-100%).

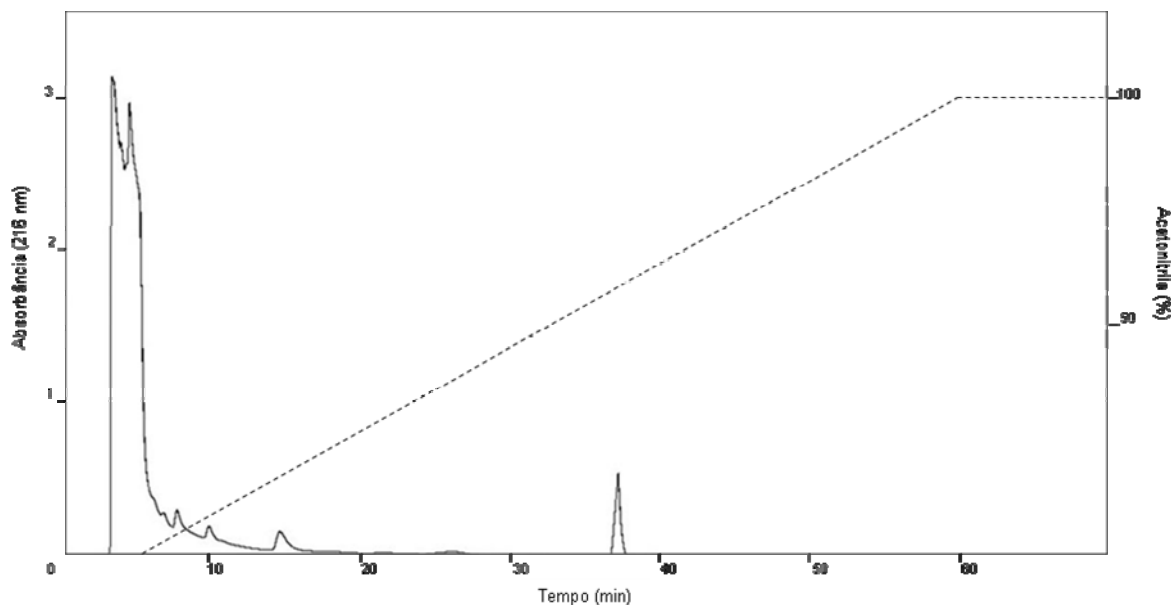




**Figura 36.** Cromatograma da HPLC de plasma de paciente com câncer. Fração de pi 5-6 separada por LIEF. A linha tracejada corresponde ao gradiente linear de acetonitrila (0-100%).



**Figura 37.** Cromatograma da HPLC de plasma de paciente com câncer. Fração de pi 6-7 separada por LIEF. A linha tracejada corresponde ao gradiente linear de acetonitrila (0-100%).



**Figura 38.** Cromatograma da HPLC de plasma de paciente com câncer. Fração de pI 7-10 separada por LIEF. A linha tracejada corresponde ao gradiente linear de acetonitrila (0-100%).

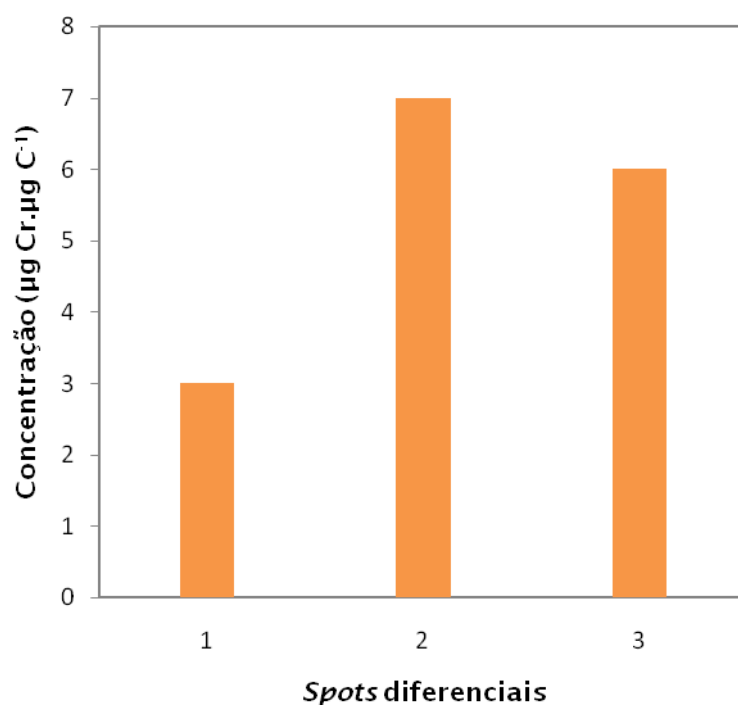
O objetivo de desenvolver metodologias alternativas à 2D-PAGE surge das limitações desta, como o excesso de manuseio da amostra, aumentando as chances de modificação ou perda (WALLER *et al.*, 2008), a inabilidade de detectar proteínas de baixa expressão e massa molecular muito baixa ou muito alta (WALL *et al.*, 2000; MORITZ *et al.*, 2005), o longo tempo necessário para obter resultados e a recuperação das proteínas para experimentos posteriores (WALL *et al.*, 2000; DAVIDSSON *et al.*, 2002; WANG *et al.*, 2003; LI *et al.*, 2005).

Os resultados preliminares obtidos com as técnicas de LIEF e HPLC sugerem sua possibilidade para a separação de proteínas. Comparando as cromatografias de HPLC dos pacientes saudáveis com os géis bidimensionais, observamos em ambos a menor quantidade de proteínas presentes nos pIs 3-4 e o aumento da sua quantidade entre os pIs 5 e 7. Apesar de mais experimentos serem necessários, para uma tentativa de desenvolvimento de protocolo, esses métodos usados juntamente parecem ser eficientes para separação de proteínas de plasma e uma alternativa mais rápida à 2D-PAGE.

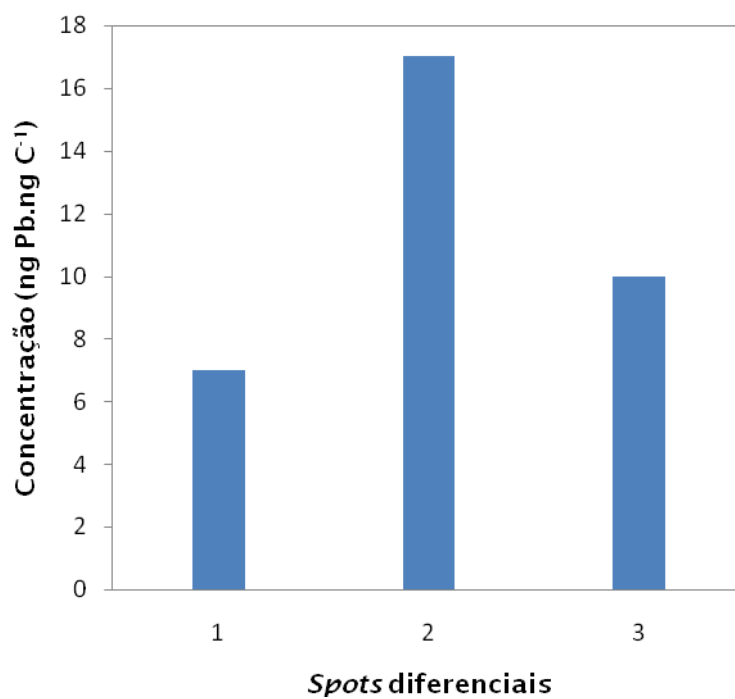
## 4.3 Metaloproteômica

Amostras de proteínas isoladas obtidas pela metodologia *gel free* (dados não mostrados) e *in gel* foram submetidas à análise de elementos traço por ICP-MS. Aliquotas dos *spots* selecionados digeridos com tripsina foram diretamente analisadas. Os metais avaliados foram Ca, Cd, Cr, Cu, Co, Fe, Mg, Mn, Mo, Se, Pb e Zn. Primeiramente, as pesquisas deste tipo buscam a quantidade de elementos em tecidos ou plasma totais. Aqui, verificamos a concentração de metais em amostras altamente purificadas a fim de verificar a possibilidade de haver metais ligados às proteínas específicas. Para tanto, o tratamento das amostras *in gel* antes de submeter à ICP-MS é inédito para nosso conhecimento, não tendo sido relatado na literatura.

Para a maioria destes elementos, Ca, Cd, Cu, Fe, Mg, Mn e Mo, os valores ficaram abaixo dos níveis de detecção pela técnica (dados não mostrados). Os metais Co, Se e Zn apareceram em algumas amostras, mas sem replicabilidade, sendo que a maior parte também ficou abaixo do nível de detecção (dados não mostrados). No entanto, o Cr e o Pb foram observados em todos os *spots*, dessa forma, foi possível fazer uma avaliação destes. Na figura 39, a concentração de Cr está representada para os *spots* diferenciais, exclusivos de pacientes com câncer. E, na figura 40, para os mesmos *spots* diferenciais, está representada a concentração de Pb.

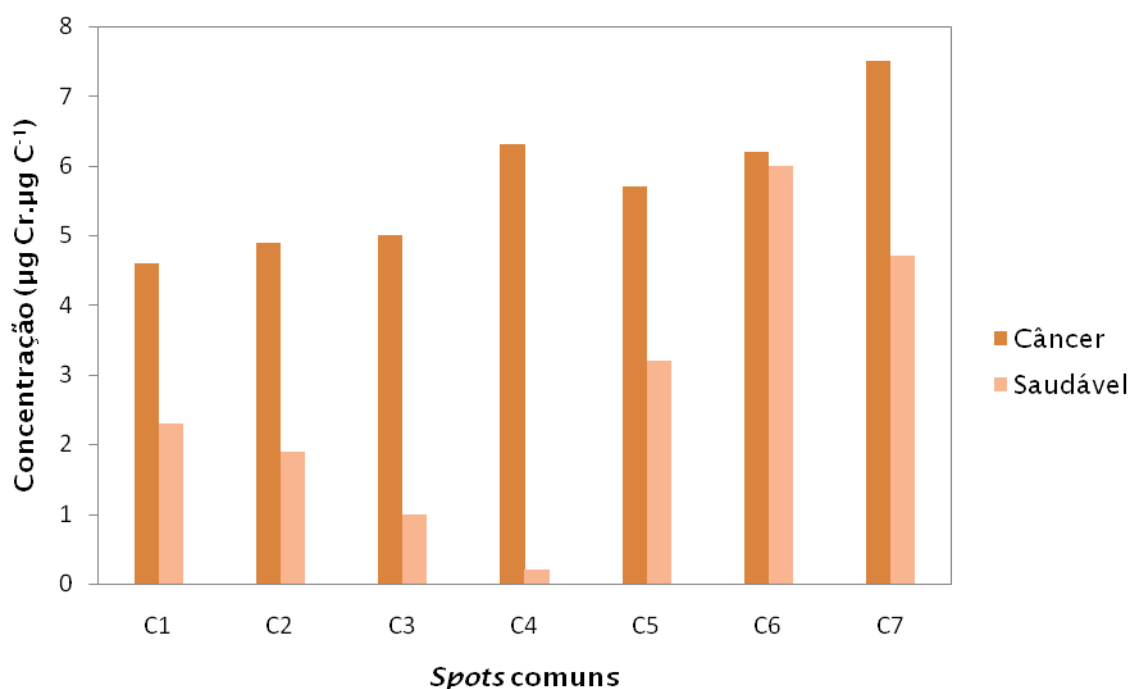


**Figura 39.** Média de Cr nos *spots* diferenciais (1, 2 e 3) de amostras de pacientes com câncer.

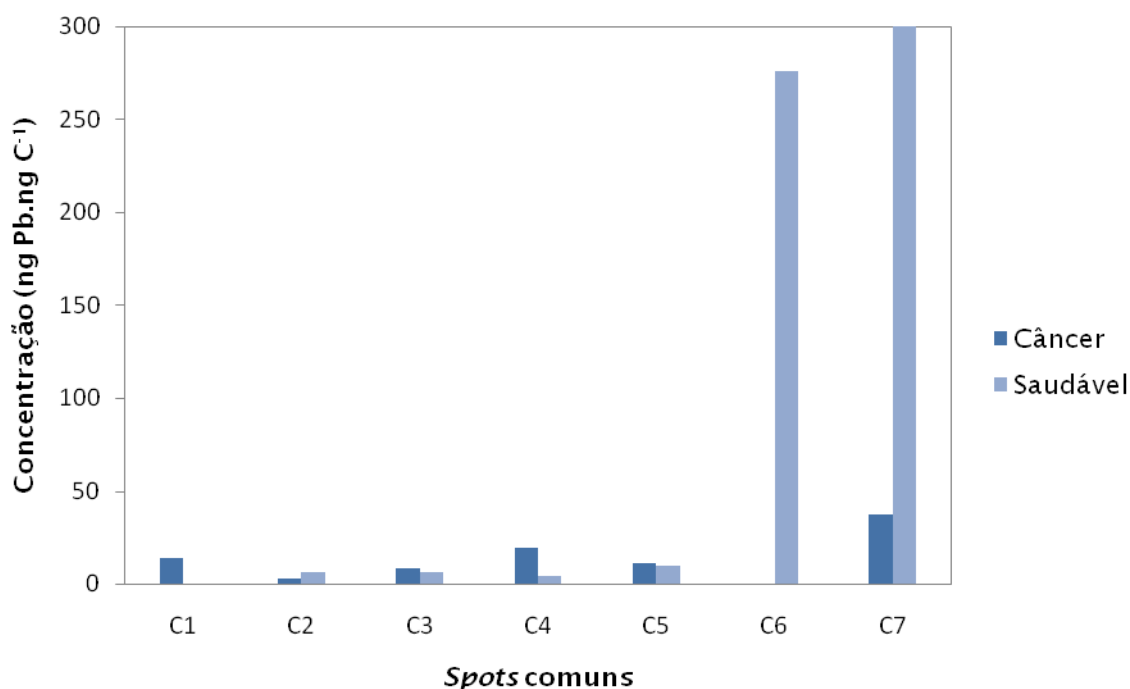


**Figura 40.** Média de Pb nos *spots* diferenciais (1, 2 e 3) de amostras de pacientes com câncer.

A média da concentração de metais entre os pacientes para cada *spot* foi determinada e representada separadamente para o Cr (Figura 41) e para o Pb (Figura 42). A quantidade de Cr encontra-se mais elevada em todas as amostras de pacientes com câncer que em saudáveis, com exceção do *spot* C6 (haptoglobina). A quantidade relativa de Pb detectada foi baixa para quase todas as amostras, exceto para os *spots* C6 (haptoglobina) e C7 (componente do complemento C3) entre os pacientes saudáveis.



**Figura 41.** Média de cromo (Cr) em pacientes saudáveis e com câncer em cada *spot* controle removido de gel bidimensional.



**Figura 42.** Média de chumbo (Pb) em pacientes saudáveis e com câncer em cada *spot* controle removido de gel bidimensional.

Em quantidades traço, o Pb tem sido considerado essencial para o metabolismo. A deficiência deste metal é associada a distúrbios de processos hematopoiéticos, sendo manifestados como anemia hipocrômica microcítica acompanhada por uma diminuição da reserva de Fe no fígado e baço, da absorção de ferro pelos intestinos e de glicose, triglicerídeos e fosfolipídeos pelo fígado (MATEO *et al.*, 1997). Este tipo de anemia é caracterizado pela redução do tamanho dos eritrócitos (microcíticos), enquanto que o termo hipocrômico refere-se a todos os tipos de anemia, onde os eritrócitos encontram-se mais pálidos que o normal (IOLASCON *et al.*, 2009). Por outro lado, as consequências de altas concentrações de Pb no organismo mostram seus efeitos deletérios em algumas funções biológicas, incluindo em eritrócitos (MATEO *et al.*, 1997).

Estudos mais recentes em cobaias e humanos têm focado na distribuição de Pb e sua interação com outros metais (YOO *et al.*, 2002). Ainda com relação ao Fe, o Pb tem efeito adverso na sua deficiência, sendo que a deficiência de Fe aumenta a absorção de Pb (KWONG *et al.*, 2004). Além disso, o Pb é mais absorvido quando há baixa concentração de Ca (KERPER e HINKLE, 1997). Pesquisa de Pasha *et al.* (2007) sobre a caracterização de metais em cabelo de pacientes com câncer e sem câncer mostrou taxas elevadas para vários metais nos primeiros, incluindo o Pb (PASHA *et al.*, 2007). Outros trabalhos relatam que uma

maior ingestão de Pb está relacionada com cânceres de estômago, intestinos, ovários, rins, pulmões e leucemias. Calvo *et al.* (2009) estudaram tecidos tumorais e saudáveis de rins, encontrando concentrações significativamente elevadas de Pb nos tecidos tumorais (CALVO *et al.*, 2009). Ao mesmo tempo, Schrauzer *et al.* (2008) demonstraram que o Pb, possivelmente junto com outros metais, corta o efeito anticancerígeno do Se sobre o crescimento e o desenvolvimento de tumor em camundongos (SCHRAUZER, 2008). Em câncer de pulmão, altos níveis de Pb também foram encontrados em tecidos de fumantes com câncer comparados com fumantes controles, além de ser demonstrado que estes níveis são influenciados pelo tabaco, tanto em tecidos de pacientes com câncer quanto sem câncer, indicando que este é um fator importante na exposição ao Pb (DE PALMA *et al.*, 2008). Apesar de não haver muitos relatos sobre a concentração deste elemento em tumores cerebrais, um estudo de 1984 mostrou uma maior quantidade dele no fluido cerebrospinal (EL-YAZIGI *et al.*, 1984). Sabe-se que, no desenvolvimento cerebral, a exposição crônica a baixos níveis de Pb causa retardo do crescimento e danos intelectuais (SURESH *et al.*, 2006).

O Cr e seus compostos possuem uma longa história de uso industrial na manufatura de produtos em larga escala, como aço inoxidável e madeira tratada com pressão. Apesar deste metal poder existir em vários estados de valência, os mais comuns são as formas oxidativas +6, +3 e 0. Normalmente, o Cr(0) está presente quando em sua forma metálica. O Cr(III) é estável termodinamicamente e é a forma oxidativa final em todos os sistemas biológicos (SALNIKOW e ZHITKOVICH, 2008). Este é tido como um nutriente essencial para o metabolismo normal de carboidratos e lipídeos (CAGLIERI *et al.*, 2008; TAN *et al.*, 2008). Por outro lado, o Cr(VI) é aceito como um agente mutagênico, apesar de não se saber muito sobre as anormalidades causadas por ele (ZHANG *et al.*, 2008). Portanto, esta forma de Cr é incluída entre os agentes conhecidamente carcinogênicos, sendo o trato respiratório considerado como o primeiro alvo para os compostos do Cr(VI), uma vez que a inalação é a principal via de entrada no corpo humano (CAGLIERI *et al.*, 2008). Em condições fisiológicas, o Cr(VI) sofre uma rápida redução de vários componentes celulares, como ascorbato e cisteína. Os produtos desta reação são Cr(III) e as formas instáveis tetra e pentavalente, que são as responsáveis pela toxicidade do Cr(VI). Além disso, a redução intracelular do Cr(VI) estimula a produção de radicais de oxigênio, induzindo danos ao DNA (CLODFELDER *et al.*, 2004; SALNIKOW e ZHITKOVICH, 2008). Deste modo, a exposição ao Cr tem sido associada a diversos efeitos na saúde. No nível genômico, a toxicidade deste metal leva a mutações gênicas, vários tipos de lesões no DNA e inibição de

síntese macromolecular. Na célula, os efeitos podem ser interrupção do ciclo celular, apoptose ou transformação neoplásica (CALVO *et al.*, 2009).

Evidências epidemiológicas e experimentais indicam que a exposição aos compostos do Cr(VI) devido à ocupação é associada ao câncer de pulmão (CAGLIERI *et al.*, 2008; SALNIKOW e ZHITKOVICH, 2008). Tais neoplasmas são do tipo SCC e desenvolvem-se tipicamente nos locais de acúmulo de Cr, como bifurcações bronquiais (SALNIKOW e ZHITKOVICH, 2008). Alguns estudos em cobaias sugerem uma relação de altas concentrações de Cr, e também Zn, com o crescimento acelerado do tumor (CZAUDEANA e ROCHALSKA, 1989; SCHRAUZER, 2006; PASHA *et al.*, 2008). Há trabalhos que mostram a relação entre Cr e a maior suscetibilidade para desenvolvimento de cânceres respiratórios e nasais (LANGARD e VIGANDER, 1983; DAVIES *et al.*, 1991). Acrescentando a estas evidências, pesquisas mostram maior concentração de Cr no sangue de pacientes com câncer de mama comparado com o de doadoras saudáveis (SINGH e GARG, 1998), além de uma taxa de mortalidade mais alta (SCHRAUZER, 2006). Os níveis significativamente mais elevados de Cr e Zn no cabelo de pacientes com tumores malignos são mais uma evidência que estes metais indicam aumento do risco de câncer (PASHA *et al.*, 2007).

Ambos os metais detectados neste experimento são encontrados no tabaco. Tanto o tabaco quanto sua fumaça são misturas complexas compostas por milhares de componentes. Até 1988, um total de 3044 constituintes já haviam sido isolados e identificados do tabaco e 3996 de sua fumaça (IARC, 2004), sendo que, hoje, este número chega a quase 5000 (JENKINS *et al.*, 2000; CARRÉ e AUBRIET, 2005). Entre estas substâncias, 69 são conhecidas por causar cânceres (IARC, 2004; CANCER RESEARCH, 2006). Os dois componentes principais da poluição ambiental causada pelo tabaco são a fumaça exalada pelo fumante (corrente primária) e a fumaça que sai da ponta do cigarro (corrente secundária), sendo esta, a mais poluente (JENKINS *et al.*, 2000; INCA, 2009). Na tabela 4, encontram-se alguns dos principais agentes cancerígenos presentes no tabaco.



**Tabela 4.** Agentes cancerígenos no tabaco e na sua fumaça.

Composto	Evidência de carcinogênese	
	Em cobaias	Em humanos
Acrilamida	Suficiente	Provável
Arsênico	Suficiente	Suficiente
Benzeno	Suficiente	Suficiente
Cádmio	Suficiente	Suficiente
Chumbo	Suficiente	Provável
Cromo	Suficiente	Suficiente
Formaldeído	Suficiente	Provável
Hidrocarbonetos aromáticos policíclicos	Suficiente	Possível
Nitrosaminas	Suficiente	Possível

Fonte: adaptado de IARC, 2004.

Cânceres induzidos pelo cigarro têm uma etiologia mais complexa devido à presença de vários agentes carcinogênicos (SALNIKOW e ZHITKOVICH, 2008). A fumaça do cigarro pode alterar a atividade de enzimas antioxidantes, cujas associações foram relatadas entre a sua atividade e a concentração de seus cofatores. No entanto, as causas de tais mudanças ainda não são conhecidas (KUMEROVA *et al.*, 2000; KOCYIGIT *et al.*, 2001). A concentração de metais como Cu, Zn, Se, e Fe foi estudada por Kocyigit *et al.* (2001) para determinar em plasma de fumantes uma relação com a atividade das seguintes enzimas antioxidantes do sistema de defesa de eritrócitos (MCCORD e FRIDOVICH, 1969): Cu-Zn superóxido dismutase (*Copper-zinc superoxide dismutase* – Cu-Zn SOD), glutathione peroxidase (*glutathione peroxidase* – GSH-Px), que necessita de Se, e catalase (CAT), cujo cofator é o Fe. Foi demonstrado que, ao comparar com não fumantes, as concentrações de Se em fumantes eram baixas, juntamente com a atividade da GSH-Px, e os níveis de Cu eram altos, assim como a atividade da Cu-Zn SOD também era mais elevada. As concentrações de Zn e Fe não mostraram ser afetadas pelo fumo. Outra observação foi que a fumaça do tabaco exerce estímulos inflamatórios (MORRISON *et al.*, 1999) e estresse oxidativo, sendo que a atividade da Cu-Zn SOD aumenta em eventos inflamatórios, possivelmente devido à inflamação crônica no trato respiratório de fumantes estimulada pelo tabaco (KOCYIGIT *et al.*, 2001).

Cada vez mais há estudos indicando que elementos traço têm papel em vários processos biológicos ao ativar ou inibir enzimas, competir com outros elementos e metaloproteínas por sítios de ligação, afetar a permeabilidade de membranas celulares, entre outros mecanismos (HUANG *et al.*, 1999). Desta forma, é possível inferir que tais elementos traço tenham efeito direto ou indireto no processo de carcinogênese (SIDDIQUI *et al.*, 2006).

O LSCC é uma doença multifatorial influenciada por fatores ambientais e relacionada ao estilo de vida. O trato aerodigestivo superior é o primeiro compartimento do corpo humano que entra em contato com os componentes prejudiciais da fumaça do cigarro. A passagem desta, seja no fumante ativo ou passivo, determina algumas alterações na área aerodigestiva, que está diretamente exposta à ação maléfica das substâncias presentes na fumaça. O tabaco contém mais de 50 componentes cancerígenos conhecidos que têm importante papel na carcinogênese, sendo as principais substâncias responsáveis pela transformação neoplásica do epitélio bucal. Um dos primeiros passos no desenvolvimento da neoplasia de cabeça e pescoço pode ser o elo entre esses compostos (SCULLY *et al.*, 2000).

# 5 Conclusões

Este trabalho mostra o estudo proteômico comparativo de plasmas de pacientes com e sem câncer de laringe, trazendo uma nova perspectiva para o estudo desta doença. Ao fazer uso da técnica mais bem estabelecida em proteômica, a 2D-PAGE, foram obtidas importantes informações sobre a relação entre o sistema imune e o câncer de laringe, onde é reforçado o papel da resposta imune para compreensão e tratamento da doença, uma vez que sua função dualística no desenvolvimento do tumor, seja de combatê-lo, seja de estimular seu desenvolvimento. Aqui, encontramos indícios de que a resposta imune nos pacientes com câncer foi representada por atividade antitumoral de linfócitos T e B baseada na expressão de imunoglobulinas.

Na tentativa de desenvolver nova metodologia para separação de proteínas de plasma sem utilizar gel, a combinação da LIEF com a HPLC indicam potencial. Apesar de este ser um trabalho preliminar, os resultados aqui obtidos mostram a capacidade da combinação destas técnicas de fracionar proteínas com padrão semelhante à separação por 2D-PAGE. Portanto, uma vez que apresentam vantagens como menos tempo de experimento, capacidade de aceitar maior concentração de proteínas na LIEF, alta sensibilidade na HPLC, sendo capaz de abranger maior faixa protéica, e menos etapas de manuseio da amostra, evitando contaminações e perdas, a continuação destes experimentos visando aperfeiçoar a tecnologia é importante.

Na terceira etapa do trabalho, detectar metais em proteínas específicas a fim de relacioná-las ao câncer de laringe e ao tabaco, foi utilizada uma metodologia ainda não relatada na literatura na medida do nosso conhecimento: submeter amostras altamente purificadas (*spots*) e tripsinizadas direto para detecção por ICP-MS. Nesta análise, dois elementos traço (Pb e Cr), conhecidos por serem carcinogênicos e que se encontram no tabaco foram observados em todas as proteínas analisadas. Uma vez que há vários estudos indicando o papel de elementos traço em processos biológicos, é possível inferir que estes tenham efeito direto ou indireto no processo de carcinogênese, podendo ser crucial para o desenvolvimento do LSCC.

# 6 Perspectivas

A necessidade de detectar o câncer de laringe em estádios iniciais da doença a fim de obter maior sucesso no tratamento e aumentar a qualidade de vida do paciente é amplamente reconhecida. Portanto, a elucidação molecular do processo carcinogênico deste e a resposta imune do organismo a ele é de extrema importância para o desenvolvimento de métodos diagnósticos. Uma vez que o tabaco é considerado um fator de grande contribuição para o desenvolvimento da doença e é constituído de vários metais cancerígenos, o estudo da concentração de tais elementos pode vir a se tornar uma ferramenta importante para o diagnóstico. Portanto, mais experimentos como os realizados neste trabalho em ICP-MS de *spots* isolados de géis bidimensionais para identificar elementos associados a outras proteínas podem continuar a fornecer informações importantes no papel destes para o câncer de laringe. A obtenção de mais amostras de plasma de pacientes com câncer de laringe permitirá a realização de experimentos adicionais de 2D-PAGE para comparar com os já obtidos e confirmar a presença dos três *spots* diferenciais em um maior número de pacientes.

Além disso, os métodos de diagnose devem visar menor invasibilidade no paciente e, ao mesmo tempo, um material rico em informações moleculares, o que torna o plasma sanguíneo o principal alvo de busca por marcadores moleculares, já que corresponde ao proteoma mais amplo do corpo humano. Por ser tão complexo, ele apresenta dificuldades na fracionamento de proteínas para detecção. Deste modo, o aperfeiçoamento de técnicas alternativas de separação de proteínas do plasma humano continua a ser um esforço importante. Como a metodologia *gel free* testada neste estudo mostrou perspectivas positivas para a separação de proteínas do plasma, é importante continuar tais experimentos a fim de aperfeiçoá-la. Cabe submeter proteínas isoladas por LIEF e HPLC à identificação por espectrometria de massa a fim de compará-las com as identificações dos experimentos *in gel*.

# 7 Referências

AEBERSOLD, R.; GOODLETT, D.R. Mass spectrometry in proteomics. *Chem Rev* [S.I.], v. 101, n. 2, p. 269-295, 2001.

AEBERSOLD, R.; MANN, M. Mass spectrometry-based proteomics. *Nature* [S.I.], v. 422, n. 6928, p. 198-207, 2003.

AKABAYOV, B.; LEE, S.-J.; AKABAYOV, S.R.; REKHI, S.; ZHU, B.; RICHARDSON, C.C. DNA Recognition by the DNA Primase of Bacteriophage T7: A Structure-Function Study of the Zinc-Binding Domain. *Biochemistry* [S.I.], v. 48, n. 8, p. 1763-1773, 2009.

ALMADORI, G.; BUSSU, F.; CADONI, G.; GALLI, J.; PALUDETTI, G.; MAURIZI, M. Molecular markers in laryngeal squamous cell carcinoma: towards an integrated clinicobiological approach. *Eur J Cancer* [S.I.], v. 41, n. 5, p. 683-693, 2005.

ALTIERI, A.; BOSETTI, C.; TALAMINI, R.; GALLUS, S.; FRANCESCHI, S.; LEVI, F.; DAL MASO, L.; NEGRI, E.; LA VECCHIA, C. Cessation of smoking and drinking and the risk of laryngeal cancer. *Br J Cancer* [S.I.], v. 87, n. 11, p. 1227-1229, 2002.

ALTSCHUL, S.F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E.W.; LIPMAN, D.J. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* [S.I.], v. 215, n. 3, p. 403-410, 1990.

ANDERSON, K.S.; LABAER, J. The Sentinel Within: Exploiting the Immune System for Cancer Biomarkers. *Journal of Proteome Research* [S.I.], v. 4, n. 4, p. 1123-1133, 2005.

ANDERSON, N.L.; ANDERSON, N.G. The human plasma proteome: history, character, and diagnostic prospects. *Mol Cell Proteomics* [S.I.], v. 1, n. 11, p. 845-867, 2002.

AZEVEDO, G.; MENDONÇA, S.; NORONHA, C.P.; ALMEIDA, L.M. *Situação do Câncer no Brasil*. Ediouro Gráfica e Editora SA. Rio de Janeiro. 2006

BARNES, L.; EVESON, J.W.; REICHART, P.; SIDRANSKY, D. *Pathology and Genetics of Head and Neck Tumours*. Lyon: IARC Press, 2005. (World Health Organization Classification of Tumours).

BAST, R.C., JR.; FEENEY, M.; LAZARUS, H.; NADLER, L.M.; COLVIN, R.B.; KNAPP, R.C. Reactivity of a monoclonal antibody with human ovarian carcinoma. *J Clin Invest* [S.I.], v. 68, n. 5, p. 1331-1337, 1981.

BERENBLUM, I. The Mechanism of Carcinogenesis: A Study of the Significance of Cocarcinogenic Action and Related Phenomena. *CA Cancer J Clin* [S.I.], v. 31, n. 4, p. 241-253, 1981.

BERTUCCI, F.; BIRNBAUM, D.; GONCALVES, A. Proteomics of breast cancer: principles and potential clinical applications. *Mol Cell Proteomics* [S.I.], v. 5, n. 10, p. 1772-1786, 2006.

BLOT, W.J.; MCLAUGHLIN, J.K.; WINN, D.M.; AUSTIN, D.F.; GREENBERG, R.S.; PRESTON-MARTIN, S.; BERNSTEIN, L.; SCHOENBERG, J.B.; STEMHAGEN, A.; FRAUMENI, J.F., JR. Smoking and drinking in relation to oral and pharyngeal cancer. *Cancer Res* [S.I.], v. 48, n. 11, p. 3282-3287, 1988.

BOS, J.L. Ras Oncogenes in Human Cancer: A Review. *Cancer Res* [S.I.], v. 49, n. 17, p. 4682-4689, 1989.

BRESLOW, J.L. Human Apolipoprotein Molecular Biology and Genetic Variation. *Annual Review of Biochemistry* [S.I.], v. 54, n. 1, p. 699-727, 1985.

BURGESS, B.K.; LOWE, D.J. Mechanism of Molybdenum Nitrogenase. *Chemical Reviews* [S.I.], v. 96, n. 7, p. 2983-3012, 1996.

BYRNE, J.C.; DOWNES, M.R.; O'DONOGHUE, N.; O'KEANE, C.; O'NEILL, A.; FAN, Y.; FITZPATRICK, J.M.; DUNN, M.J.; WATSON, R.W. 2D-DIGE as a Strategy To Identify Serum Markers for the Progression of Prostate Cancer. *J Proteome Res* [S.I.], 2008.

CAGLIERI, A.; GOLDONI, M.; DE PALMA, G.; MOZZONI, P.; GEMMA, S.; VICHI, S.; TESTAI, E.; PANICO, F.; CORRADI, M.; TAGLIAFERRI, S.; COSTA, L.G. Exposure to low levels of hexavalent chromium: target doses and comparative effects on two human pulmonary cell lines. *Acta Biomed* [S.I.], v. 79 Suppl 1, p. 104-115, 2008.

CALIFANO, J.; VAN DER RIET, P.; WESTRA, W.; NAWROZ, H.; CLAYMAN, G.; PIANTADOSI, S.; CORIO, R.; LEE, D.; GREENBERG, B.; KOCH, W.; SIDRANSKY, D. Genetic Progression Model for Head and Neck Cancer: Implications for Field Cancerization. *Cancer Res* [S.I.], v. 56, n. 11, p. 2488-2492, 1996.

CALVO, F.B.; SANTOS JUNIOR, D.; RODRIGUES, C.J.; KRUG, F.J.; MARUMO, J.T.; SCHOR, N.; BELLINI, M.H. Variation in the Distribution of Trace Elements in Renal Cell Carcinoma. *Biol Trace Elem Res* [S.I.], 2009.

CAMPBELL, R.D.; DODDS, A.; PORTER, R. The Binding of Human Complement Component C4 to Antibody-Antigen Aggregates. *Biochem. J.* [S.I.], v. 189, p. 67-80, 1980.

CANCER RESEARCH, U.K. Poisonous smoke. 2006.

CAO, J.; SHEN, C.; WANG, H.; SHEN, H.; CHEN, Y.; NIE, A.; YAN, G.; LU, H.; LIU, Y.; YANG, P. Identification of N-glycosylation sites on secreted proteins of human hepatocellular carcinoma cells with a complementary proteomics approach. *J Proteome Res* [S.I.], v. 8, n. 2, p. 662-672, 2009.

CARLSON, J.A.; ROGERS, B.B.; SIFERS, R.N.; HAWKINS, H.K.; FINEGOLD, M.J.; WOO, S.L. Multiple tissues express alpha 1-antitrypsin in transgenic mice and man. *J Clin Invest* [S.I.], v. 82, n. 1, p. 26-36, 1988.

CARRÉ, V.; AUBRIET, F. Analysis of cigarette smoke by laser desorption mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta* [S.I.], v. 540, n. 2, p. 257-268, 2005.

CARRELL, R.W. alpha 1-Antitrypsin: molecular pathology, leukocytes, and tissue damage. *J Clin Invest* [S.I.], v. 78, n. 6, p. 1427-1431, 1986.

CATTARUZZA, M.S.; MAISONNEUVE, P.; BOYLE, P. Epidemiology of laryngeal cancer. *Eur J Cancer B Oral Oncol* [S.I.], v. 32B, n. 5, p. 293-305, 1996.

CHATTERJI, B.; BORLAK, J. A 2-DE MALDI-TOF study to identify disease regulated serum proteins in lung cancer of c-myc transgenic mice. *Proteomics* [S.I.], v. 9, n. 4, p. 1044-1056, 2009.

CHEN, G.; GHARIB, T.G.; HUANG, C.C.; THOMAS, D.G.; SHEDDEN, K.A.; TAYLOR, J.M.; KARDIA, S.L.; MISEK, D.E.; GIORDANO, T.J.; IANNETTONI, M.D.; ORRINGER, M.B.; HANASH, S.M.; BEER, D.G. Proteomic analysis of lung adenocarcinoma: identification of a highly expressed set of proteins in tumors. *Clin Cancer Res* [S.I.], v. 8, n. 7, p. 2298-2305, 2002.

CHEN, J.; ANDERSON, M.; MISEK, D.E.; SIMEONE, D.M.; LUBMAN, D.M. Characterization of apolipoprotein and apolipoprotein precursors in pancreatic cancer serum samples via two-dimensional liquid chromatography and mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* [S.I.], v. 1162, n. 2, p. 117-125, 2007.

CHEN, Y.; TANG, C.E.; OUYANG, G.L.; RUAN, L.; LI, M.Y.; ZHANG, P.F.; LI, C.; YI, H.; PENG, F.; LI, J.L.; CHEN, Z.C.; XIAO, Z.Q. Identification of RKIP as a differentially tyrosine-phosphorylated protein in nasopharyngeal carcinoma and normal nasopharyngeal epithelial tissues by phosphoproteomic approach. *Med Oncol* [S.I.], 2008.

CHENG, L.; ZHOU, L.; TAO, L.; ZHANG, M.; CUI, J.; LI, Y. SELDI-TOF MS profiling of serum for detection of laryngeal squamous cell carcinoma and the progression to lymph node metastasis. *J Cancer Res Clin Oncol* [S.I.], v. 134, n. 7, p. 769-776, 2008.

CHIN, D.; BOYLE, G.M.; THEILE, D.R.; PARSONS, P.G.; COMAN, W.B. Molecular introduction to head and neck cancer (HNSCC) carcinogenesis. *Br J Plast Surg* [S.I.], v. 57, n. 7, p. 595-602, 2004.

CHIPLUNKAR, S.V. The immune system and cancer. *Current Science* [S.I.], v. 81, n. 5, p. 542-548, 2001.



CHIRASANI, S.; MARKOVIC, D.; SYNOWITZ, M.; EICHLER, S.; WISNIEWSKI, P.; KAMINSKA, B.; OTTO, A.; WANKER, E.; SCHÄFER, M.; CHIARUGI, P.; MEIER, J.; KETTENMANN, H.; GLASS, R. Transferrin-receptor-mediated iron accumulation controls proliferation and glutamate release in glioma cells. *Journal of Molecular Medicine* [S.I.], v. 87, n. 2, p. 153-167, 2009.

CHO, W. Contribution of oncoproteomics to cancer biomarker discovery. *Molecular Cancer* [S.I.], v. 6, n. 1, p. 25, 2007.

CID, M.C.; GRANT, D.S.; HOFFMAN, G.S.; AUERBACH, R.; FAUCI, A.S.; KLEINMAN, H.K. Identification of haptoglobin as an angiogenic factor in sera from patients with systemic vasculitis. *J Clin Invest* [S.I.], v. 91, n. 3, p. 977-985, 1993.

CLODFELDER, B.; CHANG, C.; VINCENT, J. Absorption of the biomimetic chromium cation triaqua- $\mu$ 3-oxo- $\mu$ -hexapropionatotrichromium(III) in rats. *Biological Trace Element Research* [S.I.], v. 98, n. 2, p. 159-169, 2004.

COHEN, A.A.; GEVA-ZATORSKY, N.; EDEN, E.; FRENKEL-MORGENSTERN, M.; ISSAEVA, I.; SIGAL, A.; MILO, R.; COHEN-SAIDON, C.; LIRON, Y.; KAM, Z.; COHEN, L.; DANON, T.; PERZOV, N.; ALON, U. Dynamic proteomics of individual cancer cells in response to a drug. *Science* [S.I.], v. 322, n. 5907, p. 1511-1516, 2008.

CONRAD, D.; GOYETTE, J.; THOMAS, P. Proteomics as a Method for Early Detection of Cancer: A Review of Proteomics, Exhaled Breath Condensate, and Lung Cancer Screening. *Journal of General Internal Medicine* [S.I.], v. 23, n. Suppl 1, p. 78-84, 2008.

CORDER, E.; SAUNDERS, A.; STRITTMATTER, W.; SCHMECHEL, D.; GASKELL, P.; SMALL, G.; ROSES, A.; HAINES, J.; PERICAK-VANCE, M. Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. *Science* [S.I.], v. 261, n. 5123, p. 921-923, 1993.

CORDER, E.H.; SAUNDERS, A.M.; RISCH, N.J.; STRITTMATTER, W.J.; SCHMECHEL, D.E.; GASKELL, P.C.; RIMMLER, J.B.; LOCKE, P.A.; CONNEALLY, P.M.;

SCHMADER, K.E.; SMALL, G.W.; ROSES, A.D.; HAINES, J.L.; PERICAK-VANCE, M.A. Protective effect of apolipoprotein E type 2 allele for late onset Alzheimer disease. *Nat Genet* [S.I.], v. 7, n. 2, p. 180-184, 1994.

CZAUADERNA, M.; ROCHALSKA, M. Interaction between Se and Cr and distribution of Zn, Rb, Co, and Fe in mice given chromate ions and selenium compounds. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry* [S.I.], v. 134, n. 2, p. 383-392, 1989.

D'ERRICO, A.; PASIAN, S.; BARATTI, A.; ZANELLI, R.; ALFONZO, S.; GILARDI, L.; BEATRICE, F.; BENA, A.; COSTA, G. A Case-control Study on Occupational Risk Factors for Sino-nasal Cancer. *Occup Environ Med* [S.I.], p. 1-18, 2009.

DAOUD, S.S. *Cancer proteomics: from bench to bedside*. Totowa, N.J.: Humana, 2008. (Cancer drug discovery and development).

DAVIDSSON, P.; FOLKESSON, S.; CHRISTIANSSON, M.; LINDBJER, M.; DELLHEDEN, B.; BLENNOW, K.; WESTMAN-BRINKMALM, A. Identification of proteins in human cerebrospinal fluid using liquid-phase isoelectric focusing as a prefractionation step followed by two-dimensional gel electrophoresis and matrix-assisted laser desorption/ionisation mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* [S.I.], v. 16, n. 22, p. 2083-2088, 2002.

DAVIES, J.M.; EASTON, D.F.; BIDSTRUP, P.L. Mortality from respiratory cancer and other causes in United Kingdom chromate production workers. *Br J Ind Med* [S.I.], v. 48, n. 5, p. 299-313, 1991.

DAVIES, J.M.; KIRSCH, P. Lung cancer mortality of workers employed in chromate pigment factories. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology* [S.I.], v. 107, n. 1, p. 65-65, 1984.

DAVIGNON, J.; GREGG, R.; SING, C. Apolipoprotein E polymorphism and atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* [S.I.], v. 8, n. 1, p. 1-21, 1988.

DE PALMA, G.; GOLDONI, M.; CATALANI, S.; CARBOGNANI, P.; POLI, D.; MOZZONI, P.; ACAMPA, O.; INTERNULLO, E.; RUSCA, M.; APOSTOLI, P. Metallic elements in pulmonary biopsies from lung cancer and control subjects. *Acta Biomed* [S.I.], v. 79 Suppl 1, p. 43-51, 2008.

DE VISSER, K.E.; EICHTEN, A.; COUSSENS, L.M. Paradoxical roles of the immune system during cancer development. *Nat Rev Cancer* [S.I.], v. 6, n. 1, p. 24-37, 2006.

DIAMANDIS, E.P. Point: Proteomic patterns in biological fluids: do they represent the future of cancer diagnostics? *Clin Chem* [S.I.], v. 49, n. 8, p. 1272-1275, 2003.

DRASCH, G.; SCHÖPFER, J.; SCHRAUZER, G. Selenium/cadmium ratios in human prostates. *Biological Trace Element Research* [S.I.], v. 103, n. 2, p. 103-107, 2005.

DUNN, G.P.; OLD, L.J.; SCHREIBER, R.D. The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting. *Immunity* [S.I.], v. 21, n. 2, p. 137-148, 2004.

EBERT, M.P.A.; MEUER, J.; WIEMER, J.C.; SCHULZ, H.-U.; REYMOND, M.A.; TRAUOGOTT, U.; MALFERTHEINER, P.; ROCKEN, C. Identification of Gastric Cancer Patients by Serum Protein Profiling. *Journal of Proteome Research* [S.I.], v. 3, n. 6, p. 1261-1266, 2004.

EL-YAZIGI, A.; AL-SALEH, I.; AL-MEFTY, O. Concentrations of Ag, Al, Au, Bi, Cd, Cu, Pb, Sb, and Se in cerebrospinal fluid of patients with cerebral neoplasms. *Clin Chem* [S.I.], v. 30, n. 8, p. 1358-1360, 1984.

ERDEI, A.; ANDRÁSFALVY, M.; PÉTERFY, H.; TÓTH, G.; PECHT, I. Regulation of mast cell activation by complement-derived peptides. *Immunology Letters* [S.I.], v. 92, n. 1-2, p. 39-42, 2004.

FAIRBANKS, K.D.; TAVILL, A.S. Liver Disease in Alpha 1-Antitrypsin Deficiency: A Review. *Am J Gastroenterol* [S.I.], v. 103, n. 8, p. 2136-2141, 2008.

FANNING, D. A mortality study of lead workers, 1926-1985. *Arch Environ Health* [S.I.], v. 43, n. 3, p. 247-251, 1988.

FIRPO, M.; GAY, D.; GRANGER, S.; SCAIFE, C.; DISARIO, J.; BOUCHER, K.; MULVIHILL, S. Improved Diagnosis of Pancreatic Adenocarcinoma Using Haptoglobin and Serum Amyloid A in a Panel Screen. *World Journal of Surgery* [S.I.], 2008.

FORASTIERE, A.; KOCH, W.; TROTTI, A.; SIDRANSKY, D. Head and Neck Cancer. *N Engl J Med* [S.I.], v. 345, n. 26, p. 1890-1900, 2001.

FORMAN, D.; NEWELL, D.G.; FULLERTON, F.; YARNELL, J.W.; STACEY, A.R.; WALD, N.; SITAS, F. Association between infection with *Helicobacter pylori* and risk of gastric cancer: evidence from a prospective investigation. *BMJ* [S.I.], v. 302, n. 6788, p. 1302-1305, 1991.

FRANCESCHI, S.; TALAMINI, R.; BARRA, S.; BARON, A.E.; NEGRI, E.; BIDOLI, E.; SERRAINO, D.; LA VECCHIA, C. Smoking and drinking in relation to cancers of the oral cavity, pharynx, larynx, and esophagus in northern Italy. *Cancer Res* [S.I.], v. 50, n. 20, p. 6502-6507, 1990.

GABRIEL, J. *The biology of cancer*. 2nd. ed. Chichester ; Hoboken, NJ: John Wiley & Sons, 2007.

GAHMBERG, C.; ANDERSSON, L. Leukocyte surface origin of human alpha1-acid glycoprotein (orosomuroid). *J. Exp. Med.* [S.I.], v. 148, n. 2, p. 507-521, 1978.

GALE, N.; MICHAELS, L.; LUZAR, B.; POLJAK, M.; ZIDAR, N.; FISCHINGER, J.; CARDESA, A. Current review on squamous intraepithelial lesions of the larynx. *Histopathology* [S.I.], 2008.

GANZ, P.A.; BARAS, M.; MA, P.Y.; ELASHOFF, R.M. Monitoring the Therapy of Lung Cancer with  $\alpha$ -1-Acid Glycoprotein. *Cancer Res* [S.I.], v. 44, n. 11, p. 5415-5421, 1984.

GARCIA, M.; JEMAL, A.; WARD, E.; CENTER, M.; HAO, Y.; SIEGEL, R.; THUN, M. *Global Cancer Facts & Figures 2007*. Atlanta, GA: American Cancer Society, 2007.

GAS, M.-C.W.; TINTEREN, H.V.; BONTENBAL, M.; HOESEL, R.Q.V.; NOOIJ, M.A.; RODENHUIS, S.; SPAN, P.N.; TJAN-HEIJNEN, V.C.; VRIES, E.G.D.; HARRIS, N.; TWISK, J.W.; SCHELLENS, J.H.; BEIJNEN, J.H. Haptoglobin phenotype is not a predictor of recurrence free survival in high-risk primary breast cancer patients. *BMC Cancer* [S.I.], v. 8, p. 1-26, 2008.

GASQUE, P. Complement: a unique innate immune sensor for danger signals. *Molecular Immunology* [S.I.], v. 41, n. 11, p. 1089-1098, 2004.

GAST, M.C.; SCHELLENS, J.H.; BEIJNEN, J.H. Clinical proteomics in breast cancer: a review. *Breast Cancer Res Treat* [S.I.], 2008.

GASTEIGER, E.; GATTIKER, A.; HOOGLAND, C.; IVANYI, I.; APPEL, R.D.; BAIROCH, A. ExPASy: the proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis. *Nucl. Acids Res.* [S.I.], v. 31, n. 13, p. 3784-3788, 2003.

GICHNER, T. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Hepatitis viruses. *Biologia Plantarum* [S.I.], v. 59, n. 1, p. 8, 1995.

GOLD, P.; FREEDMAN, S.O. Demonstration of Tumor-Specific Antigens in Human Colonic Carcinomata by Immunological Tolerance and Absorption Techniques. *J Exp Med* [S.I.], v. 121, p. 439-462, 1965.

GORTER, A.; MERI, S. Immune evasion of tumor cells using membrane-bound complement regulatory proteins. *Immunol Today* [S.I.], v. 20, n. 12, p. 576-582, 1999.

GOURIN, C.G.; XIA, Z.S.; HAN, Y.; FRENCH, A.M.; O'ROURKE, A.K.; TERRIS, D.J.; ADAM, B.L. Serum protein profile analysis in patients with head and neck squamous cell carcinoma. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* [S.I.], v. 132, n. 4, p. 390-397, 2006.

GRAVELEY, B.R. Alternative splicing: increasing diversity in the proteomic world. *Trends Genet* [S.I.], v. 17, n. 2, p. 100-7, Feb 2001.

GUO, R.-F.; WARD, P.A. Role of C5a in inflammatory responses. *Annual Review of Immunology* [S.I.], v. 23, n. 1, p. 821-852, 2005.

HA-DUONG, N.-T.; HÉMADI, M.; CHIKH, Z.; CHAHINE, J.-M.E.H. Kinetics and thermodynamics of metal-loaded transferrins: transferrin receptor 1 interactions. *Biochemical Society Transactions* [S.I.], v. 36, n. 6, p. 1422-1426, 2008.

HAHNE, M.; RIMOLDI, D.; SCHROTER, M.; ROMERO, P.; SCHREIER, M.; FRENCH, L.E.; SCHNEIDER, P.; BORNAND, T.; FONTANA, A.; LIENARD, D.; CEROTTINI, J.; TSCHOPP, J. Melanoma cell expression of Fas(Apo-1/CD95) ligand: implications for tumor immune escape. *Science* [S.I.], v. 274, n. 5291, p. 1363-1366, 1996.

HAMDAM, M. *Cancer Biomarkers: Analytical Techniques for Discovery*. New Jersey: John Wiley & Sons, 2007.

HANN, S.R.; EISENMAN, R.N. Proteins encoded by the human c-myc oncogene: differential expression in neoplastic cells. *Mol. Cell. Biol.* [S.I.], v. 4, n. 11, p. 2486-2497, 1984.

HAO, Y.; YU, Y.; WANG, L.; YAN, M.; JI, J.; QU, Y.; ZHANG, J.; LIU, B.; ZHU, Z. IPO-38 Is Identified as a Novel Serum Biomarker of Gastric Cancer Based on Clinical Proteomics Technology. *Journal of Proteome Research* [S.I.], v. 7, n. 9, p. 3668-3677, 2008.

HARAGUCHI, H. Metallomics as Integrated Biometal Science. *J. Anal. At. Spectrom* [S.I.], v. 19, p. 5-14, 2004.

HASS, H.G.; SCHMIDT, A.; NEHLS, O.; KAISER, S. DNA ploidy, proliferative capacity and intratumoral heterogeneity in primary and recurrent head and neck squamous cell carcinomas (HNSCC)--potential implications for clinical management and treatment decisions. *Oral Oncol* [S.I.], v. 44, n. 1, p. 78-85, 2008.

HAYES, R.B. The carcinogenicity of metals in humans. *Cancer Causes and Control* [S.I.], v. 8, p. 371-385, 1997.

HIRSCH, J.; HANSEN, K.C.; BURLINGAME, A.L.; MATTHAY, M.A. Proteomics: current techniques and potential applications to lung disease. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* [S.I.], v. 287, n. 1, p. 1-23, 2004.

HO, J.; KONG, J.-W.-F.; CHOONG, L.-Y.; LOH, M.-C.-S.; TOY, W.; CHONG, P.-K.; WONG, C.-H.; WONG, C.-Y.; SHAH, N.; LIM, Y.-P. Novel Breast Cancer Metastasis-Associated Proteins. *Journal of Proteome Research* [S.I.], v. 8, n. 2, p. 583-594, 2009.

HOUGHTON, A.N.; GOLD, J.S.; BLACHERE, N.E. Immunity against cancer: lessons learned from melanoma. *Curr Opin Immunol* [S.I.], v. 13, n. 2, p. 134-140, 2001.

HUANG, Y.-L.; SHEU, J.-Y.; LIN, T.-H. Association between oxidative stress and changes of trace elements in patients with breast cancer. *Clinical Biochemistry* [S.I.], v. 32, n. 2, p. 131-136, 1999.

HUANG, Y.; BOYNTON, R.F.; BLOUNT, P.L.; SILVERSTEIN, R.J.; YIN, J.; TONG, Y.; MCDANIEL, T.K.; NEWKIRK, C.; RESAU, J.H.; SRIDHARA, R.; REID, B.J.; MELTZER, S.J. Loss of Heterozygosity Involves Multiple Tumor Suppressor Genes in Human Esophageal Cancers. *Cancer Res* [S.I.], v. 52, n. 23, p. 6525-6530, 1992.

HUNG, K.; HAYASHI, R.; ANNE LAFOND-WALKER; CHARLES LOWENSTEIN; DREW PARDOLL; LEVITSKY, H. The Central Role of CD4+ T Cells in the Antitumor Immune Response. *J Exp Med.* [S.I.], v. 188, n. 12, p. 2357-2368, 1998.

IARC. *Tobacco smoke and involuntary smoking*. Lyon: World Health Organization, 2004. (IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans).

INCA. *Tabagismo Passivo*. n. Março 2009.

IOLASCON, A.; DE FALCO, L.; BEAUMONT, C. Molecular basis of inherited microcytic anemia due to defects in iron acquisition or heme synthesis. *Haematologica* [S.I.], v. 94, n. 3, p. 395-408, 2009.

ISSAQ, H.J.; CONRADS, T.P.; JANINI, G.M.; VEENSTRA, T.D. Methods for fractionation, separation and profiling of proteins and peptides. *Electrophoresis* [S.I.], v. 23, n. 17, p. 3048-3061, 2002.

JAKUBOWSKI, N.; LOBINSKI, R.; MOENS, L. Metallobiomolecules. The Basis of Life, the Challenge of Atomic Spectroscopy. *J. Anal. At. Spectrom* [S.I.], v. 19, p. 1-4, 2004.

JANEWAY, C. *Immunobiology : the immune system in health and disease*. 5th. ed. New York: Garland Pub., 2001.

JANKOVIC, M.M.; MILUTINOVIC, B.S. Glycoforms of CA125 antigen as a possible cancer marker. *Cancer Biomark* [S.I.], v. 4, n. 1, p. 35-42, 2008.

JENKINS, R.A.; GUERIN, M.R.; TOMKINS, B.A.; CENTER FOR INDOOR AIR RESEARCH. *The chemistry of environmental tobacco smoke: composition and measurement*. 2nd. ed. Boca Raton: Lewis Publishers, 2000. (Indoor air research series).

JIANG, J.-T.; XU, N.; ZHANG, X.-Y.; WU, C.-P. Lipids changes in liver cancer. *Journal of Zhejiang University Science* [S.I.], v. 8, n. 6, p. 398-409, 2007.

JOHNSON, J.M.; CASTLE, J.; GARRETT-ENGELE, P.; KAN, Z.; LOERCH, P.M.; ARMOUR, C.D.; SANTOS, R.; SCHADT, E.E.; STOUGHTON, R.; SHOEMAKER, D.D. Genome-wide survey of human alternative pre-mRNA splicing with exon junction microarrays. *Science* [S.I.], v. 302, n. 5653, p. 2141-4, Dec 19 2003.

KERPER, L.E.; HINKLE, P.M. Cellular Uptake of Lead Is Activated by Depletion of Intracellular Calcium Stores. *J. Biol. Chem.* [S.I.], v. 272, n. 13, p. 8346-8352, 1997.



KIM, D.-Y.; MARTIN, C.B.; LEE, S.N.; MARTIN, B.K. Expression of complement protein C5a in a murine mammary cancer model: tumor regression by interference with the cell cycle. *Cancer Immunology, Immunotherapy* [S.I.], v. 54, n. 10, p. 1026-1037, 2005.

KIM, H.-J.; KANG, H.J.; LEE, H.; LEE, S.-T.; YU, M.-H.; KIM, H.; LEE, C. Identification of S100A8 and S100A9 as Serological Markers for Colorectal Cancer. *Journal of Proteome Research* [S.I.], 2008.

KOCH, W.M.; BRENNAN, J.A.; ZAHURAK, M.; GOODMAN, S.N.; WESTRA, W.H.; SCHWAB, D.; YOO, G.H.; LEE, D.J.; FORASTIERE, A.A.; SIDRANSKY, D. p53 mutation and locoregional treatment failure in head and neck squamous cell carcinoma. *J Natl Cancer Inst* [S.I.], v. 88, n. 21, p. 1580-1586, 1996.

KOCYIGIT, A.; EREL, O.; GUR, S. Effects of tobacco smoking on plasma selenium, zinc, copper and iron concentrations and related antioxidative enzyme activities. *Clin Biochem* [S.I.], v. 34, n. 8, p. 629-633, 2001.

KOLCH, W.; MISCHAK, H.; PITT, A.R. The molecular make-up of a tumour: proteomics in cancer research. *Clin Sci (Lond)* [S.I.], v. 108, n. 5, p. 369-383, 2005.

KOPPLE, J.D.; MASSRY, S.G. *Kopple and Massry's nutritional management of renal disease*. 2nd. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2004.

KROEMER, G. The proto-oncogene Bcl-2 and its role in regulating apoptosis. *Nat Med* [S.I.], v. 3, n. 6, p. 614-620, 1997.

KUFE, D.W.; HOLLAND, J.F.; FREI, E.; AMERICAN CANCER SOCIETY. *Cancer medicine 6*. 6th. ed. Hamilton, Ont.; Lewiston, NY: BC Decker, 2003.

KUMEROVA, A.; LECE, A.; SKESTERS, A.; ORLIKOV, G.; SELEZNEV, J.; RAINSFORD, K. Antioxidant defense and trace element imbalance in patients with postradiation syndrome. *Biological Trace Element Research* [S.I.], v. 77, n. 1, p. 1-12, 2000.

KUS, J.; MIODONSKI, A.J.; OLSZEWSKI, E.; SEKULA, J. Cellular elements of the immune system in the larynx cancer, SEM study. *Folia Histochem Cytobiol* [S.I.], v. 23, n. 3, p. 155-158, 1985.

KWONG, W.T.; FRIELLO, P.; SEMBA, R.D. Interactions between iron deficiency and lead poisoning: epidemiology and pathogenesis. *Science of The Total Environment* [S.I.], v. 330, n. 1-3, p. 21-37, 2004.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* [S.I.], v. 227, n. 5259, p. 680-685, 1970.

LAM, K.W.-K.; LO, S.C.-L. Discovery of diagnostic serum biomarkers of gastric cancer using proteomics. *Proteomics - Clinical Applications* [S.I.], v. 2, n. 2, p. 219-228, 2008.

LANGARD, S.; VIGANDER, T. Occurrence of lung cancer in workers producing chromium pigments. *Br J Ind Med* [S.I.], v. 40, n. 1, p. 71-74, 1983.

LAWN, R.M.; ADELMAN, J.; BOCK, S.C.; FRANKE, A.E.; HOUCK, C.M.; NAJARIAN, R.C.; SEEBURG, P.H.; WION, K.L. The sequence of human serum albumin cDNA and its expression in *E. coli*. *Nucleic Acids Res* [S.I.], v. 9, n. 22, p. 6103-114, Nov 25 1981.

LE NAOUR, F. Contribution of proteomics to tumor immunology. *PROTEOMICS* [S.I.], v. 1, n. 10, p. 1295-1302, 2001.

LEE, C.S.; BALGLEY, B.M. Capillary Isoelectric Focusing/Reversed Phase Liquid Chromatography/Mass Spectrometry *Mass Spectrometry of Proteins and Peptides*, 2009. p. 233-240.

LEVY, S.; SUTTON, G.; NG, P.C.; FEUK, L.; HALPERN, A.L.; WALENZ, B.P.; AXELROD, N.; HUANG, J.; KIRKNESS, E.F.; DENISOV, G.; LIN, Y.; MACDONALD, J.R.; PANG, A.W.C.; SHAGO, M.; STOCKWELL, T.B.; TSIAMOURI, A.; BAFNA, V.; BANSAL, V.; KRAVITZ, S.A.; BUSAM, D.A.; BEESON, K.Y.; MCINTOSH, T.C.; REMINGTON, K.A.; ABRIL, J.F.; GILL, J.; BORMAN, J.; ROGERS, Y.-H.; FRAZIER,

M.E.; SCHERER, S.W.; STRAUSBERG, R.L.; VENTER, J.C. The Diploid Genome Sequence of an Individual Human. *PLoS Biol* [S.I.], v. 5, n. 10, p. e254, 2007.

LI, R.X.; ZENG, R. Dynamic proteomics for investigating the response of individual cancer cells under drug action. *Expert Rev Proteomics* [S.I.], v. 6, n. 1, p. 19-21, 2009.

LI, R.X.; ZHOU, H.; LI, S.J.; SHENG, Q.H.; XIA, Q.C.; ZENG, R. Prefractionation of proteome by liquid isoelectric focusing prior to two-dimensional liquid chromatography mass spectrometric identification. *J Proteome Res* [S.I.], v. 4, n. 4, p. 1256-1264, 2005.

LIM, J.; CHO, J.; PAIK, Y.; CHANG, Y.; KIM, H. Diagnostic application of serum proteomic patterns in gastric cancer patients by ProteinChip surface-enhanced laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Int J Biol Markers* [S.I.], v. 22, p. 281-286, 2007.

LOS, M.; WALCZAK, H. *Caspases: their role in cell death and cell survival*. Georgetown, Tex., U.S.A.  
New York, N.Y., U.S.A.: Landes Bioscience; Kluwer Academic/Plenum Pub., 2002.

LOVELAND, B.E.; CEBON, J. Cancer exploiting complement: a clue or an exception? *Nat Immunol* [S.I.], v. 9, n. 11, p. 1205-1206, 2008.

LU, Q.-Y.; YANG, Y.; JIN, Y.S.; ZHANG, Z.-F.; HEBER, D.; LI, F.P.; DUBINETT, S.M.; SONDEJ, M.A.; LOO, J.A.; RAO, J.Y. Effects of green tea extract on lung cancer A549 cells: Proteomic identification of proteins associated with cell migration. *Proteomics* [S.I.], v. 9, n. 3, p. 757-767, 2009.

MACDONALD, F.; FORD, C.H.J.; CASSON, A.G. *Molecular biology of cancer*. 2nd. ed. London ; New York, N.Y.: BIOS Scientific Publishers, 2004.

MAHLEY, R.W.; WEISGRABER, K.H.; HUANG, Y. Apolipoprotein E: structure determines function-from atherosclerosis to Alzheimer's disease to AIDS. *J. Lipid Res.* [S.I.], 2008.

MAKRIDAKIS, M.; GAGOS, S.; PETROLEKAS, A.; ROUBELAKIS, M.G.; BITSIKA, V.; STRAVODIMOS, K.; PAVLAKIS, K.; ANAGNOU, N.P.; COLEMAN, J.; VLAHOU, A. Chromosomal and proteome analysis of a new T24-based cell line model for aggressive bladder cancer. *Proteomics* [S.I.], v. 9, n. 2, p. 287-298, 2009.

MAO, L.; HONG, W.K.; PAPADIMITRAKOPOULOU, V.A. Focus on head and neck cancer. *Cancer Cell* [S.I.], v. 5, n. 4, p. 311-316, 2004.

MARKIEWSKI, M.M.; DEANGELIS, R.A.; BENENCIA, F.; RICKLIN-LICHTSTEINER, S.K.; KOUTOULAKI, A.; GERARD, C.; COUKOS, G.; LAMBRIS, J.D. Modulation of the antitumor immune response by complement. *Nat Immunol* [S.I.], v. 9, n. 11, p. 1225-1235, 2008.

MATEO, M.M.; MARTÍN, B.; BENEIT, M.; RABADÁN, J. Catalase activity in erythrocytes from colon and gastric cancer patients. Influence of nickel, lead, mercury, and cadmium. *Biological Trace Element Research* [S.I.], v. 57, n. 1, p. 79-90, 1997.

MCCORD, J.M.; FRIDOVICH, I. Superoxide Dismutase. An enzymic function for erythrocyte (hemocuprein). *J. Biol. Chem.* [S.I.], v. 244, n. 22, p. 6049-6055, 1969.

MCGUIRE, K.; DAVIDSON, W.; JONAS, A. High yield overexpression and characterization of human recombinant proapolipoprotein A-I. *J. Lipid Res.* [S.I.], v. 37, n. 7, p. 1519-1528, 1996.

MERLETTI, F.; BOFFETTA, P.; CICCONE, G.; MASHBERG, A.; TERRACINI, B. Role of tobacco and alcoholic beverages in the etiology of cancer of the oral cavity/oropharynx in Torino, Italy. *Cancer Res* [S.I.], v. 49, n. 17, p. 4919-4924, 1989.

MINGHETTI, P.; RUFFNER, D.; KUANG, W.; DENNISON, O.; HAWKINS, J.; BEATTIE, W.; DUGAICZYK, A. Molecular structure of the human albumin gene is revealed by nucleotide sequence within q11-22 of chromosome 4. *J. Biol. Chem.* [S.I.], v. 261, n. 15, p. 6747-6757, 1986.

MONK, P.N.; SCOLA, A.M.; MADALA, P.; FAIRLIE, D.P. Function, structure and therapeutic potential of complement C5a receptors. *Br J Pharmacol* [S.I.], v. 152, n. 4, p. 429-448, 2007.

MORITZ, R.L.; JI, H.; SCHUTZ, F.; CONNOLLY, L.M.; KAPP, E.A.; SPEED, T.P.; SIMPSON, R.J. A Proteome Strategy for Fractionating Proteins and Peptides Using Continuous Free-Flow Electrophoresis Coupled Off-Line to Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography. *Analytical Chemistry* [S.I.], v. 76, n. 16, p. 4811-4824, 2004.

MORITZ, R.L.; SKANDARAJAH, A.R.; JI, H.; SIMPSON, R.J. Proteomic Analysis of Colorectal Cancer: Prefractionation Strategies Using two-Dimensional Free-Flow Electrophoresis. *Comp Funct Genomics* [S.I.], v. 6, n. 4, p. 236-243, 2005.

MORRISON, D.; RAHMAN, I.; LANNAN, S.; MACNEE, W. Epithelial Permeability, Inflammation, and Oxidant Stress in the Air Spaces of Smokers. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* [S.I.], v. 159, n. 2, p. 473-479, 1999.

MUÑOZ, N. Human papillomavirus and cancer: the epidemiological evidence. *J Clin Virol* [S.I.], v. 19, n. 1-2, p. 1-5, 2000.

MURAKAMI, Y.; HAYASHI, K.; HIROHASHI, S.; SEKIYA, T. Aberrations of the Tumor Suppressor p53 and Retinoblastoma Genes in Human Hepatocellular Carcinomas. *Cancer Res* [S.I.], v. 51, n. 20, p. 5520-5525, 1991.

NAWARAK, J.; HUANG-LIU, R.; KAO, S.H.; LIAO, H.H.; SINCHAIKUL, S.; CHEN, S.T.; CHENG, S.L. Proteomics analysis of A375 human malignant melanoma cells in response to arbutin treatment. *Biochim Biophys Acta* [S.I.], v. 1794, n. 2, p. 159-167, 2009.

OLSEN, J.; SABREO, S.; FASTING, U. Interaction of alcohol and tobacco as risk factors in cancer of the laryngeal region. *J Epidemiol Community Health* [S.I.], v. 39, n. 2, p. 165-168, 1985.

OUVRY-PATAT, S.A.; TORRES, M.P.; QUEK, H.-H.; GELFAND, C.A.; O'MULLAN, P.; NISSUM, M.; SCHROEDER, G.K.; HAN, J.; ELLIOTT, M.; DRYHURST, D.; AUSIO, J.; WOLFENDEN, R.; BORCHERS, C.H. Free-flow electrophoresis for top-down proteomics by Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry. *PROTEOMICS* [S.I.], v. 8, n. 14, p. 2798-2808, 2008.

PARK, H.-J.; KIM, B.-G.; LEE, S.-J.; HEO, S.-H.; KIM, J.-Y.; KWON, T.-H.; LEE, E.-B.; RYOO, H.-M.; CHO, J.-Y. Proteomic Profiling of Endothelial Cells in Human Lung Cancer. *Journal of Proteome Research* [S.I.], v. 7, n. 3, p. 1138-1150, 2008.

PARKIN, D.M.; BRAY, F.; FERLAY, J.; PISANI, P. Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin* [S.I.], v. 55, n. 2, p. 74-108, 2005.

PASHA, Q.; MALIK, S.; IQBAL, J.; SHAH, M. Characterization and Distribution of the Selected Metals in the Scalp Hair of Cancer Patients in Comparison with Normal Donors. *Biological Trace Element Research* [S.I.], v. 118, n. 3, p. 207-216, 2007.

PASHA, Q.; MALIK, S.A.; SHAH, M.H. Statistical analysis of trace metals in the plasma of cancer patients versus controls. *J Hazard Mater* [S.I.], v. 153, n. 3, p. 1215-1221, 2008.

PATZ, E.F., JR.; CAMPA, M.J.; GOTTLIN, E.B.; KUSMARTSEVA, I.; GUAN, X.R.; HERNDON, J.E., 2ND. Panel of serum biomarkers for the diagnosis of lung cancer. *J Clin Oncol* [S.I.], v. 25, n. 35, p. 5578-5583, 2007.

POLTICELLI, F.; BOCEDI, A.; MINERVINI, G.; ASCENZI, P. Human haptoglobin structure and function: a molecular modelling study. *FEBS Journal* [S.I.], v. 275, n. 22, p. 5648-5656, 2008.

PORTH, C. *Essentials of pathophysiology : concepts of altered health states*. 2nd. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2007.

PROJECT, T.A. MRI, head and neck, sagittal section v. 2009: Parthenon Publishing Group, 1997.

RAO, A.R.; MOTIWALA, H.G.; KARIM, O.M.A. The discovery of prostate-specific antigen. *BJU International* [S.I.], v. 101, n. 1, p. 5-10, 2008.

REED, J. Bcl-2 and the regulation of programmed cell death. *J. Cell Biol.* [S.I.], v. 124, n. 1, p. 1-6, 1994.

RICH, T. *Toll and toll-like receptors: an immunologic perspective*. Georgetown, Tex.: Landes Bioscience/Eureka.com ; New York, N.Y. : Kluwer Academic/Plenum Publishers, 2005. (Molecular biology intelligence unit).

RODENHUIS, S.; SLEBOS, R.J.C. Clinical Significance of ras Oncogene Activation in Human Lung Cancer. *Cancer Res* [S.I.], v. 52, n. Suppl 9, p. 2665-2669, 1992.

ROSENBERG, S.A. Progress in human tumour immunology and immunotherapy. *Nature* [S.I.], v. 411, n. 6835, p. 380-384, 2001.

ROSS, P.; CHENG, I.; LIU, X.; CICEK, M.; CARROLL, P.; CASEY, G.; WITTE, J. Carboxypeptidase 4 gene variants and early-onset intermediate-to-high risk prostate cancer. *BMC Cancer* [S.I.], v. 9, n. 1, p. 69, 2009.

RUBIO, L.M.; LUDDEN, P.W. Biosynthesis of the Iron-Molybdenum Cofactor of Nitrogenase. *Annual Review of Microbiology* [S.I.], v. 62, n. 1, p. 93-111, 2008.

RUDDON, R.W. *Cancer biology*. 4th. ed. Oxford ; New York: Oxford University Press, 2007.

RYAN, K.M.; BIRNIE, G.D. Myc oncogenes: the enigmatic family. *Biochem J* [S.I.], v. 314, p. 713-721, 1996.

SALNIKOW, K.; ZHITKOVICH, A. Genetic and Epigenetic Mechanisms in Metal Carcinogenesis and Cocarcinogenesis: Nickel, Arsenic, and Chromium. *Chemical Research in Toxicology* [S.I.], v. 21, n. 1, p. 28-44, 2008.

SARAFANOV, A.G.; TODOROV, T.I.; KAJDACSY-BALLA, A.; GRAY, M.A.; MACIAS, V.; CENTENO, J.A. Analysis of iron, zinc, selenium and cadmium in paraffin-embedded prostate tissue specimens using inductively coupled plasma mass-spectrometry. *J Trace Elem Med Biol* [S.I.], v. 22, n. 4, p. 305-314, 2008.

SAÚDE, M.D. Estimativas 2008: Incidência de Câncer no Brasil. p.94, 2007.

SCHRAUZER, G. Interactive Effects of Selenium and Cadmium on Mammary Tumor Development and Growth in MMTV-Infected Female Mice. A Model Study on the Roles of Cadmium and Selenium in Human Breast Cancer. *Biological Trace Element Research* [S.I.], v. 123, n. 1, p. 27-34, 2008.

SCHRAUZER, G.N. Anticarcinogenic effects of selenium. *Cellular and Molecular Life Sciences (CMLS)* [S.I.], v. 57, n. 13, p. 1864-1873, 2000.

SCHRAUZER, G.N. Interactive effects of selenium and chromium on mammary tumor development and growth in MMTV-infected female mice and their relevance to human cancer. *Biol Trace Elem Res* [S.I.], v. 109, n. 3, p. 281-292, 2006.

SCHRAUZER, G.N.; WHITE, D.A.; SCHNEIDER, C.J. Cancer mortality correlation studies-IV: associations with dietary intakes and blood levels of certain trace elements, notably Se-antagonists. *Bioinorg Chem* [S.I.], v. 7, n. 1, p. 35-56, 1977.

SCRUTTON, M.C.; WU, C.W.; GOLDTHWAIT, D.A. The Presence and Possible Role of Zinc in RNA Polymerase Obtained from *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* [S.I.], v. 68, n. 10, p. 2497-2501, 1971.

SCULLY, C.; FIELD, J.K.; TANZAWA, H. Genetic aberrations in oral or head and neck squamous cell carcinoma 2: chromosomal aberrations. *Oral oncology* [S.I.], v. 36, n. 4, p. 311-327, 2000.

SEGELMARK, M.; ELZOUKI, A.N.; WIESLANDER, J.; ERIKSSON, S. The PiZ gene of alpha 1-antitrypsin as a determinant of outcome in PR3-ANCA-positive vasculitis. *Kidney Int* [S.I.], v. 48, n. 3, p. 844-850, 1995.



SEWELL, D.A.; YUAN, C.X.; ROBERTSON, E. Proteomic signatures in laryngeal squamous cell carcinoma. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec* [S.I.], v. 69, n. 2, p. 77-84, 2007.

SHEVCHENKO, A. Evaluation of the efficiency of in-gel digestion of proteins by peptide isotopic labeling and MALDI mass spectrometry. *Anal Biochem* [S.I.], v. 296, n. 2, p. 279-283, 2001.

SIDDIQUI, M.K.J.; JYOTI; SINGH, S.; MEHROTRA, P.K.; SINGH, K.; SARANGI, R. Comparison of some trace elements concentration in blood, tumor free breast and tumor tissues of women with benign and malignant breast lesions: An Indian study. *Environment International* [S.I.], v. 32, p. 630–637, 2006.

SINGH, V.; GARG, A. Trace element correlations in the blood of indian women with breast cancer. *Biological Trace Element Research* [S.I.], v. 64, n. 1, p. 237-245, 1998.

SINICROPE, F.A.; RUAN, S.B.; CLEARY, K.R.; STEPHENS, L.C.; LEE, J.J.; LEVIN, B. bcl-2 and p53 Oncoprotein Expression during Colorectal Tumorigenesis. *Cancer Res* [S.I.], v. 55, n. 2, p. 237-241, 1995.

SOBIN; WITTEKIND. *TNM: classification of malignant tumours*. 6th. ed. New York: Wiley-Liss, 2002.

SOGN, J.A. Tumor immunology: the glass is half full. *Immunity* [S.I.], v. 9, n. 6, p. 757-763, 1998.

SORENSSON, J.; MATEJKA, G.L.; OHLSON, M.; HARALDSSON, B. Human endothelial cells produce orosomucoid, an important component of the capillary barrier. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* [S.I.], v. 276, n. 2, p. 530-534, 1999.

STAMEY, T.; YANG, N.; HAY, A.; MCNEAL, J.; FREIHA, F.; REDWINE, E. Prostate-specific antigen as a serum marker for adenocarcinoma of the prostate. *N Engl J Med* [S.I.], v. 317, n. 15, p. 909-916, 1987.

STEWART, B.W.; KLEIHUES, P. *World Cancer Report*. Lyon: IARC Press, 2003.

SUN, W.; XING, B.; SUN, Y.; DU, X.; LU, M.; HAO, C.; LU, Z.; MI, W.; WU, S.; WEI, H.; GAO, X.; ZHU, Y.; JIANG, Y.; QIAN, X.; HE, F. Proteome analysis of hepatocellular carcinoma by two-dimensional difference gel electrophoresis: novel protein markers in hepatocellular carcinoma tissues. *Mol Cell Proteomics* [S.I.], v. 6, n. 10, p. 1798-1808, 2007.

SURESH, C.; DENNIS, A.O.; HEINZ, J.; VEMURI, M.C.; CHETTY, C.S. Melatonin Protection against Lead-Induced Changes in Human Neuroblastoma Cell Cultures. *International Journal of Toxicology* [S.I.], v. 25, n. 6, p. 459-464, 2006.

TALAMINI, R.; BOSETTI, C.; LA VECCHIA, C.; DAL MASO, L.; LEVI, F.; BIDOLI, E.; NEGRI, E.; PASCHE, C.; VACCARELLA, S.; BARZAN, L.; FRANCESCHI, S. Combined effect of tobacco and alcohol on laryngeal cancer risk: a case-control study. *Cancer Causes and Control* [S.I.], v. 13, n. 10, p. 957-964, 2002.

TAN, G.-Y.; BI, J.-M.; ZHANG, M.-H.; FENG, J.-H.; XIE, P.; ZHENG, S.-S. Effects of Chromium Picolinate on Oxidative Damage in Primary Piglet Hepatocytes. *Biol Trace Elem Res* [S.I.], v. 126, n. Suppl 1, p. S69-S79, 2008.

TERHUNE, M.W.; SANDSTEAD, H.H. Decreased RNA Polymerase Activity in Mammalian Zinc Deficiency. *Science* [S.I.], v. 177, n. 4043, p. 68-69, 1972.

TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; CASE, C.L. *Microbiology : an introduction*. 8th. ed. San Francisco, CA: Benjamin Cummings, 2004.

TOYOKUNI, S. Role of iron in carcinogenesis: Cancer as a ferrotoxic disease. *Cancer Science* [S.I.], v. 100, n. 1, p. 9-16, 2009.

UEMURA, N.; NAKANISHI, Y.; KATO, H.; SAITO, S.; NAGINO, M.; HIROHASHI, S.; KONDO, T. Transglutaminase 3 as a prognostic biomarker in esophageal cancer revealed by proteomics. *International Journal of Cancer* [S.I.], v. 124, n. 9, p. 2106-2115, 2009.

UEMURA, N.; OKAMOTO, S.; YAMAMOTO, S.; MATSUMURA, N.; YAMAGUCHI, S.; YAMAKIDO, M.; TANIYAMA, K.; SASAKI, N.; SCHLEMPER, R.J. Helicobacter pylori Infection and the Development of Gastric Cancer. *N Engl J Med* [S.I.], v. 345, n. 11, p. 784-789, 2001.

VARELA, J.C.; IMAI, M.; ATKINSON, C.; OHTA, R.; RAPISARDO, M.; TOMLINSON, S. Modulation of protective T cell immunity by complement inhibitor expression on tumor cells. *Cancer Res* [S.I.], v. 68, n. 16, p. 6734-6742, 2008.

VLOCK, D.; SCHANTZ, S.; FISHER, S.; SAVAGE, H.; CAREY, T.; WOLF, G. Clinical correlates of circulating immune complexes and antibody reactivity in squamous cell carcinoma of the head and neck. The Department of Veterans Affairs Laryngeal Cancer Study Group. *J Clin Oncol* [S.I.], v. 11, n. 12, p. 2427-2433, 1993.

WADSWORTH, J.T.; SOMERS, K.D.; CAZARES, L.H.; MALIK, G.; ADAM, B.L.; STACK, B.C., JR.; WRIGHT, G.L., JR.; SEMMES, O.J. Serum protein profiles to identify head and neck cancer. *Clin Cancer Res* [S.I.], v. 10, n. 5, p. 1625-1632, 2004.

WADSWORTH, J.T.; SOMERS, K.D.; STACK, B.C., JR.; CAZARES, L.; MALIK, G.; ADAM, B.L.; WRIGHT, G.L., JR.; SEMMES, O.J. Identification of patients with head and neck cancer using serum protein profiles. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* [S.I.], v. 130, n. 1, p. 98-104, 2004.

WALL, D.B.; KACHMAN, M.T.; GONG, S.; HINDERER, R.; PARUS, S.; MISEK, D.E.; HANASH, S.M.; LUBMAN, D.M. Isoelectric Focusing Nonporous RP HPLC: A Two-Dimensional Liquid-Phase Separation Method for Mapping of Cellular Proteins with Identification Using MALDI-TOF Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry* [S.I.], v. 72, n. 6, p. 1099-1111, 2000.

WALLER, L.N.; SHORES, K.; KNAPP, D.R. Shotgun Proteomic Analysis of Cerebrospinal Fluid Using Off-Gel Electrophoresis as the First-Dimension Separation. *Journal of Proteome Research* [S.I.], v. 7, n. 10, p. 4577-4584, 2008.

WANG, M.Z.; HOWARD, B.; CAMPA, M.J.; JR., E.F.P.; FITZGERALD, M.C. Analysis of human serum proteins by liquid phase isoelectric focusing and matrix-assisted laser desorption/ionization-mass spectrometry. *Proteomics* [S.I.], v. 3, n. 9, p. 1661-1666, 2003.

WANG, X.-Y.; FACCIPONTE, J.; CHEN, X.; SUBJECK, J.R.; REPASKY, E.A. Scavenger Receptor-A Negatively Regulates Antitumor Immunity. *Cancer Res* [S.I.], v. 67, n. 10, p. 4996-5002, 2007.

WARD, D.G.; SUGGETT, N.; CHENG, Y.; WEI, W.; JOHNSON, H.; BILLINGHAM, L.J.; ISMAIL, T.; WAKELAM, M.J.O.; JOHNSON, P.J.; MARTIN, A. Identification of serum biomarkers for colon cancer by proteomic analysis. *Br J Cancer* [S.I.], v. 94, n. 12, p. 1898-1905, 2006.

WASILENKO, W.J.; PAYNE, D.M.; FITZGERALD, D.L.; WEBER, M.J. Phosphorylation and activation of epidermal growth factor receptors in cells transformed by the src oncogene. *Mol. Cell. Biol.* [S.I.], v. 11, n. 1, p. 309-321, 1991.

WEINSTEIN, I.B. The Origins of Human Cancer: Molecular Mechanisms of Carcinogenesis and Their Implications for Cancer Prevention and Treatment--Twenty-seventh G. H. A. Clowes Memorial Award Lecture. *Cancer Res* [S.I.], v. 48, n. 15, p. 4135-4143, 1988.

WILLEMSE, J.L.; HENDRIKS, D.F. A rapid and sensitive assay for the quantitation of carboxypeptidase N, an important regulator of inflammation. *Clin Chim Acta* [S.I.], v. 371, n. 1-2, p. 124-129, 2006.

WILLIAMS, N. Tumor cells fight back to beat immune system. *Science* [S.I.], v. 274, n. 5291, p. 1302, 1996.

YANG, J.W.; AFJEHI-SADAT, L.; GELPI, E.; KUNZE, M.; HOGER, H.; FLECKNER, J.; BERGER, J.; LUBEC, G. Proteome profiling in the rat Harderian gland. *J Proteome Res* [S.I.], v. 5, n. 7, p. 1751-62, 2006.

YE, B.; CRAMER, D.W.; SKATES, S.J.; GYGI, S.P.; PRATOMO, V.; FU, L.; HORICK, N.K.; LICKLIDER, L.J.; SCHORGE, J.O.; BERKOWITZ, R.S.; MOK, S.C. Haptoglobin- $\{\alpha\}$  Subunit As Potential Serum Biomarker in Ovarian Cancer: Identification and Characterization Using Proteomic Profiling and Mass Spectrometry. *Clin Cancer Res* [S.I.], v. 9, n. 8, p. 2904-2911, 2003.

YOO, Y.C.; LEE, S.K.; YANG, J.Y.; KIM, K.W.; LEE, S.-Y.; OH, S.M.; CHUNG, K.H. Interrelationship between the concentration of toxic and essential elements in Korean tissues. *J.Health Sci.* [S.I.], v. 48, n. 2, p. 195-200, 2002.

ZHANG, Y.; QI, Z.; ZHENG, D.; LI, C.; LIU, Y. Interactions of Chromium (III) and Chromium (VI) with Bovine Serum Albumin Studied by UV Spectroscopy, Circular Dichroism, and Fluorimetry. *Biol Trace Elem Res* [S.I.], p. 1-13, 2008.

ZHAO, J.; PATWA, T.H.; PAL, M.; QIU, W.; LUBMAN, D.M. Analysis of Protein Glycosylation and Phosphorylation Using Liquid Phase Separation, Protein Microarray Technology, and Mass Spectrometry *Mass Spectrometry of Proteins and Peptides*, 2009. p. 321-351.

ZHONG, H.; YUN, D.; ZHANG, C.; YANG, P.; FAN, H.; HE, F. Comprehensive proteome analysis of mouse liver by ampholyte-free liquid-phase isoelectric focusing. *Electrophoresis* [S.I.], v. 29, n. 11, p. 2372-2380, 2008.

ZHU, L.-R.; ZHANG, W.-Y.; L. YU, Y.-H.Z.; ZHANG, J.-Z.; LIAO, Q.-P. Serum proteomic features for detection of endometrial cancer. *International Journal of Gynecological Cancer* [S.I.], v. 16, n. 3, p. 1374-1378, 2006.

ZUO, X.; SPEICHER, D.W. A method for global analysis of complex proteomes using sample prefractionation by solution isoelectrofocusing prior to two-dimensional electrophoresis. *Anal Biochem* [S.I.], v. 284, n. 2, p. 266-278, 2000.

ZUR HAUSEN, H. Viruses in human cancers. *Science* [S.I.], v. 254, n. 5035, p. 1167-1173, 1991.

# Anexo I

## Aprovação do comitê de ética



ASSOCIAÇÃO DE COMBATE  
AO CÂNCER EM GOIÁS

Goiânia, 30 de junho de 1998.

Ilma Sra.  
Dra. Maria Paula Curado  
Serviço de Cabeça e Pescoço do Hospital Araújo Jorge - ACCG  
Nesta

Prezada Sra.,

Encaminhamos a V.Sa. relatório do Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Vivos, após análise do projeto "**ESTUDO INTERNACIONAL CORRELACIONANDO VIROSES E CÂNCER DE CAVIDADE ORAL E DE LARINGE**".

Informamos que o referido projeto foi aprovado em reunião do comitê realizado no dia 30/06/98 após ser apresentado aos membros presente.

Colocamo-nos ao seu inteiro dispor para esclarecimentos necessários.

Cordiais Saudações.

  
Dr. Geraldo Silva Queiroz  
Presidente do Comitê de Ética - ACCG

# Anexo II

**Artigos publicados e submetidos durante o  
mestrado**



## Comparative proteomical and metalloproteomical analyses of human plasma from patients with laryngeal cancer

Clarissa P. C. Gomes · Mirna S. Freire · Bruno R. B. Pires · Érico A. R. Vasconcelos ·  
Thales L. Rocha · Maria de Fátima Grossi-de-Sá · Taia M. B. Rezende ·  
Ângela Mehta · Rinaldo W. Pereira · Bernardo A. Petriz · Aparecido D. da Cruz ·  
Igor C. Pescara · Octávio Luiz Franco

Received: 22 April 2009 / Accepted: 8 July 2009  
© Springer-Verlag 2009

**Abstract** Laryngeal cancer is a significant disease worldwide, which presents an increasing incidence. Two contrasting ideas of the immune system role during cancer development are accepted: (1) it fights tumor cells, and (2) it aids tumor progression. Thus, there is no clear understanding about the immune response in laryngeal cancer. Furthermore, since tobacco is the main cause of laryngeal cancer and it contains various carcinogenic components, including metallic elements, these may play a role on cancer development. Plasmas of patients with laryngeal cancer and of healthy smokers were evaluated by 2D gel

electrophoresis and mass spectrometry. Proteins were detected on every gel around pH 4.0–10.0 from molecular mass of 10–60 kDa. Few differences were found among cancer and control patients. However, three spots gathered between pI 7.3 and 7.6 with different molecular masses appeared exclusively in cancer profiles. From ten spots identified, six correspond to immune system components, including the three differential ones. The latter were observed only in cancer patients. The presence of several trace elements in the identified proteins was determined by inductively coupled plasma mass spectrometry, where chromium was increased in all proteins analyzed from patients with cancer. This study reinforces the importance of the immune response as target in the understanding and treatment of laryngeal cancer and the possibility that chromium is important in the carcinogenic progress.

**Keywords** Laryngeal cancer · Immunology · Proteomics · Human plasma · Trace elements

C. P. C. Gomes · M. S. Freire · B. R. B. Pires ·  
T. M. B. Rezende · R. W. Pereira · B. A. Petriz ·  
O. L. Franco (✉)

Centro de Análises Proteômicas e Bioquímicas,  
Programa de Pós-Graduação em Ciências Genômicas  
e Biotecnologia, Universidade Católica de Brasília,  
SGAN Quadra 916, Av. W5 Norte, Módulo C, 70,  
Brasília, DF 790-160, Brazil  
e-mail: ocf Franco@gmail.com

É. A. R. Vasconcelos · T. L. Rocha ·  
M. de Fátima Grossi-de-Sá · Â. Mehta  
Embrapa (Brazilian Agricultural Research Corporation)  
Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, Brazil

É. A. R. Vasconcelos  
Universidade de Brasília, Brasília, Brazil

A. D. da Cruz  
Universidade Católica de Goiás,  
Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa,  
Goiânia, Brazil

I. C. Pescara  
Laboratório de Espectroscopia Atômica,  
Hospital da Universidade Católica de Brasília,  
Brasília, Brazil

### Introduction

Laryngeal squamous cell carcinoma (LSCC) is a significant disease worldwide, and accounts for 90% of all malignancies of the larynx. Much of its increasing incidence is related to tobacco and alcohol consumption, which have a clear synergistic effect [1]. Given the few signs and symptoms of early-stage disease, these tumors are usually discovered in advanced-stages, when more severe treatments are needed, often leaving patients with debilitating functions. The survival rates for advanced-stage disease are less than 50% [2].

Tobacco and tobacco smoke contain several metallic elements associated to cancer development [3]. The

number of studies showing that trace elements have important roles in various biological processes, such as activation or inhibition of enzymes and competition with other elements for the metalloprotein's active site, for example, is constantly increasing [4]. Therefore, it is possible to infer that these elements have direct or indirect effect on tumor development process [5].

On the other hand, it is known that the immune system responds to tumors but in a lower magnitude compared to its response to infectious agents [6]. Contradicting the widely accepted view of the immune system response [7], there are more recent studies showing it actually contributes to tumor growth [8]. The idea that the immune system mounts a defense against cancer development is opposed by the idea that persistent inflammatory reactions facilitate tumor progression. Usually, the sufferer's immune system almost always fails to eliminate the tumor [9], and tumor suppression mechanisms vary. Hahne et al. [10] reported that melanoma cells bear on their surface a molecule (Apo-1 or Fas) that induces immune cells to initiate apoptosis. Recently, Markiewski et al. [9] demonstrated that the complement system indeed contributes to mechanisms that promote the growth of malignant tumors. In their study, deficiency of complement proteins C3, C4 or C5a receptor associates with slowing of tumor growth.

Much remains to be uncovered about this disease, while the literature regarding LSCC proteomics is relatively scarce. Recent advances in proteomic technologies have the potential to lead to better understanding of the pathology of laryngeal cancer, its immunology, diagnosis and aid drug discovery for treatment [11]. There has been an increase in proteomic studies related to cancer in order to enlighten our understanding of this pathology. Much of this is due to the strong relation between individual differences of protein expression and cellular activity, and the possibility to identify changes in protein patterns between different states of the organism, such as in health and disease [12]. Typical medical studies are based on body fluids, which represent complex mixtures of proteins. The most complex human proteome is the blood plasma, since it contains different proteins synthesized by all body tissues [13]. The identification by proteomic techniques of antigens involved in tumor immunity can provide insights into the reaction of the host to the tumor [12]. Furthermore, determining the concentrations of trace elements in samples of healthy and cancer patients may help the understanding of the etiology, diagnosis and prognostic of different cancers [14].

Given this paradoxical function of the immune system in different models, to our knowledge, there is no clear understanding about the immune response in laryngeal cancer. In the present work, our aim is to focus on plasma proteomics, where most components of the immune system

are present as well as metallic elements [13]. The inherent dynamic nature of the proteome reflects physiological and pathological changes related to cell activity, which allows the monitoring of the course of the disease. For this reason and for the readiness and availability of blood, plasma was used to investigate laryngeal cancer proteomics. Thus in this study, plasmas of different patients with LSCC and of healthy smoking people were evaluated by a combo two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis (2D-PAGE) following mass spectrometry (MS) identification in order to search for differences between them, making a plasma protein profile for this type of cancer. Selected proteins from 2D-PAGE profiles were also analyzed by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) in order to detect metals bound to them.

## Materials and methods

### Patient characteristics and plasma collection

Plasma samples were obtained from four patients with LSCC, on the same tumor staging (T2: localized tumor with metastasis in one lymph node but no distant metastasis) according to the classification of malignant tumors, TNM [15]. These patients correspond to male and female smokers of ages between 59 and 73 years. The six control samples came from healthy people from the same age interval, from both sexes and with the same smoking habits of the LSCC patients. All individuals reported habits of consuming alcohol regularly. Plasma was obtained by centrifuging (1,000 g) blood collected with sodium heparin (Vacuette 4 mL, Greiner Bio-One, Rio de Janeiro, Brazil) at low temperature (4°C). Immediately after collection, 1 mM of proteinase inhibitor cocktail (Sigma) was added. The protocol of this experiment was approved by the Associação de Combate ao Câncer em Goiás (*Goiás Association of Cancer Action*) Ethics Committee (June 30, 1998), and all patients signed informed consent forms.

### Sample processing and 2D-PAGE profiling

Plasma samples (500 µg) quantified with BCA (BioAgency, São Paulo, Brazil) and Qubit fluorescence standard kit (Invitrogen) assays, according to manufacturer's instructions, were subjected to the *2-D Clean-Up Kit* (Amersham Biosciences, Piscataway, USA) according to the manufacturer's protocol. Samples were then hydrated for 11 h with a solution containing 2 M thiourea, 7 M urea, 1% dithiothreitol (DTT), 2% CHAPS, 1% IPG-buffer and traces of bromophenol blue. Samples were then applied to 18 cm pH 3–10 linear IPG strips (GE Healthcare Life Sciences, Sweden). Isoelectric focusing at the *Ettan*



*IPGphor 3* (GE Healthcare Life Sciences) was carried out for 1,000 V during the first 2.5 h, then increased linearly from 1,000 up to 10,000 V for 3 h. Finally, it remained at 10,000 V for 1 h. 12.5% polyacrylamide gels containing 1.5 M Tris-HCl pH 8.8, 10% sodium dodecyl sulfate (SDS), 10% ammonium persulfate (APS), 10% tetramethyl-ethylenediamine (TEMED) and Milli-Q water were used. Electrophoresis was performed at 5 W per gel overnight at 15°C using *Ettan DALTsix Vertical System* (GE Healthcare Life Sciences). The broad range isoelectric point marker (GE Healthcare Life Sciences) was also used for posterior pI identification on gels as well as molecular weight markers (GE Healthcare Life Sciences). Each protein sample was analyzed in triplicate.

#### Image analysis

Gel image analysis was performed with the BioNumerics software v. 4.5 (Applied Maths). Comparisons were made between gel images of cancer and control samples. First, calibration with a gray scale was necessary to transform gray levels into values for each pixel of the gel picture. A calibration curve from the software was used. All gel pictures were analyzed as Tiff files. The 12 gel images were placed in one folder and the wizard detection method proposed by the software was used for spot detection. Automatically detected spots were manually checked, and some of them were manually added or removed according to the size (>0.2), shape (circular) and density (>2 pixel  $\text{cm}^{-1}$ ). Following the detection procedure, the normalization step was carried out to attribute a common protein identity for identical spots from different gel images. For this procedure, a reference gel was constructed and automatically matching options of BioNumerics software were used. Proteins detected in all gel images were automatically added to the reference gel. Spots that appeared on every gel (used as controls) and spots exclusive of cancer samples were selected for analysis by matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry (MALDI TOF-TOF MS).

#### Protein purification and mass spectrometry

Protein spots were excised from Coomassie blue-stained gels using a scalpel, and further destained and digested with sequencing-grade Trypsin Gold (Promega, Madison, USA), according to Shevchenko et al. [16]. Briefly, spots were treated with acetonitrile until dehydrated before adding ammonium bicarbonate solution with DTT and incubated at 56°C. After 1 h, this solution was substituted for one containing iodoacetamide for 45 min at room temperature. Spots were washed with 100 mM ammonium

bicarbonate solution and dehydrated with acetonitrile before being rehydrated with a solution containing 600 ng of trypsin. After overnight incubation, the supernatant was collected with water containing acetonitrile and trifluoroacetic acid.

Peptides derived from tryptic digestion were analyzed by two methodologies: MALDI TOF-TOF MS/MS and nano-liquid chromatography electrospray ionization (LC-ESI) MS/MS. Most samples were identified by the first methodology. Peptides were analyzed in MALDI TOF-TOF Ultra Flex II (Bruker Daltonics) MS and de novo sequenced using CID and LIFT acquired MS/MS spectral data. The identification of protein spots (2, C1-C3 and C5-C7) was performed by sequence searches in public databases using the Blastp program.

Peptides corresponding to spot numbers 1, 3 and C4 were analyzed by nano-LC-ESI-MS/MS UltiMate 3000 system (Dionex Corporation, Sunnyvale, CA, USA) interfaced to the QSTAR Pulsar mass spectrometer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). The high performance liquid chromatography (HPLC) used was an Ultimate 3000 system (Dionex Corporation, Sunnyvale, CA, USA) equipped with a PepMap100 C-18 trap column (300  $\mu\text{m} \times 5 \text{ mm}$ ) and PepMap100 C-18 analytic column (75  $\mu\text{m} \times 150 \text{ mm}$ ). The gradient was (A = 0.1% formic acid in water, B = 0.08% formic acid in acetonitrile) 8–30% B from 0 to 25 min, 80% B from 25 to 30 min, 8% B from 30 to 50 min. The flow rate was 300 nL/min. A HCTultra ETDII (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) was used to record peptide spectra over the mass range of  $m/z$  350–1,500, and MS/MS spectra in information-dependent data acquisition over the mass range of  $m/z$  100–2,800. The voltage between ion spray tip and spray shield was set to 1,600 V. Drying nitrogen gas was heated to 150°C and the flow rate was 7 L/min. The collision energy was set automatically according to the mass and charge state of the peptides chosen for fragmentation. Multiple charged peptides were chosen for MS/MS experiments due to their good fragmentation characteristics. MS/MS spectra were interpreted and peak lists were generated by DataAnalysis 4.0 (Bruker Daltonics, Bremen, Germany). Searches were done by using the MASCOT 2.2.04 (Matrix Science, London, UK) against latest Swissprot database for protein identification. The MASCOT program used the probability-based Mowse Score and a threshold of  $P < 0.05$ . Only matches to human proteins showing a significant score were considered reliable and therefore determined as positive identifications according proteomics previous studies [17, 18]. Protein identification and modification information returned from MASCOT were manually inspected and filtered to obtain confirmed protein identification list.

### Trace element analysis

Spots selected from 2D-PAGE experiments that were digested with trypsin to be identified by MS were analyzed by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS 810-MS, Varian Mulgrave, Australia) to determine the concentration of the trace elements calcium (Ca), cadmium (Cd), chromium (Cr), copper (Cu), iron (Fe), magnesium (Mg), manganese (Mn), molybdenum (Mo), selenium (Se), lead (Pb), cobalt (Co) and zinc (Zn). Trypsinized samples were diluted with 65% nitric acid and digested at microwave SPEX (MX 350) for 30 min. Each sample was subjected directly to ICP-MS, and reference carbon solution was used to calibrate the equipment. Reference solutions for each metal were also used.

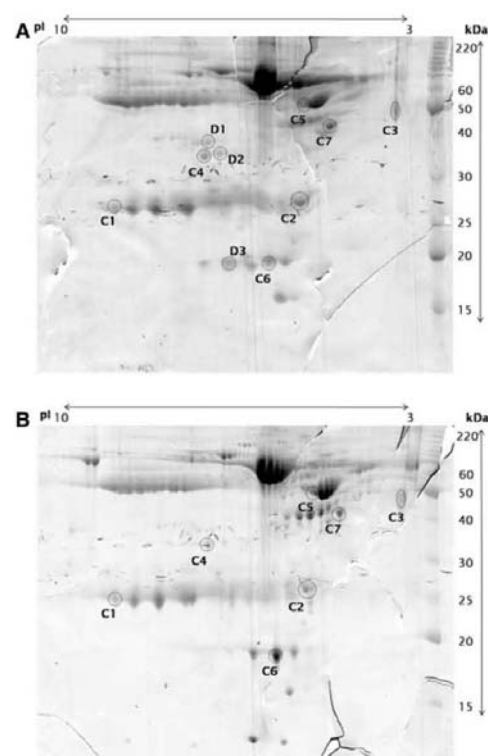
### Results and discussion

#### 2-D protein maps

LSCC is a multifactorial disease influenced by environmental and lifestyle-related factors. Our control group was represented by healthy smokers. The upper aero digestive tract is the first compartment of the human body that has contact with the harmful components of the tobacco smoke. The passage of smoke, whether in an active or passive smoker determines some alterations in the aero digestive area, is directly exposed to the harmful action of the substances present in smoke. The tobacco contains more than 50 components, including aromatic polycyclic hydrocarbon, tobacco-specific nitrosamines, aromatic amines, aldehydes and free radicals that have important role in carcinogenesis, being the main responsible substances for the neoplastic buccal epithelium transformation. One of the first steps in the development of head and neck neoplasia may be the link between these compounds and mutations of the mucosal cell's DNA [19].

Human plasma samples from patients with LSCC and of smoking health controls were obtained through approved protocols. The low incidence of this kind of tumor was reflected in our small number of samples [20]. The 2D-PAGE profiling of these samples was done in three technical and four biological replicates. The gel images obtained were compared against each other using the spots' volume with the software BioNumerics. After the normalization procedure, where identical spots on different gel images were selected, it was possible to identify spots exclusive to cancer patients.

In order not to eliminate or degrade any protein, plasma samples were used instead of serum. Besides, plasma is not only the primary clinical specimen but also represents the largest and deepest version of the human proteome present



**Fig. 1** 2D map of plasma with cancer (a) and without cancer (b). Identified proteins are circled and identified with their corresponding spot number. Each gel was carried in technical and biological triplicates. 2D gels were Coomassie blue stained

in any sample; in addition to the classical “plasma proteins”, it contains all tissue proteins (as leakage markers) plus very numerous distinct immunoglobulin sequences, and it has an extraordinary dynamic range in that more than ten orders of magnitude in concentration separate albumin from the rarest proteins now measured clinically [13].

In every 2D gel, protein spots with molecular mass of 10–60 kDa and pH ranging from 4 to 10 were observed (Fig. 1). Profiles from normal samples showed over 50 spots, out of which 34 were considered well defined (Fig. 1b). Profiles from samples with cancer showed the same amount of spots, but 45 were considered as distinguished spots (Fig. 1a). Most proteins were detected on every gel from pI 4.4 to 7.0, and around molecular weight of 53 and 60 kDa, forming a conglomerate especially around pI 6.4. According to this mass' characteristics and comparison with breast cancer serum profile available in ExPASy's Swiss-2DPAGE [21], these proteins correspond



**Table 1** Identification of differential (D) and control (C) trypsinized protein spots from 2D gels

Spot number	Mowse score	Peptide sequence	Sequence mode	Protein identification	Access number (UniProt)	Identified pI	Identified MW (kDa)
D1	220	KNQVSLTCLVKG	De novo/CID	Ig gamma-3 chain C region	P01860	7.61	44.86
D2	294	KLQYASPTAKR	De novo/CID	Complement component C4a	P0C0L4	7.39	42.56
D3	422	KDSTYSLSSLTILSKA	De novo/CID	Ig kappa chain C region	P01834	7.28	20.34
C1	70	KSGTASVVCLLNFPRE	De novo	Ig kappa chain C region	P01834	9.7	32.23
C2	56	RTHLAPYSDELRLQ	De novo	Proapolipoprotein A-I	P02647	5.67	32.12
C3	82	KEQLGEFYEALDCLRI	De novo	Alpha-1-acid glycoprotein precursor	P02763	3.5	49.95
C4	398	RVEYGFQVKV	De novo/CID	Complement component C4a	P0C0L4	7.73	41.88
C5	88	KITPNLAFAFSLYRQ	De novo	Alpha-1-antitrypsin precursor	P01009	5.22	52.32
C6	56	KLPECEADDGCPKPEIAHGYYVEHSVRY	De novo	Haptoglobin Hp2	P00738	6.39	20.65
C7	71	KVYAYYNLEESCTRF	De novo	Complement component C3	P01024	4.97	47.34

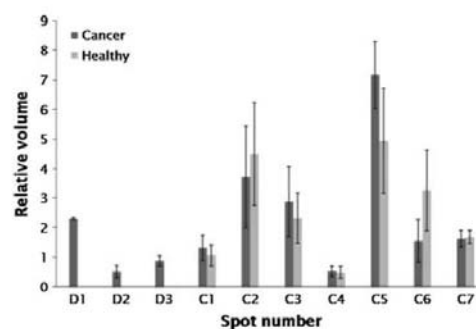
MOWSE score is based on the number of peptide mass sequenced with the corresponding at the database (MASCOT, <http://www.matrixscience.com/help/scoring-help.html>). Sequencing mode de novo was done by MALDI-TOF and CID by LC-ESI-MS

to albumins. The same pattern was also found when comparing the profiles here obtained with the one of human plasma obtained by Anderson and Anderson [22]. From the similarity of the gels in this work and the maps available, let us infer the identity of some previously identified proteins.

To restrict the major proteins in our study, we focused in the differentiated proteins expressed between the control and experimental groups. Few differences were found among the cancer and control patients (Fig. 1). There were spots found differentially expressed in many samples, but were not exclusive of cancer or control gels. However, the appearance of three spots named D (for differential) 1, 2 and 3 gathered between pI 7.3 and 7.6 and molecular masses of 20, 42 and 44 kDa in all gels from patients with cancer suggests the expression of proteins either caused by the cancer or that may aid in the disease development (Fig. 1a). These three spots—D1, D2 and D3—along with seven others that appeared on every gel—called C (for control) 1–7—were treated with trypsin and identified by MALDI TOF-TOF de novo mass spectrometry and nano-LC-ESI-MS/MS.

**MS protein identification**

A total of ten spots were identified by MS (Table 1), including the three differential ones. All identified proteins are typically found in plasma, being six of them immune system components. Among control spots, named C and the cognate number, is spot C2, which was identified as the



**Fig. 2** Histogram of sequenced spots from samples with and without cancer according to their volume. Vertical bars correspond to standard deviation

proapolipoprotein A-I, a precursor of major apolipoprotein A-I (apoA-I). This protein binds to lipids to form high density lipoproteins (HDL), which is relatively abundant in plasma. ApoA-I is a cofactor for lecithin:cholesterol acyltransferase (LCAT), responsible for the formation of most cholesterol esters on HDL. It stabilizes the structure of HDL and also promotes efflux of cholesterol from cells [23]. Apolipoproteins have been linked to several diseases such as Alzheimer [24] and atherosclerosis [25]. In the present study, the protein spot number C2 analyzed by volume counting the pixel numbers suggests a slightly higher expression of proapolipoprotein A-I in healthy patients (Fig. 2). Differences on the expression of apolipoproteins

have been reported in pancreatic [26] and liver cancer [27]. In pancreatic cancer serum, proapolipoprotein C-II and apolipoprotein C-III<sub>1</sub> were up- and down-regulated, respectively, suggesting their use as possible diagnostic markers for the disease [26]. ApoA-I and apoA-II show lower values in serum from patients with liver cancer [27].

Moreover, spot C3 corresponds to alpha-1-acid glycoprotein (AGP), also called orosomucoid, and is a serum protein derived from the liver. Orosomucoid concentrations increase under certain conditions, such as inflammation, pregnancy, after surgery and cancer, since it belongs to the acute phase proteins. It has been reported that there is a significant homology between AGP protein amino acid sequence with immunoglobulin (Ig) G and that it is needed to maintain the capillary permeability required for homeostasis [28]. The suggestion that AGP levels reflect disease activity and may reflect tumor burden was also observed by Ganz et al. [29]. AGP plasma levels of active lung cancer patients were elevated compared with cancer patients with disease remission (considered inactive). In this study, the normalization of AGP during chemotherapy correlated with a prolonged relapse-free survival [29].

The spot numbered C5 was identified as pre-alpha-1-antitrypsin, a major serine protease inhibitor in human plasma. This glycoprotein belongs to the serpin family of protease inhibitors, and is produced mainly in the hepatocytes. Its main function is to protect tissues from enzymes of inflammatory cells, especially neutrophil elastase [30]. The disorder of this enzyme, called alpha-1-antitrypsin deficiency, is caused by a single base mutation and prevents its export from the hepatocyte, causing a decrease of the protein concentration in the plasma. Thus, it is associated with chronic liver disease and premature emphysema [30], and according to some research, it is also related to cancer [31]. Alpha-1-antitrypsin deficiency causes chronic liver disease and hepatocellular carcinoma in adults, although little is known about the latter [32]. Study by Yang et al. [33] evaluated this risk factor in the development of lung cancer, demonstrating that people with alpha-1-antitrypsin deficiency has twice the risk of developing lung cancer than those without it.

Control spot C6 was attributed as haptoglobin (HPT), which belongs to the family of acute-phase proteins, whose synthesis is induced by several cytokines during inflammatory processes [34]. A major function of haptoglobin is to bind free plasma hemoglobin to form a stable complex, and thereby prevent hemoglobin-induced oxidative tissue damage [34]. HPT has also been shown to be an angiogenic agent [35], activating endothelial cell growth and differentiation. The experiments presented here based on the spot volume show a higher expression in patients without laryngeal cancer (Fig. 2). On the other hand, this protein has

been found over expressed in serum of patients with solid tumors such as ovarian and small-cell lung cancer [36].

Once our control group was represented by healthy smokers, the immune response was not completely activated by this stimulus, although we observed the expression of some inflammatory proteins. Laryngeal tissue samples were used in many proteomic analysis studies with different scopes of protein expression. Sewell et al. [37], for example, observed that the differentially expressed proteins were represented by stratifin, S100 calcium-binding, protein A9, p21-ARC, stathmin, and enolase. In our study, the differentiated proteins were represented by immune response components. The immune response occurs in loco and also in a systemic level. In this way, in our study, the remaining identified spots correspond to proteins of the immune system: Ig gamma-3 chain C region, complement component C4a, Ig kappa chain C region and complement component C3 (spots D1, D2 and C4, D3 and C1, C7, respectively). The differential spots were all in this category.

Another component of the immune system with an important role in the inflammatory response, including cancer, is the complement system, which is made up of many plasma proteins. Complement is a key link between the innate and adaptive immunity, since it can be activated by both [38]. Complement proteins are activated by cleavage, where some fragments get attached to pathogen or host cell surfaces and others are released to act as inflammatory factors. For example, the complement proteins C3a, C4a and C5a enhance inflammatory reactions by stimulating dilation of arteries, releasing histamine from mast cells and basophils and attracting neutrophils by chemotaxis [8]. Activation of the complement system causes tumor-cell destruction by inducing lysis and promoting cell-mediated killing [39].

On the other hand, Markiewski et al.'s [9] study contradicts this common thought, showing evidence that certain immune responses by complement can give the tumor a growth advantage. They demonstrated that the complement system indeed contributes to mechanisms that promote the growth of malignant tumors. In their study, deficiency of complement proteins C3, C4 or C5a receptor associates with retardation of tumor growth. Such impairment was observed in C4-deficient mice together with deposition of C1q in tumor tissue, indicating activation of complement through the classical pathway during tumor development. They concluded that complement activation and C5a signaling generated an immunosuppressive environment by efficiently recruiting myeloid-derived suppressor cells (MDSCs) into tumors to suppress the CD8+ T cell-mediated antitumor response.

Cancer cells can be viewed from an immunologic perspective as altered self-cells that escaped normal



growth-regulating mechanisms. The possibility that specific immune responses can eliminate tumors is widely accepted, and has been subject of several researches [7, 40]. Kús et al. [41] observed that scanning electronic microscopy of primary larynx tumors revealed that these tumors are infiltrated by cells involved in the immune responses. These cells are located within and also in surrounding cancer infiltrations and are represented by: lymphocytes, monocytes and macrophages. Gabriel et al. [42] verified the presence of immune response components in the laryngeal tissue samples by immunohistochemical staining. They observed that the CD 43 lymphocytic infiltration indicate a prognostic value for determining a shorter survival time and the possibility of lymph node metastases in patients with recurrences of cancer. These findings confirm that the human organism, until certain degree, is able to fight against malignant tissue. Tumor-reactive antibodies found in the serum of people with cancer support the role of the T and B lymphocytes as members of the immune surveillance team against tumors [40].

Regarding the immunoglobulins' expression present in the laryngeal blood cancer patients, Vlock et al. [43] observed that patients with moderately or poorly differentiated tumors had significantly higher antibody titers when compared with patients with well-differentiated tumors. In this study, they also observed that patients with higher levels of circulating immune complexes were less likely to respond to chemotherapy. No correlations were noted between immune complex levels and stage of disease, nodal status, site of disease, recurrence, or survival. These results support the fact that the formation of tumor-associated immune complexes in patients with squamous cell carcinoma of the head and neck is associated with a decreased response to chemotherapy.

In our study, we observed that C3 and C4 complement components are present in both cancer and non-cancer plasma samples. The presence of these components, according to Markiewski et al. [9], in smoking healthy patients may contribute to tumor growth. Based on our results, it seems that the active immune response against the tumor was represented by the T and B lymphocytes activities based on the immunoglobulin's expression in the cancer patients' samples.

Since there is a tremendous molecular heterogeneity in all human cancers and proteins are cell's function mediators, the study of proteins changes that result from a pathological lesion, would appear to be a rich source of potential cancer markers. According to our study and to current literature, a specific serum biomarker for laryngeal cancer diagnosis was not found, although the literature reports biomarkers for different kinds of cancer, such as nasopharyngeal. Cho et al. [44] identified two isoforms of

serum amyloid A proteins as biomarkers to monitor relapse of nasopharyngeal carcinoma. They observed a dramatic serum amyloid A protein increase, which correlated with relapse and a drastic fall correlated with response to salvage chemotherapy. Surprisingly, despite the close localization of the nasopharynx and the larynx, our study did not find the same biomarkers for laryngeal and nasopharyngeal cancers. Our study confirms the tobacco role in the development of laryngeal cancer and reinforces the immune response importance as target in cancer understanding and treatment.

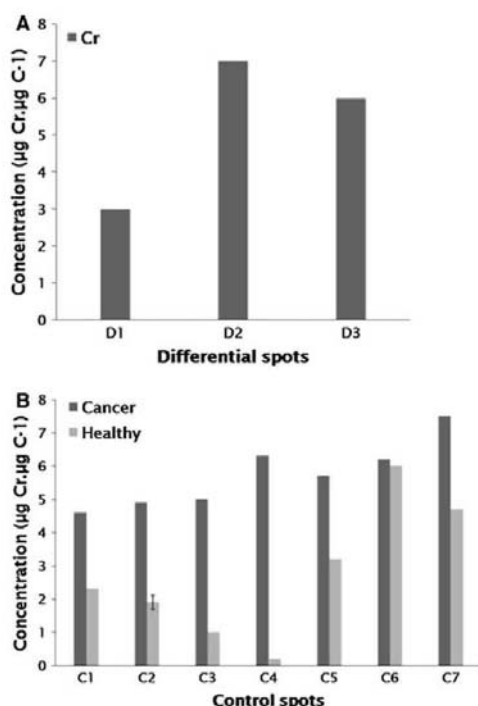
#### Trace element analysis

Aliquots of the trypsinized proteins submitted to MS were also analyzed by ICP-MS for selected metals. Most elements, Ca, Cd, Co, Cu, Fe, Mg, Mn, Mo, Se and Zn, were below detection level by this technique, where Cr and Pb were the only ones observed in all samples. The average concentration of Cr and Pb between patients for each spot was determined separately.

The relative amount of Pb detected was low in most spots; however, spot C6 (haptoglobin) and C7 (complement component C3) showed higher levels among healthy patients (data not shown). The values found here were not in accordance with study by Pasha et al. [45] where the concentration of Pb was higher in plasmas of cancer patients. These results might be due to different amounts of Pb in the diet of the patients, once this is the main source of Pb intake.

Cr was found in all three differential spots (Fig. 3a). For the common spots, higher amounts of Cr were found in all samples from patients with cancer, except in spot C6 (haptoglobin), where the same concentration was found in samples from both cancer and healthy patients (Fig. 3b). The maximum increase was of 3,050% for spot C4 (complement component C4a). Cr has a long history of industrial use, such as welding and plating and is accepted as a mutagenic agent [46], being the respiratory tract the primary target organ once inhalation is the main route of entry into the body [47]. Its exposure causes gene mutations, cell cycle arrest, apoptosis and neoplastic transformation [14]. Epidemiological and experimental evidences show that occupational exposure to Cr is associated with lung cancer [47, 48]. Studies show a relation between high concentrations of Cr with accelerated tumor growth [45]. Others relate this metal with greater susceptibility to develop nasal and respiratory cancers [49]. Significant higher levels of Cr in scalp hair of patients with malignant tumors add to the evidences that it increases cancer risk [50].

Both elements detected in this work are found in tobacco and its smoke, which are a complex mixture of thousands of components, adding to near 5,000 already isolated and



**Fig. 3** Average of Cr concentration at each differential spot (1, 2 and 3) of patients with cancer (a) and average of Cr concentration for common spots in samples of patients with and without cancer (b). All samples were obtained from trypsinized proteins of the 2D gel spots. Vertical bars correspond to standard deviation

identified. Among these, 69 are known to cause cancers [51]; therefore, neoplasms induced by tobacco smoking have a more complex etiology due to the presence of various carcinogenic agents [48]. Once there are evidences of the role trace elements play in biological processes, it is possible to infer that the chromium found in the samples analyzed in this work has direct or indirect effect on the carcinogenic process, including the development of LSCC.

**Acknowledgments** The study was supported by UCB, Embrapa, CAPES. We wish to thank Dr. Gert Lubec for providing precious equipment and time at his lab at Medical University of Vienna and Wei-Qiang Chen for his skilful technical assistance in LC-ESI-MS experiments. We also wish to acknowledge Dr. Aparecido D. da Cruz from Catholic University of Goiás for providing the plasma samples.

## References

- Ronchetti D, Neglia CB, Cesana BM et al (2004) Association between p53 gene mutations and tobacco and alcohol exposure in

laryngeal squamous cell carcinoma. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 130:303–306

- Gouin CG, Xia ZS, Han Y et al (2006) Serum protein profile analysis in patients with head and neck squamous cell carcinoma. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 132:390–397
- De Palma G, Goldoni M, Catalani S et al (2008) Metallic elements in pulmonary biopsies from lung cancer and control subjects. *Acta Biomed* 79(Suppl 1):43–51
- Huang Y-L, Sheu J-Y, Lin T-H (1999) Association between oxidative stress and changes of trace elements in patients with breast cancer. *Clin Biochem* 32:131–136
- Siddiqui MKJ, Jyoti SS, Mehrotra PK, Singh K, Sarangi R (2006) Comparison of some trace elements concentration in blood, tumor free breast and tumor tissues of women with benign and malignant breast lesions: an Indian study. *Environ Int* 32:630–637
- Anderson KS, LaBaer J (2005) The sentinel within: exploiting the immune system for cancer biomarkers. *J Proteome Res* 4:1123–1133
- Varela JC, Imai M, Atkinson C, Ohta R, Rapisardo M, Tomlinson S (2008) Modulation of protective T cell immunity by complement inhibitor expression on tumor cells. *Cancer Res* 68:6734–6742
- de Visser KE, Eichten A, Coussens LM (2006) Paradoxical roles of the immune system during cancer development. *Nat Rev Cancer* 6:24–37
- Markiewski MM, DeAngelis RA, Benencia F et al (2008) Modulation of the antitumor immune response by complement. *Nat Immunol* 9:1225–1235
- Hahne M, Rimoldi D, Schroter M et al (1996) Melanoma cell expression of Fas(Apo-1/CD95) ligand: implications for tumor immune escape. *Science* 274:1363–1366
- Cho W (2007) Contribution of oncoproteomics to cancer biomarker discovery. *Mol Cancer* 6:25
- Kolch W, Mischak H, Pitt AR (2005) The molecular make-up of a tumour: proteomics in cancer research. *Clin Sci Lond* 108:369–383
- Anderson NL, Anderson NG (2002) The human plasma proteome: history, character, and diagnostic prospects. *Mol Cell Proteomics* 1:845–867
- Calvo FB, Santos Junior D, Rodrigues CJ et al (2009) Variation in the distribution of trace elements in renal cell carcinoma. *Biol Trace Elem Res* (in press)
- Sobin LH, Wittekind CH (2002) TNM: classification of malignant tumours, 6th edn. Wiley-Liss, New York
- Shevchenko A (2001) Evaluation of the efficiency of in-gel digestion of proteins by peptide isotopic labeling and MALDI mass spectrometry. *Anal Biochem* 296:279–283
- Andrade AE, Silva LP, Pereira JL et al (2008) In vivo proteome analysis of *Xanthomonas campestris* pv *campestris* in the interaction with the host plant *Brassica oleracea*. *FEMS Microbiol Lett* 281:167–174
- Rabello AR, Guimaraes CM, Rangel PHN et al (2008) Identification of drought-responsive genes in roots of upland rice (*Oryza sativa* L). *BMC Genomics* 9
- Scully C, Field JK, Tanzawa H (2000) Genetic aberrations in oral or head and neck squamous cell carcinoma 2: chromosomal aberrations. *Oral Oncol* 36:311–327
- Beenken SW, Urist MM, Casiano RR (2007) Laryngeal cancer (cancer of the larynx). Available at: <http://www.health.am/cr/laryngeal-cancer/>. Accessed 22 Mar 2007
- Gasteiger E, Gattiker A, Hoogland C, Ivanyi I, Appel RD, Bairoch A (2003) ExpASY: the proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis. *Nucl Acids Res* 31:3784–3788
- Anderson L, Anderson NG (1977) High resolution two-dimensional electrophoresis of human plasma proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 74:5421–5425



23. McGuire K, Davidson W, Jonas A (1996) High yield overexpression and characterization of human recombinant proapolipoprotein A-I. *J Lipid Res* 37:1519–1528
24. Corder EH, Saunders AM, Risch NJ et al (1994) Protective effect of apolipoprotein E type 2 allele for late onset Alzheimer disease. *Nat Genet* 7:180–184
25. Davignon J, Gregg R, Sing C (1988) Apolipoprotein E polymorphism and atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 8:1–21
26. Chen J, Anderson M, Mizek DE, Simeone DM, Lubman DM (2007) Characterization of apolipoprotein and apolipoprotein precursors in pancreatic cancer serum samples via two-dimensional liquid chromatography and mass spectrometry. *J Chromatogr A* 1162:117–125
27. Jiang J-t, Xu N, Zhang X-y, Wu C-p (2007) Lipids changes in liver cancer. *J Zhejiang Univ Sci* 8:398–409
28. Sorensson J, Matejka GL, Ohlson M, Haraldsson B (1999) Human endothelial cells produce orosomucoid, an important component of the capillary barrier. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 276:530–534
29. Ganz PA, Baras M, Ma PY, Elashoff RM (1984) Monitoring the therapy of lung cancer with {alpha}-1-acid glycoprotein. *Cancer Res* 44:5415–5421
30. Fairbanks KD, Tavill AS (2008) Liver disease in alpha 1-antitrypsin deficiency: a review. *Am J Gastroenterol* 103:2136–2141
31. Perlmutter DH (2008) Autophagic disposal of the aggregation-prone protein that causes liver inflammation and carcinogenesis in [alpha]-1-antitrypsin deficiency. *Cell Death Differ* 16:39–45
32. Perlmutter DH (2009) Autophagic disposal of the aggregation-prone protein that causes liver inflammation and carcinogenesis in alpha-1-antitrypsin deficiency. *Cell Death Differ* 16:39–45
33. Yang P, Sun Z, Krowka MJ et al (2008) Alpha1-antitrypsin deficiency carriers, tobacco smoke, chronic obstructive pulmonary disease, and lung cancer risk. *Arch Intern Med* 168:1097–1103
34. Firpo M, Gay D, Granger S et al (2009) Improved diagnosis of pancreatic adenocarcinoma using haptoglobin and serum amyloid A in a panel screen. *World J Surg* 33(4):716–722
35. Ye B, Cramer DW, Skates SJ et al (2003) Haptoglobin-{alpha} subunit as potential serum biomarker in ovarian cancer: identification and characterization using proteomic profiling and mass spectrometry. *Clin Cancer Res* 9:2904–2911
36. Gas M-CW, Tinteren Hv, Bontenbal M et al (2008) Haptoglobin phenotype is not a predictor of recurrence free survival in high-risk primary breast cancer patients. *BMC Cancer* 8:1–26
37. Sewell DA, Yuan CX, Robertson E (2007) Proteomic signatures in laryngeal squamous cell carcinoma. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec* 69:77–84
38. Gasque P (2004) Complement: a unique innate immune sensor for danger signals. *Mol Immunol* 41:1089–1098
39. Gorter A, Meri S (1999) Immune evasion of tumor cells using membrane-bound complement regulatory proteins. *Immunol Today* 20:576–582
40. Chiplunkar SV (2001) The immune system and cancer. *Curr Sci* 81:542–548
41. Kus J, Miodonski AJ, Olszewski E, Sekula J (1985) Cellular elements of the immune system in the larynx cancer, SEM study. *Folia Histochem Cytobiol* 23:155–158
42. Gabriel A, Namyslowski G, Ziolkowski A, Morawski K, Stepiewska-Mazur K, Urbaniec P (1999) Immunohistochemical analysis of lymphocytic infiltration in the tumor microenvironment in patients operated on for laryngeal cancer. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 256:384–387
43. Vlock D, Schantz S, Fisher S, Savage H, Carey T, Wolf G (1993) Clinical correlates of circulating immune complexes and antibody reactivity in squamous cell carcinoma of the head and neck. The Department of Veterans Affairs Laryngeal Cancer Study Group. *J Clin Oncol* 11:2427–2433
44. Cho WC, Yip TT, Yip C et al (2004) Identification of serum amyloid a protein as a potentially useful biomarker to monitor relapse of nasopharyngeal cancer by serum proteomic profiling. *Clin Cancer Res* 10:43–52
45. Pasha Q, Malik SA, Shah MH (2008) Statistical analysis of trace metals in the plasma of cancer patients versus controls. *J Hazard Mater* 153:1215–1221
46. Zhang Y, Qi Z, Zheng D, Li C, Liu Y (2008) Interactions of chromium (III) and chromium (VI) with bovine serum albumin studied by UV spectroscopy, circular dichroism, and fluorimetry. *Biol Trace Elem Res* 1–13
47. Caglieri A, Goldoni M, De Palma G et al (2008) Exposure to low levels of hexavalent chromium: target doses and comparative effects on two human pulmonary cell lines. *Acta Biomed* 79(Suppl 1):104–115
48. Salnikow K, Zhitkovich A (2008) Genetic and epigenetic mechanisms in metal carcinogenesis and cocarcinogenesis: nickel, arsenic, and chromium. *Chem Res Toxicol* 21:28–44
49. Davies JM, Easton DF, Bidstrup PL (1991) Mortality from respiratory cancer and other causes in United Kingdom chromate production workers. *Br J Ind Med* 48:299–313
50. Pasha Q, Malik S, Iqbal J, Shah M (2007) Characterization and distribution of the selected metals in the scalp hair of cancer patients in comparison with normal donors. *Biol Trace Elem Res* 118:207–216
51. IARC (2004) Tobacco smoke and involuntary smoking. World Health Organization, Lyon

## Comparative Proteomic Analysis of Zygotic Embryo and Endosperm from *Coffea arabica* Seeds

LÍVIA L. KOSHINO,<sup>†</sup> CLARISSA P. GOMES,<sup>§</sup> LUCIANO P. SILVA,<sup>#</sup>  
MIRIAN T. S. EIRA,<sup>⊥</sup> CARLOS BLOCH JR.,<sup>#</sup> OCTÁVIO L. FRANCO,<sup>§,‡</sup> AND  
ÂNGELA MEHTA<sup>\*</sup>

Universidade de Brasília; Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Embrapa Café; Centro de Análises Proteômicas e Bioquímicas, Programa de Pós-Graduação em Ciências Genômicas e Biotecnologia, Universidade Católica de Brasília, Brasília, Brazil and Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, Minas Gerais, Brazil

During coffee seed development, proteins are predominantly deposited in cotyledons and in the endosperm. Reserve proteins of the 11S family are the most abundant globulins in coffee seeds, acting as a nitrogen source during roasting and guaranteeing flavor and aroma. The aim of the present study was to compare the protein profiles of endosperm and zygotic embryos of coffee seeds. Proteins were extracted from whole seed as well as from embryo and endosperm, separately. Total proteins were analyzed by two-dimensional electrophoresis (2-DE) followed by identification by mass spectrometry (MS). The most abundant spots observed in the gels of coffee seeds were excised, digested with trypsin, and identified by MS as subunits of the 11S globulin. Spots with identical *pI* and molecular masses were also observed in the protein profiles of coffee endosperm and embryo, indicating that 11S protein is also highly expressed in those tissues. Peptide sequence coverage of about 20% of the entire 11S globulin was obtained. Three other proteins were identified in the embryo and endosperm 2-DE profiles as a Cupin superfamily protein, an allergenic protein (Pru ar 1), exclusive to the endosperm 2D map, and a hypothetical protein, observed only in the zygotic embryo profile.

**KEYWORDS:** 2-DE; mass spectrometry; zygotic embryo; endosperm; *Coffea arabica*

### INTRODUCTION

Coffee is one of the most important agricultural products worldwide and is cultivated in more than 60 countries. Brazil is responsible for more than one-third of the global coffee production and exportation and, together with Vietnam and Colombia, accounts for about 50% of the world production. The main cultivated coffee species are *Coffea arabica* and *Coffea canephora*. Several studies of protein/gene expression have been performed mostly related to flavor and aroma in these species (1–6).

Coffee seeds contain specialized storage tissues (cotyledons and endosperm) in which proteins are formed and deposited during maturation. After development, these proteins constitute a major seed protein fraction. Seed storage proteins comprise groups of multiple isoforms encoded by gene families, including

globulins, albumins, glutelins, and prolamin (7). These proteins have shown multiple functions such as storage (8) as well as a key role in the plant defense system (9, 10). Globulins constitute the most widely distributed group of seed proteins, which are stored as hexameric structures (11). In coffee, the 11S globulin has been extensively studied by using genomic and proteomic approaches (5, 12, 13). This protein is formed by two subunits linked by a disulfide bond: a large acid  $\alpha$  subunit and a small basic  $\beta$  subunit derived from a single 11S precursor, which exists as multiple isoforms (7, 14). These abundant proteins are probably important for the quality of the beverage, because they act as the main source of nitrogen during roasting (15, 16).

Proteomic analysis has been increasingly employed to better understand biological processes. By using this approach, a high number of proteins expressed in a specific tissue or under certain biological conditions can be visualized, allowing the determination of quantitative data regarding protein abundance, as well as qualitative differences related to protein mass and isoelectric point (*pI*). Currently, proteomic analyses are being performed by coupling two-dimensional electrophoresis (2-DE) and high-throughput mass spectrometry (MS). In 2-DE, proteins are separated by protein mass and *pI*, and therefore a high resolution can be obtained. Protein spots can be further analyzed by MS and identified by peptide mass fingerprinting (PMF) or *de novo*

\* Address correspondence to this author at Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia PqEB, Av. W5 Norte Final, Asa Norte CEP 70770-900 Brasília, DF, Brazil (telephone +55 61 3448-4901; fax +55 61 3340-3658; email: amehta@cenargen.embrapa.br).

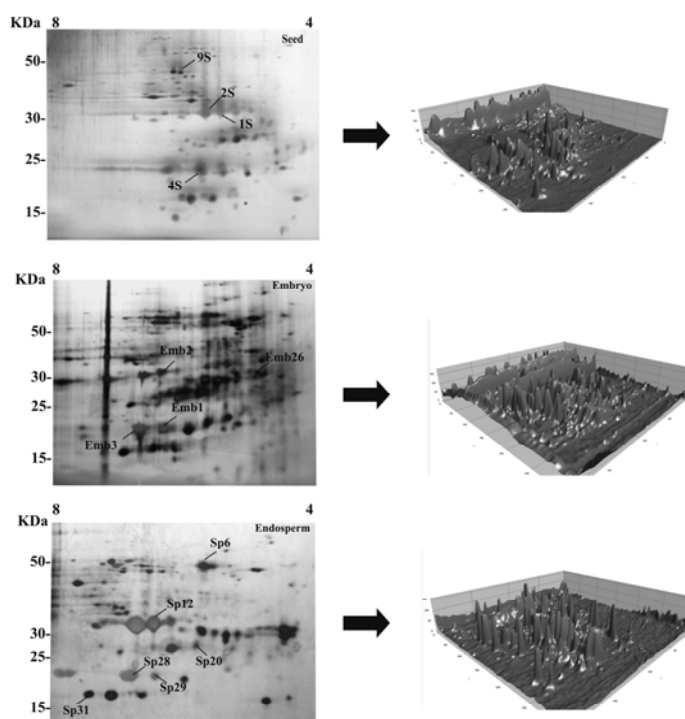
<sup>†</sup> Universidade de Brasília.

<sup>§</sup> Universidade Católica de Brasília.

<sup>#</sup> Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

<sup>⊥</sup> Embrapa Café.

<sup>‡</sup> Universidade Federal de Juiz de Fora.



**Figure 1.** Two-dimensional electrophoresis (left) and three-dimensional gel representations (right) of proteins from whole seed, endosperm, and embryo, as indicated.

sequencing. Peptide sequencing gives more detailed information and allows the identification of proteins from organisms with noncharacterized or nonpublic genomes, which is the case of the Coffee Genome database. Proteomic analyses have been applied for the study of coffee grains (5, 6, 17); however, still little is known regarding coffee seed proteins accumulated in different tissues, especially in the embryo. In summary, this paper aims to compare the global protein profiles of coffee zygotic embryo and endosperm by two-dimensional gel electrophoresis (2-DE) and mass spectrometry (MS).

#### MATERIALS AND METHODS

**Plant Material.** *C. arabica* (cultivar Catuai Vermelho IAC-99) fruits were collected 210–220 days after anthesis, corresponding to the stage when the germinability is acquired (13, 18). Seeds were isolated from the fruits and further separated into embryo and endosperm. Whole seeds were also used for comparison, and all tissues were stored at  $-80^{\circ}\text{C}$ .

**Protein Extraction.** Whole seed, endosperm, and embryo samples collected from two consecutive years were separately homogenized in a liquid nitrogen-precooled mortar by using a pestle, and total proteins were extracted according to the method described by de Mot and Vanderleyden (19). Approximately 0.1 g of the resulting tissue powder was put into a 1.5 mL tube with 0.75 mL of extraction buffer consisting of 0.7 M sucrose, 0.5 M Tris-HCl, 30 mM HCl, 50 mM EDTA, 0.1 M KCl, and 40 mM DTT. An equal volume of buffer-saturated phenol (Invitrogen) was added, and after 15 min of vigorous shaking, the sample was centrifuged and the supernatant recovered. Two additional rounds of extraction were performed using an equal volume of extraction buffer each time. Proteins in the phenol phase were precipitated in 5 volumes of chilled 0.1 M ammonium acetate in methanol at  $-20^{\circ}\text{C}$  for 2 h. Precipitates were washed in acetone and resuspended

in 40  $\mu\text{L}$  of lysis buffer [9.8 M urea, 0.2% (v/v) Nonidet P-40 (Sigma), 100 mM DTT, and 2% (v/v) of a mixture of ampholytes pH 5–8 and pH 3–10 (Bio-Rad) in the ratio of 5:1]. The total protein content was estimated according to the method of Bradford (20).

**Two-Dimensional Electrophoresis.** Isoelectric focusing of coffee proteins was performed according to the method of de Mot and Vanderleyden (19). Polyacrylamide gels containing 3.6% acrylamide, 0.21% bisacrylamide, 7.2% ampholyte pH 5–7 and 3–10 in the proportion of 5:1 (v/v), 2% Nonidet P-40, and 55% urea were used. Approximately 150  $\mu\text{g}$  of proteins was loaded onto the 11 cm gel after a prerun. Electrophoresis was performed in a vertical system (Invitrogen) at 400 V for 18 h, using 20 mM NaOH in the upper compartment of the chamber and 10 mM  $\text{H}_3\text{PO}_4$  in the lower. Molecular mass separation was performed according to the method of Laemmli (21) in  $18 \times 18$  cm gels 12%. Electrophoresis was performed for 6 h at 120 V using glycine buffer in the upper and lower compartments of the chamber, and at least four repetitions for each tissue were obtained. After running, 2D gels were fixed overnight in a solution containing 50% ethanol and 12% acetic acid. Silver staining was carried out according to the method of Blum et al. (22). Gels were digitalized using the scanner HP Scanjet model 8290 and further analyzed with Bionumerics software v. 4.5 (Applied-Maths). First, calibration with a gray scale was necessary to transform gray levels into values for each pixel of the gel picture. A calibration curve from Bionumerics software was used, and all gel pictures were analyzed as tiff files. The six gel images were placed in one folder, and the wizard detection method proposed by the software was used for spot detection. Automatically detected spots were manually checked, and some of them were manually added or removed according to size ( $>0.2$  cm), format (circular), and density ( $>2$  pixels  $\text{cm}^{-1}$ ). Following the detection procedure, the normalization step was carried out to attribute a common protein identity for identical spots derived from different images. For this procedure, a reference gel was constructed, and automatic matching options of

**Table 1.** MS/MS Protein Identification of Spots from 2D Gels of Whole Seed, Embryo, and Endosperm

spot	peptide sequence	protein identification	accession no.
1S, Sp12	LNAQEPSFR GGQEGQR		
2S	LNAQEPSFR EGHQGQQQHR		
4S	TNDNAMIN AVEETLSSTVK IPLSSLQLSAER LQVVDHK IQVVDHK SALY VIR AIPEEVLK LSENIQLPQEADVFNPR	11S globulin	AAC61983
9S, Emb 1, Emb 2, Emb 3, Sp28, Sp29			
Sp20	IPLSSLQLSAER LSENIQLPQEADVFNPR		
Sp6	FGVEEGDIFAVQR	Cupin family protein	NP_195388
Sp31	APVTSSYEVTFNIAAPR	major allergen Pru ar 1	O50001
Emb26	SSWNPPYYDTSSYGAG- SGGGGGGR	hypothetical protein	EAZ14610

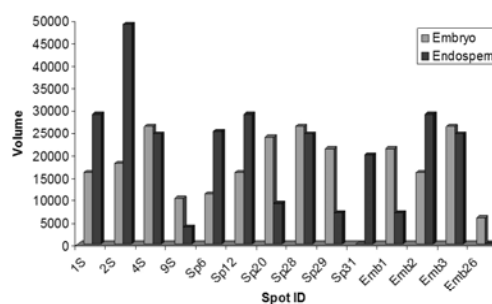
Bionumerics software was used. For each sample, when a protein was detected in all gel images, this protein was automatically added to the reference gel.

**Mass Spectrometry.** Protein spots were excised from silver nitrate-stained gels, destained, and digested with trypsin according to the method of Shevchenko et al. (23). Peptides were analyzed in MALDI TOF-TOF Ultra Flex II (Bruker Daltonics) MS and *de novo* sequenced using CID and LIFT acquired MS/MS spectral data. The identification of protein spots was performed by sequence searches in public databases and in the Coffee Genome Project database using the Blastp and tBlastn programs, respectively.

## RESULTS AND DISCUSSION

In this study, we have analyzed the proteomes of coffee seeds as well as zygotic embryo and endosperm. The main proteins observed in all three protein maps were identified by MS/MS experiments. Initially, the whole seed proteome was analyzed and revealed approximately 70 proteins ranging in mass from 10 to 100 kDa and in *pI* from 4 to 8. Some of the main proteins observed (1S, 2S, 4S, and 9S) were excised from the gel and analyzed by mass spectrometry. The proteins identified corresponded to the 11S globulin, previously described (5, 6, 12). To verify the proteins expressed in the different compartments of the whole seed, we analyzed the endosperm and zygotic embryo separately by 2-DE. Comparison of all three 2D maps showed similar protein profiles (Figure 1). The 2-DE of embryos and endosperm revealed approximately 120 and 80 protein spots, respectively, showing higher protein diversity in the embryo. Several of the proteins observed in the seed could be visualized in the embryo and endosperm profiles (Table 1). Some of these proteins observed in the embryo (Emb1, Emb2, and Emb3) and endosperm (Sp12, Sp20, Sp28, and Sp29) were also excised from the gel and analyzed by MS to determine whether the proteins corresponded to the seed globulin. The results revealed that all protein spots corresponded to the same globulin 11S protein.

By using a proteomic approach, Rogers et al. (6) previously characterized the 11S globulin in coffee endosperm mainly by

**Figure 2.** Expression comparison of spot volumes of identified proteins using the Bionumerics software.

NH<sub>2</sub> terminal sequencing. In this work, we have analyzed several protein spots by MS/MS analysis and obtained 11S protein coverage of approximately 20% of the whole protein, considering the number of amino acid residues determined (Table 1). Yuffá et al. (17) previously analyzed zygotic and somatic embryos as well as whole seed of *C. arabica* and showed the expression of abundant polypeptides in all three protein profiles; however, no protein identification was performed. In this study, we identified protein spots from zygotic embryo, and our results show that 11S globulin is also highly expressed in this tissue.

It has been reported that the 11S globulin represents approximately 45% of total proteins in the endosperm tissue and 5–7% of coffee bean dry weight (24). Endosperm is a very important specialized storage organ and, therefore, study of the endosperm proteome can provide information on seed development. Nevertheless, this tissue is rich in storage proteins such as globulins, which hinders the identification of poorly abundant proteins. Indeed, a total of 11 different protein spots analyzed in this study were identified as the 11S globulin. A recent analysis of the rice endosperm proteome was performed, and a method to remove the highly abundant proteins was developed (25). This is an important strategy to detect and identify new proteins in the endosperm.

In this study, differentially expressed proteins were also excised from the gel and analyzed by MS/MS; however most proteins did not reveal reliable identification, probably due to the low amount of protein or low ionization capacity. One protein spot (Sp6), observed in the embryo and up-regulated in the endosperm (Figure 2), was identified as a Cupin superfamily protein. This family includes 11S and 7S plant seed storage proteins and germins (26, 27), which have been associated with allergy (28, 29). In coffee, allergy to caffeine (30–32) and the beans (33–35) has been reported. However, no protein has been directly associated with coffee allergies.

Another protein identified was spot Sp31, which was expressed only in the endosperm (Figure 2) and showed identity to Mal d 1, the major apple allergen, which belongs to a group of pathogenesis-related (PR) 10 proteins (36). It has been reported that the expression of PR10 genes occurs during conditions of stress and ripening (37, 38). Proteins from this family have been implicated in allergy in different consumed fruits such as peach, cherry, and oranges (39–41). Although there are no reports associating these proteins with coffee allergy, additional studies need to be performed to investigate their role in allergy.

A protein spot (Emb26) specifically expressed in the zygotic embryo was identified and showed 100% identity to a hypothetical protein from *Oryza sativa*. Although the masses

of both proteins were similar (30 kDa), the calculated *pI* of this protein was 10 as opposed to 4.5 for the coffee protein. Unexpectedly, this protein did not show a high identity to any protein present in the Coffee Genome database. It is possible that this protein is a new one, not present in the Coffee and public databases.

Overall, in this work we have identified several protein spots in the whole seed, embryo, and endosperm of coffee as the 11S globulin. We show that this protein is highly expressed in the endosperm and embryo tissues. Moreover, two allergenic proteins were identified, as well as a hypothetical protein. Further studies need to be performed to determine the functional role of these proteins in development and their possible relationship to quality, flavor, and aroma, as well as allergy.

## LITERATURE CITED

- (1) Lin, C.; Mueller, L. A.; McCarthy, J.; Crouzillat, D.; Pétiard, V.; Tanksley, S. D. Coffee and tomato share common gene repertoires as revealed by deep sequencing of seed and cherry transcripts. *Theor. Appl. Genet.* **2005**, *112*, 114–130.
- (2) Nunes, F. M.; Coimbra, M. A. Chemical characterization of the high-molecular-weight material extracted with hot water from green and roasted robusta coffees as affected by the degree of roast. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50* (24), 7046–7052.
- (3) Montavon, P.; Mauron, A. F.; Duruz, E. Changes in green coffee protein profiles during roasting. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 2335–2343.
- (4) Montavon, P.; Duruz, E.; Rumo, G.; Pratz, G. Evolution of green coffee protein profiles with maturation and relationship to coffee cup. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 2328–2334.
- (5) Marraccini, P.; Deshayes, A.; Pétiard, V.; Rogers, W. J. Molecular cloning of the complete 11S seed storage protein gene of *Coffea arabica* and promoter analysis in transgenic tobacco plants. *Plant Physiol. Biochem.* **1999**, *37*, 273–282.
- (6) Rogers, W. J.; Bezar, G.; Deshayes, A.; Meyer, I.; Pétiard, V.; Marraccini, P. Biochemical and molecular characterization and expression of the 11S-type storage protein from *Coffea arabica* endosperm. *Plant Physiol. Biochem.* **1999**, *37*, 261–272.
- (7) Shewry, P. R. Plant storage proteins. *Biol. Rev.* **1995**, *70*, 375–426.
- (8) Sivakumar, S.; Franco, O. L.; Thayumanavan, B.; Murad, A. M.; Manickan, A.; Mohan, M.; Mridula, M. Cloning and structural analyses of an Indian little millet (*Panicum sumatrense*) zein-like storage protein: implication for molecular assembly. *Biochemistry (Moscow)* **2006**, *71*, 1183–1191.
- (9) Pelegri, P. B.; Noronha, E. F.; Muniz, M. A.; Vasconcelos, I. M.; Chiarello, M. D.; Oliveira, J. T.; Franco, O. L. An antifungal peptide from passion fruit (*Passiflora edulis*) seeds with similarities to 2S albumin proteins. *Biochim. Biophys. Acta* **2006**, *1764* (6), 1141–1146.
- (10) Pelegri, P. B.; Murad, A. M.; Silva, L. P.; Santos, R. C. P.; Tagliari, P. D.; Bloch, C.; Noronha, E. F.; Miller, R. N. G.; Franco, O. L. A novel glycine-rich peptide from guava (*Psidium guajava*) seeds with activity against gram-negative bacteria: novel insights on the control of hospital infections. *Peptides* **2008**, 1271–1279.
- (11) De Dios-Alché, J.; Jiménez-López, J. C.; Wang, W.; Castro-López, A. J.; Rodríguez-García, M. I. Biochemical characterization and cellular localization of 11S type storage proteins in olive (*Olea europaea* L.) seeds. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 5562–5570.
- (12) Acuña, R.; Bassünner, R.; Beilinson, V.; Cortina, H.; Cadena-Gómez, G.; Montes, V.; Nielsen, N. C. Coffee seeds contain 11S storage proteins. *Physiol. Plant.* **1999**, *105*, 122–131.
- (13) De Castro, R. D.; Marraccini, P. Cytology, biochemistry and molecular changes during coffee fruit development. *Braz. J. Plant Physiol.* **2006**, *18*, 175–199.
- (14) Muntz, K. Deposition of storage proteins. *Plant Mol. Biol.* **1998**, *38*, 77–99.
- (15) Arnold, U.; Ludwig, E. Analysis of free amino acids in green coffee beans II. Changes of the amino acid content in arabica coffees in connection with post-harvest treatment. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **1996**, *203*, 379–384.
- (16) Baltes, W. Vorstufen und entstehung von farbe und geschmack des kaffees. In *7th International Colloquium on the Chemistry of Coffee*; ASIC: Paris, France, 1975; pp 91–108.
- (17) Yuffa, A. M.; De Garcia, E. G.; Nieto, M. S. Comparative study of protein electrophoretic patterns during embryogenesis in *Coffea arabica* cv. Catimor. *Plant Cell Rep.* **1994**, *13*, 197–202.
- (18) De Castro, R. D.; Estanislau, W. T.; Mesquita, P. R.; Hilhorst, H. W. A semente de café: desenvolvimento e perspectivas genômicas. In *Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil 2. Vitória, Brasil: 2001* (CD-ROM).
- (19) De Mot, R.; Vanderleyden, J. Application of two dimensional protein analysis for strain fingerprinting and mutant analysis of *Azospirillum* species. *Can. J. Microbiol.* **1989**, *35*, 960–967.
- (20) Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **1976**, *72*, 248–254.
- (21) Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. *Nature* **1970**, *227*, 680–685.
- (22) Blum, H.; Beier, H.; Gross, H. J. Improved silver staining of plant protein: RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* **1987**, *8*, 93–98.
- (23) Shevchenko, A.; Wilm, M.; Vorm, O.; Mann, M. Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. *Anal. Chem.* **1996**, *68*, 850–858.
- (24) Clifford, M. N. Chemical and physical aspects of green coffee and coffee products. In *Coffee: Botany, Biochemistry and Production of Beans and Beverage*; Clifford, M. N.; Wilson, K. C., Eds.; Croom Helm: London, U.K., 1987; pp 305–374.
- (25) Li, G.; Nallamilli, B. R.; Tan, F.; Peng, Z. Removal of high-abundance proteins for nuclear subproteome studies in rice (*Oryza sativa*) endosperm. *Electrophoresis* **2008**, *29*, 604–617.
- (26) Bäumlein, H.; Braun, H.; Kakhovskaya, I. A.; Shutov, A. D. Seed storage proteins of spermatophytes share a common ancestor with desiccation proteins of fungi. *J. Mol. Evol.* **1995**, *41*, 1070–1075.
- (27) Gane, P. J.; Dunwell, J. M.; Warwicker, J. Modelling based on the structure of vicilins predicts a histidine cluster in the active site of oxalate oxidase. *J. Mol. Evol.* **1998**, *46*, 488–493.
- (28) Mills, E. N.; Jenkins, J. A.; Alcocer, M. J.; Shewry, P. R. Structural, biological, and evolutionary relationships of plant food allergens sensitizing via the gastrointestinal tract. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2004**, *44*, 379–407.
- (29) Palomares, O.; Cuesta-Herranz, J.; Vereda, A.; Sirvent, S.; Villalba, M.; Rodríguez, R. Isolation and identification of an 11S globulin as a new major allergen in mustard seeds. *Ann. Allergy Asthma Immunol.* **2005**, *94*, 586–592.
- (30) Caballero, T.; Garcia, C.; Pascual, C.; Diaz-Pena, J. M.; Ojeda, A. Urticaria induced by caffeine. *J. Invest. Allergol. Clin. Immunol.* **1993**, *3*, 160–162.
- (31) Pola, J.; Subiza, J.; Armentia, A.; Zapata, C.; Hinojosa, M.; Losada, E.; et al. Urticaria caused by caffeine. *Ann. Allergy* **1988**, *60*, 207–208.
- (32) Hinrichs, R.; Hunzelmann, N.; Ritzkowsky, A.; Zollner, T. M.; Krieg, T.; Scharffetter-Kochanek, K. Caffeine hypersensitivity. *Allergy* **2002**, *57*, 859–860.
- (33) Leher, S. B.; Karr, R. M.; Salvaggio, J. E. Extraction and analysis of coffee bean allergens. *Clin. Allergy* **1978**, *8*, 217–226.
- (34) Patussi, V.; De Zotti, R.; Riva, G.; Fiorito, A.; Larèse, F. Allergic manifestations due to castor beans: an undue risk for the dock workers handling green coffee beans. *Med. Lav.* **1990**, *81*, 301–307.
- (35) Romano, C.; Sulotto, F.; Piolatto, G.; Ciacco, C.; Capellaro, E.; Falagiani, P.; Constable, D. W.; Verga, A.; Scansetti, G. Factors related to the development of sensitization to green coffee and castor bean allergens among coffee workers. *Clin. Exp. Allergy* **1995**, *25*, 643–650.

10926 *J. Agric. Food Chem.*, Vol. 56, No. 22, 2008

Koshino et al.

- (36) Breiteneder, H.; Ebner, C. Molecular and biochemical classification of plant-derived food allergens. *J. Allergy Clin. Immunol.* **2000**, *106*, 27–36.
- (37) Atkinson, R. G.; Perry, J.; Matsui, T.; Ross, G. S.; Macrae, E. A. A stress-pathogenesis and allergen-related cDNA in apple fruit is also ripening-related. *N.Z. J. Crop. Hort. Sci.* **1996**, *24*, 103–107.
- (38) Puehlinger, H.; Moll, D.; Hoffmann Sommergruber, K.; Watillon, B.; Katinger, H.; Laimer da Camara Machado, M. The promoter of an apple Ypr10 gene, encoding the major allergen Mal d 1, is stress- and pathogen-inducible. *Plant Sci.* **2000**, *152*, 35–50.
- (39) Ahrazem, O.; Ibanez, M. D.; Lopez-Torres, G.; Sanchez-Monge, R.; Sastre, J.; Lombardero, M.; Barber, D.; Salcedo, G. Lipid transfer proteins and allergy to oranges. *Int. Arch. Allergy Immunol.* **2005**, *137* (3), 201–210.
- (40) Gamboa, P. M.; Caceres, O.; Antepara, I.; Sanchez-Monge, R.; Ahrazem, O.; Salcedo, G.; Barber, D.; Lombardero, M.; Sanz, M. L. Two different profiles of peach allergy in the north of Spain. *Allergy* **2007**, *62*, 408–411.
- (41) Scheurer, S.; Metzner, K.; Hausteiner, D.; Vieths, S. Molecular cloning, expression and characterization of Pru a 1; the major cherry allergen. *Mol. Immunol.* **1997**, *34*, 619–629.

---

Received for review June 5, 2008. Revised manuscript received September 2, 2008. Accepted September 17, 2008.

JF801734M

**Proteomic evaluation of coffee zygotic embryos in two  
different stages of seed development**

**Octavio L. Franco<sup>1\*</sup>, Patrícia B. Pelegrini<sup>1</sup>, Clarissa P.C. Gomes<sup>1</sup>, Andréa Souza<sup>1</sup>,  
Fabio T. Costa<sup>1</sup>, Gilberto Domont<sup>2</sup>,  
Betania F. Quirino<sup>3</sup>, Mirian T. Eira<sup>4</sup> and Ângela Mehta<sup>3</sup>**

<sup>1</sup>*Centro de Análises Proteômicas e Bioquímicas, Programa de Pós-Graduação em Ciências Genômicas e  
Biotecnologia, Universidade Católica de Brasília, Brasília – DF, Brazil*

<sup>2</sup>*Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro-RJ, Brazil*

<sup>3</sup>*Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília – DF, Brazil*

<sup>4</sup>*Embrapa Café, Brasília – DF, Brazil*

\* Corresponding author: [ocfranco@pos.uch.br](mailto:ocfranco@pos.uch.br)

SGAN Quadra 916, Módulo B, Av. W5 Norte 70.790-160 – Asa Norte, Brasília-DF, Brazil

Fax: + 55-61-3347-4797

## ABSTRACT

Coffee seed development is accompanied by severe modifications in water-soluble proteins, several of these being associated to a specific developmental stage. For this reason, a proteomic approach has been used to describe spatial-temporal proteome modifications in zygotic embryos at different stages of seed development. Embryos from *C. arabica* seeds were harvested in two different developmental stages: stage 1 at 210 days after anthesis and stage 2 at 255 days. Total proteins were extracted and submitted to 2-DE. From these gels, several spots were identified by mass spectrometry including kinases, MYB transcription factor and enzymes involved in metabolic pathways. All proteins identified seem to affect coffee development in different ways, being directly involved in plant growth or used as an intermediate in some metabolic pathway that, indirectly, will influence coffee development. This is the first work using two-dimensional electrophoresis followed by mass spectrometry analyses that evaluates the expression of proteins during coffee zygotic embryos development. Data here reported supply some light over coffee development and could be used in a near future to improve coffee plants' growth and development by molecular strategies.

**Keywords:** coffee, proteome, plant development, zygotic embryos.



## INTRODUCTION

The two most common coffee species cultivated in the world are *Coffea arabica* and *Coffea canephora*. Due to the economic and agricultural importance of coffee, several studies have been accomplished to genetically improve this grain. A special focus has been given, for example, to the identification of the genes encoding methyltransferases, which seem to have crucial importance for caffeine biosynthesis (1). Furthermore, some studies are also related to increasing coffee production or to improve tolerance to biotic and abiotic stresses. Earlier reports showed the identification and characterization of *C. canephora* leaf compounds such as caffeoylquinic acids involved in abiotic stress response and also plant development (2). The comparative evaluation of caffeine, chlorogenic acids, fat, trigonelline and sucrose was carried out in order to shed some light over coffee resistance/susceptibility toward plant pests (3).

Although some papers compare coffee resistance against biotic and abiotic stresses, few reports aim to study the development of coffee from a molecular perspective (4). One example consists of the evaluation of gibberellins and ethylene in coffee seeds and seedlings (5-6). Gibberellins could change coffee seed germination, causing cell death in the embryo and lead to inhibition of radicle protrusion (1).

Proteomics permits qualitative and quantitative measurements of a great number of proteins that are directly involved in cellular biochemistry, providing accurate analysis of the cell state or system changes during growth, development, and response to environmental factors. Due to the fact that proteomics is able to reveal both chemical complexity and biological dynamics, it allows functional information of the biochemical processes underlying phenotypes that are not accessible or predictable by other means (7). Thousands of different proteins can be visualized in a 2D gel, allowing an overall analysis of the total content of proteins expressed in an organism (8). The identification of proteins can be performed by mass spectrometry which determines molecular masses with great accuracy (8). However, only few studies of coffee using proteomics and 2D-gels have been reported (36-37). One of these showed the comparison of green and roasted coffee beans to identify the differences that lead to flavor development (9).

In this work, coffee zygotic embryos from *C. arabica* seeds harvested in two different developmental stages were evaluated by proteomic analyses to study protein

expression patterns. Water soluble seed proteins were extracted and submitted to 2-DE and several spots were identified by mass spectrometry. The identification of these proteins contributes to the understanding of the molecular mechanisms of coffee development. In the future, this information may be used to improve coffee plants' growth and development by molecular strategies.

## 2. Materials and Methods

### *Zygotic embryos and protein extraction*

*C. arabica* fruits of the Catuaí Vermelho IAC-99 cultivar were collected at two developmental stages: stage 1 at 210 DAA (days after anthesis) and stage 2 at 255 DAA. Stage 1 consists in 210-220 days after anthesis, which corresponding to the developmental stage when the germinability is acquired. Moreover Stage 2 is 250-260 days after anthesis and was also defined as a stage in which germinability is vigorous, especially in metabolic processes (38). According those same authors (38), both stages represent different contrasting developmental stages of coffee fruit and several deep modifications occur at the physiological and molecular level. Embryos were isolated and further used for protein extraction. Each sample was separately grinded in a liquid nitrogen pre-cooled mortar by using a pestle and water soluble proteins were extracted according to the De Mot and Vanderleyden (10) protocol in the presence of inhibitor cocktail (GE healthcare) at a standard concentration of 1mM. Approximately 0.1 g of the resulting ground tissue was placed into a 1.5 mL tube with 1 mL of extraction buffer consisting of 0.7 M sucrose, 0.5 M Tris-HCl, 30 mM HCl, 50 mM EDTA, 0.1 M KCl and 40 mM DTT. An equal volume of phenol was added and after 15 min of vigorous shaking, the sample was centrifuged at 4,000 g and re-extracted twice with the extraction buffer. Proteins were precipitated in 5 volumes of 0.1 mM ammonium acetate in chilled methanol at -20 °C for 2 h. Precipitates were washed in acetone and resuspended in 40 µL of GE healthcare lysis buffer. The protein content was estimated according to Bradford (11).

*Gel electrophoresis analyses*

Isoelectric focusing and molecular mass separation were conducted according to Gorg *et al.* (12), using 13 cm immobilized pH gradient (IPG) strips with a pH range of 3-11 and a Multiphor II electrophoresis system (GE HealthCare). Samples were precipitated using a 2D Clean-Up Kit (GE HealthCare) and approximately 600 µg of total protein were resuspended in 250µl solution of 2% CHAPS, 8M urea, 2M thiourea, 1% dithiothreitol (DTT), traces of bromophenol blue and 1% IPG Buffer. Protein concentration was calibrated by Bradford (11) and also by Qubit fluorescence standard kit (Biorad) according manufacturer manual, being strips loaded with identical protein quantities. Strips were hydrated in this solution for 16 h. Isoelectric focusing was carried out in gradient mode for 30 min at 500 V, 30 min at 1000 V, 90 min at 3500V and 6h at 3500 V, at 2 mA and 5 W. After the first dimension, strips were equilibrated in a solution of 1.5 M Tris-HCl pH 8.8, 6M urea, 1% DTT, 30 % glycerol, traces of bromophenol blue and 2% SDS for 15 min. A second dimension was performed in 18 x 16 x 0.1 cm SDS-PAGE 12% gels, as described by Laemmli (13) with bromophenol blue used as tracking dye. Electrophoresis was conducted on a Hoefer system (GE HealthCare) at 250 V, 50 mA and 10 W for 6 h. Gels were silver stained according Blum *et al.* (14). The broad range isoelectric point marker (GE HealthCare) was also used for posterior pI identification on gels as well molecular weight markers (GE HealthCare). Each protein sample was analyzed in triplicate. Gels were digitalized using the scanner HP Scanjet Model 8290 and further analyzed with the Bionumerics software v. 4.5 (Applied-Maths). First, calibration with a gray scale was necessary to transform gray levels into values for each pixel of the gel picture. The calibration method used a calibration curve from Bionumerics software. All gel pictures were analyzed as tiff files. The six gel images were placed in one folder and the wizard detection method proposed by the software was used for spot detection. Automatically detected spots were manually checked, and some of them manually added or removed according to the size (>0.2 cm was used as the cutoff limit for inclusion), shape (circular) and density (>2 pixel.cm<sup>-1</sup>). Following the detection procedure, the normalization step was carried out to attribute a common protein identity for identical spots from different gel images. For this procedure, a reference gel was constructed and automatically matching

options of Bionumerics software were used. For each sample, when a protein was detected in all gel images, this protein was automatically added to the reference gel.

#### *Protein digestion*

The most intense spots were excised from gels using a scalpel. A protein in-gel digestion with trypsin Gold (Promega) was conducted following the protocol described by Shevchenko *et al.* (15). Briefly, 300  $\mu$ l of 100% acetonitrile was added to the tubes and incubated for 5 min. Supernatant was removed and spots were dried in a SpeedVac for 5 min. Samples were incubated for 60 min at 56 °C in a solution containing 50  $\mu$ l of 10 mM DTT and 100 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ . The solution was replaced with 50  $\mu$ l of 55 mM iodoacetamide and 100 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  and incubated in the dark for 45 min. Spots were rinsed twice with MilliQ water (Millipore) for 10 min, and exposed to 100  $\mu$ l of 100% acetonitrile for 5 min. Excess acetonitrile was removed and again spots were dried in a SpeedVac for 5 min. Protein digestion was carried out using 650 ng trypsin diluted in 50  $\mu$ l of 50 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  and 6 mM  $\text{CaCl}_2$ , with overnight incubation at 37 °C. The supernatant was used for mass spectrometry analysis.

#### *Protein identification by mass spectrometry*

Monoisotopic masses of the molecular components from digested peptides ranging from  $m/z$  600 to 6000 were determined by mass spectrometry using a 4700 MALDI-TOF/TOF (Applied Biosystems, Framingham, MA) controlled by the manufacturer's softwares. A sample of 2  $\mu$ l was mixed with 6  $\mu$ l of 0.1 %  $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamic acid, 0.1% trifluoroacetic acid and acetonitrile (1:1). A volume of 0.5  $\mu$ l was applied to a MALDI's plate and air dried at room temperature. The spectrometer was operated in linear mode for MS acquiring and reflected mode for MS/MS acquisitions using modulated power with 200 random shots. Data was saved in standard Bruker's software format. Spots were identified using Peptide Mass Fingerprinting (PMF) and *de novo* sequencing. The mass list for each sample was analyzed using the program MASCOT v2.1.0, Matrix Science, London (<http://www.matrixscience.com>) assuming one missed cleavage, carboxymethylation and methionine oxidation as modifications. The lists of masses were compared against the non-

redundant NCBI database. Results were evaluated by comparing the molecular mass and isoelectric point of the hit of highest score to data here reported observed in 2D gels. *De novo* sequencing was conducted manually, subtracting the masses from y series and comparing to amino acid masses. Sequences were then compared to the Swiss-Prot Data base ([www.expasy.org](http://www.expasy.org)) using the MPSrch tool from the European Institute of Bioinformatics (EBI). Only protein hits with molecular mass and isoelectric point values similar to those found on gels, together with coverage, similarity and tryptic digestion pattern were considered as a match.

## RESULTS AND DISCUSSION

### *Comparative analyses of protein maps*

Water soluble proteins were extracted from zygotic embryos at two different developmental stages of *C. arabica* seeds. Stage 1 corresponding at 210 DAA (days after anthesis) and stage 2 at 255 DAA. Stage 1 is directly related to developmental stage of starting germinability. Moreover Stage 2 was distinct as a stage in which germinability is vigorous, especially in metabolic processes (38). After extraction, two-dimensional gels from coffee embryos were obtained (Figure 1A for stage 1 and B for stage 2), using a pH range varying from 3.0 to 11.0 and molecular mass varying from 14 to 181 kDa (Figure 1A for stage 1 and B for stage 2). Protein maps obtained from two independent samples were scanned and further compared to identify differences in protein expression using the Bionumerics software. Each protein sample was analyzed in triplicate and corresponding gels showed correlation values higher than 0.9 (data not shown).

Two-dimensional gels from the first stage of coffee seed development analyzed showed 185 spots, distributed throughout the gel. pI and molecular masses of identified proteins varied from 4.5 to 9.0 and from 10 to 140 kDa, respectively (Figure 1A). Most of the spots were situated between pIs 5.0 and 7.0, where the most abundant proteins are also located. A similar profile was observed for stage 2 of *C. arabica* seed development (Figure 1B), where a high quantity of spots were resolved, showing proteins with pH varying from 4.5 and 9.0, and molecular masses ranging from 10 to 115 kDa (Figure 1B). Nevertheless, only differential spots were choosing for protein identification. Among all spots, only 10

proteins were observed in one or another developmental stage at triplicate gels. Stage 1 showed four differential proteins expressed (spots 1-4, Figure 1A) and at stage 2D-E, six proteins were differentially expressed (spots 5-10, Figure 1B). These ten spots were further identified by MS analyses as described above.

#### *Mass spectrometry protein identification at earlier stage embryos*

Spots were sliced, trypsinized, submitted to mass spectrometry analyses (MALDI-ToF) and further analyzed. They were mainly situated between pH 4.5 to 8.0 and with molecular mass varying from 13 kDa to 85 kDa (Table 1). Mascot and BLAST analyses of these protein spots revealed clear similarities to proteins involved in plant development and germination (Table 1).

Spot 1, only observed at stage 1, showed similarity to U1 snRNP 70K protein from *A. thaliana* (Table 1) (16). This protein was earlier described as being involved in pre-mRNAs splicing, and there are some evidences that U1 snRNAs genes are differently expressed during plant development (17). U1 snRNAs were previously described in bean (18), pea (19), tomato (20), wheat (21) and potato (29). They have been shown to be encoded by multiple genes that occur in clusters (22). A U1 snRNA is the most abundant snRNA in eukaryotic cells and is essential for pre-mRNAs splicing (23), especially at earlier stages of development. Furthermore, two different spots of coffee were also identified by fingerprint analyses as protein kinases, showing similarities to proteins from *Petroselinum crispum* and *A. thaliana* (Table 1, spot 2 and 7) (34). Mitogen-activated protein kinases (MAPKS) are activated after phosphorylation of tyrosine and threonine residues, and their pathways can be stimulated by several reasons, including growth factors, cytokines, irradiation and changes in osmolarity (35). In fact is difficult to relate the kinase activity to single developmental stage, spot 2 appears at stage 1 (Figure 1A) and spot 7 at stage 2 (Figure 1B), since this enzyme class could be involved in a wide diversity of processes.

Spot 3, also recovered from stage 1 2D gels showed similarity to an oxygen evolving enhancer protein from *Bruguiera gymnorhiza* (Table 1). This protein has been related to plant metabolism, growth and development, as well as to signaling defense against the presence of pathogens (29), being this presence at earlier stages an indicative of intense occurrence of metabolic processes. Finally, the last spot identified at stage 1,

numbered as 4, corresponding to one more protein of *C. arabica* from stage 1 identified by 2D-electrophoresis, showed homology to an ATP synthase from *Trachycystis flagellaris* (Table 1) (24). ATP synthases catalyze the synthesis of ATP from ADP at bacterial, mitochondrial and chloroplast membranes (25). This is the main and last process for energy production in all live organisms, composed by an enzyme complex (26).

#### *Mass spectrometry protein identification at latter stage embryos*

As in the first stage, the second one also generates differential proteins. Initially, some protein spots showed clear similarity to proteins not directly related to plant growth and development. For example spot 5 (Figure 1B, Table 1) showed similarity to a hypothetical protein from *O. sativa*. Moreover, a ribulose-1,5-biphosphate carboxylase/oxygenase was identified on spot 6 from stage 2 *C. arabica* (Table 1). Ribulose-1,5-biphosphate is one of the components of Calvin-Benson-Bassham cycle, being the product of catalysis by a phosphoribulokinase (28). 1,5-Biphosphate carboxilase/oxigenases occupies a central position in the carbon global cycle and is a key enzyme for conversion of inorganic carbon dioxide into organic cellular components (28), and its unusual that this protein have also been identified at developmental stage 2.

A glutaredoxin family protein (spot 8) was also identified at second stage as being similar to *A. thaliana* molecules (Table 1, Figure 1B). Earlier studies described those genes encoding glutaredoxins are related to defects in sepal and petal development in flowers, as well in oxidative stress in plants (27), being commonly found when embryos starts cell differentiation. Furthermore, a fingerprint analysis of spot 9 revealed a protein with similarity to MYB transcription factor R2R3 type isolated from *Populus* sp. (30). This MYB factor seems to be involved with signaling mechanisms related to secondary wall and lignin formation, as well as to cellulose biosynthesis and xylem development (31). This protein class has been associated with the control of tannin product, being involved in some stage of the proanthocianidins (PAs) biosynthesis metabolic pathway (33).

Finally, spot 10 (Table 1, Figure 1B) showed similarity to CTP: phosphocholine cytidyltransferase. This enzyme is a rate-limiting enzyme in biosynthesis of phosphatidylcholine in plant cells (39). The role of complex lipids in plant physiology and cellular metabolism has remained under debate. The biosynthesis of phosphatidylcholine

(PC) in plants is of particular interest, since some freezing tolerance has been correlated with changes in phospholipid content of plant systems (40). Nevertheless, this is a new observation of a CTP: phosphocholine cytidyltransferase at different plant developmental stages. This fact could occur due a clear modification of lipid content during plant development.

In summary, it could be observed that *C. arabica* presents differential expression of diverse proteins related to development during both stages analyzed. All proteins identified seem to affect directly or indirectly coffee development by different manners, being strictly involved in plant growth or used as an intermediate in some metabolic pathway that, could influence in coffee germination. Furthermore, the identification of such proteins expressed during two stages of development in *C. arabica* can now be used as an important tool for future experiments. By using genetic engineering techniques, the specific role that each one of these proteins play in coffee embryo development can now be studied, improving coffee embryo development.

## ACKNOWLEDGMENTS

The authors are thankful for the financial support by EMBRAPA-Café, UCB, CAPES, CNPq and FAPEMIG.



## REFERENCES

- (1) H. Ashihara, A. M. Monteiro, F.M. Gillies, A. Crozier, Biosynthesis of caffeine in leaves of coffee, *Plant Physiol.* (1996) 747-753.
- (2) L. Mondolot, P. La Fisca, B. Buatois, E. Talansier, A. Kochko, C. Campa, Evolution in caffeoylquinic acid content and histolocalization during *Coffea canephora* leaf development, *Ann. Bot.* (2006) 33-40.
- (3) B. Bertrand, B. Guyot, F. Anthony, P. Lashermes, Impact of the *Coffea canephora* gene introgression on beverage quality of *C. Arabica*, *Theor. Appl. Genet.* (2003) 387-394.
- (4) G. Bytof, S-E. Knopp, D. Kramer, B. R. Breitenstein, J.H.W. Bergervoet, S. Groot, D. Selmar, Transient occurrence of seed germination processes during coffee post-harvest. *Ann. Bot.* (2007) 61-66.
- (5) E. A. Amaral da Silva, P. E. Toorop, J. Nijse, J. D. Bewley, H.W.M. Hilhorst, Exogenous gibberellins inhibit coffee (*Coffea arabica* cv Rubi) seed germination and cause cell death in the embryo, *J. Exp. Bot.* (2005) 1029-1038.
- (6) J. Bustamante-Porras, C. Campa, V. Poncet, M. Noirot, T. Leroy, S. Hamon, A. Kochko, Molecular characterization of an ethylene receptor gene (CcETR1) in coffee trees, its relationship with fruit development and caffeine content. *Mol. Gen. Genomics* (2007) 701-712.
- (7) S. Chen, A. C. Harmon, Advances in plant proteomics, *Proteomics* (2006) 5504-5516.
- (8) S. Viswanathan, S. Unlu, Mustafa, J. S. Minden, Two-dimensional difference gel electrophoresis. *Nature Prod.* (2006) 1350-1358.
- (9) P. Montavon, A.F. Mauron, E. Duruz, Changes in green coffee protein profiles during roasting. *J. Agric. Food. Chem.* (2003) 2335-2343.
- (10) R. De Mot, J. Vanderleyden, Application of two dimensional protein analysis for strain fingerprinting and mutant analysis of *Azospirillum* species, *Can. J. Microbiol.* (1989) 960-967.

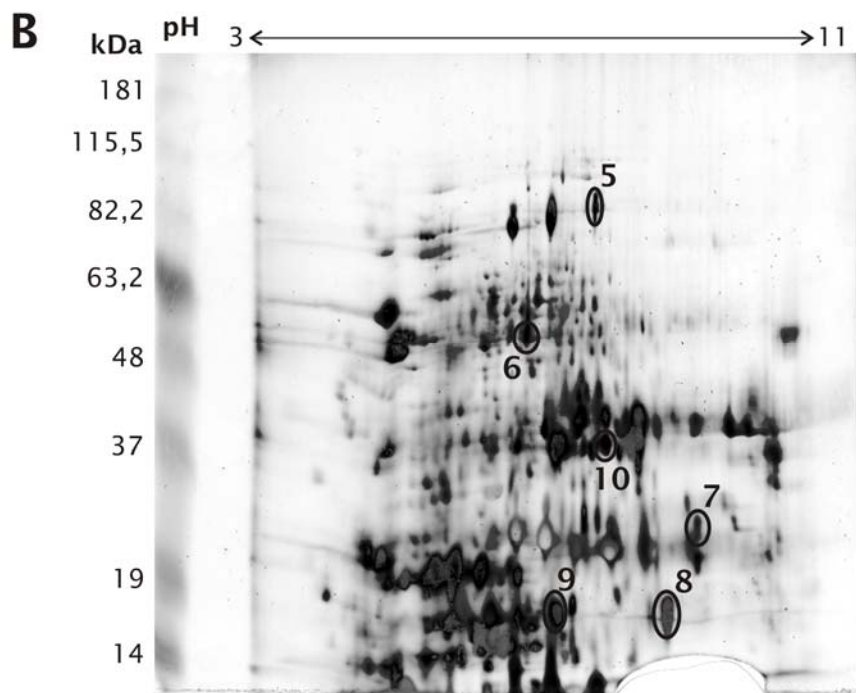
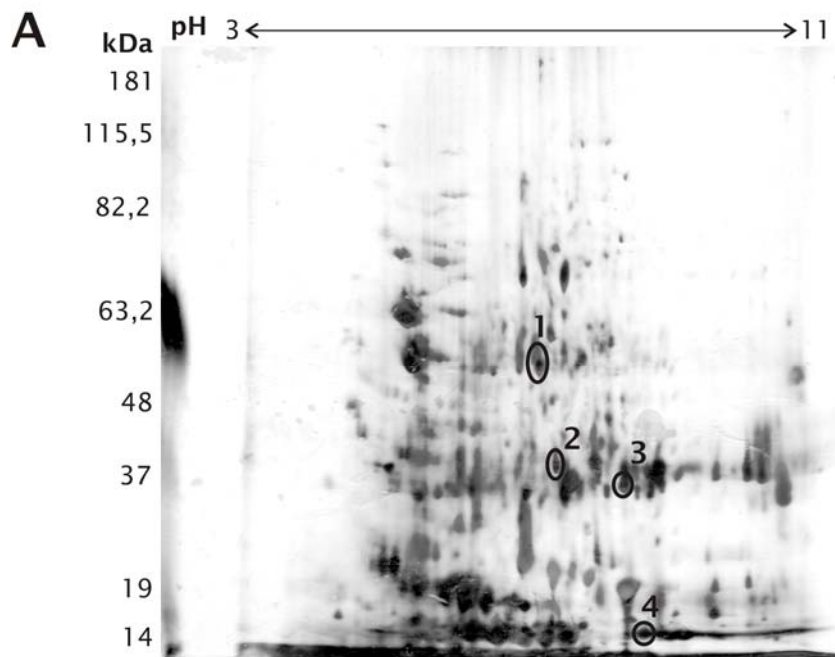
- (11) M.M. Bradford, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.* (1976) 248-254.
- (12) A. Gorg, W. Postel, S. Gubther, The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients, *Electrophoresis* (1988) 531-546.
- (13) U.K. Laemmli, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4, *Nature*. 1970, 680-685.
- (14) H. Blum, H. Beier, H.J. Gross, Improved silver staining of plant protein: RNA and DNA in polyacrilamide gels, *Electrophoresis* (1987) 93-98.
- (15) A. Shevchenko, M. Wilm, O. Vorm, M. Mann, Mass spectrometric sequencing of proteins from silver stained polyacrylamide gels, *Anal. Chem.* (1996) 850-858.
- (16) M. Golovkin, A. S. N. Reddy, Structure and expression of a plant U1 snRNP 70L gene: alternative splicing of U1 snRNP 70K Pre-mRNAs produces two different transcripts, *Plant Cell* (1996) 1421-1435.
- (17) B. A. Hanley, M. A. Schuler, cDNA cloning of U1, U2, U4 and U5snRNA families expressed in pea nuclei, *Nucleic Acids Res.* (1991) 1861-1869.
- (18) V. L. Van Santen, R. A. Spritz, Splicing of plant pre-mRNAs in animal systems and vice versa, *Gene* (1987), 253-265.
- (19) B. A. Hanley, M. A. Schuler, Developmental expression of plant snRNAs. *Nucleic Acids Res.* (1991) 6319-6325.
- (20) S. Abel, T. Kiss, F. Solymosy, Molecular analysis of eight U1 RNA genes candidates from tomato that could potentially be transcribed into U1 RNA sequence variants differing from each other in similar regions of secondary structure, *Nucleic Acids Res.* (1989) 6329-6337.
- (21) M. A. Musci, D. B. Egeland, M. A. Schuler, Molecular comparison of monocot and dicot U1 and U2 snRNAs, *Plant J.* (1992) 589-599.
- (22) M. A. Musci, D. B. Egeland, M. A. Schuler, Molecular comparison of monocot and dicot U1 and U2 snRNAs, *Plant J.* (1992) 589-599.

- (23) C. Guthrie, Messenger RNA splicing in yeast: Clues to why the spliceosome is a ribonucleoprotein, *Science* (1991) 157-163.
- (24) T. O'Brien, The dubious origins of pleurocarpous mosses: evidence from the chloroplast genes *atpB*, *rbcL*, *rps4* and *trnL*. *Biol. Sci.* (2001) NCBI direct submission <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=protein&id=32563501>.
- (25) C. Lemaire, F-A. Wollmang, The chloroplast ATP synthase in *Chlamydomonas reinhardtii*. *J. Biol. Chem.* (1988) 10235-10242.
- (26) L. M. Amzel, P. L. Pedersen, Proton ATPases: structure and mechanism, *Annu. Rev. Biochem.* (1983) 801-824.
- (27) S. Xing, M. G. Rosso, S. Zachgo, ROY1, a member of the plant glutaredoxin family, is required for petal development in *Arabidopsis thaliana*. *Development* (2005) 1555-1565.
- (28) T.E. Hanson, F.R. Tabita, A ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (RubisCO)-like protein from *Chlorobium tepidum* that is involved with sulfur metabolism and the response to oxidative stress. *Proc. Nat. Acad. Sci.* (2001) 4397-4402.
- (29) E. J. Yanga, Y. A. Oh, E. S. Lee, A. R. Park, S. K. Cho, Y. J. Yoo, O. K. Park, Oxygen-evolving enhancer protein 2 is phosphorylated by glycine-rich protein 3/wall-associated kinase 1 in *Arabidopsis*, *Biophys. Res. Comm.* (2003) 862-868.
- (30) B. Karpiniska, M. Karlsoon, M. Srivastava, A. Stenberg, J. Schrader, F. Sterky, R. Bhalerao, G. Wingsle, MYB transcription factors are differentially expressed and regulated during secondary vascular tissue development in hybrid aspen. *Plant. Mol. Biol.* (2004) 255-270.
- (31) T. Arioli, L. Peng., A. S. Betzner et al. Molecular analysis of cellulose biosynthesis in *Arabidopsis*, *Science* (1998) 717-720.
- (32) Z. H. Ye, Vascular tissue differentiation and pattern formation in plants, *Ann. Rev. Plant Biol.* (2002) 183-202.

- (33) J. Bogs, F.W. Jaffe, A.M. Takos, A.A.R. Walker, S.P. Robinson, The grapevine transcription factor VvMyBPA1 regulates proanthocyanidin synthesis during fruit development. *Plant Physiol.* (2007) 1347-1361.
- (34) T. Kroj, J.J. Rudd, T. Nurnberger, Y. Gaebler, J. Lee, D. Scheel, Mitogen-activated protein kinases play an essential role in oxidative burst-independent expression of pathogenesis-related genes in parsley, *J. Biol. Chem.* (2003) 2256-2264.
- (35) C. Widmann, S. Gibson, M. B. Jarpe, Mitogen-activated protein kinase: conservation of a three-kinase module from yeast to human. *Physiol. Rev.* (1999) 143-180.
- (36) M.T. Gil-Agusti, N. Campostrini, L. Zolla, C. Ciambella, C. Invernizzi, P.G. Righetti. Two-dimensional mapping as a tool for classification of green coffee bean species, *Proteomics* (2005) 710-7088.
- (37) L.L. Koshino, C.P. Gomes, L.P. Silva, M.T. Eira, C. Bloch Jr, O.L. Franco, A. Mehta. Comparative proteomical analysis of zygotic embryo and endosperm from *Coffea arabica* seeds, *J. Agric. Food Chem.* (2008) 10922–10926.
- (38) De Castro, R.D.; Marraccini, P. Cytology, biochemistry and molecular changes during coffee fruit development, *Brazilian J. Plant Physiol.* (2006) 175-199.
- (39) Nishida, I.; Swinhoe, R.; Slabas, A.R.; Murata, N. Cloning of *Brassica napus* CTP: phosphocholine cytidyltransferase cDNAs by complementation in a yeast cct mutant. *Plant Mol Biol.* (1996) 205-211.
- (40) Inatsugi, R.; Nakamura, M.; Nishida, I. Phosphatidylcholine biosynthesis at low temperature: differential expression of CTP:phosphorylcholine cytidyltransferase isogenes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.* (2002) 1342-1350.

### Figure Legend

**Figure 1.** Two-dimensional gels of *C. arabica* embryos at the developmental stage 1 (210-220 days after anthesis - A) and 2 (250-260 days after anthesis - B). Numbers represent the differential spots further identified by mass spectrometry technology. Numbers on the left side of the gel correspond to the molecular masses. Numbers on the top correspond to pI range.



**Table 1.** Proteins identified from *C. arabica* embryos in different developmental stages. Peptide mass fingerprint (PMF) was conducted using the software Mascot. Mpsrch score, sequence, pI and molecular mass were used for protein identification. Proteins that showed no sequence, identified by PMF, were only identified by Mascot scores.

Spot	Protein class (Species)	Accession number	Score	Gel Molecular Mass	Theoretical Molecular Mass (Da)	Gel pI	Theoretical pI	Partial sequence
1	U1 snRNP 70K protein ( <i>Arabidopsis thaliana</i> )	S71267	38	45-50	50415	5.5-6.5	6.6	LYTQEGVRSFSSK FPGQTESTLSAEIELR TVPNWRPRR
2	Mitogen-activated protein kinase 2 ( <i>Petroselinum crispum</i> )	gi 42601214	41	30-40	39458	5.0-6.0	5.6	GLWYLHHEK KRPSANELLR
3	Oxygen evolving enhancer protein 1 precursor ( <i>Petroselinum crispum</i> )	Q9LRC4_9ROSI	33	30-40	35340	6.0-7.0	6.5	NTSSSTGKITLGVTK
4	ATP synthase beta subunit ( <i>Bruguiera gymnorhiza</i> )	Q7YL94_9BRYO	41	<20	12988	7.0-8.0	7.9	TQIIGPVLDAVFSR
5	Hypothetical protein ( <i>Oryza sativa</i> )	gi 115484731	27	75-85	83526	6.5-7.5	7.6	PMF
6	Ribulose-1,5-biphosphate carboxylase/oxygenase ( <i>Ceratopteris talictroides</i> )	T03448	41	45-55	41659	5.5-6.5	5.2	IPPAYSKTFLGPPHGQVER
7	Putative protein kinase ( <i>Arabidopsis thaliana</i> )	gi 110739818	42	20-30	36869	4.5-5.5	6.3	CWQTDKLRPSFAEIMASLK RLDIPDFVDPALADLISK MKHSTYLSK
8	Glutaredoxin family protein ( <i>Arabidopsis thaliana</i> )	gi 15218686	52	<20	14989	5.0-6.5	5.7	TDNAVKNHWHVIMAR
9	MYB transcription factor R2R3 type ( <i>Populus tremula</i> )	gi 31980093	30	<20	21908	7.5-8.5	9.5	PMF
10	CTP: phosphocholine cytidyltransferase ( <i>Brassica napus</i> )	gi 1418125	28	35-45	38463	4.5-5.5	5.0	PMF

# Anexo III

**Artigo para submissão**



## Short communication

### Analysis of trace elements of trypsinized proteins directly from 2D-PAGE spots from human plasma: a novel strategy for metalloproteomics

Clarissa Gomes<sup>1</sup>, Mirna S. Freire<sup>1</sup>, Igor C. Pescara<sup>2</sup>, Octávio Luiz Franco<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>*Centro de Análises Proteômicas e Bioquímicas, Programa de Pós-Graduação em Ciências Genômicas e Biotecnologia, Universidade Católica de Brasília, Brazil*

<sup>2</sup>*Hospital da Universidade Católica de Brasília, Brazil*

#### \*Corresponding author:

Octávio Luiz Franco

SGAN Quadra 916, Módulo C, Av. W5 Norte

70.790-160

Brasília – DF, Brazil

PHONE: + 55-61-9235-4942

FAX: + 55-61-3347-4797

E-MAIL: ocf Franco@gmail.com

#### Abstract

The distribution and concentration of trace elements may provide valuable information about the state of health and disease of individuals, once many metals have important roles in biological systems or are considered toxic or dangerous in certain amounts. Inductively coupled plasma mass spectrometry is a sensitive analytical method to detect the total concentrations of elements in biological samples, but it is unable to identify molecules that can bind to the metals and, for this reason, the combination of biochemical techniques such as matrix assisted laser desorption ionization is critical. Therefore, in order to identify elements complexed to specific proteins, a novel combination of two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis followed by inductively coupled plasma mass spectrometry was used. Besides, these proteins were identified by matrix assisted laser desorption ionization mass spectrometry. Protein spots from gels were excised and submitted directly to metallic elements detection, a method not reported before. This report focused on the use of human plasma of persons with laryngeal squamous cell carcinoma. Most elements were below detection level by this technique, where Cr and Pb were the only ones observed in all samples. Although more experiments are necessary to conclude the relationship between Cr and laryngeal cancer, it is possible to indicate that the methodology here utilized is successful and has the advantage of determining to which proteins the elements are bound.

**Key words:** metalloproteomics, ICP-MS, 2D-PAGE, human plasma

Many trace elements, found in fluids and tissues of the body in very small concentrations [1], are known to have important roles in biological systems, where the majority is associated to proteins, known as metalloproteins. The distribution and concentration of trace elements may provide valuable information about the state of health and disease of individuals, once many metals are considered toxic or dangerous in certain amounts, such as mercury, cadmium and lead. Among the sensitive analytical methods available to detect the total concentrations of elements in biological samples is the inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) [2]. Although it can detect almost all elements from major to trace concentrations, it cannot identify the molecules bound to the metals and, for this reason, the combination of biochemical techniques such as matrix assisted laser desorption ionization (MALDI) is critical [3]. The number of studies showing that trace elements have an important role in various biological processes, such as activate or inhibit enzymes and compete with other elements for the metalloprotein's active site, for example, is constantly increasing [4]. Therefore, it is important to know the concentration and distribution of trace elements present in human fluids, such as blood plasma [2], and it is possible to infer that these elements have direct or indirect effect on tumor development process [5]. Despite this evaluation can be easily applied to numerous and important problems, this report focuses on the use of human plasma of persons with laryngeal squamous cell carcinoma (LSCC). LSCC is a significant disease worldwide and accounts for 90% of all malignancies of the larynx. Given the few signs and symptoms of early-stage disease, these tumors are usually discovered in advanced-stages, when more severe treatments are needed, often leaving patients with debilitating functions [6]. The survival rates for advanced-stage disease are less than 50% [7]. Much of its increasing incidence is related to tobacco and alcohol consumption, which have a synergistic effect [8, 9]. Furthermore, tobacco and tobacco smoke contain several metallic elements associated to cancer development [10]. In order to identify elements bound to specific proteins related to laryngeal cancer, a novel combination of two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis (2D-PAGE) followed by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) was used. Protein spots from gels were excised and submitted directly to metallic elements detection, a method not reported before.

Plasma samples were obtained from four patients with LSCC on the same tumor staging (T2 – localized tumor with metastasis in one lymph node but no distant metastasis) according to the Classification of Malignant Tumors – TNM [11]. These patients correspond to male and female smokers between 59 and 73 years old. The six control plasma samples came from healthy people from the same age interval, from both sexes and with the same smoking habits of the LSCC patients. All individuals reported habits of consuming alcohol regularly. The protocol of this experiment was approved by the Associação de Combate ao Câncer em Goiás (*Goiás Association of Cancer Action*) ethics committee and all patients signed informed consent forms. First, 2D-PAGE profiling was processed with 500 µg of protein from plasma samples submitted to the *2-D Clean-Up Kit* (Amersham Biosciences, Piscataway, USA) according to the manufacturer's protocol. Samples were then hydrated for 11 h with a solution containing 2M thiourea, 7M urea, 1% dithiothreitol (DTT), 2% CHAPS, 1% IPG-buffer, and traces of bromophenol blue. Samples were then applied to 18 cm pH 3-10 linear IPG strips (GE Healthcare Life Sciences, Sweden). Isoelectric focusing at the *Ettan IPGphor 3* (GE Healthcare Life Sciences) was carried out at 1.000 V during the first two and a half hours, then increased linearly from 1.000 V up to 10.000 V for

three hours. Finally, it remained at 10.000 V for one hour. Twelve point five percent polyacrylamide gels containing 1.5M Tris-HCl pH 8.8, 10% sodium dodecyl sulfate (SDS), 10% ammonium persulfate (APS), 10% tetramethyl-ethylenediamine (TEMED) and Milli-Q water were used. Electrophoresis was performed at 5 W per gel overnight at 15°C using *Ettan DALTsix Vertical System* (GE Healthcare Life Sciences). Gel image analysis was performed with the BioNumerics software v. 4.5 (Applied Maths). Comparisons were made between gel images of cancer and control samples. Spots that appeared on every gel (used as controls) and spots exclusive of cancer samples were selected for further analysis. Protein spots were excised from Coomassie blue-stained gels using a scalpel and further destained and digested with sequencing-grade Trypsin Gold (Promega, Madison, USA) according to Shevchenko *et al.* [12]. Two aliquots were separated from each sample, where one aliquot was submitted to Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization time of flight mass spectrometry (MALDI TOF-TOF MS) to be identified, and the other to ICP-MS for the detection of calcium (Ca), cadmium (Cd), chromium (Cr), copper (Cu), iron (Fe), magnesium (Mg), manganese (Mn), molybdenum (Mo), selenium (Se), lead (Pb), cobalt (Co) and zinc (Zn). Concentration of the trace elements was determined by ICP-MS (810-MS, Varian Mulgrave, Australia), where trypsinized samples were diluted with 65% nitric acid and digested at microwave SPEX (MX 350) for 30 min. Each sample was subjected directly to ICP-MS and reference carbon solution was used to calibrate the equipment. Reference solutions for each metal were also used.

In every 2D gel, protein spots with molecular mass of 10 to 60 kDa and pH ranging from 4 to 10 were observed. Most elements, Ca, Cd, Co, Cu, Fe, Mg, Mn, Mo, Se and Zn, were below detection level by this technique, where Cr and Pb were the only ones observed in all samples. The average concentration of Cr and Pb between patients for each spot was determined separately (Tab. 1). Various techniques have been in use to determine trace elements as well as different types of materials that are analyzed, such as whole blood, plasma, scalp hair and tissue. However, this is the first report using protein spots isolated by 2D-PAGE directly to ICP-MS. Study using ICP-MS to estimate the amount of metals in renal carcinoma shows significant differences between these and healthy kidney tissues for Al, Ca, Cd, Cr, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Pb, Zn and Na, suggesting that some may influence the disease pathogenesis [13]. Cr has a long history of industrial use, such as welding and plating [14] and is accepted as a mutagenic agent [15], being the respiratory tract the primary target organ once inhalation is the main route of entry into the body [16]. Its exposure causes gene mutations, cell cycle arrest, apoptosis and neoplastic transformation [13]. Epidemiological and experimental evidences show that occupational exposure to Cr is associated with lung cancer [14, 16]. Some studies using animal models suggest a relationship between rapid tumor growth and high levels of Cr, detected by neutron activation analysis [17], x-ray fluorescence analysis [18] and flame atomic absorption spectroscopy [19, 20]. Other works show high levels of Cr in breast cancer patients blood compared to healthy donors [21], and a higher mortality rate [18]. Significant higher levels of Cr in scalp hair of patients with malignant tumors add to the evidences that it increases cancer risk [20]. Once there are evidences of the role trace elements play in biological processes, it is possible to infer that the chromium found in the samples analyzed in this work has direct or indirect effect on the carcinogenic process, including the development of LSCC.

Capillary electrophoresis (CE) coupled with an element or molecule-specific mass spectrometry-based detector has made possible the speciation of elements in complex biological samples [22]. However, CE disadvantages include poor migration time repeatability and limited sensitivity in comparison with separation techniques such as HPLC [23]. Electrospray ionization mass spectrometry (ESI-MS) with ICP-MS is the most commonly used approach to obtain parallel information about the metal/metalloid associated with the organic moiety as well as the complete structure of the organic entity. On the other hand, the detection capability of ESI-MS is compromised by complex matrices, a limitation that must be kept in mind, especially if the metalloprotein occurs in low concentrations [24]. Thus, chromatography and electrophoresis, which have been of primary importance in proteomics research [23], coupled with ICP-MS have been widely used to access trace level metal speciation [22]. Some advantages of the latter technique are multiisotopic (including non-metals such as S, P, or Se) detection capability, high sensitivity, tolerance to matrix, and large linearity range regardless of the chemical environment of an analyte [22, 25]. Since the best established method to separate proteins is 2D-PAGE [26, 27], and the most widely used approach to identify metals bound to a protein is through ICP-MS [25], the combination of these was chosen for this work. Furthermore, to identify the selected proteins, which is a crucial information, MALDI-TOF was used. To solve problems posed by ESI-MS and CE, the steps of metal and protein identification were done separately.

The identification of biomolecules such as metalloproteins, nucleic acids and metabolites that bound to metallic elements may be relevant for the determination of their biological function and metabolism. Therefore, direct methods of biomolecule identification (such as MALDI-TOF) coupled with ICP-MS allow the detection of organic molecules and trace elements simultaneously [2]. The application of metalloproteomics in studies of cancer and various other diseases might be valuable. There are many works reporting the comparative analysis of metals in blood, plasma, scalp hair and tissue from cancer patients and healthy individuals [13]. To our knowledge, the work presented here is the first to detect trace elements from proteins isolated directly from 2D gels. Although more experiments are necessary to conclude the relationship between Cr and LSCC, it is possible to say the methodology used here is successful and has the advantage of determining to which proteins the elements are bound.

## References

- [1] Kopple, J. D., Massry, S. G., *Kopple and Massry's nutritional management of renal disease*, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia 2004.
- [2] Haraguchi, H., *J. Anal. At. Spectrom* 2004, 19, 5-14.
- [3] Jakubowski, N., Lobinski, R., Moens, L., *J. Anal. At. Spectrom* 2004, 19, 1-4.
- [4] Huang, Y.-L., Sheu, J.-Y., Lin, T.-H., *Clinical Biochemistry* 1999, 32, 131-136.
- [5] Siddiqui, M. K. J., Jyoti, Singh, S., Mehrotra, P. K., *et al.*, *Environment International* 2006, 32, 630-637.
- [6] Gourin, C. G., Xia, Z. S., Han, Y., French, A. M., *et al.*, *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2006, 132, 390-397.

- [7] Sewell, D. A., Yuan, C. X., Robertson, E., *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec* 2007, *69*, 77-84.
- [8] Ronchetti, D., Neglia, C. B., Cesana, B. M., Carboni, N., *et al.*, *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2004, *130*, 303-306.
- [9] Altieri, A., Bosetti, C., Talamini, R., Gallus, S., *et al.*, *Br J Cancer* 2002, *87*, 1227-1229.
- [10] De Palma, G., Goldoni, M., Catalani, S., Carbone, P., *et al.*, *Acta Biomed* 2008, *79 Suppl 1*, 43-51.
- [11] Sobin/Wittekind, *TNM: classification of malignant tumours*, Wiley-Liss, New York 2002.
- [12] Shevchenko, A., *Anal Biochem* 2001, *296*, 279-283.
- [13] Calvo, F. B., Santos Junior, D., Rodrigues, C. J., Krug, F. J., *et al.*, *Biol Trace Elem Res* 2009.
- [14] Salnikow, K., Zhitkovich, A., *Chemical Research in Toxicology* 2008, *21*, 28-44.
- [15] Zhang, Y., Qi, Z., Zheng, D., Li, C., Liu, Y., *Biol Trace Elem Res* 2008, 1-13.
- [16] Caglieri, A., Goldoni, M., De Palma, G., Mozzoni, P., *et al.*, *Acta Biomed* 2008, *79 Suppl 1*, 104-115.
- [17] Czauderna, M., Rochalska, M., *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry* 1989, *134*, 383-392.
- [18] Schrauzer, G. N., *Biol Trace Elem Res* 2006, *109*, 281-292.
- [19] Pasha, Q., Malik, S. A., Shah, M. H., *J Hazard Mater* 2008, *153*, 1215-1221.
- [20] Pasha, Q., Malik, S., Iqbal, J., Shah, M., *Biological Trace Element Research* 2007, *118*, 207-216.
- [21] Singh, V., Garg, A., *Biological Trace Element Research* 1998, *64*, 237-245.
- [22] Lobinski, R., Moulin, C., Ortega, R., *Biochimie* 2006, *88*, 1591-1604.
- [23] Prange, A., Profrock, D., *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 2005, *383*, 372-389.
- [24] Bettmer, J., *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 2005, *383*, 370-371.
- [25] Shi, W., Chance, M., *Cellular and Molecular Life Sciences (CMLS)* 2008, *65*, 3040-3048.
- [26] Hirsch, J., Hansen, K. C., Burlingame, A. L., Matthay, M. A., *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2004, *287*, 1-23.
- [27] Conrad, D., Goyette, J., Thomas, P., *Journal of General Internal Medicine* 2008, *23*, 78-84.

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)