



Universidade de Brasília
Programa de Pós-Graduação em Patologia Molecular

**Análise da expressão diferencial de proteases salivares em
pacientes com Síndrome de Sjögren**

LAÍS GARRETO ALVES DE ALMEIDA CHAGAS

Brasília – DF



LAÍS GARRETO ALVES DE ALMEIDA CHAGAS

**Análise da expressão diferencial de proteases salivares em
pacientes com Síndrome de Sjögren**

Orientadora: Prof.^a Dra. Izabela Marques Dourado Bastos

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Patologia Molecular da Universidade de Brasília, como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Patologia Molecular.

Brasília - DF



**Ficha catalográfica elaborada automaticamente,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)**

CL189a Chagas, Laís Garreto Alves de Almeida
Análise da expressão diferencial de proteases salivares em pacientes com Síndrome de Sjögren / Laís Garreto Alves de Almeida Chagas; orientador Izabela Marques Dourado Bastos.
- Brasília, 2019.
113 p.

Dissertação (Mestrado - Mestrado em Patologia Molecular)
- Universidade de Brasília, 2019.

1. Síndrome de Sjögren. 2. Saliva. 3. Proteases salivares. 4. Atividade proteolítica. 5. Análise proteômica. I. Bastos, Izabela Marques Dourado, orient. II. Título.



Trabalho desenvolvido no Laboratório de Interação Patógeno-Hospedeiro (LIPH) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, com apoio financeiro da CAPES, CNPq, FAPDF e FUB.



**Dedico este trabalho aos meus
amores e maiores incentivadores: meu
filho Jonathan e meu marido Danilo.**



AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha orientadora, Profa. Dra. **Izabela Marques Dourado Bastos**, por acreditar no meu potencial, por proporcionar oportunidades para que eu planeje e alcance os meus sonhos e por incentivar minha permanência no mestrado, quando descobri a minha gravidez logo na primeira semana de pós-graduação. Agradeço, com muito carinho, por contribuir pela formação do meu pensamento científico desde os programas de iniciação científica.

Agradeço ao Prof. Dr. **Sébastien Olivier Charneau**, por colaborar com o delineamento metodológico na etapa de espectrometria de massas e por ser sempre tão solícito e disposto a discutir ideias, solucionar dúvidas e propor novos caminhos.

Agradeço ao Prof. Dr. **Otávio Nóbrega**, por prontamente cooperar com as análises estatísticas e por disponibilizar material para ensaios imunoenzimáticos no Laboratório de Immunogerontologia, na Universidade Católica de Brasília.

Agradeço à Dra. **Audrey Cecília**, por ensinar e auxiliar nos ensaios imunoenzimáticos, em meio a tantas dificuldades.

Agradeço ao Prof. Dr. **Jaime Martins de Santana**, por incentivar a produção científica em nosso laboratório e em nossa universidade, com esmero e dedicação.

Agradeço à Profa. Dra. **Ana Carolina Acevedo**, por ter iniciado a orientação deste trabalho durante minha graduação em odontologia, por me incentivar a dar continuidade a este trabalho por meio do mestrado e por me ensinar com primor o valor dos detalhes na escrita e na apresentação de trabalhos científicos.

Agradeço à Profa. Dra. **Lilian Marly de Paula** e à Profa. Dra. **Flávia Marques Borba Modesto**, por gentilmente cederem as amostras salivares utilizadas neste trabalho, que foram coletadas no âmbito do doutorado da Dra. Flávia.

Agradeço ao Dr. **Samuel Mandacaru**, por gentilmente realizar a digestão do gel para análise em espectrometria de massas, quando eu estava com 8 meses de gestação.

Agradeço à Dra. **Milene Andrade**, por me ajudar com testes estatísticos, com a produção de gráficos, com a organização e sequência de ideias para apresentação oral e por me receber em sua casa para trabalharmos em tudo isto. Meu muito obrigada!



Agradeço a todos os colegas do Laboratório de Interação Patógeno-Hospedeiro, especialmente **Yanna Reis, Amanda Rocha, Allan Mascarenhas, Kaio Bentes, Arthur Soares, Natália Alves e Guilherme Moss**, por me socorrerem em dúvidas sobre imunologia, bioquímica, bioinformática, *photoshop*, genética e até mesmo cálculos para preparos de soluções de estoque. Mas, principalmente, pela amizade, pelas gargalhadas, por me apoiarem na minha realidade materno-acadêmica e por tornar o tempo de mestrado mais leve e agradável.

Agradeço ao CNPq, CAPES, COFECUB, FAPDF e FINATEC pelo financiamento que possibilitou a realização deste trabalho.

Agradeço ao meu marido, **Danilo Chagas**, por me ensinar a ser resiliente, pelo constante apoio, pelas palavras de encorajamento e por tudo isso ser cheio de amor, compreensão e carinho. Agradeço por preparar incontáveis cafés e cuidar do nosso filho, enquanto eu escrevia esta dissertação. Sem esse suporte não seria possível realizar tudo isso.

Agradeço ao meu filho, **Jonathan Garreto Chagas**, por ser o meu maior presente e o meu maior desafio vivenciado no mestrado. Agradeço por me ensinar a equilibrar a maternidade, que é minha maior prioridade, preciosidade e realização, com minhas obrigações e anseios profissionais e acadêmicos. O seu doce olhar me recarrega profundamente e me dá forças para vencer!

Agradeço à minha prima, **Késia Rozzett Oliveira**, por revisar cuidadosamente o artigo para avaliação da dissertação em inglês, pela Prof. Dra. Hèlene Chardin, da Université Paris-Descartes.

Agradeço à minha sogra, **Maria Nicéas Chagas**, por cuidar tão bem do netinho Jonathan quando eu precisava vir à universidade. Meu muito obrigada!

Agradeço à minha mãe, **Míria Garreto**, por batalhar pela minha educação, mesmo sem recursos financeiros suficientes, por ter me ensinado a dar o meu melhor em tudo o que faço. Agradeço pelo modelo de mãe e de perseverança em todas as áreas da vida.

Agradeço a **Deus**, pela oportunidade de cursar uma pós-graduação de altíssimo nível, por me capacitar a desenvolver o trabalho científico a mim designado, por me proporcionar a força que vem Dele para prosseguir diariamente e por me consolar nos momentos de angústia. Agradeço por ter me dado a melhor família e amigos.



**“All our dreams can come true, if we have
the courage to pursue them.”**

Walt Disney

RESUMO

A Síndrome de Sjögren (SS) é uma doença autoimune caracterizada por destruição de glândulas exócrinas, principalmente as glândulas salivares e lacrimais. A saliva tem sido relatada como potencial meio de diagnóstico em diversas doenças, por meio da identificação de marcadores e padrões biológicos salivares. O presente estudo tem como objetivo avaliar a expressão diferencial de proteases salivares de indivíduos controle e SS. As amostras de saliva total estimulada de 40 indivíduos foram analisadas em substratos fluorogênicos sintéticos e na presença de inibidores de proteases. Zimografias foram realizadas em SDS-PAGE 8% copolimerizado com gelatina 0,1% (w/v) e na presença de inibidores de proteases. Amostras de um SDS-PAGE 8% contendo saliva de 9 indivíduos, separadamente (3 controle, 3 SS-primária, 3 SS-secundária), foram processadas e analisadas pelo EASY-nano LC em espectrometria de massas LTQ-Orbitrap Velos. Ainda, ensaios imunoenzimáticos foram realizados para corroborar os demais resultados. Os ensaios enzimáticos resultaram na proteólise mais intensa ($p < 0,05$) de Gly-Pro-AMC em SS e de sua inibição por Sitagliptina, inibidor altamente seletivo de DPP-IV. O ELISA para DPP-IV/CD26 humana corroborou a caracterização proteolítica, exibindo maior intensidade de DPP-IV em SS. Nas zimografias, as bandas de 50 kDa e >220 kDa diferiram em intensidade ($p < 0,05$) entre os grupos avaliados. As bandas de atividade proteolítica foram consideravelmente inibidas por EDTA, inibidor seletivo de MMP. O ELISA para MMP-9 confirmou a presença da protease e exibiu maior expressão ($p < 0,05$) em saliva SS. As serinoproteases elastase neutrofílica, catepsina G e proteinase 3 foram reportadas apenas em saliva de SS, por meio da análise proteômica. Os resultados obtidos em ambos os ensaios sugerem que a atividade proteolítica salivar difere entre os grupos avaliados. Mais estudos são necessários, a fim de melhor compreender o papel das proteases na patogênese da SS.

Palavras-chaves: Síndrome de Sjögren, Saliva, Proteases Salivares, Atividade Proteolítica, Análise Proteômica.



ABSTRACT

Sjögren's Syndrome (SS) is an autoimmune disease characterized by the destruction of exocrine glands, mainly salivary and lacrimal glands. Saliva has been reported as a potential tool for diagnosing several diseases, coming as a result of the identification of salivary biomarkers. The objective of this study was to evaluate the differential expression of salivary proteases from control and SS individuals. We tested whole stimulated saliva samples from 40 individuals on synthetic fluorogenic substrates and protease inhibitors, and performed zymogram assays by submitting samples to SDS-PAGE 8%, copolymerized with gelatin 0.1% (w/v) in the presence of inhibitors. Moreover, we analyzed gel samples from 3 control, 3 primary-SS, and 3 secondary-SS patients by EASY-nano LC coupled to LTQ-Orbitrap Velos mass spectrometry. The enzymatic assays resulted in Gly-Pro-AMC proteolysis and its inhibition by Sitagliptin, a highly selective inhibitor of dipeptidyl peptidase IV (DPP-IV). This enzymatic activity was increased ($p < 0.05$) in SS samples. ELISA for Human DPP-IV/CD26 corroborated protease characterization results. In zymography, proteolytic activity bands were mostly inhibited by EDTA, a selective inhibitor of metalloprotease (MMP) family. 50 kDa and >220 kDa bands differed in intensity ($p < 0.05$) between groups. ELISA for Human MMP-9 corroborated protease characterization and indicated a higher expression ($p < 0.05$) in pSS samples. Cathepsin G, Neutrophil elastase and Proteinase 3 were serine proteases reported only in SS samples by mass spectrometry analysis. Results obtained in these assays suggest salivary protease expression differs between evaluated groups. We recommend further studies to better understand the role of proteases in the pathogenesis of SS.

Keywords: Sjögren Syndrome, Saliva, Salivary Proteases, Enzymatic Activity, Proteomic Analysis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Imagem clínica e histológica detalhada por Mikulicz. Reimpressão do livro Kozuschek W. Johann von Mikulicz-Radecki 1850-1905. Mitbegründer der modernen Chirurgie. Wrocław: Wydawnictwo Uniwersytetu Wrocławskiego, 2003, p. 108. Adaptado de (GRZYBOWSKI; SAK, 2011).

Figura 2. Esquema representativo dos principais fatores etiológicos envolvidos na patogênese da Síndrome de Sjögren. Adaptado de (FOX, 2005).

Figura 3. Esquema representativo de como os centros germinais são formados na patogênese da Síndrome de Sjögren. Adaptado de (NOCTURNE; MARIETTE, 2018).

Figura 4. Histologia da glândula salivar. Adaptado de (PEDERSEN et al. 2018)

Figura 5. Desenho experimental global.

Figura 6. Concentração proteica salivar. Os testes T de Student e Levene revelaram diferenças significativas ($p < 0,05$) nos valores médios entre os grupos formados por indivíduos controle e por aqueles acometidos por SS. Nota-se que a saliva de indivíduos SS apresentou menor concentração de proteínas totais.

Figura 7. Atividade proteolítica contra substratos fluorogênicos. Dentre os doze substratos testados em saliva de um indivíduo controle, Gly-Pro-AMC, Phe-Arg-AMC, N-Gly-Gly-Arg-AMC e Pro-AMC apresentaram maior hidrólise frente às proteases presentes em amostra salivar e seus valores são exibidos no gráfico.

Figura 8. Caracterização da atividade proteolítica salivar contra Gly-Pro-AMC. (A) O Teste Mann-Whitney revelou expressiva atividade proteolítica ($p < 0,05$) na saliva total do grupo de indivíduos SS. (B) O inibidor seletivo de serino proteases, AEBSF, apresentou considerável inibição. Além disso, percebe-se que a sitagliptina, inibidor altamente seletivo de DPP-IV, inibiu maciçamente a atividade da protease em substrato.

Figura 9. ELISA para DPP-IV/CD26 humana. (A) Curvas de calibração com coeficiente de ajustamento (R^2) igual ou superior a 0,98 e limiar para detecção de 20 ng/mL, sendo OD "Densidade Óptica". (B) O ELISA para DPP-IV/CD26 humana revelou elevada ($p < 0,05$) expressão de DPP-IV em saliva de indivíduos SS, por teste T de Student. (C) Quando comparadas as dosagens entre controle e SSp, estes apresentaram-se significantes ($p < 0,05$), de acordo com o teste One-way ANOVA e teste de múltiplas comparações de Dunnett's.

Figura 10. Gel de atividade gelatinolítica com amostra salivar de indivíduo controle. Observa-se intensa proteólise referente aos pesos moleculares que se aproximam de 80 kDa a 90 kDa. Além disso, o volume de trabalho de 10 μ L foi definido para os testes nas demais amostras salivares.

Figura 11. Espelhamento de gel para análise da intensidade de atividade proteolítica em concentração de 500 ng de proteínas totais. (A) SDS-PAGE 10% corado em prata exhibe uniformidade de perfis eletroforéticos, mediante quantificação de proteínas totais realizadas por Qubit. (B) Zimografia de gelatina SDS-PAGE 8% e copolimerizado com gelatina 0,1% (w/v) apresenta mesma razão de atividade enzimática que as zimografias anteriores.

Figura 12. Zimografias de gelatina referente a toda amostra de conveniência. Nota-se que a atividade proteolítica é diversificada quanto ao peso molecular e quanto à intensidade de suas bandas de atividade.

Figura 13. Mapeamento da frequência de bandas de atividade em zimografia. Não houve significância ($p > 0,05$) quanto à frequência em que elas estão distribuídas.

Figura 14. Bandas de atividade proteolítica em zimografia significativamente diferentes entre os grupos. (A) Houve significativa ($p < 0,05$) diferença entre os grupos avaliados, no que se refere às bandas de >220 kDa e 50 kDa, de acordo com o teste de Mann-Whitney. (B) Conforme pode-se observar nas, a banda >220 kDa é mais intensa nas salivas do grupo SS, sendo SSs a mais acentuada. Concomitantemente, a banda 50 kDa é pouco intensa nas salivas do grupo SS, sendo próxima a zero em SSs.

Figura 15. Inibição de proteases em zimografia, com inibidores específicos. Nota-se que, aparentemente, AEBSF e E-64 não realizaram inibição de proteases, visto que o padrão de atividade proteolítica permanece semelhante ao do controle positivo (+C). No entanto, EDTA exibiu inibição majoritária de bandas de atividade, com exceção à banda de aproximadamente 40 kDa. É importante destacar que a banda de aproximadamente 90 kDa foi completamente inibida. Mw: marcador para proteínas; -C: controle negativo, fervido.

Figura 16. ELISA para MMP-9 humana. (A) Curvas de calibração, sendo OD “Densidade Óptica”. (B) O ELISA para dosagem de MMP-9 humana mostrou-se em tendência à significância, de acordo com o teste de Mann Whitney. (C) Submetidos ao teste ROUT, com $Q=1\%$, os outliers foram removidos. Em seguida, de acordo com o teste de Mann Whitney, o ELISA revelou elevada expressão ($p < 0,05$) de MMP-9 em saliva de indivíduos SS (D) Em subgrupos, as dosagens mostram-se significantes ($p < 0,05$) comparando-se controle e SSp, de acordo com o teste One-way ANOVA e teste de múltiplas comparações de Dunnett’s (Teste de Kruskal-Wallis).

Figura 17. Expressão de DPP-IV e MMP-9 humana em subgrupos. Quanto às dosagens de DPP-IV e MMP-9 humana, de acordo com o teste de correlação de Spearman, não há diferença significativa entre os grupos ($p > 0,05$). é possível observar aumento da expressão de DPP-IV e MMP-9 conjuntamente em indivíduos SSp, sendo 40% deles com ambas as proteases aumentadas. Observa-se, ainda, que a DPP-IV teve expressão aumentada tanto em SSp (60%) quanto em SSs (50%), e que a MMP-9 teve expressão aumentada em SSp (50%).

Figura 18. Uso de medicamentos. Observou-se que o uso de anti-inflamatórios esteroides e não esteroides e imunossupressores, incluindo a hidroxicloroquina, são as principais medicações utilizadas por indivíduos SS.

Figura 19. Relação de dosagens de proteases com o uso de medicamentos, nos grupos. Anti-inflamatórios compreendem os não esteroidais e os esteroidais. Imunossupressores compreendem hidroxicloroquina, inicialmente disposta em grupo distinto. O teste Row Stats com SEM não mostrou relação de dosagem de proteases com o uso de medicamentos.

Figura 20. Relação de dosagens de proteases com o uso de medicamentos, nos grupos. 60% dos indivíduos com maior expressão de DPP-IV fazem uso de imunossupressores. Em rosa os indivíduos que fazem uso de anti-inflamatórios e em verde os que fazem uso de imunossupressores. AI: anti-inflamatórios, IS: imunossupressores.

Figura 21. SDS-PAGE 8% submetido à digestão para análise em espectrometria de massas. Mw: marcador de proteínas. 500 ng de proteínas totais salivares foram submetidas em cada poço do gel. Foram 9 amostras diferentes, sendo 3 controle, 3 SSp e 3 SSs.

Figura 22. Interações proteína-proteína, pelo STRING. Distribuição de interações proteína-proteína, em três grandes clusters. As proteínas estão indicadas por desgranulação de neutrófilos, na cor azul, e por participação em resposta do sistema imune inato, na cor vermelha.

Figura 23. Cluster de interações de serino proteases, pelo STRING. Indica-se desgranulação de neutrófilos, pela cor azul, e participação em resposta do sistema imune inato, pela cor vermelha. As serino proteases elastase neutrofílica (ELANE), catepsina G (CTSG) e proteinase 3 (PRTN3) apresentam associações proteína-proteína. É importante destacar outras proteínas verificadas apenas nas amostras salivares de indivíduos SS, como: proteína induzida de prolactina (PIP), zinco-alfa2-glicoproteína (AGZP1), mieloperoxidase (MPO), calgranulina A (S100A8), calgranulina B (S100A9) e lipocalina associada a gelatinase neutrofílica (LCN2).

Figura 24. Agrupamento de termos GO, pelo G:Profiler. Distribuição por espaço semântico, p-valor de representação e tamanho no banco de proteínas. GO: MF (26) indica função molecular, GO: BP (139) indica processos biológicos, GO: CC (74) indica componentes celulares. KEGG, REAC e WP indicam presença em vias biológicas. TF e MIRNA indicam motivos regulatórios. HPA e CORUM indicam bancos de dados de proteínas. HP indica o fenótipo ontológico humano. Os achados mais importantes foram numerados, de acordo com tabela subsequente.

Figura 25. Expressão de genes relacionados a doenças associadas à transdução do sinal, pelo Reactome. A maior expressão de genes envolvidos em doenças associadas à transdução do sinal apresentam-se em tons de azul escuro. Observa-se, principalmente, acometimento em pâncreas, fígado, estômago e glândulas salivares.

Figura 26. Classe de serino proteases, até a DPP-IV. Adaptado de (BASTOS et al. 2013).

Figura 27. Classe de metaloproteases, até a MMP-9. Adaptado de (MACIEJCZYK et al. 2016).

Figura 28. Via do Lupus Eritematoso Sistêmico, disponível no KEGG com componentes salivares encontrados nas amostras deste trabalho. Compartilha não apenas os autoanticorpos anti-Ro/SSA e anti-La/SSB, mas também algumas das serino proteases aqui discutidas: a elastase neutrofílica e a catepsina G.



LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Inibidores de protease, tipo catalítico ao qual inibem e a concentração final em amostra.



LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AEBSF	4-(fluoreto de 2-aminoetilbenzenossulfonil)
AMC	7-amino-4-metil-cumarina
ANA	Autoanticorpos antinucleares
Anti-SSA	Anticorpo contra antígeno A para Síndrome de Sjögren
Anti-SSB	Anticorpo contra antígeno B para Síndrome de Sjögren
Anti-La	Anticorpo contra antígeno ribonucleoproteína La
Anti-Ro	Anticorpo contra antígeno ribonucleoproteína Ro
BAFF	Fator de ativação das células B
CD	Cluster de diferenciação
CEGS	Células epiteliais de glândulas salivares
DPP	Dipeptidil peptidase
DUB	Desubiquitinase
E-64	L-trans-epoxisuccinilleucilamido (4-guanidino)-butano
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ELISA	Ensaio de imunoadsorção enzimática
GIP	Peptídeo inibidor gástrico
GLP-1	Peptídeo semelhante a glucagon 1
Gly-Pro	Glicina-Prolina
HLA	Antígeno leucocitário humano
IL	Interleucina
INF	Interferon
kDa	Kilodalton
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade
MMP	Matriz metaloprotease
Célula NK	Célula exterminadora natural
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo Dodecil sulfato de sódio
SS	Síndrome de Sjögren



SSp	Síndrome de Sjögren primária
SSs	Síndrome de Sjögren secundária
TIMP	Inibidor tecidual para matriz metaloproteases
TLCK	N-tosil-L-lisina clorometil cetona
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral - α
TPCK	N-tosil-L-fenilalanina clorometil cetona



SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS.....	VI
RESUMO.....	IX
ABSTRACT	X
LISTA DE FIGURAS.....	XI
LISTA DE TABELAS.....	XV
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	XVI
INTRODUÇÃO	1
SÍNDROME DE SJÖGREN	1
ETIOLOGIA E EPIDEMIOLOGIA	3
PATOGENESE E TERAPÊUTICA	6
DIAGNÓSTICO SALIVAR E SALIVA	11
PROTEASES E AVALIAÇÃO PROTEOLÍTICA.....	14
JUSTIFICATIVA	18
OBJETIVOS.....	20
METODOLOGIA	22
DESENHO EXPERIMENTAL GLOBAL	22
AMOSTRA DE CONVENIÊNCIA	23
COLETA SALIVAR	23
QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS TOTAIS	23
ENSAIOS DE ATIVIDADE ENZIMÁTICA CONTRA PEPTÍDEOS FLUOROGÊNICOS	24
ENSAIOS DE ATIVIDADE ENZIMÁTICA EM SDS-PAGE CONTRA GELATINA.....	25
ENSAIOS IMUNOENZIMÁTICOS	26
ESPECTROMETRIA DE MASSAS.....	26
ANÁLISE DA RELAÇÃO DE PROTEASES COM O USO DE MEDICAMENTOS	29
ANÁLISE ESTATÍSTICA	29
RESULTADOS	32



DISCUSSÃO	56
CONCLUSÃO	71
PERSPECTIVAS	73
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	75
APÊNDICE A.....	90



INTRODUÇÃO

INTRODUÇÃO

Síndrome de Sjögren

A Síndrome de Sjögren é uma doença sistêmica, crônica e autoimune na qual glândulas exócrinas são comprometidas em sua estrutura, ocasionando progressiva disfunção. Caracterizada pelo ressecamento das mucosas oral e ocular, as secreções das glândulas salivares e lacrimais são particularmente afetadas quanto ao fluxo e à composição (FOX, 2005).

A relação de anormalidade volumétrica concomitante em glândulas salivares e lacrimais foi primeiramente caracterizada pelo cirurgião Jan Mikulicz-Hadecki, em 1892. No entanto, apesar do edema bilateral, a condição relatada não apresentava sinais de inflamação glandular, aparentemente sem perda de função (LEE et al. 2006). Já ao exame histológico em glândula salivar e lacrimal foi observada atrofia de células acinares e infiltrado de células redondas (MORGAN, 1954).

Em 1933, a imagem clínica e histológica detalhada por Mikulicz (Figura 1) foi analisada pelo oftalmologista Henrik Samuel Sjögren, o qual acrescentou a essas especificações os sinais e sintomas de ressecamento oral e ocular (GRZYBOWSKI; SAK, 2011). Além disso, com o intuito de distinguir a *secura ocular* proveniente da xeroftalmia, Sjögren introduziu o termo *keratoconjuntivite sicca* ao referido sintoma, não atribuído à falta de vitamina A. Até então, a doença descrita era conhecida como Síndrome de Mikulicz, contudo, subsequentemente, a síndrome foi renomeada em homenagem a Sjögren. Atualmente, sabe-se que a Síndrome de Mikulicz e a Síndrome de Sjögren (SS) são enfermidades distintas, clinicamente e imunohistoquimicamente (TSUBOTA et al. 2000).

Como principais sinais e sintomas na Síndrome de Sjögren têm-se a hipossalivação (redução do fluxo salivar), a xerostomia (ressecamento bucal) e a *keratoconjuntivite sicca* (ressecamento da conjuntiva e da córnea). Mediante a redução desses fluidos biológicos, há consequências na saúde geral do indivíduo e em sua

percepção de qualidade de vida. Ademais, sabe-se que o fluxo salivar é fundamental para a homeostase do ecossistema bucal (CARPENTER, 2013).

Sendo assim, a hipossalivação, condição característica de pacientes com SS, afeta a lubrificação das superfícies dentais, a capacidade tampão, a manutenção da supersaturação da hidroxiapatita, o *clearance* bucal, a formação da película adquirida e a defesa imunológica, podendo ocasionar o aumento do risco de desordens odontológicas, como lesões de cárie cervical, erosão dental e doença periodontal (AMERONGEN; VEERMAN, 2002). Além disso, a redução do fluxo salivar pode provocar manifestações locais como ardência bucal, candidíase oral, queilite angular, língua fissurada, redução de papilas gustativas e intensa dificuldade na deglutição e na fala (MATHEWS; KURIEN; SCOFIELD, 2008).

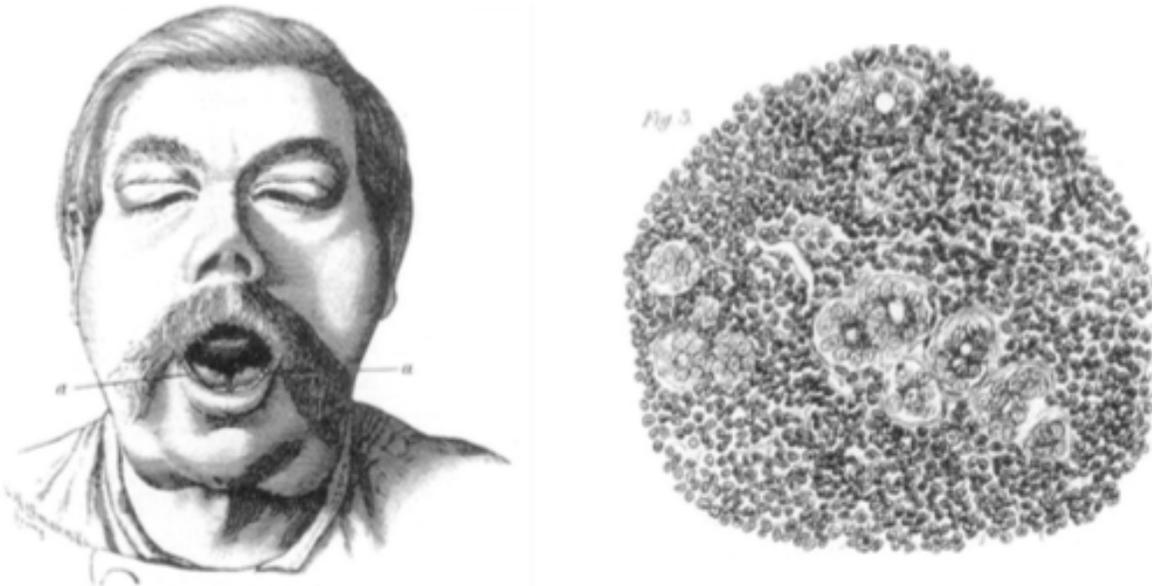


Figura 1. Imagem clínica e histológica detalhada por Mikulicz. Reimpressão do livro Kozuschek W. Johann von Mikulicz-Radecki 1850-1905. Mitbegründer der modernen Chirurgie. Wrocław: Wydawnictwo Uniwersytetu Wrocławskiego, 2003, p. 108. Adaptado de (GRZYBOWSKI; SAK, 2011).

Outras manifestações clínicas podem estar associadas à síndrome. Uma vez que as glândulas exócrinas são especificamente comprometidas, o distúrbio acomete diversos sistemas (ALEXANDER et al. 1986). Ressecamentos epiteliais, nasais, guturais e vaginais, bem como desordens renais, pulmonares, cardiovasculares, gastrointestinais,

tegumentares, hematológicas e neuroperiféricas são observadas (KASSAN; HARALAMPOS; MOUTSOPOULOS, 2014). Além destas, o desarranjo funcional ou autoimune na glândula tireoide e o linfoma com alto risco de mortalidade são condições que podem estar associadas à síndrome (BRITO-ZERÓN et al. 2016). Portanto, as consequências crônicas da doença resultam em redução da qualidade de vida, bem como aumento do risco de morbidade e mortalidade.

Etiologia e Epidemiologia

A SS é uma exocrinopatia autoimune de etiologia desconhecida, no entanto, diversos fatores ambientais parecem contribuir para estabelecimento dessa condição em um indivíduo geneticamente suscetível (Figura 2). Dessa forma, embora os fatores genéticos ainda estejam relativamente pouco explorados, é diversamente relatada a ocorrência de dois ou mais casos da síndrome em famílias. No entanto, a possível relação de hereditariedade carece de esclarecimentos (LICHTENFELD; KIRSCHNER; WIERNIK, 1976; REVEILLE et al. 1984).

Considera-se, principalmente, a possibilidade de que a predisposição genética se dê por meio do polimorfismo dos alelos do MHC de classe II, especialmente os haplótipos do antígeno leucocitário humano, *HLA-DR* e *HLA-DQ*. As amostras de DNA de indivíduos com SS primária (SSp) compartilham uma sequência de aminoácidos em comum para *HLA-DQB1*, nas etnias caucasiana, japonesa e chinesa (KANG et al. 1993). Além disso, os alelos específicos *HLA-DRB1* e *HLA-DQA* parecem conferir suscetibilidade genética à SS devido à apresentação de autoantígenos e, conseqüentemente, à produção dos autoanticorpos anti-SSA e anti-SSB (FEI et al. 1991).

Ainda, é levantada a hipótese de que alterações epigenéticas, ocasionadas pela metilação de DNA nas células epiteliais de glândula salivar em SSp, estejam associadas à expressão do gene *SSB*, à produção de autoanticorpos anti-SSB e à infiltração leucocitária glandular (KONSTA et al. 2016). Do mesmo modo, modificações em histonas e expressão de micro-RNA vêm sendo relatadas (KONSTA et al. 2014).

Ademais, fatores ambientais, principalmente relacionados a infecções virais, são estudados no que diz respeito à etiologia da doença (BOLSTAD; SKARSTEIN, 2016).

Consideradas um possível gatilho para patogênese da SS, estas infecções virais podem ocorrer, por exemplo, por meio dos seguintes vírus: herpes humano 6, Epstein-Barr, citomegalovírus, hepatite C, imunodeficiência humana e linfotrópico de células T humano tipo 1 (HTLV-1) (YOUINOU et al. 2005). Desses, as evidências epidemiológicas que associam o HTLV-1 como gatilho para SS, em estudo retrospectivo realizado em Nagasaki, mostram-se mais consistentes (TERADA et al. 1994), bem como estudo que associa alta prevalência de anticorpos anti-HTLV-1 em soro de pacientes SSsp, indicando o aumento do risco de se desenvolver a síndrome, em áreas endêmicas (HIDA et al. 1999). É fundamental elucidar que a prevalência de SS em Nagasaki, cidade atingida pela bomba atômica, foi expressivamente maior; todavia, não havia associação com a dose de radiação (HIDA et al. 2008).

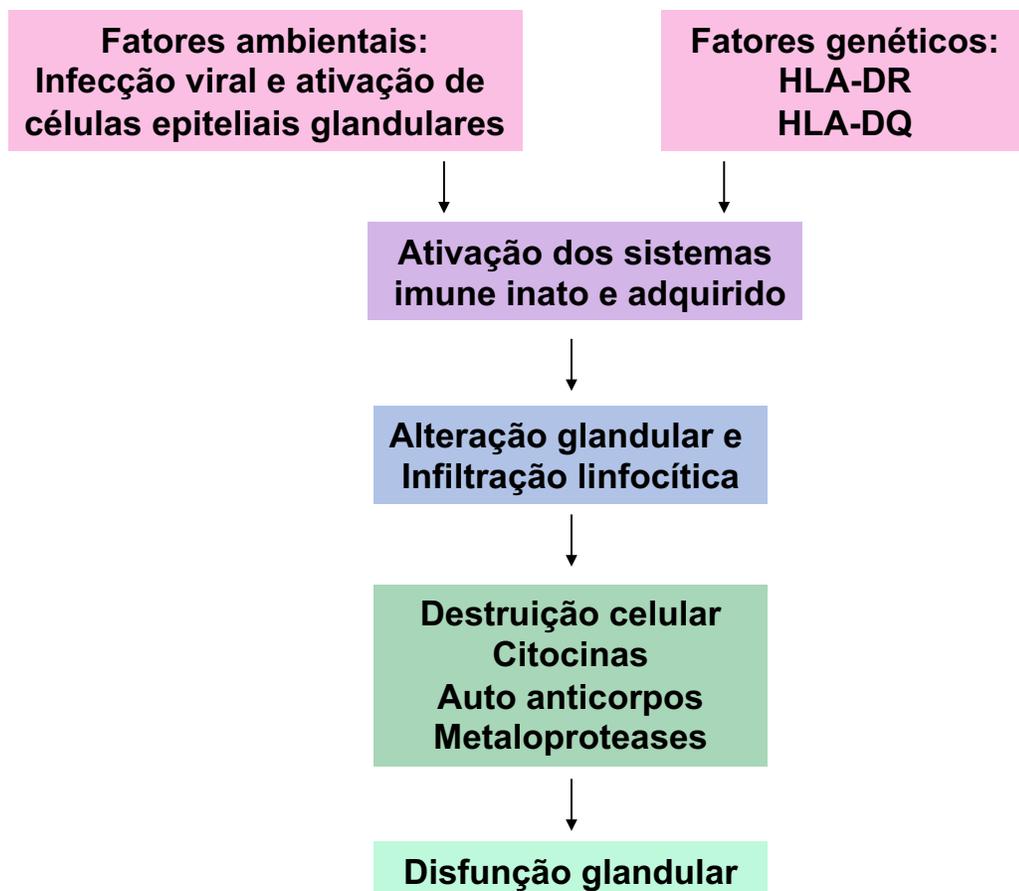


Figura 2. Esquema representativo dos principais fatores etiológicos envolvidos na patogênese da Síndrome de Sjögren. Adaptado de (FOX, 2005).

Além desses, a etiologia dessa síndrome sistêmica pode envolver, conjuntamente, fatores hormonais, com regulação neuroendócrina. Um estudo com camundongos transgênicos, com nocaute para aromatase ($Ar^{-/-}$), mediador de estrogênio, revelou que a presença do fitoestrógeno possa ser um elemento de proteção ao desenvolvimento da SS e sua ausência possa provocar surgimento de doença semelhante a SS, com infiltrado de linfócitos B (SHIM et al. 2004). Em estudo caso-controle com 2.680 mulheres, mediu-se a exposição cumulativa ao estrogênio, a fim de testar se haveria efeitos no desenvolvimento da SSp. Concluiu-se que as mulheres com SSp apresentavam menor exposição que o controle, e que a maior exposição foi associada negativamente ao desenvolvimento da doença (MACCOY, SAMPENE; BAER, 2019).

Escassos estudos epidemiológicos, com intuito de apresentar estimativas de prevalência e incidência da SS, variam de acordo com os diferentes critérios de classificação da doença (PATEL; SHAHANE, 2014). Em concordância, estudo retrospectivo realizado na Noruega revelou que a incidência variou entre os grupos de nascidos entre 1953 e 1957 de 0,22% a 0,44%, e de nascidos entre 1925 e 1927 de 1,40% e 3,39%, a depender do critério de classificação utilizado (HAUGEN et al. 2008). Além disso, a estimativa de incidência anual observada em estudo retrospectivo realizado nos Estados Unidos da América, entre 1976 e 1992 (PILLEMER et al. 2001), bem como em estudo prospectivo realizado na Eslovênia, entre 2000 e 2002 (PLESIVCNİK et al. 2004), revelaram que há 3,9 casos da doença a cada 100.000 indivíduos. Em suma, com ocorrência de aproximadamente 0,5% da população geral, a SS é, dentre as desordens autoimunes, uma das mais prevalentes. A prevalência pode variar entre 0,1% a 4,8% a depender de áreas geográficas ou étnicas (MAVRAGANI; MOUTSOPOULOS, 2010).

De acordo com Walsh, em 1995 nos Estados Unidos, as doenças autoimunes estavam entre as 10 principais causas de morte em mulheres com idade inferior a 65 anos. Além disso, a proporção de pacientes com doenças autoimunes que são mulheres é de 3:4 indivíduos (WALSH; RAU, 2000). Observadas as características epidemiológicas, as mulheres são predominantemente mais acometidas pela SS, representando 90% dos pacientes (KASSAN; MOUTSOPOULOS, 2004). Nota-se, ainda, que a SS representa uma das maiores prevalências em mulheres dentre as doenças autoimunes, inferior apenas quando comparado à tireoidite (COOPER; STROEHLA,

2003). Além disso, apresenta-se com pico de incidência na faixa etária entre a quarta e a sexta década de vida (FOX, 2007). Sendo assim, possivelmente, fatores hormonais estabeleçam relação etiológica em mulheres acometidas pela síndrome, em fase pré ou pós menopausa (MACCOY; SAMPENE; BAER, 2019).

Patogênese e Terapêutica

Os mecanismos que envolvem a patogênese da SS ainda não foram completamente elucidados, no entanto, estudos atuais indicam que há abrangência da ativação dos sistemas imune inato e adquirido. A teoria mais aceita é de que, em indivíduos geneticamente suscetíveis, as células epiteliais de glândulas salivares (CEGS) regulariam a resposta autoimune, apresentando autoanticorpos e expressando moléculas imuno competentes (Figura 3). Por conseguinte, as CEGS provocariam e seriam alvo desta resposta. Assim, as ribonucleoproteínas Ro/SSA e La/SSB, constituintes do núcleo celular, são apresentadas via MHC de classe II em CEGS e passam a ser reconhecidas como antígenos pelo sistema imune. Além disso, as próprias CEGS, quando estimuladas por vírus ou IFN- α de células dendríticas foliculares, também secretam BAFF, fator de ativação de linfócitos B (NOCTURNE; MARIETTE, 2018).

A expressão de moléculas imuno competentes, como proteínas coestimulatórias, moléculas de adesão, receptores, citocinas e quimiocinas, resulta no recrutamento de linfócitos. Dessa forma, no processo inflamatório são formados infiltrados linfocitários que se desenvolvem ao redor dos ductos glandulares, com perda de células acinares e preservação de células ductais (DANIELS, 1984). Por conseguinte, linfócitos T e B são as principais células que compõem o foco inflamatório periductal, conjuntamente a algumas poucas células mononucleadas, como macrófagos e células dendríticas foliculares. Então, essas células são organizadas de maneira segregada com tecido endotelial venoso, formando as estruturas linfoides ectópicas (KROESE; HAACKE; BOMBARDIEI, 2018). Nesse ambiente celular organizado, há constante interação entre linfócitos T e B, por meio da via CD40 e CD154, favorecendo linfócitos B maduros a produzirem autoanticorpos (WIECZOREK et al. 2019).

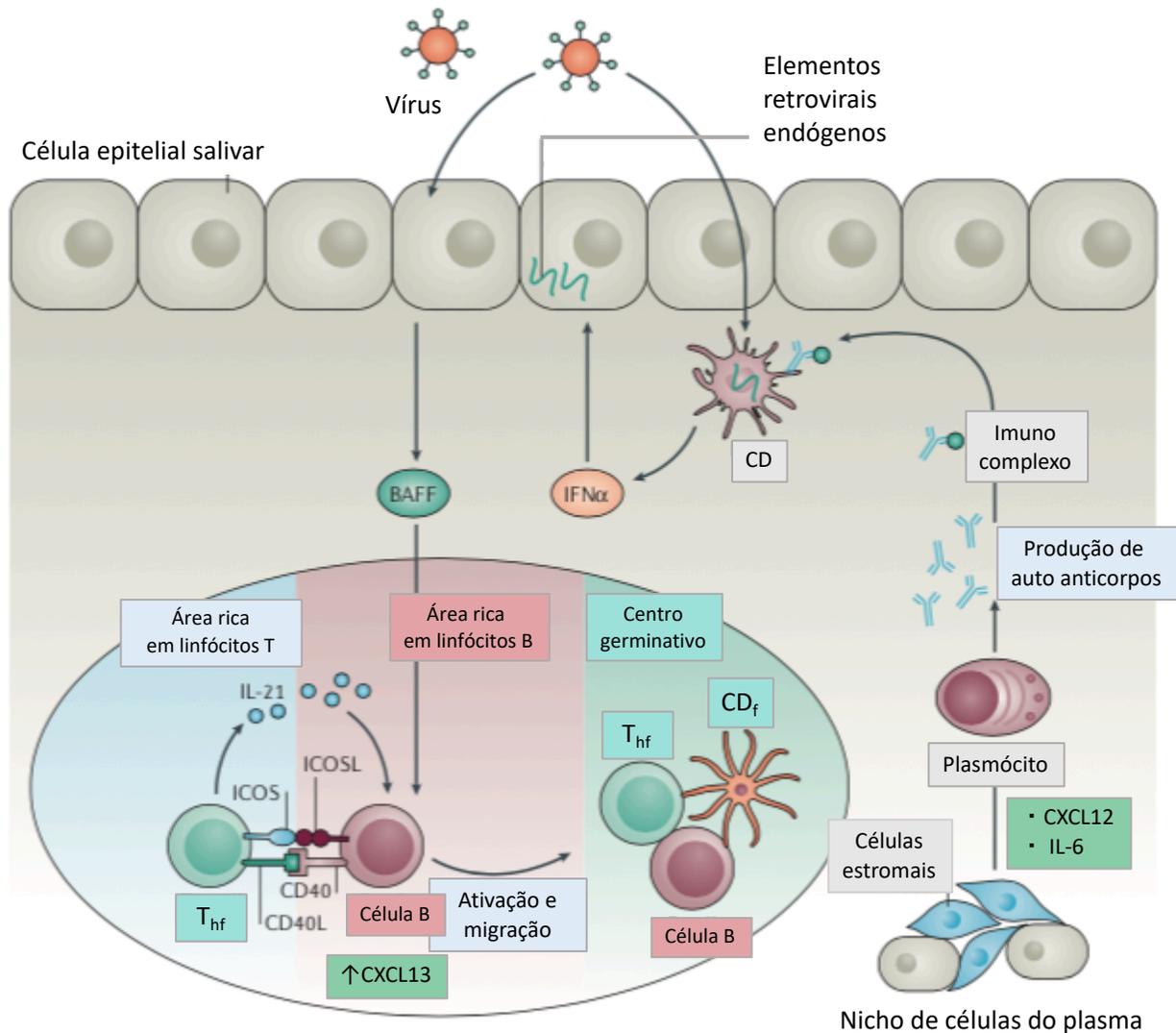


Figura 3. Esquema representativo de como os centros germinais são formados na patogênese da Síndrome de Sjögren. Adaptado de (NOCTURNE; MARIETTE, 2018).

Observam-se diferentes manifestações clínicas em SS a depender do autoanticorpo expresso pelo paciente. Quanto ao anti-SSA/Ro e anti-SSB/La, mostrou-se evidenciado em pacientes jovens, com disfunções exócrinas mais graves e maior da prevalência de manifestações extraglandulares. Quanto aos autoanticorpos antinucleares (ANA) e o fator reumatoide, há correlação com manifestações extraglandulares e com desenvolvimento de linfoma, com alto risco de mortalidade (BOURNIA; VLACHOYANNOPOULOU, 2012). Adicionalmente, dentre os indivíduos diagnosticados pela síndrome, há os que sejam negativos tanto para anti-Ro/SSA quanto

para anti-La/SSB. Estes parecem apresentar um menor risco de desenvolver linfoma e um nível reduzido de expansão de células B (QUARTUCCIO et al. 2015).

Ainda, nesse processo de regulação imune, observa-se que há uma contribuição de receptores Toll-like (TLR) na sinalização, regulação positiva de citocinas e quimiocinas mediando a inflamação na SS, além de apoptose e hipofunção do epitélio glandular (KIRIPOLSKY; KRAMER, 2018). Dentre eles, observa-se que há aumento significativo da expressão de TLR-2, TLR-4 e TLR-6 em tecido glandular de pacientes com SSp. Quando estimulados, especialmente o TLR-2, promovem a produção no plasma de IL-17 e IL-23, citocinas associadas à resposta Th17. Considerando esses resultados, há correlação da expressão de TLR-2 com o grau do infiltrado mononuclear tecidual e com o aumento da expressão de mediadores, como IL-6, STAT3 e NF- κ B (KATISIFIS et al. 2009; KWOK et al. 2012). Ainda, demonstrou-se que o TLR-4 reconhece mucinas do tipo MUC5B em células epiteliais e essa interação seria capaz de iniciar a resposta pró-inflamatória em SS (BARRERA et al. 2015).

Sendo assim, há uma expressão consideravelmente aumentada de citocinas na patogênese da SS, especialmente, a IL-6, evidenciada em biópsia de glândulas salivares menores, em saliva total e em sangue periférico, pela expressão de mRNA e por ensaio imunoenzimático (FOX et al. 2007; HUNG et al. 2019). Uma das principais funções da IL-6 nessa regulação imune é induzir a diferenciação de células B ativa em plasmócitos produtores de anticorpos. Outra citocina evidenciada no processo inflamatório é o TNF- α , relacionado à apoptose, à ativação de metaloprotease 9 em células acinares de glândulas salivares e à destruição da glândula salivar (AZUMA et al. 2002; HU et al. 2007).

Outro aspecto relevante é o papel de neutrófilos no contexto de doenças inflamatórias e de doenças autoimunes (WANG et al. 2018), particularmente em SS (WU et al. 2015). Estas células participam tanto da resposta imune inata, por meio do processo de fagocitose, da desgranulação, da produção de espécies reativas de oxigênio, da produção de citocinas e da formação de armadilhas extracelulares de neutrófilos (NETs), quanto pela resposta imune adaptativa, mediando a ativação de outras células imuno competentes, como células dendríticas, linfócitos e células NK (MAYADAS; CULLERE; LOWELL, 2014).

Ademais, quanto à hipossalivação e à redução do fluxo de fluidos lacrimais em SSp, ainda se sugere que esses sintomas estejam relacionados com a regulação negativa de aquaporina 1, proteína transmembrana responsável pelo transporte de água e que está presente em células mioepiteliais que circundam o ácino (BEROUKAS et al. 2002). Não apenas isso, mas a progressiva perda celular referente ao processo autoimune, assim como eventos apoptóticos no tecido epitelial glandular, provocam perda de função (KIRIPOLSKY; KRAMER, 2018).

Tendo em vista que a SS é uma doença sem cura estabelecida, o tratamento tem como propósito a melhoria na qualidade de vida do paciente, reduzindo o desconforto e as sequelas. Dentre as medidas instituídas, têm-se o uso de colírios e saliva artificial, a estimulação da produção de lágrima e saliva por meio de agonistas muscarínicos de uso oral, a estimulação salivar por uso de goma de mascar sem açúcar, a redução da inflamação local pela administração de corticoides, o aumento do consumo de água, o controle rigoroso do biofilme dental, o uso de terapias que promovam a remineralização dental, a assistência odontológica contínua, o consumo de alimentos com baixo potencial cariogênico e dieta que favoreça resposta anti-inflamatória (GONZÁLEZ et al. 2013).

Além dessas, a terapêutica potencial para a doença pode compreender o bloqueio da via de interação CD40-CD154, que se mostrou capaz de inibir estruturas leucocitárias ectópicas, redução expressiva da sialoadenite e de autoanticorpos anti-Ro no plasma. Estes resultados foram obtidos em camundongos do modelo de SSp, não obesos diabéticos (WIECZOREK et al. 2019). Ademais, inibidores de BAFF (FOX, 2007), terapias anti-CD20, por meio de fármaco rituximab (PIJPE et al. 2005; DEVAUCHELLE-PENSEC et al. 2010) e terapias anti-CD22, por meio de fármaco epratuzumab (STEINFELD; YOUINOU, 2006) são promissoras.

Contudo, até o presente momento, não há ensaios clínicos que comprovem a segurança, viabilidade e eficácia em humanos para tratamento da SS. Todavia, alguns desses fármacos já vêm sendo utilizados para tratamento da artrite reumatoide e outras doenças autoimunes (ZISAPEL; PARAN; ELKAYAM, 2019).

Classificação e Diagnóstico

O Consenso Americano-Europeu (VITALI et al. 2002) unificou critérios para classificação e diagnóstico da Síndrome de Sjögren (SS). Com intuito de evitar ou reduzir erros de diagnóstico, são utilizados como critérios de exclusão outras condições que também provocam redução do fluxo salivar. São elas: os tratamentos com radiação em cabeça e pescoço, a infecção por hepatite C, a imunodeficiência por HIV, o linfoma pré-existente, as sarcoidoses, a doença do enxerto contra hospedeiro e o uso de drogas anticolinérgicas.

Quanto à classificação, consideram-se SS primária (SSp) os pacientes que obedecem a critérios objetivos e que apresentem histopatologia e sorologia positivas. Em contrapartida, consideram-se SS secundária (SSs) os pacientes que são portadores de outras doenças reumatológicas, como artrite reumatoide, lúpus eritematoso sistêmico, esclerodermia e cirrose biliar primária (VITALI et al. 2002).

Os pacientes acometidos pela síndrome ainda não são classificados quanto às manifestações sistêmicas por meio do índice criado pelo Consenso Americano-Europeu, embora mais de um quarto destes pacientes sofram sinais e sintomas referentes ao comprometimento de glândulas exócrinas (TOUMA et al. 2019).

Quanto ao diagnóstico, observam-se critérios objetivos e subjetivos, tanto bucais quanto oculares. A sensação de secura bucal e ocular é constatada por meio de questionário ao paciente. Sinais de ressecamento ocular são investigados pelos Teste de Schirmer e Teste Rose Bengal, visto que averiguam volumetricamente o fluxo lacrimal. Sinais de ressecamento bucal são investigados pelo envolvimento das glândulas salivares, por meio de dados quantitativos do fluxo salivar, por sialografia da glândula parótida e por cintilografia salivar. Em biópsia de glândulas salivares menores, observa-se no histopatológico a sialadenite linfocitária focal, e no soro observa-se a presença de anticorpos anti-SSA/Ro ou anti-SSB/La (VITALI et al. 2002).

Diagnóstico Salivar e Saliva

Nos últimos anos, diversos estudos clínicos têm avaliado a saliva total com o intuito de determinar marcadores salivares. Para tal, um biomarcador ideal deve apresentar sensibilidade aos testes e especificidade à doença, sendo capaz de representar a severidade e os estágios de progressão da doença (BAUM et al. 2011). Sendo assim, certamente, a saliva possui um enorme potencial de aplicação clínica, pois o diagnóstico salivar seria capaz de detectar patologias em estágios iniciais, proporcionando a redução dramática da gravidade do impacto da doença na vida do paciente, bem como a prevenção de complicações subsequentes (LEE; WONG, 2009).

Desse modo, a saliva tem sido usada como um meio diagnóstico para detectar drogas, vírus e amostras estáveis de DNA (BONNE; WONG, 2012), bem como doenças bucais, sistêmicas, autoimunes e de imunodeficiência, como doença periodontal, câncer, SS e aids. Assim, o diagnóstico salivar é um método não invasivo, seguro, de fácil coleta e baixo custo. Além disso, a amostra de saliva não sofre coagulação, como ocorre com o sangue (HELMERHORST; DAWES; OPPENHEIM, 2017). Por ser um método não invasivo, reduz a ansiedade e o desconforto do paciente, além de permitir um monitoramento longitudinal mais efetivo e cômodo (SPIELMANN; WONG, 2010).

Portanto, não apenas como meio diagnóstico, a saliva pode ser empregada como forma de monitorar a doença, bem como ser utilizada para indicação de um prognóstico (LIU; DUAN, 2012). Um indicador molecular sensível e presente em todas as amostras e que componha a saliva apenas de indivíduos doentes seria um bom candidato para ser marcador da doença (SCHAFER et al. 2014; GUERRA et al. 2015). Esses marcadores podem, inclusive, marcar estágios iniciais, nos quais os sinais clínicos ainda não são graves. Dessa forma, o paciente teria acesso a alternativas de tratamento antes mesmo de sofrer os efeitos da doença (SPIELMANN; WONG, 2010).

Dessa forma, apesar de os autoanticorpos anti-SSA/Ro e anti-SSB/La serem possíveis de ser detectados na saliva (BEM-CHETRIT; FISCHER; RUBINOW, 1993), eles não são exclusivos para diagnóstico de SS, visto que também são parte da mediação autoimune do lúpus eritematoso sistêmico (KROEF et al. 2019). Além disso, nem todos os pacientes com a síndrome têm sorologia positivas, especialmente quando a coleta é

realizada em fase incipiente da doença (BECKMAN; LUCHS; MILNER, 2016). Sendo assim, a biópsia de glândulas salivares menores ainda é um procedimento fundamental para diagnosticar a SS.

Por conseguinte, é desejável o desenvolvimento de novos métodos de diagnóstico que sejam não invasivos, como o diagnóstico salivar. Sendo assim, faz-se necessária a busca por marcadores biológicos que sejam específicos, sensíveis e presentes em todos os indivíduos. Assim, o estudo da expressão diferencial de componentes salivares em SS pode ser promissor para este propósito (KATSIIOUGIANNIS; WONG, 2016).

Até o momento, estudos que avaliam expressão de proteínas salivares em SS (RYU et al. 2006; AQRAWI et al. 2017) carecem de dados quanto à atividade e regulação da expressão de proteases. Sabe-se, portanto, que para avaliar proteínas salivares em fluidos biológicos, dispõe-se de diversas estratégias e ferramentas metodológicas promissoras na busca de padrões biológicos que possam identificar patologias (LEE; WONG, 2009). Desse modo, conhecer a composição salivar em indivíduos saudáveis seria a primeira etapa para, então, poder observar o que destoa da condição de normalidade.

A saliva é um biofluido quimicamente complexo, composto por diversos componentes orgânicos e inorgânicos, os quais exercem funções importantes para a manutenção da saúde geral e bucal do indivíduo (MADRID et al. 2000). Formada por meio de rotas transcelulares e paracelulares, com pequena quantia de plasma (OPPENHEIM, 1970), a secreção exócrina produzida exclusivamente pelas porções secretoras das glândulas salivares maiores e menores é denominada saliva ductal (Figura 4).

Contudo, o complexo que compreende a saliva ductal, o fluido crevicular, células descamadas da mucosa e bactérias e seus metabólitos é denominado saliva total. Devido à sua composição orgânica, representada por proteínas, enzimas, proteases, aminoácidos, imunoglobulinas e hormônios, e inorgânica, por água e íons, a saliva pode refletir perfis metabólicos e informações imunológicas do indivíduo (CARPENTER, 2013).

Desse modo, a composição da saliva total é importante para caracterização salivar e para investigação de alterações do padrão. Como a secreção salivar é um processo regulado neurologicamente pelo sistema autônomo simpático e parassimpático, há

diferenças de volume e composição entre a saliva total estimulada (coletada por meio de estímulo mastigatório) e a saliva total não estimulada (PEDERSEN et al. 2018). Embora haja grande variabilidade de concentração de proteínas entre os métodos de coleta, a saliva total estimulada apresenta menor grau de alterações (JASIN et al. 2016). Com cerca de 60% do seu volume proveniente da glândula parótida, a saliva total estimulada é rica em amilase e proteínas ricas em prolina. Já a saliva não estimulada é proveniente 70% das glândulas submandibulares e sublinguais (BARONE; COLAFRANCESCO, 2016).

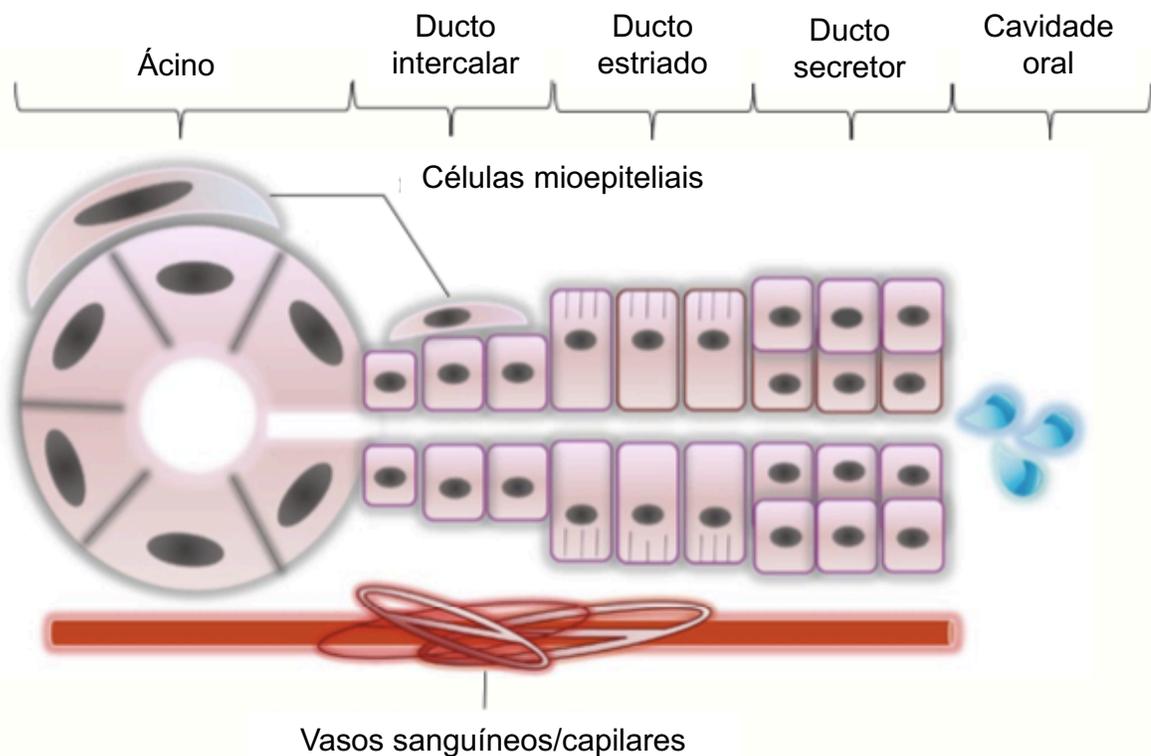


Figura 4. Histologia da glândula salivar. Adaptado de (PEDERSEN et al. 2018)

É importante destacar que tanto o segmento acinar quanto o ductal das glândulas salivares recebem um rico suprimento sanguíneo e que a composição da saliva total é de aproximadamente 27% das proteínas encontradas no plasma. Assim, embora a saliva exiba menor concentração de componentes quando comparada ao sangue, há técnicas altamente sensíveis para detecção desses componentes, como os ensaios imuno

enzimáticos (RAYMENT; OPPENHEIM; TROXLER, 2000) e a análise de proteomas salivares, por espectrometria de massas (FLEISSIG et al. 2009).

Dessa forma, para análise de moléculas de interesse, é essencial compreender o perfil padrão de composição biológica salivar em indivíduos normais. Segundo Ruhl, em estudo baseado em extensa literatura, a abundância relativa de proteínas e peptídeos em saliva humana é exemplificada em ordem decrescente da seguinte forma, até o valor de 1% da saliva total: amilases, proteínas ricas em prolina, cistatinas, mucina 5B, IgA secretória, mucina 7, estaterinas, anidrase carbônica VI, histatinas, lisozimas, albumina sérica, componente secretor livre, IgG e IgM (RUHL, 2012). Entretanto, o perfil proteômico de saliva total e glandular em indivíduos saudáveis mostrou-se variável a depender do método de coleta utilizado (JASIN et al. 2016).

Proteases e Avaliação Proteolítica

Por meio de estudo da expressão diferencial de componentes salivares, as proteases podem ser promissoras para cumprir este propósito de busca por biomarcadores salivares. Assim, é relevante o estudo da proteólise, visto que essas reações enzimáticas são parte de processos de manutenção fisiológica da célula, de resposta imunológica, de regulação da inflamação, do reparo tecidual, de coagulação sanguínea e de migração e crescimento celular (RAO et al. 1998).

As proteases expressas na saliva podem ser potenciais biomarcadores, visto que estão envolvidas em processos biológicos que podem caracterizar condições de normalidade ou patogênese (KATISIOUGIANNIS et al. 2016). Apesar de apresentarem-se em diminuta concentração (RUHL, 2012), são parte de processos de elevada especificidade, como ativação de citocinas, processo de fagocitose, sinalização intracelular e processamento de antígenos (BUTLER; OVERALL, 2009). Por conseguinte, uma forma de identificar prováveis marcadores biológicos moleculares é pela avaliação da atividade proteolítica salivar.

Assim, as proteases ou enzimas proteolíticas hidrolisam ligações peptídicas. Podem ser subgrupadas em exopeptidases, as quais são capazes de clivar aminoácidos nas posições terminais de uma proteína, ou em endopeptidases, as quais hidrolisam

ligações peptídicas internas de uma proteína. Também chamadas de peptidases, a maioria das proteases são altamente específicas e podem processar uma quantidade restrita de substratos, com sequência definida de aminoácidos (RAWLINGS; BARRETT, 1994). Dessa forma, as proteases são classificadas conforme sua predileção de catálise e de acordo com o resíduo de aminoácido presente em seu sítio catalítico. Portanto, têm-se: serino, cisteíno, metalo, aspártico e treonino proteases (TURK; TURK; TURK, 2012).

Sendo assim, as proteases podem ser identificadas tendo em vista sua especificidade por clivar determinados substratos, bem como observando quais inibidores são capazes de cessar sua atividade, parcial ou completamente. Logo, para que essas enzimas sejam adequadamente caracterizadas por sua funcionalidade, é necessário que sejam testados não somente substratos, mas inibidores enzimáticos (BASTOS et al. 2013).

A Síndrome de Sjögren compreende diversos mecanismos de resposta imune e, conseqüentemente, processos extremamente regulados para estabelecimento das vias de inflamação crônica glandular. Para tal, há proteases que, reconhecidamente, possuem papéis importantes para desencadear reações chave, como ocorre nos inflamassomas (SHAO et al. 2015) com a caspase-1 (NETEA et al. 2010). Ainda, observou-se que em tecido epitelial glandular de indivíduos acometidos por SS há desregulação do NF- κ B, provocando características semelhantes à síndrome (WANG et al. 2018). Isso posto, na via em questão, a caspase-1 que é uma protease se mostrou fundamental para o desencadear de uma cascata de reações e, por conseguinte, o desenvolvimento da doença. Outras proteases vêm sendo estudadas em SS (AQRAWI et al. 2017) para melhor compreensão de seu papel na patogênese.

Com extensa variabilidade de aplicações industriais, farmacêuticas e medicinais, as proteases vêm sendo investigadas para compor possíveis aplicações diagnósticas (RAO et al. 1998).

Análise Proteômica

A análise de proteomas é uma forma de avaliar a abundância diferencial de proteínas, como por exemplo, em fluidos biológicos. Esta análise é possível por meio da

técnica de espectrometria de massas, a qual ioniza peptídeos submetidos a um campo elétrico ou magnético e fornece uma relação de massa molecular e carga (m/z) (FENN et al. 1989).

As amostras analisadas primeiramente sofrem digestão química ou enzimática e, então, a razão m/z , após fragmentação, é avaliada por meio da distância entre picos de espectros, os quais identificam um peptídeo. Reconhece-se um *fingerprint*, juntamente com os demais peptídeos sequenciados, determinando uma proteína ou um fragmento de proteína. A partir da análise desse perfil químico, bancos de dados são consultados para busca de sequências ou perfis proteicos semelhantes. Dessa maneira, as proteínas são identificadas em espectrometria de massas por meio de um algoritmo (JAMES et al. 1993).

Ao longo dos anos, desde sua criação em meados da década de 50, as técnicas em espectrometria de massas avançaram fortemente. Os avanços envolvem as fontes de ionização, os analisadores de massas e os detectores por cromatografia, sendo essas, portanto, as variáveis que determinam a aplicação metodológica de um projeto (ROEPSTORFF, 2012). Dentre os equipamentos de análise de massa mais modernos, sensíveis e precisos, têm-se o Orbitrap Velos, empregado neste trabalho.

O Orbitrap é um aprisionador eletrostático orbital, visto que apresenta um eletrodo central, no qual os íons da amostra se movimentam em espiral e são aprisionados em um campo eletrostático. O que o torna de altíssima acurácia são o elevado campo elétrico, a maior energia de colisão e o espaço de tempo entre a detecção e a injeção em microssegundos, prevenindo saturação. A fonte de ionização geralmente é o eletrospray (ESI) e a informação de m/z é determinada por frequências de oscilação (AHIF et al. 2012).



JUSTIFICATIVA

JUSTIFICATIVA

A Síndrome de Sjögren é, dentre as doenças autoimunes, uma das mais prevalentes, com incidência de, aproximadamente, 0,5% na população geral (MAVRAGANI; MOUTSOPOULOS, 2010). Além dos sinais e sintomas que prejudicam o bem-estar dos pacientes, estudos relacionam a elevada incidência de linfoma em pacientes acometidos por SS, com alto índice de mortalidade (BRITO-ZERÓN et al. 2006).

Sendo uma doença incurável, é desejável proporcionar melhoria na qualidade de vida ao paciente, bem como redução do desconforto na fase de diagnóstico e acompanhamento. Sendo o diagnóstico da SS realizado com base em critérios estabelecidos pelo Conselho Americano-Europeu (VITALI et al. 2002), uma das orientações é a biópsia de glândulas salivares menores. Em contraposição, o diagnóstico salivar seria um meio mais confortável, não invasivo, de baixo custo e de fácil manuseio (SPIELMANN; WONG, 2010).

Têm sido relatados na literatura estudos que relacionam a atividade das proteases em doenças autoimunes por meio da análise sérica (LIU et al. 2005; CARLSSON et al. 2011). No entanto, escassos trabalhos têm avaliado a atividade de proteases na saliva, à exceção dos estudos que avaliam as metaloproteases (MACIEJCZYK et al. 2016; RATHNAYAKE et al. 2017). No presente momento, foram encontrados poucos estudos relacionados à regulação positiva de proteases na saliva de indivíduos em patologias sistêmicas que comprometam o fluxo salivar, como a SS (AQRAWI et al. 2017). Assim, a identificação de padrões proteolíticos e proteômicos na saliva total carece de detalhamento e pode ser um instrumento promissor para o diagnóstico salivar de SS (FOX, 2016).

O melhor entendimento da patogênese, portanto, bem como a busca por possíveis marcadores biológicos, é de interesse na análise salivar de indivíduos com SS (PORTO-MASCARENHAS et al. 2017). Destarte, o presente trabalho busca contribuir para o entendimento das mudanças de perfis de proteases e de atividade proteolítica nas salivas de pacientes com SS, a fim de prover ferramentas para posteriores estudos acerca dos marcadores biológicos salivares.



OBJETIVOS



OBJETIVOS

Com o intuito de determinar especificamente as proteases caracterizadas em trabalho anterior (GARRETO, 2017), o objetivo do presente estudo foi avaliar a expressão diferencial evidenciada no perfil de proteases de indivíduos controle e SS. Isto posto, por meio do proteoma salivar, de ensaios imunoenzimáticos, bem como pela atividade enzimática de proteases na saliva total estimulada, busca-se contribuir para identificação de alterações biológicas para SS em relação ao controle.

Objetivos específicos

Detectar proteases salivares em amostras de saliva total estimulada de indivíduos SS em relação ao controle, por meio de:

1. Caracterização proteolítica, fazendo uso de substratos peptídicos e inibição específica de atividade proteolítica em saliva total.
2. Dosagem de proteases salivares em ensaio imunoenzimático, mediante kit ELISA.
3. Espectrometria de massas, para análise qualitativa da presença de proteases salivares.



METODOLOGIA

METODOLOGIA

A avaliação dos participantes do estudo para amostra de conveniência e a coleta da saliva foram realizadas no âmbito da tese de doutorado no Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, na Universidade de Brasília, pela Dra. Flávia Marques Borba Modesto. Esse projeto foi aprovado no comitê de ética CEP/FS, 073/11. Todos os indivíduos participantes do estudo assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (MODESTO, 2015).

Desenho experimental global

Para análise da expressão diferencial de proteases salivares procedeu-se com a caracterização proteolítica, tanto por meio de ensaios com substratos fluorogênicos e inibidores específicos, quanto por ensaios com substrato em SDS-PAGE e inibidores específicos; com ensaios imunoenzimáticos, com ELISA para DPP-IV e MMP-9 humana; com análise proteômica qualitativa, com digestão em gel, ionização EASY-nano LC em espectrômetro de massas Orbitrap Velos (Figura 5).

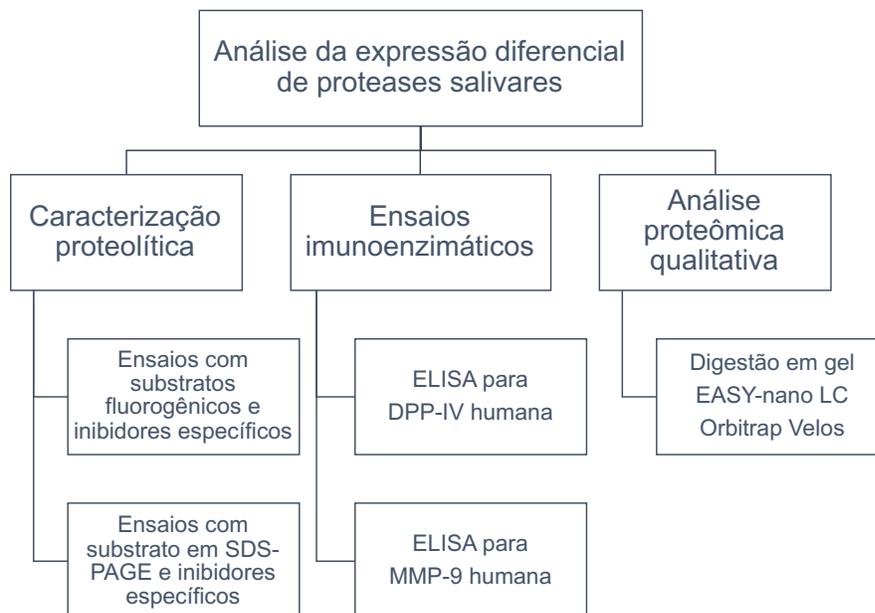


Figura 5. Desenho experimental global.

Amostra de conveniência

Trata-se de um estudo de caso controle, no qual houve uma comparação da atividade proteolítica salivar. Foram avaliadas amostras de saliva total estimulada de 40 indivíduos, sendo 20 diagnosticados com SS pelo Serviço de Reumatologia do Hospital Universitário de Brasília (HUB), conforme critério de diagnóstico Americano-Europeu (VITALI et al. 2002), e 20 não acometidos por SS. De cada grupo, 19 são mulheres e 1 é homem. No grupo de indivíduos com SS, há 10 com SSp e 10 com SSs. Os indivíduos avaliados compreendem a faixa etária de 29 a 82 anos. Foram excluídos os indivíduos com doenças sistêmicas ou com fatores que pudessem interferir nos resultados deste estudo, tais como: portadores de HIV, HCV, HVB ou HTLV-1; diabéticos; tabagistas, pacientes com linfoma previamente diagnosticados, pacientes com sarcoidose, história de tratamento radioterápico de cabeça e pescoço e uso de medicação anticolinérgica.

Coleta salivar

A saliva total estimulada foi coletada em jejum, entre 9 e 11 horas da manhã, com intuito de atenuar a influência do ritmo circadiano. Os indivíduos foram instruídos a realizar a higiene bucal uma hora antes do exame. O estímulo para realização da coleta de saliva total estimulada foi por mastigação de uma goma de mascar sem sabor. Após a coleta, as amostras foram centrifugadas a 2.600 x g, por 15 minutos, e armazenadas a -80°C no Laboratório de Histopatologia Bucal, Faculdade de Ciências da Saúde, UnB.

Quantificação de proteínas totais

As proteínas totais das amostras salivares foram quantificadas por meio de fluorometria, no equipamento Qubit® 2.0 Fluorometer.

Os dados recolhidos deste resultado de concentração de proteínas totais foram utilizados para normalizar os volumes de saliva utilizados para análise em espectrômetro de massas.



Além disso, com o intuito de comparar a intensidade de atividade gelatinolítica em zimografia, quanto ao volume e quanto à uniformização da quantificação salivar, um SDS PAGE 10% corado em prata, espelhado a uma zimografia de gelatina, foi realizado.

Ensaio de atividade enzimática contra peptídeos fluorogênicos

Em atividade proteolítica da saliva contra peptídeos fluorogênicos, foram avaliadas as amostras de saliva estimulada dos indivíduos controle e dos pacientes acometidos por SS. Foram testados os seguintes peptídeos fluorogênicos: Gly-Pro-AMC, Phe-Arg-AMC, N-Gly-Gly-Arg-AMC, Pro-AMC, Arg-Arg-AMC, Ala-Ala-Phe-Ala-AMC, N-suc-Ile-Leu-Cys-Ala-AMC, N-suc-Gly-Pro-Leu-Gly-Pro-AMC, Gly-Arg-AMC, N-suc-Leu-Thr-AMC, Arg-AMC, N-suc-Leu-Leu-Val-Thy-AMC.

A atividade enzimática presente foi medida por meio da liberação do 7-amino-4-metilcoumarin (AMC) pela hidrólise do substrato durante 15 minutos (SANTANA et al. 1997). O AMC liberado foi medido no espectrofluorímetro SpectraMax® M5 ROM v3.0.22, Molecular Devices, a excitação de 380 nm e emissão de 460 nm em microplaca de 96 poços, em FU/min. Todas as reações enzimáticas foram realizadas em tampão de atividade (HEPES 25 mM, pH 7,5) na presença de 10 μ M de substrato em 100 μ L de volume final. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

Para inibição proteolítica específica do Gly-Pro-AMC, foram testados os inibidores AEBSF, E-64, EDTA, Leupeptina, Pepstatina A, Sitagliptina, TLCK e TPCK, a fim de constatar a classe à qual pertence a protease estudada. Todas as inibições de proteases foram realizadas em duplicata. Os inibidores específicos de protease, os seus tipos catalíticos ao qual realizam inibição e a concentração final em amostra são indicados na Tabela 1.

Tabela 1. Inibidores de protease, tipo catalítico ao qual inibem e a concentração final em amostra.

Inibidor de protease	Tipo catalítico	Concentração final
AEBSF	Serino protease	1 mM
E-64	Cisteíno protease	100 μ M
EDTA	Metaloprotease	1 mM
Leupeptina	Cisteíno protease	100 μ M
	Serino protease	
	Threonino protease	
Pepstatina A	Ácido aspártico	100 μ M
Sitagliptina	Dipeptidil peptidase	1 μ M
	IV	
TLCK	Cisteíno protease	100 μ M
	Serino protease	
TPCK	Cisteíno protease	100 μ M
	Serino protease	

Ensaio de atividade enzimática em SDS-PAGE contra gelatina

A zimografia, técnica de eletroforese na qual se observa atividade proteolítica em gel de gelatina, foi carregada com 10 μ L de saliva total estimulada em um SDS PAGE a 8% e copolimerizado com gelatina 0,1% (w/v). Para que pudessem ser visualizadas as bandas de atividade, os géis foram submetidos a duas lavagens com Tris-HCl 100mM pH7,5 e Triton 2,5% (v/v) por 30 minutos cada lavagem e incubadas a 37°C *overnight*. Em seguida, os géis foram corados com solução fixadora de Coomassie Blue R-250, durante 1 hora, em temperatura ambiente e descorados com solução descorante. A hidrólise das bandas é visualizada em bandas claras sobre um fundo azul.

Dentre os testes realizados em zimografia, procedeu-se à comparação da atividade enzimática de saliva estimulada de indivíduos controle e daqueles acometidos pela SS. Para inibição proteolítica específica das enzimas que hidrolisam a gelatina,

testam-se os inibidores AEBSF, E-64, EDTA, a fim de constatar a classe a qual pertence a enzima estudada. Como o EDTA é um inibidor reversível, a coluna de gel com a amostra foi tratada em lavagem e incubação em concentração final de EDTA 2 mM. As concentrações finais de inibidores de proteases em amostra salivar estão de acordo com a Tabela 1.

A intensidade das bandas de atividade em zimografia foi avaliada por densitometria, utilizando o software de processamento de imagens ImageJ 1.51a, em escala de cinza, para quantificação de imagens digitais. A normalização dos valores quantificados foi realizada tendo como base para *standard* a amostra mais intensa de um indivíduo controle, em cada gel. Portanto, os valores fornecidos são de intensidade relativa.

Ensaio imunoenzimático

Os testes de imunoabsorção enzimáticos foram realizados baseados na técnica sanduíche de antígenos, por meio dos kits: Human DPPIV/CD26 DuoSet ELISA da R&D Systems (cód DY1180), com especificidade para DPP-IV natural e recombinante, e Human MMP-9 da R&D Systems (cód. DY911-05), com especificidade para Pro-MMP-9 de 92 kDa, natural e recombinante, bem como para MMP-9 ativa de 82kDa. Ambos os kits foram utilizados em conjunto com o DuoSet ELISA Ancillary Reagent Kit 2. Os ensaios foram conduzidos respeitando-se as instruções e recomendações do fabricante, em protocolo próprio.

Espectrometria de massas

Dentre a amostra de conveniência de 40 indivíduos, escolheu-se amostras salivares que apresentaram maior variabilidade de bandas de atividade proteolítica em zimogramas previamente realizados. As amostras salivares seguiram a seguinte disposição: 3 controles, 3 pSS e 3 sSS. O SDS-PAGE foi carregado com 500 ng de proteína salivar em cada poço.

Para digestão em gel, o SDS-PAGE 8% foi cortado em colunas, referente a cada amostra salivar em poço individual, e cada coluna foi cortada em 3 partes, horizontalmente, totalizando 27 recortes do gel. Em seguida, as partes foram descoradas. As proteínas presentes na banda de SDS-PAGE 8% tiveram suas pontes dissulfeto reduzidas por incubação das fatias de gel em NH_4HCO_3 100 mM, contendo DTT 10 mM, por 1 h, a 56°C . Removida a solução, os resíduos de cisteína foram alquilados em solução de NH_4HCO_3 100 mM contendo iodoacetamida 55 mM, por 45 min, em temperatura ambiente, no escuro. Posteriormente, um novo ciclo de lavagem água/acetonitrila foi realizado, seguido de secagem em Speed Vac. Os géis foram hidratados novamente em NH_4HCO_3 50 mM, CaCl_2 5 mM, contendo $12,5 \text{ ng}/\mu\text{L}$ de tripsina de grau de sequenciamento (Promega, Madison, WI, EUA) e incubados a 37°C , por 16–18 h. Os peptídeos trípticos foram extraídos duas vezes com $40 \mu\text{L}$ de solução acetonitrila/água/TFA (66:33:0,1) em sonicador, por 10 min. O produto da digestão foi dessalinizado e concentrado, usando ZipTips® C18 (Millipore, Billerica, MA, EUA).

As amostras foram analisadas utilizando um sistema EASY-nano LC (Proxeon Biosystems) acoplado *online* com um espectrômetro de massas LTQ-Orbitrap Velos (Thermo Scientific). Para tal, 27 alíquotas contendo $20 \mu\text{g}$ de AnHyal foram utilizadas. Uma alíquota foi previamente acetilada pela adição de $40 \mu\text{L}$ de anidrido acético em 1.5 mL, em tampão Tris-HCl 100 mM, pH 8,0. Essa mistura foi incubada por 1 h a 25°C e desalinizada em ponta de pipeta embalada com membrana C8 (Empore, Supelco). As amostras foram lavadas 3 vezes com TFA 0,1% (v/v). As proteínas eluídas em solução de acetonitrila a 40%, 70% e 100%, todas contendo TFA 0,1%, foram, então, liofilizadas.

As 27 alíquotas de AnHyal foram reduzidas com 10 mM dithiothreitol (DTT) em 6 M de tampão guanidina, 0,25 M Tris, pH 8,6 por 1 h a 52°C e alquiladas por meio da adição de 50 mM iodoacetamida por 1 h a 25°C . A alíquota acetilada foi digerida overnight com tripsina (Promega, Madison, WI, USA) a 37°C em 100 mM de bicarbonato de amônia, pH 8,1. As 27 alíquotas foram digeridas com tripsina Lys-C ou Glu-C (Promega, Madison, WI, USA) sob as mesmas condições. Todas com uma razão enzima/substrato de 1:50. As amostras foram desalinizadas em uma ponta de pipeta embalada com membrana C18, como descrito anteriormente, e liofilizadas. Os digestos foram resuspendidos em ácido fórmico a 0,1% (v/v) e carregados em um sistema nano-

UPLC Dionex 3000 (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) equipado com uma coluna do tipo C18 (100 μm x 3 cm com partículas de 5 $\mu\text{m}/100 \text{ \AA}$) e uma coluna C18 analítica (75 μm x 35 cm com partículas de 3 $\mu\text{m}/100 \text{ \AA}$). Os peptídeos foram eluídos da coluna analítica com o gradiente de 2% para 35% de solvente B (0,01% (v/v) de ácido fórmico em acetonitrila) durante 50 min, diretamente dentro do espectrômetro de massas, sob ionização ESI. O espectro de massa molecular foi adquirido por meio do modo DDA (Data Dependent Acquisition) e controlado pelo software Xcalibur 2.0 (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA). O ciclo de aquisição DDA compreendeu o intervalo de 350 a 1650 m/z e a resolução de 120.000 por MS1. Os dez íons precursores mais abundantes foram fragmentados por dissociação, induzida por colisão (CID), com a exclusão dinâmica por 90 s, energia de colisão normalizada para 35% e os fragmentos foram detectados utilizando-se o sistema de armadilha de íons. As mesmas amostras foram injetadas novamente em sistema LC-MS/MS para fragmentação com alta energia de colisão e dissociação (HCD), quando a detecção de MS2 é realizada a resolução de 60.000 em analisador de massas Orbitrap.

O processamento dos dados .raw gerados pelo espectrômetro foi importado para o software PEAKS Studio 7.0 (Bioinformatics Solution Inc., Waterloo, Canada), para realizar o sequenciamento peptídico *de novo*, por meio do MS/MS spectra. O banco de dados foi gerado no UniprotKB, em formato FASTA, composto por dados de *Homo sapiens*, em 3 de maio de 2019. Em seguida, as proteínas contaminantes foram removidas manualmente das listas de identificação.

As buscas processadas cumpriram os seguintes parâmetros: precisão no MS de 10 ppm, no MS/MS de 0.5 Da para espectros de fragmentação por CID e 10 MS de ppm e MS/MS de 0,05 ppm para espectros de fragmentação por HCD, até 2 sítios de clivagem perdidos, carbamidometilação de cisteínas como modificação fixa e oxidação da 51 metionina, acetilação N-terminal da proteína como modificações variáveis. O número de proteínas, grupo de proteínas e número de peptídeos foram filtrados com uma taxa de detecção de falsos positivos (FDR) menor que 0,5% e peptídeos com rank1 e mínimo de 2 peptídeos únicos por proteínas foram aceitos para identificação.

Análise da relação de proteases com o uso de medicamentos

Os medicamentos utilizados por indivíduos SS foram agrupados da seguinte forma: corticoides, hidroxiquina, imunossupressores, pilocarpina/cevimelina, colírios, antidepressivos, anti-inflamatórios não esteroides e outros. Em seguida, para observação da possível relação do uso de medicamentos por indivíduos SS com as dosagens de proteases identificadas por ensaio imunoenzimático, os medicamentos foram agrupados da seguinte forma: anti-inflamatórios, envolvendo anti-inflamatórios não esteroides e corticosteroides; e imunossupressores, adicionando a esta classe a hidroxiquina, anteriormente em grupo distinto.

Primeiramente, a análise foi realizada comparando-se o valor médio da dosagem de proteases em subgrupos, de acordo com o uso de medicamentos. Em seguida, os valores individuais foram avaliados quanto à expressão de proteases, com cutoff 1 ng/mL para grupo controle.

Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas em GraphPad Prism para Mac (versão 7.0e.198) e Statistical Package for Social Sciences (SPSS) para Windows (versão 13.0). Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos.

Os dados paramétricos analisados entre dois grupos foram realizados pelo Teste T de Student, os quais são enumerados a seguir: análise estatística da concentração proteica salivar dos grupos, em conjunto com o teste Levene, e dosagem de DPP-IV em ensaio imunoenzimático.

Os dados não paramétricos analisados entre dois grupos foram realizados pelo Teste de Mann-Whitney, os quais são enumerados a seguir: análise estatística da atividade enzimática de Gly-Pro-AMC, a análise estatística das bandas de atividade enzimática, tanto quanto em sua intensidade de determinada banda de atividade quanto na frequência em que elas se distribuem nas zimografias, e análise estatística da dosagem de MMP-9 em ensaio imunoenzimático.



Os dados referentes à DPP-IV avaliados em subgrupos foram executados de acordo com o teste One-way ANOVA e teste Bartlett's. Os dados referentes à MMP-9 avaliados em subgrupos foram executados de acordo com o teste Kruskal-Wallis. Ambos foram submetidos à identificação e remoção de *outliers*, por meio do teste ROUT, com Q=1%.

A intensidade das bandas de atividade enzimática e a atividade enzimática específica dos substratos fluorogênicos foram comparadas entre os subgrupos pelo teste de correlação de Spearman. As dosagens de DPP-IV e MMP-9, referentes aos ensaios imunoenzimáticos, foram comparadas pelo teste de correlação de Spearman. A relação de dosagem de proteases com o uso de medicamentos foi medida pelo teste Row com SEM.



RESULTADOS

RESULTADOS

Primeiramente, as amostras de saliva total foram quantificadas, para obtenção de valor de concentração de proteína total (ng/ μ L). Os testes T de Student e Levene revelaram diferenças significativas ($p < 0,05$) nos valores médios entre os grupos constituídos por indivíduos controle e por aqueles acometidos por SS. Nota-se que a saliva de indivíduos SS apresentou menor concentração de proteínas totais quando comparada aos indivíduos controle (Figura 6).

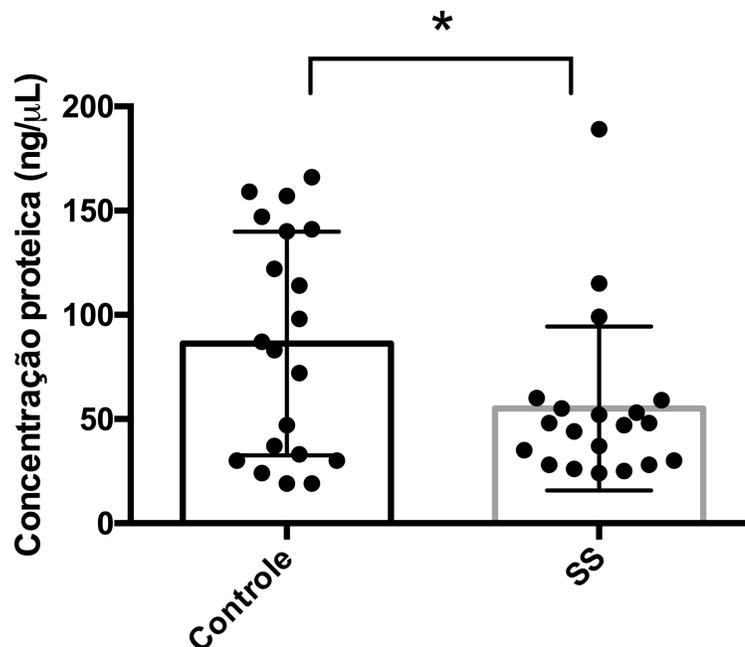


Figura 6. Concentração proteica salivar. Os testes T de Student e Levene revelaram diferenças significativas ($p < 0,05$) nos valores médios entre os grupos formados por indivíduos controle e por aqueles acometidos por SS. Nota-se que a saliva de indivíduos SS apresentou menor concentração de proteínas totais.

Inicialmente, com o intuito de caracterizar a atividade proteolítica salivar, duas estratégias foram utilizadas: medição de liberação de fluorescência em espectrofotômetro e uso de substrato na composição de SDS-PAGE. Assim, doze substratos fluorogênicos foram testados em saliva de um indivíduo controle e medida liberação de FU/min em espectrofotômetro. Os substratos foram cuidadosamente

selecionados, a fim de dispor uma variedade de peptídeos, uma vez que em caso de hidrólise, possivelmente corresponderia a uma determinada classe de proteases.

Dentre eles, Gly-Pro-AMC, Phe-Arg-AMC, N-Gly-Gly-Arg-AMC e Pro-AMC foram os substratos mais hidrolisados frente às proteases presentes em amostra salivar (Figura 7). Ainda, os ensaios de atividade, realizados em triplicata, mostraram-se fidedignos quando ao baixíssimo desvio padrão. Percebe-se crescente liberação de FU/min, não havendo formação de platô no gráfico de atividade, mediante saturação de proteases, em 20 μ L de saliva.

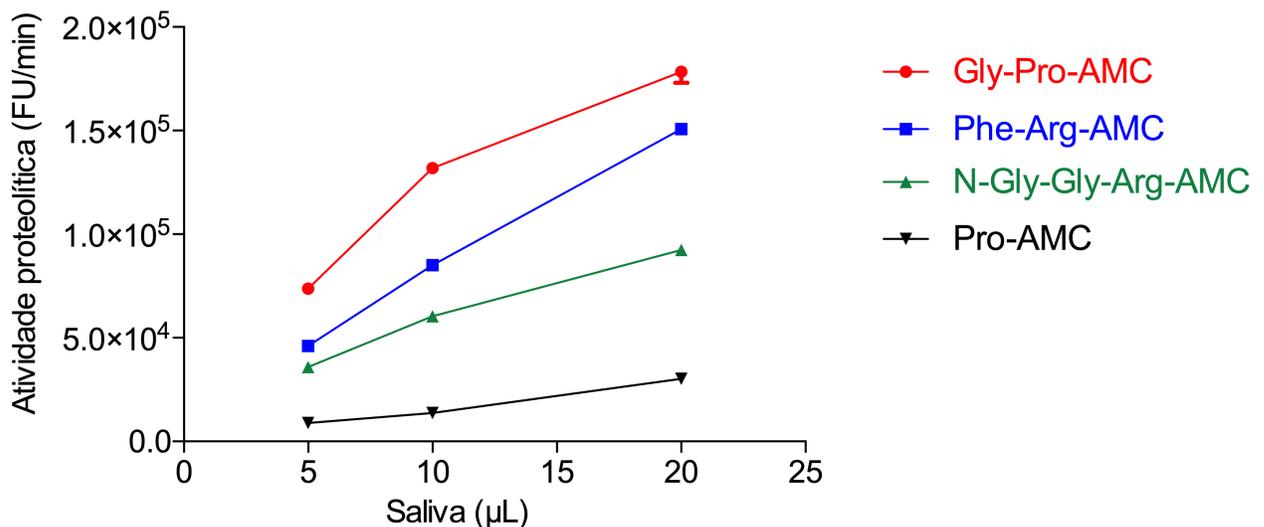


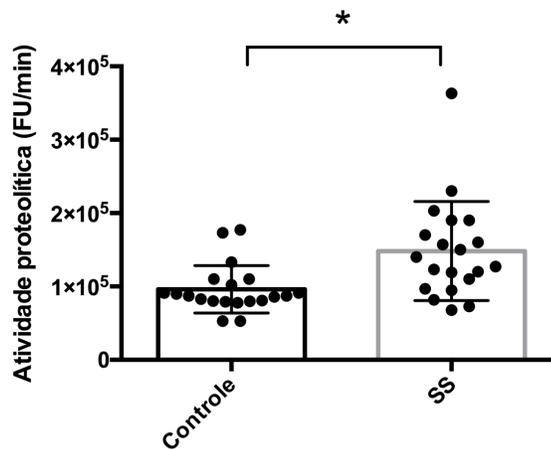
Figura 7. Atividade proteolítica contra substratos fluorogênicos. Dentre os doze substratos testados em saliva de um indivíduo controle, Gly-Pro-AMC, Phe-Arg-AMC, N-Gly-Gly-Arg-AMC e Pro-AMC apresentaram maior hidrólise frente às proteases presentes em amostra salivar e seus valores são exibidos no gráfico.

Sendo Gly-Pro-AMC o substrato que estabeleceu maior atividade proteolítica salivar, ele foi escolhido para realização dos testes em todas as demais amostras. Isso porque, por se tratar de uma condição patológica na qual há hipossalivação, os testes foram cuidadosamente selecionados, para que não houvesse desperdício de amostra salivar.

Em seguida, todas as quarenta amostras de saliva foram testadas em substrato fluorogênico Gly-Pro-AMC. Como é possível observar, o teste Mann-Whitney revelou

expressiva atividade proteolítica ($p < 0,05$) na saliva total do grupo de indivíduos SS, com maior amplitude na liberação de FU/min, conforme Figura 8A. Subsequentemente, foram testados os inibidores seletivos de protease, na presença de Gly-Pro-AMC, em saliva de um indivíduo controle. Então, o inibidor seletivo de serino proteases, AEBSF, apresentou considerável inibição. Além disso, percebe-se que a sitagliptina, inibidor altamente seletivo de DDP-IV, inibiu maciçamente a atividade da protease em substrato (Figura 8B).

A)



B)

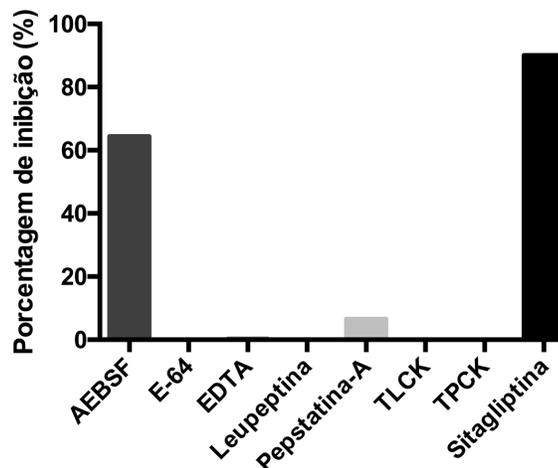


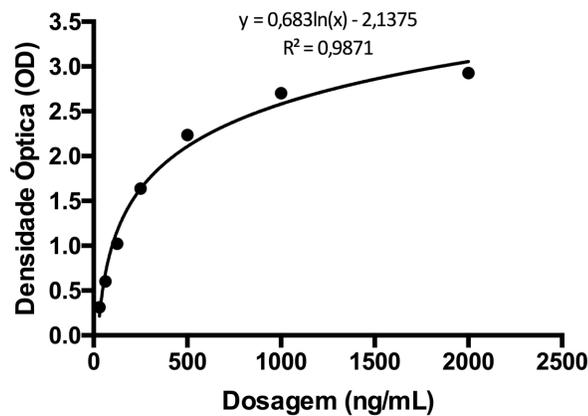
Figura 8. Caracterização da atividade proteolítica salivar contra Gly-Pro-AMC. (A) O Teste Mann-Whitney revelou expressiva atividade proteolítica ($p < 0,05$) na saliva total do grupo de indivíduos SS. (B) O inibidor seletivo de serino proteases, AEBSF, apresentou considerável inibição. Além disso, percebe-se que a sitagliptina, inibidor altamente seletivo de DPP-IV, inibiu maciçamente a atividade da protease em substrato.

Então, baseado no resultado da caracterização proteolítica, procedeu-se com ensaio imunoenzimático para dosagem de DPP-IV/CD26 humana, realizado em toda amostra de conveniência. Com curvas de calibração com coeficiente de ajustamento (R^2) igual ou superior a 0,98, o limiar para detecção do ensaio foi 0,02 ng/mL (Figura 9A).

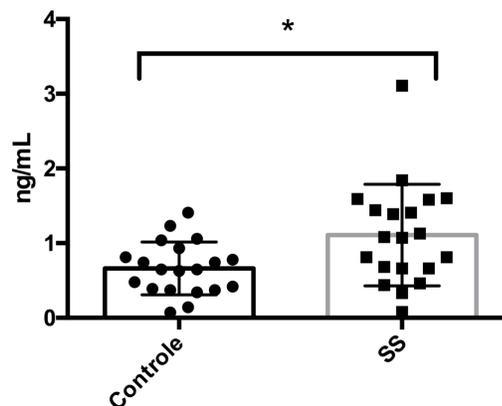
Assim, os resultados das dosagens de DPP-IV foram submetidos ao teste de identificação de *outliers*, por meio do teste ROUT, com $Q=1\%$, e não houve identificação ou remoção de *outliers*. Portanto, o ELISA revelou elevada expressão ($p<0,05$) de DPP-IV em saliva de indivíduos SS, de acordo com o teste T de Student (Figura 9B).

Em seguida, os resultados referentes à DPP-IV também foram avaliados em subgrupos, sendo eles: controle, SSp e SSs (Figura 9C). Quando comparadas as dosagens entre controle e SSp, essas apresentaram-se significantes ($p<0,05$), de acordo com o teste One-way ANOVA e teste de múltiplas comparações de Dunnett's.

A)



B)



C)

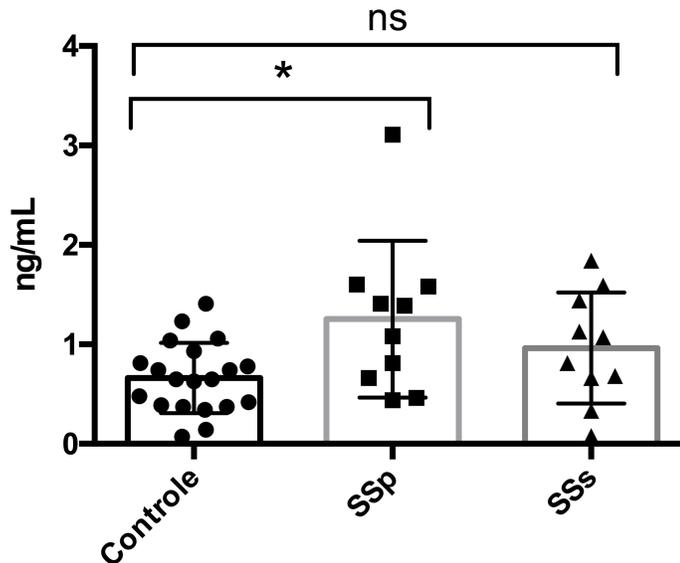


Figura 9. ELISA para DPP-IV/CD26 humana. (A) Curvas de calibração com coeficiente de ajustamento (R^2) igual ou superior a 0,98 e limiar para detecção de 20 ng/mL, sendo OD “Densidade Óptica”. (B) O ELISA para DPP-IV/CD26 humana revelou elevada ($p < 0,05$) expressão de DPP-IV em saliva de indivíduos SS, por teste T de Student. (C) Quando comparadas as dosagens entre controle e SSp, estes apresentaram-se significantes ($p < 0,05$), de acordo com o teste One-way ANOVA e teste de múltiplas comparações de Dunnett’s.

Paralelamente, seguindo a outra estratégia de caracterização de proteases, realizou-se zimografia de gelatina em indivíduo controle, com volumes de saliva total em razão decrescente. O objetivo do experimento foi constatar atividade gelatinolítica em zimografia e, então, definir o volume de trabalho adequado para visualização das bandas de atividade. Dessa forma, observa-se intensa proteólise referente aos pesos moleculares que se aproximam de 80 kDa a 90 kDa. Além disso, o volume de trabalho de 10 μ L foi definido para os testes nas demais amostras salivares (Figura 10).

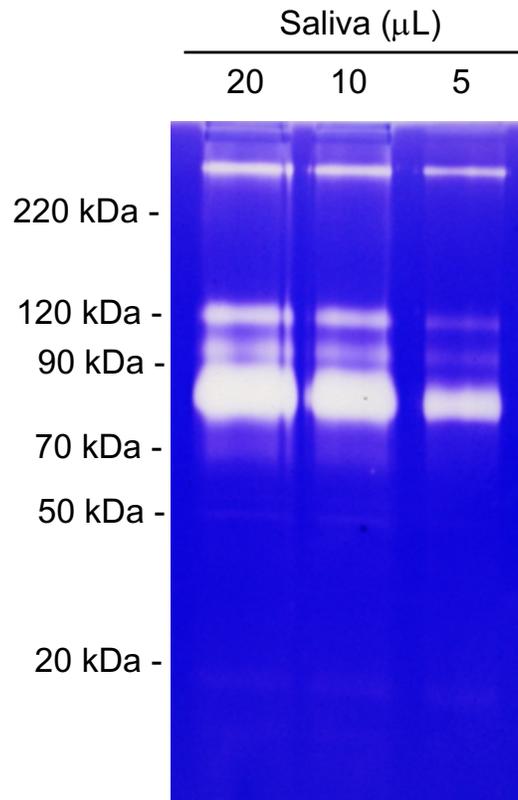


Figura 10. Gel de atividade gelatinolítica com amostra salivar de indivíduo controle. Observa-se intensa proteólise referente aos pesos moleculares que se aproximam de 80 kDa a 90 kDa. Além disso, o volume de trabalho de 10 μL foi definido para os testes nas demais amostras salivares.

Posteriormente, os valores de concentração proteica das amostras salivares foram padronizados em ambos os grupos para carregamento do gel em 500 ng de proteína, a fim de analisar a intensidade de atividade proteolítica em equivalência de concentração proteica (Figura 11). As amostras para visualização de mobilidade eletroforética não foram fervidas, para adequada comparação com peso molecular das bandas no gel de atividade. Desta maneira, o SDS-PAGE 10% corado em prata apresentou uniformidade de perfis eletroforéticos, demonstrando adequada normalização de proteínas totais. Para mais, a zimografia de gelatina exibiu atividade proteolítica seguindo a mesma razão de intensidade de atividade que a zimografias precedente. Sendo assim, por meio da normalização de proteínas constatou-se que, embora as zimografias tenham sido carregadas em volume de amostra salivar e não em concentração proteica, proteínas

estandardizadas seguem o mesmo padrão de razão de intensidade de atividade quando se utiliza volume de saliva.

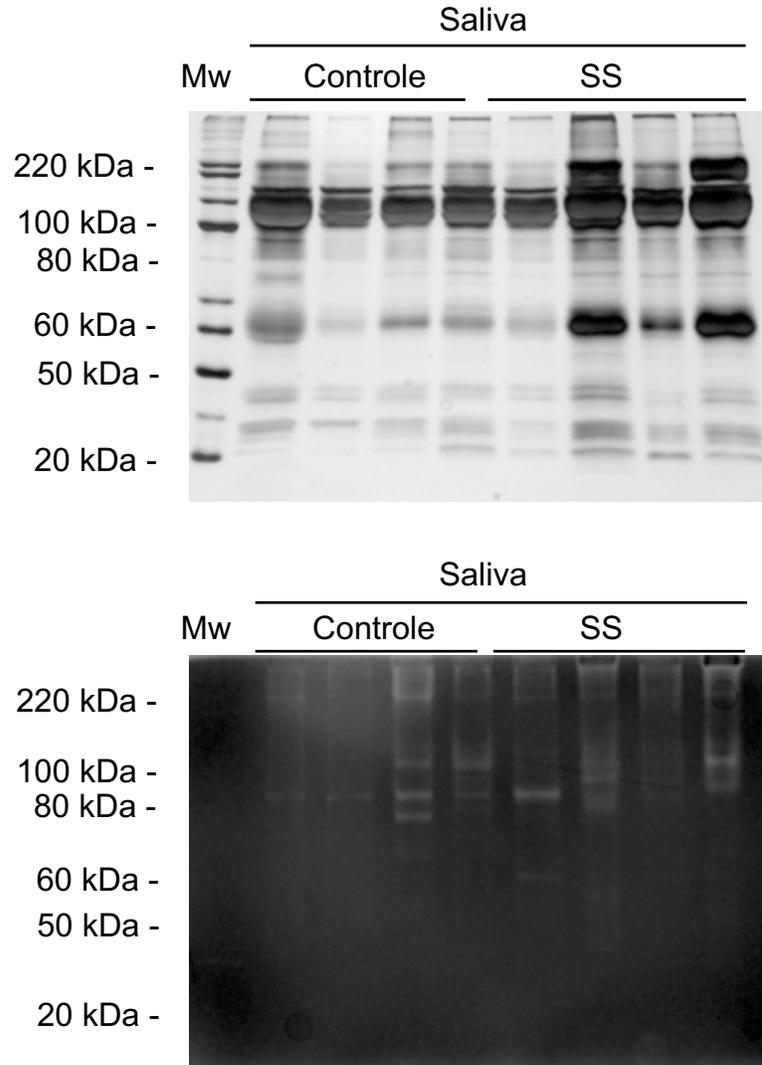


Figura 11. Espelhamento de gel para análise da intensidade de atividade proteolítica em concentração de 500 ng de proteínas totais. (A) SDS-PAGE 10% corado em prata exibe uniformidade de perfis eletroforéticos, mediante quantificação de proteínas totais realizadas por Qubit®. (B) Zimografia de gelatina SDS-PAGE 8% e copolimerizado com gelatina 0,1% (w/v) apresenta mesma razão de atividade enzimática que as zimografias anteriores.

Então, as zimografias de gelatina foram realizadas em toda a amostra de conveniência, dispostas em 5 géis de atividade, seguindo a distribuição de 4 amostras de indivíduos controle e 4 amostras de indivíduos SS, por gel (Figura 12).

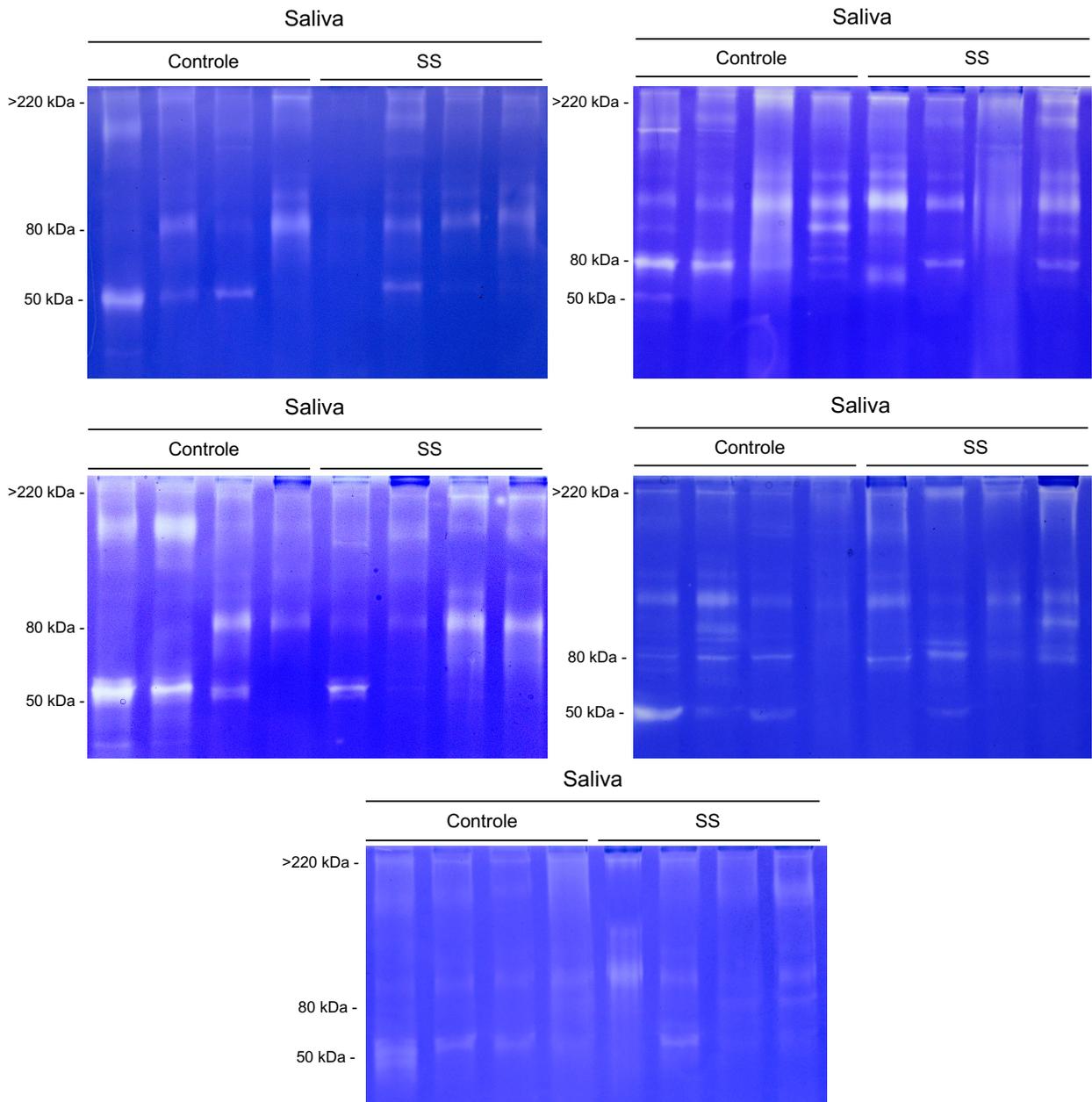


Figura 12. Zimografias de gelatina referente a toda amostra de conveniência. Nota-se que a atividade proteolítica é diversificada quanto ao peso molecular e quanto à intensidade de suas bandas de atividade.

Ainda, cada zimografia foi espelhada a um SDS-PAGE 10% corado em prata, para visualização do perfil proteico eletroforético. Nota-se que a atividade proteolítica é diversificada quanto ao peso molecular e quanto à intensidade de suas bandas de

atividade. Procedeu-se, então, com o mapeamento do peso molecular de cada banda de atividade e de sua intensidade de atividade proteolítica, por meio do ImageJ.

Sendo assim, foram identificadas 10 bandas de atividade, conforme disposto na Figura 12: >220 kDa, 220 kDa, 160 kDa, 130 kDa, 100 kDa, 90 kDa, 80 kDa, 55 kDa, 50 kDa e 40 kDa. No entanto, de acordo com o teste Mann-Whitney, não houve significância ($p > 0,05$) quanto à frequência em que elas se distribuem nas zimografias (Figura 13).

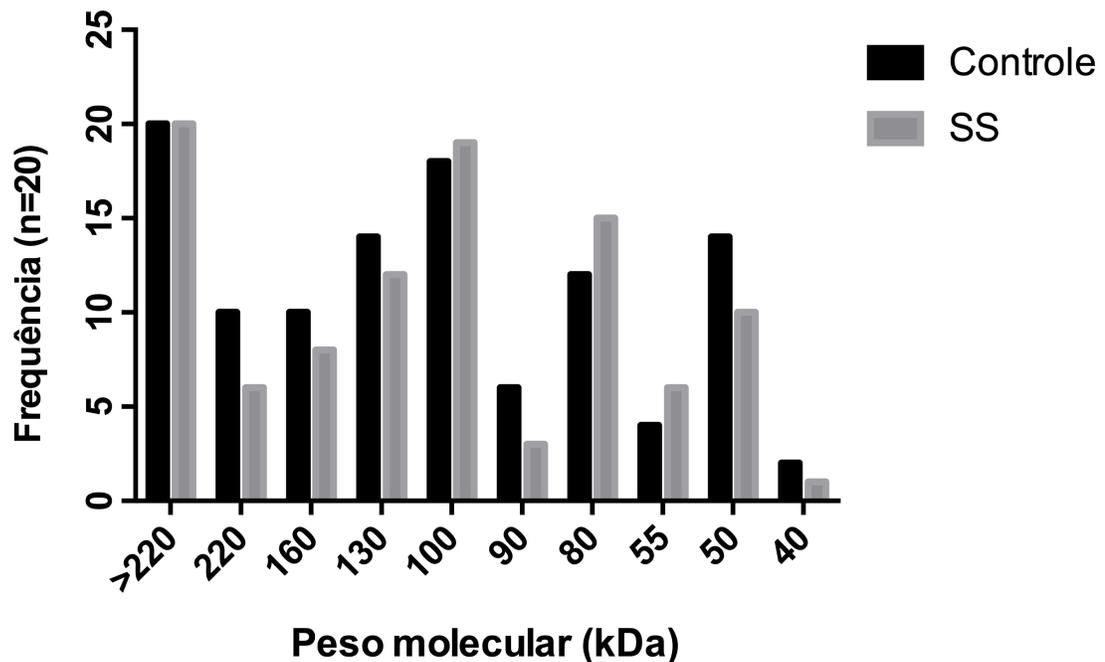
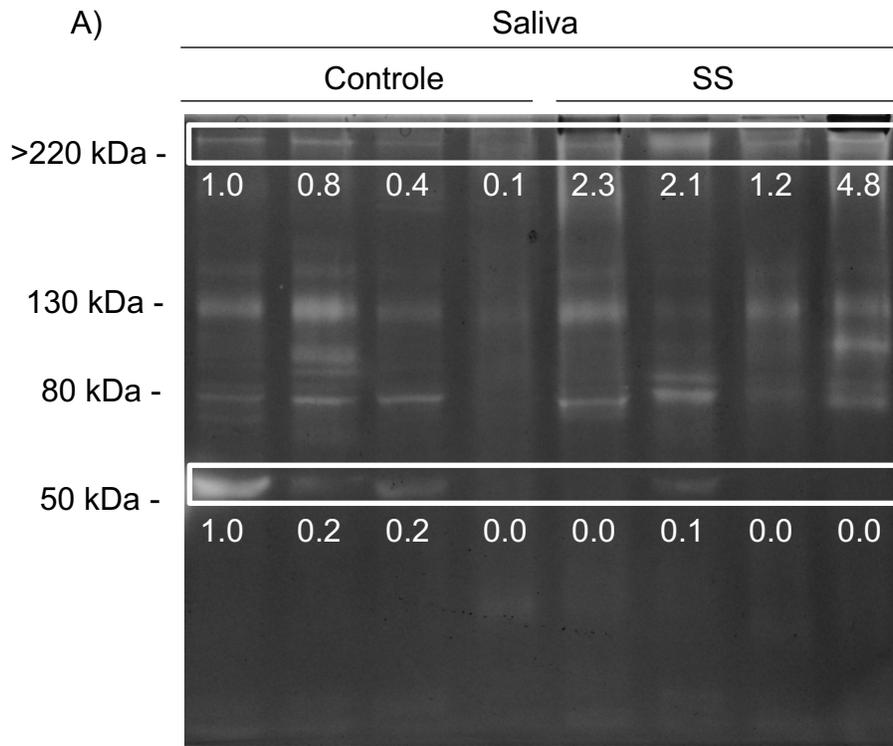
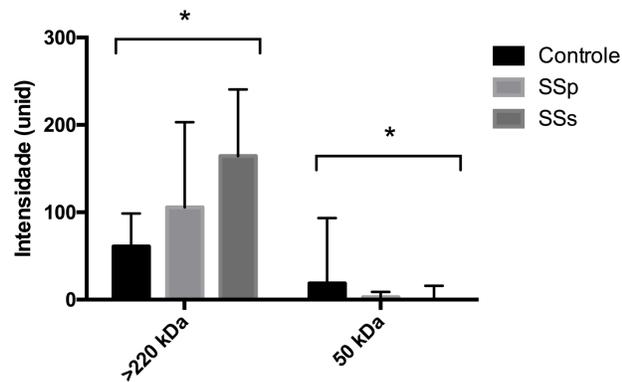


Figura 13. Mapeamento da frequência de bandas de atividade em zimografia. Não houve significância ($p > 0,05$) quanto à frequência em que elas estão distribuídas.

Quanto à intensidade das bandas de atividade, houve significativa ($p < 0,05$) diferença entre os grupos avaliados, no que se refere às bandas de >220 kDa e 50 kDa, de acordo com o teste de Mann-Whitney (Figura 14). Conforme pode-se observar nas Figuras 14A e 14B, a banda >220 kDa é mais intensa nas salivas do grupo SS, sendo SSs a mais acentuada. Concomitantemente, a banda 50 kDa é pouco intensa nas salivas do grupo SS, sendo próxima a zero em SSs.



B)



	Controle (n = 20)	SSp (n= 10)	SSs (n= 10)	p^*
Peso molecular				
>220 kDa	60.92 [40.22; 98.50]	105.52 [58.48; 203.02]	164.42 [66.02; 240.50]	0,001
50 kDa	18.56 [0.00; 93.37]	2.97 [0.00; 8.80]	0.00 [0.00; 15.94]	0,012

Figura 14. Bandas de atividade proteolítica em zimografia significativamente diferentes entre os grupos. (A) Houve significativa ($p < 0,05$) diferença entre os grupos avaliados, no que se refere às bandas de >220 kDa e 50 kDa, de acordo com o teste de Mann-Whitney. (B) Conforme pode-se observar nas, a banda >220 kDa é mais intensa nas salivas do grupo SS, sendo SSs a mais acentuada. Concomitantemente, a banda 50 kDa é pouco intensa nas salivas do grupo SS, sendo próxima a zero em SSs.

Embora a idade dos indivíduos tenha sido testada estatisticamente para verificar possíveis correlações, esse dado não se mostrou relevante nos resultados. Além desse, o dado de gênero também não foi relevante, já que a participação de apenas 1 homem por grupo não permite constituir um grupo para comparação.

Em sequência, foram testados os inibidores seletivos de protease, em zimografia de gelatina, utilizando saliva de um indivíduo controle. Então, os inibidores específicos avaliados foram: o AEBSF, para serino proteases; o E-64, para cisteíno proteases; e o EDTA, para metaloproteases (Figura 15).

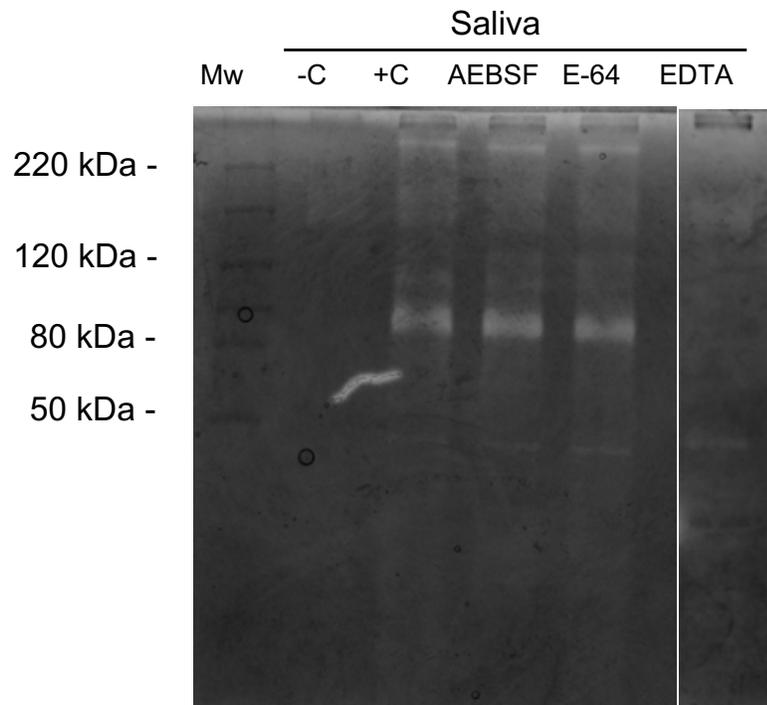


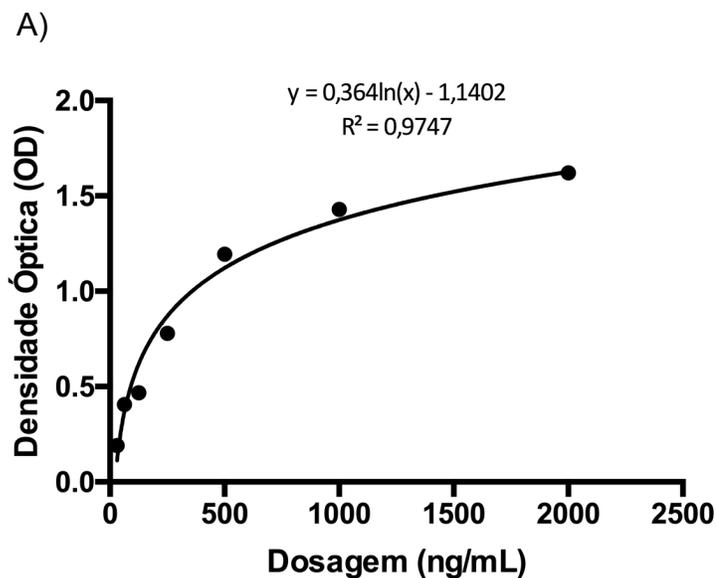
Figura 15. Inibição de proteases em zimografia, com inibidores específicos. Nota-se que, aparentemente, AEBSF e E-64 não realizaram inibição de proteases, visto que o padrão de atividade proteolítica permanece semelhante ao do controle positivo (+C). No entanto, EDTA exibiu inibição majoritária de bandas de atividade, com exceção à banda de aproximadamente 40 kDa. É importante destacar que a banda de aproximadamente 90 kDa foi completamente inibida. Mw: marcador para proteínas; -C: controle negativo, fervido.

Aparentemente, AEBSF e E-64 não realizaram inibição de proteases, visto que o padrão de atividade proteolítica permanece semelhante ao do controle positivo (+C). No entanto, EDTA exibiu inibição majoritária de bandas de atividade, com exceção à banda

de aproximadamente 40 kDa. É importante destacar que a banda de aproximadamente 90 kDa foi completamente inibida.

Com a finalidade de investigar a metaloprotease provavelmente envolvida na atividade gelatinolítica, o ensaio imunoenzimático para dosagem de MMP-9 humana, também conhecida como gelatinase B, a qual tem peso molecular de 86 kDa quando ativa, foi realizado em toda amostra de conveniência. O ensaio imunoenzimático teve curvas de calibração com coeficiente de ajustamento (R^2) igual ou superior a 0,97. O limiar para detecção do ensaio foi 0,02 ng/ μ L (Figura 16A).

No entanto, apesar de o ELISA apresentar $p > 0,05$, com o exato valor de 0,0531, houve forte tendência à significância, de acordo com o teste de Mann Whitney (Figura 16B). Semelhantemente ao teste de identificação de *outliers* realizado para DPP-IV, e pelo valor de p ser próximo ao estabelecido como significativo, os resultados das dosagens de MMP-9 foram submetidos ao teste ROUT, com $Q=1\%$, e os *outliers* foram, então, removidos. Em seguida, de acordo com o teste de Mann Whitney, o ELISA revelou elevada expressão ($p < 0,05$) de MMP-9 em saliva de indivíduos SS (Figura 16C).



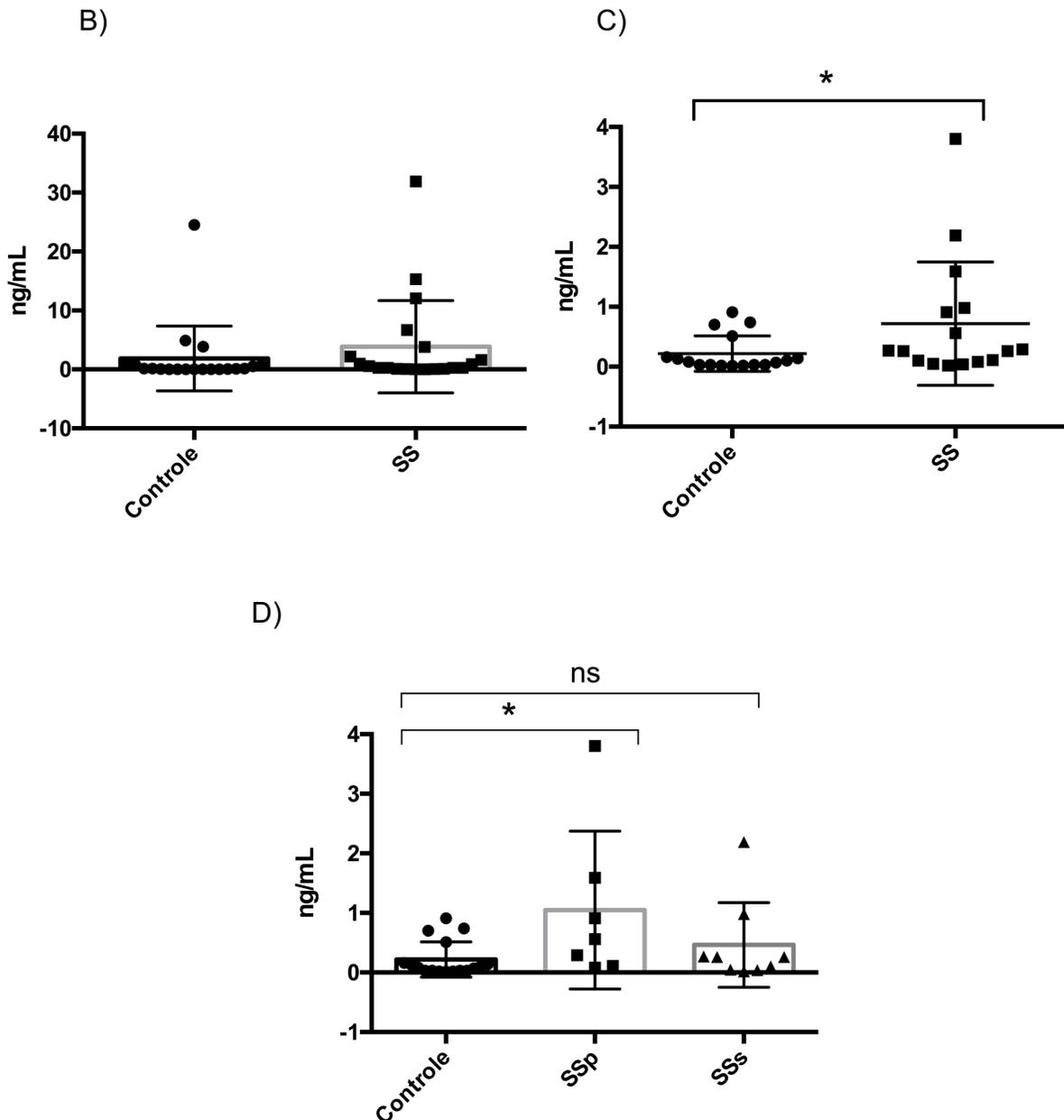


Figura 16. ELISA para MMP-9 humana. (A) Curvas de calibração, sendo OD “Densidade Óptica”. (B) O ELISA para dosagem de MMP-9 humana mostrou-se em tendência à significância, de acordo com o teste de Mann Whitney. (C) Submetidos ao teste ROUT, com $Q=1\%$, os outliers foram removidos. Em seguida, de acordo com o teste de Mann Whitney, o ELISA revelou elevada expressão ($p<0,05$) de MMP-9 em saliva de indivíduos SS (D) Em subgrupos, as dosagens mostram-se significantes ($p<0,05$) comparando-se controle e SSp, de acordo com o teste One-way ANOVA e teste de múltiplas comparações de Dunnett’s (Teste de Kruskal-Wallis).

Em seguida, os resultados referentes à MMP-9 também foram avaliados em subgrupos, sendo eles: controle, SSp e SSS (Figura 16D). Estes apresentaram-se significantes ($p<0,05$) quando comparados indivíduos controle e SSp, de acordo com o

teste One-way ANOVA e teste de múltiplas comparações de Dunnett's (Teste de Kruskal-Wallis).

Utilizando os dados de dosagens, estas passaram por transformação logarítmica, a fim de dispor os valores espaçadamente e permitir análise qualitativa, uma vez que o teste de correlação de Spearman aplicado entre as dosagens de DPP-IV e de MMP-9 que não apresentou correlação ($p > 0,05$). Por conseguinte, é possível observar aumento da expressão de DPP-IV e MMP-9 conjuntamente em indivíduos SSp, sendo 40% deles com ambas as proteases aumentadas. Observa-se, ainda, que a DPP-IV teve expressão aumentada tanto em SSp (60%) quanto em SSs (50%), e que a MMP-9 teve expressão aumentada em SSp (50%) (Figura 17).

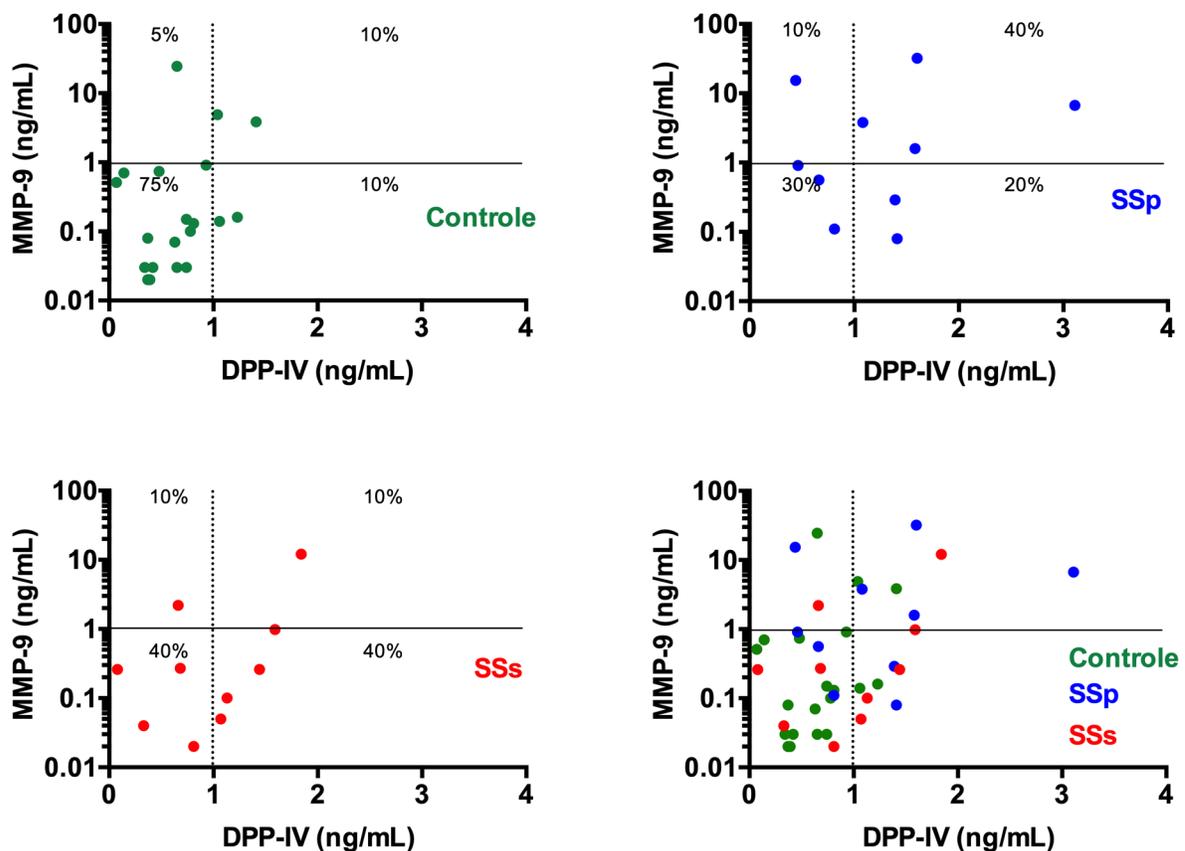


Figura 17. Expressão de DPP-IV e MMP-9 humana em subgrupos. Quanto às dosagens de DPP-IV e MMP-9 humana, de acordo com o teste de correlação de Spearman, não há diferença significativa entre os grupos ($p > 0,05$). É possível observar aumento da expressão de DPP-IV e MMP-9 conjuntamente em indivíduos SSp, sendo 40% deles com ambas as proteases aumentadas. Observa-se, ainda, que a DPP-IV teve expressão aumentada tanto em SSp (60%) quanto em SSs (50%), e que a MMP-9 teve expressão aumentada em SSp (50%).

Posto que os indivíduos SS fazem uso de medicações para controle da doença, faz-se necessária a análise das dosagens de proteases identificadas e sua relação com estes medicamentos, os quais foram agrupados da seguinte forma: corticoides, hidroxicloroquina, imunossuppressores, pilocarpina/cevimeлина, colírios, antidepressivos, anti-inflamatórios não esteroides e outros.

Primeiramente, em análise quantitativa de indivíduos que fazem uso de cada uma dessas medicações, observou-se que o uso de anti-inflamatórios esteroides e não esteroides e imunossuppressores, incluindo a hidroxicloroquina, são as principais medicações utilizadas por indivíduos SS (Figura 18).

Medicações

SSp	4	1	4	1	8	6	4	9
SSs	1	4	1	0	6	3	1	8
Controle	0	0	0	0	0	0	0	0
	Ct	H	Im	PI	CI	AD	NE	O

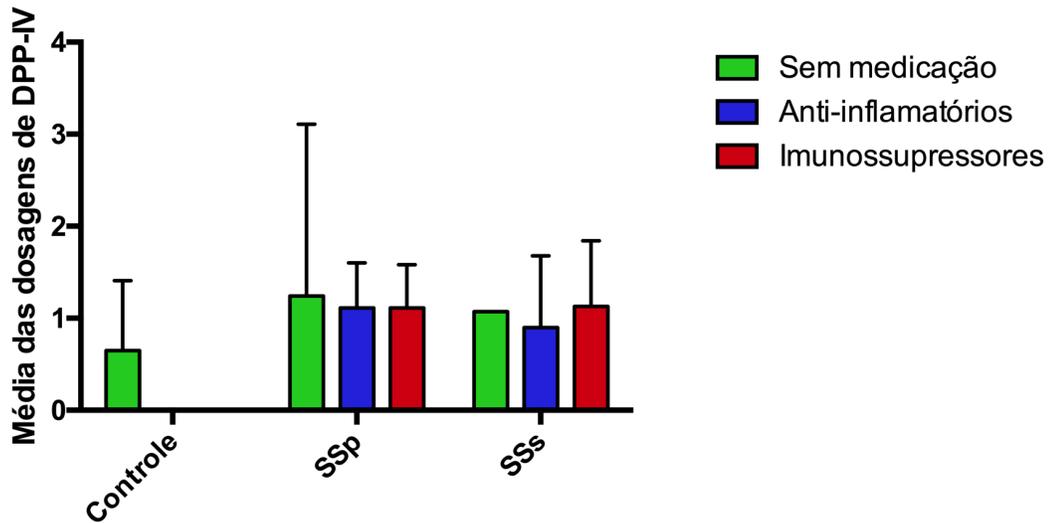
Ct – Corticosteroides
H – Hidroxicloroquina
Im – Imunossuppressores
PI – Pilocarpina
CI – Colírios
AD – Antidepressivos
NE – AINES
O – Outros

Figura 18. Uso de medicamentos. Observou-se que o uso de anti-inflamatórios esteroides e não esteroides e imunossuppressores, incluindo a hidroxicloroquina, são as principais medicações utilizadas por indivíduos SS.

Para análise desses dados, os medicamentos foram agrupados de forma simplificada: anti-inflamatórios, que compreendem os não esteroides e os esteroides, e imunossuppressores, que compreende a hidroxicloroquina, inicialmente disposta em grupo distinto. Contudo, os valores médios de dosagens dessas proteases em cada grupo, quando comparados em situações em que não há uso de medicações, uso de anti-inflamatórios e de imunossuppressores, não apresentou diferença significativa, como

é possível observar nos gráficos a seguir, para DPP-IV (Figura 19A) e para MMP-9 (Figura 19B), de acordo com o teste Row Stats com SEM.

A)



B)

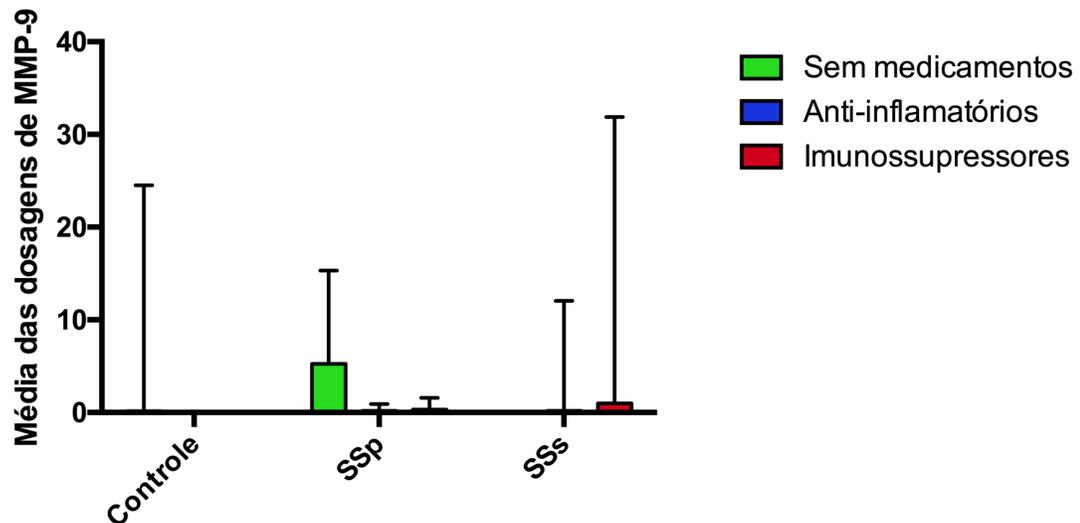


Figura 19. Relação da média das dosagens de proteases com o uso de medicamentos, nos grupos. Anti-inflamatórios compreendem os não esteroidais e os esteroidais. Imunossupressores compreendem hidroxiclороquina, inicialmente disposta em grupo distinto. O teste Row Stats com SEM não mostrou relação de dosagem de proteases com o uso de medicamentos.

Igualmente à análise dos valores médios das dosagens de proteases realizada anteriormente, procedeu-se com análise dos valores absolutos, em subgrupos. É possível observar que em indivíduos SSp, tanto os que fazem uso de anti-inflamatórios (em rosa) quanto os que fazem uso de imunossupressores (em verde), bem como os SSp que fazem uso de anti-inflamatórios não apresentaram aumento da expressão de proteases. Contudo, em SSp, 60% dos indivíduos com maior expressão de DPP-IV fazem uso de imunossupressores (Figura 20).

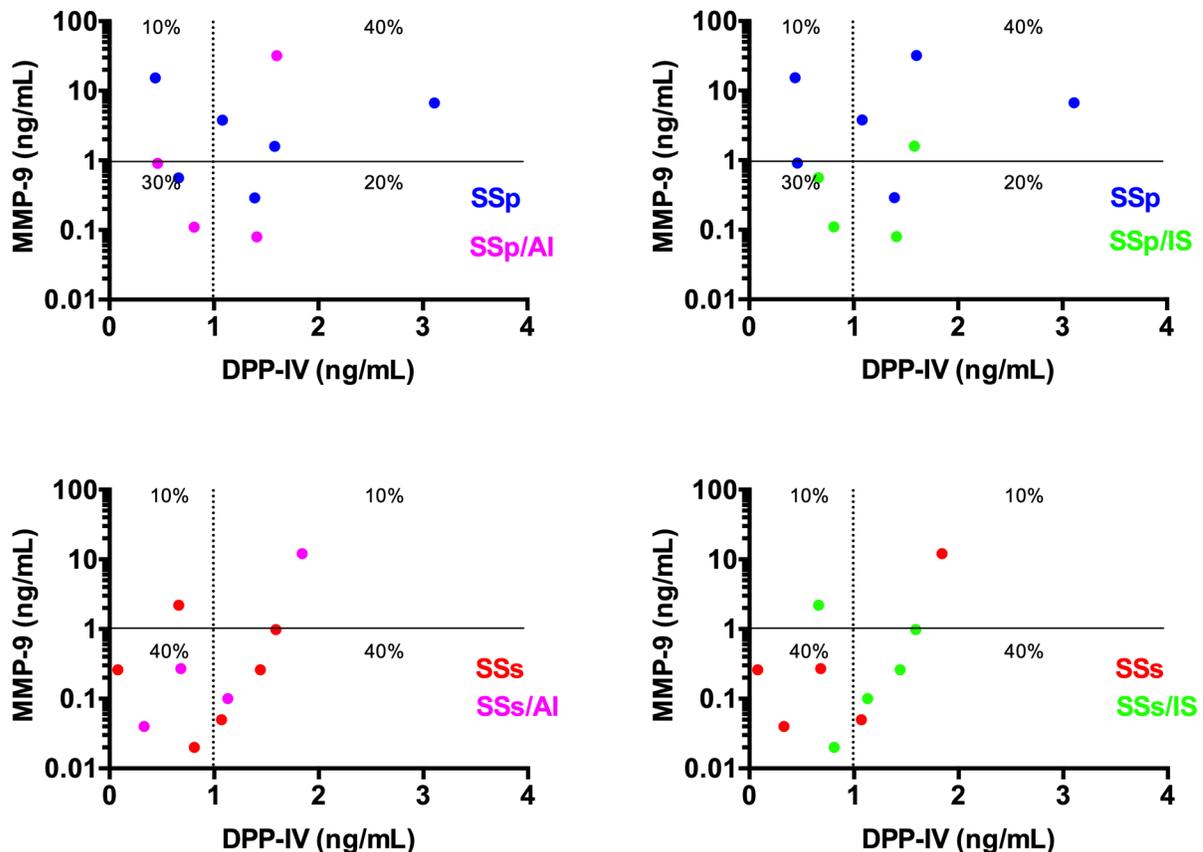


Figura 20. Relação de dosagens de proteases com o uso de medicamentos, nos grupos. 60% dos indivíduos com maior expressão de DPP-IV fazem uso de imunossupressores. Em rosa os indivíduos que fazem uso de anti-inflamatórios e em verde os que fazem uso de imunossupressores. AI: anti-inflamatórios, IS: imunossupressores.

Quanto aos resultados da análise dos dados de espectrometria de massas, no qual a saliva total estimulada foi, primeiramente, submetida a SDS-PAGE 8%, o gel foi disposto em 3 amostras de saliva de indivíduos distintos, para compor cada um dos

subgrupos. Cada coluna foi recortada individualmente e dividida em 3 partes, conforme Figura 21. Houve identificação de 683 proteínas ou fragmentos de proteínas (Apêndice A).

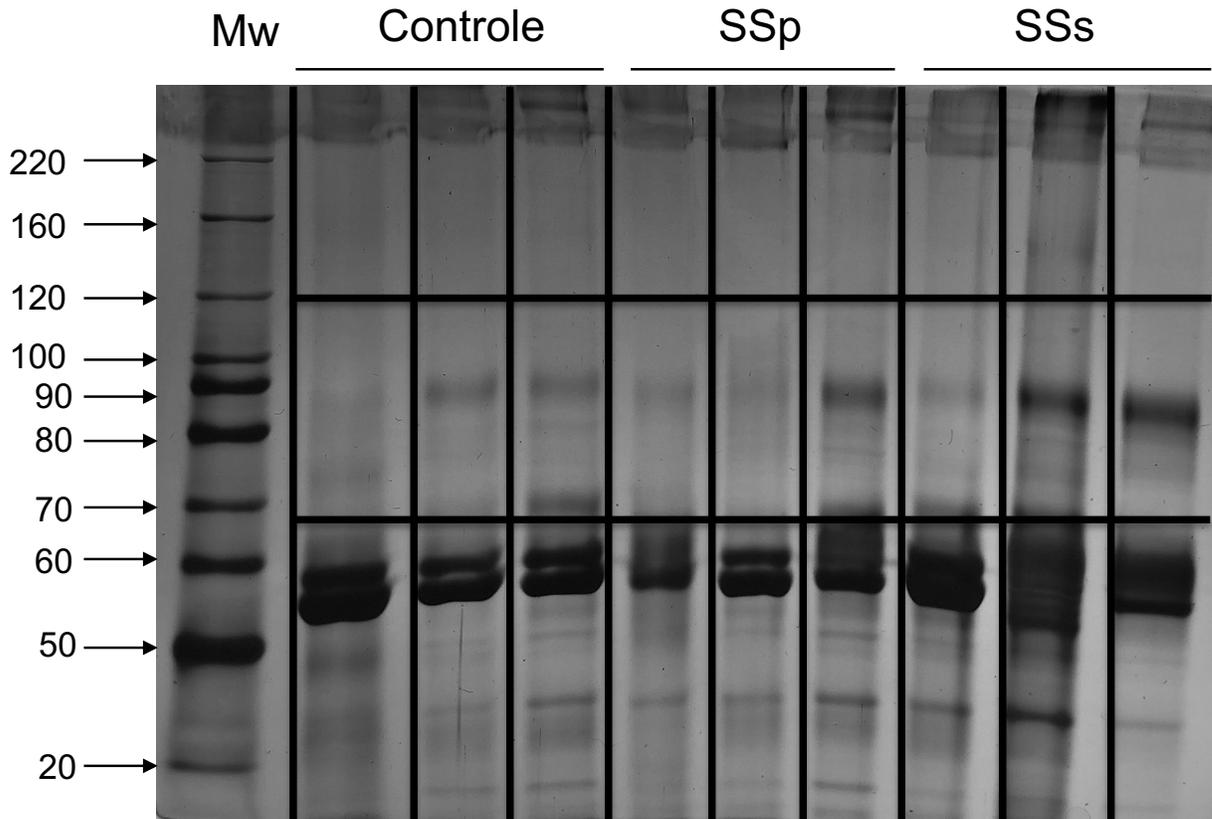


Figura 21. SDS-PAGE 8% submetido à digestão para análise em espectrometria de massas. Mw: marcador de proteínas. 500 ng de proteínas totais salivares foram submetidas em cada poço do gel. Foram 9 amostras diferentes, sendo 3 controle, 3 SSp e 3 SSs.

Dentre os resultados obtidos, DPP-IV e MMP-9 não foram constatados. No entanto, outras serino proteases expressas apenas no grupo SS foram reportadas. Em agrupamento por interações proteína-proteína por *gene symbol*, obtido pelo STRING (FABREGAT et al. 2018), observam-se 3 grandes clusters (Figura 22). Todas as análises de bioinformática foram resultantes do proteoma total obtido pelo SDS-PAGE, sendo amostras de 3 indivíduos controle, 3 SSp e 3SSs.

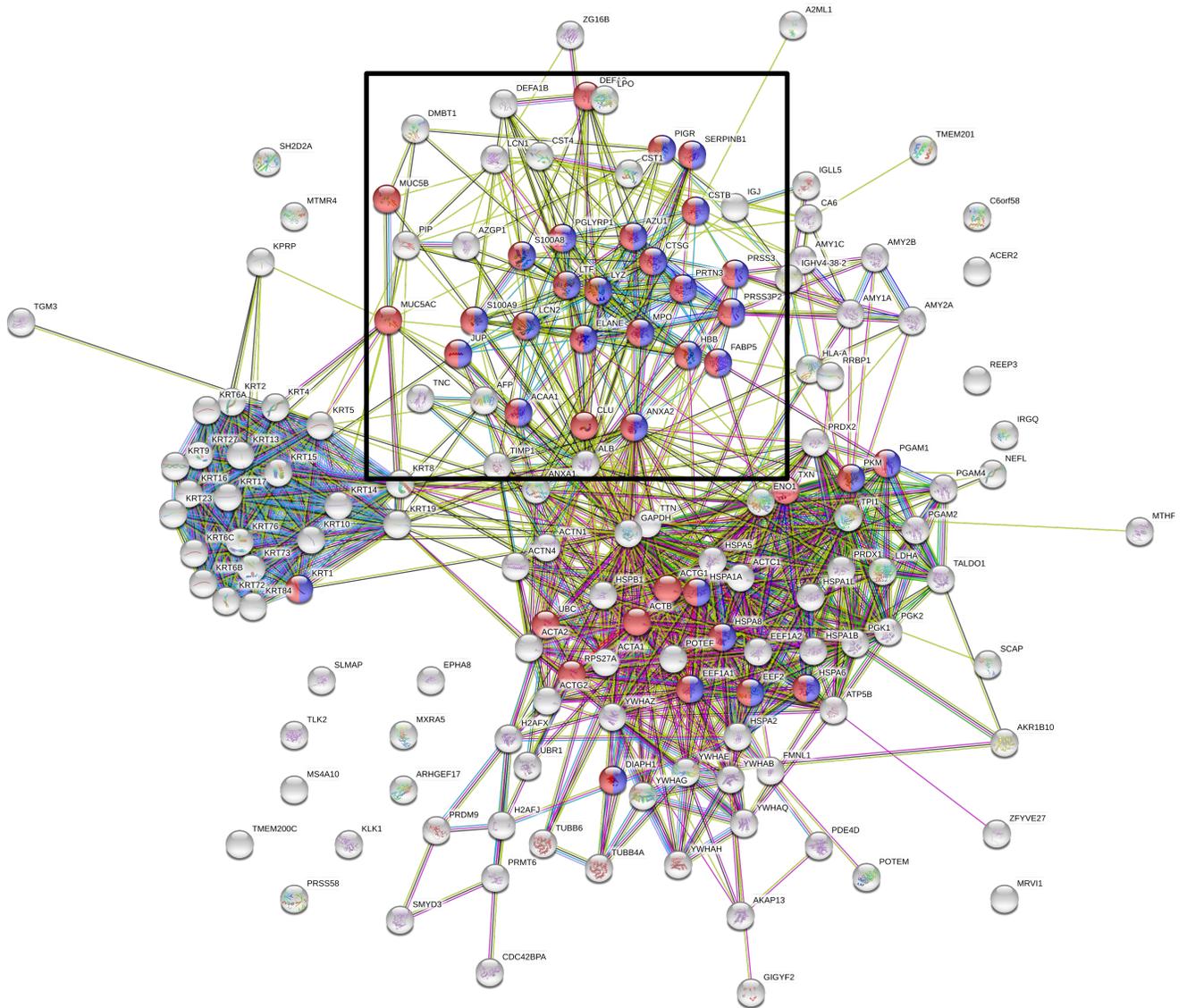


Figura 22. Interações proteína-proteína, pelo STRING. Distribuição de interações proteína-proteína, em três grandes clusters. As proteínas estão indicadas por desgranulação de neutrófilos, na cor azul, e por participação em resposta do sistema imune inato, na cor vermelha.

Dentre eles, o cluster destacado indica interações entre as serino proteases: elastase neutrofílica (ELANE), proteinase 3 (PRTN3) e catepsina G (CTSG), como observado na Figura 23.

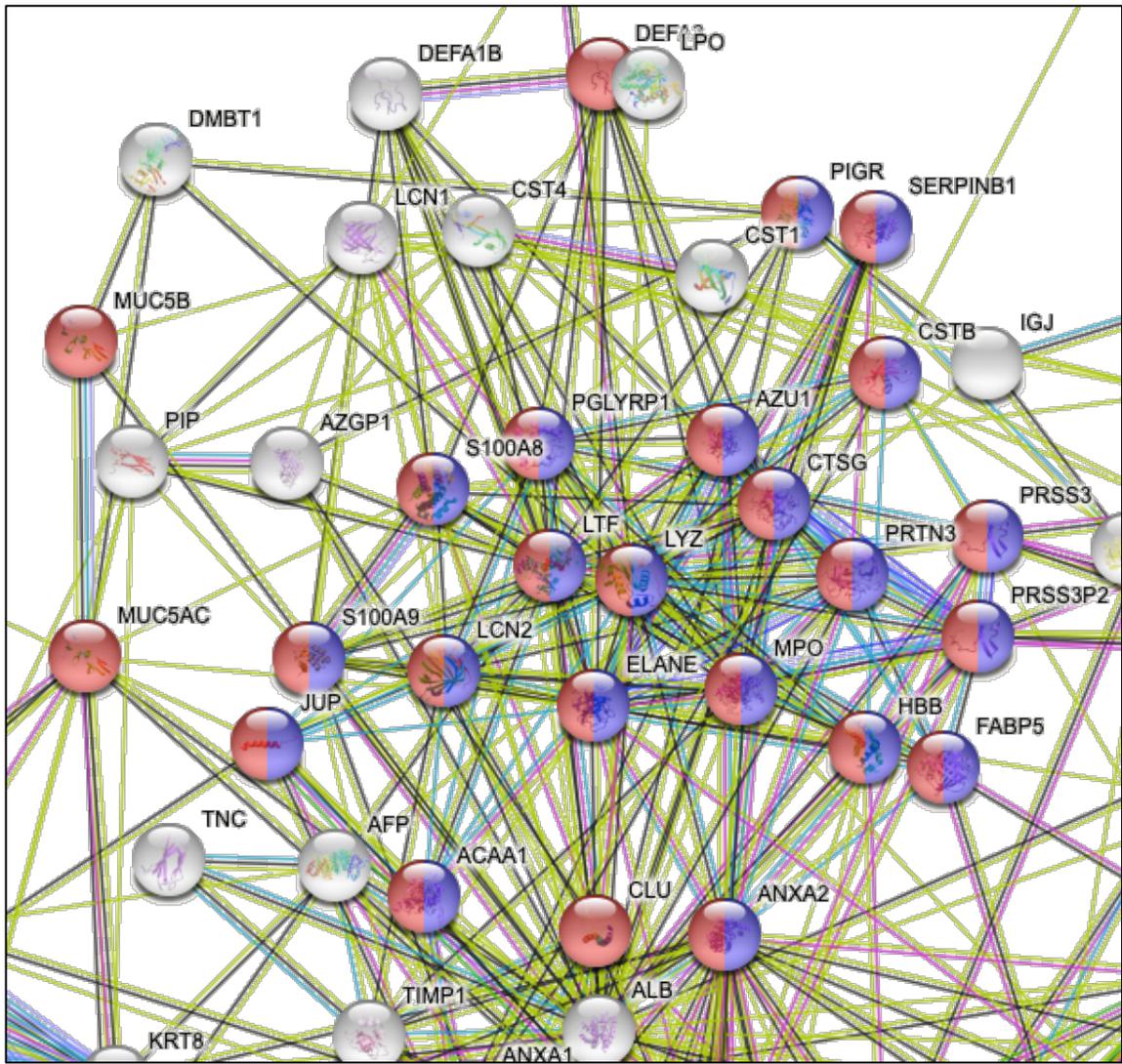


Figura 23. Cluster de interações de serino proteases, pelo STRING. Indica-se desgranulação de neutrófilos, pela cor azul, e participação em resposta do sistema imune inato, pela cor vermelha. As serino proteases elastase neutrofílica (ELANE), catepsina G (CTSG) e proteinase 3 (PRTN3) apresentam associações proteína-proteína. É importante destacar outras proteínas verificadas apenas nas amostras salivares de indivíduos SS, como: proteína induzida de prolactina (PIP), zinco-alfa2-glicoproteína (AGZP1), mieloperoxidase (MPO), calgranulina A (S100A8), calgranulina B (S100A9) e lipocalina associada a gelatinase neutrofílica (LCN2).

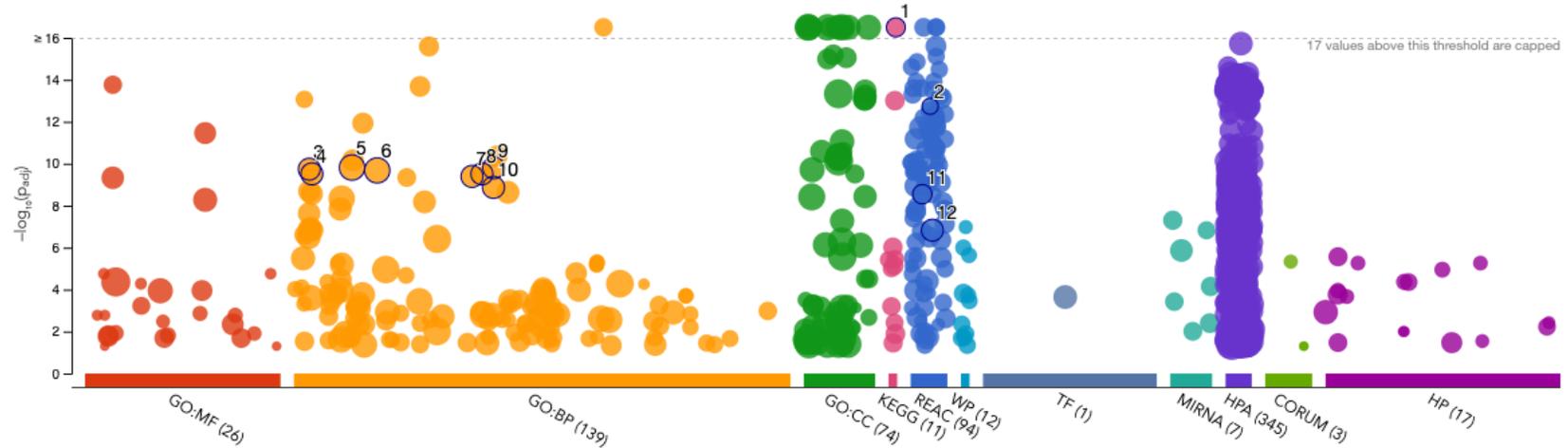
A título de complementação, a fim de enriquecer a análise de proteases, proteínas que interagem com o processo de resposta imune inflamatória observadas nas análises de espectrometria de massas foram listadas neste cluster de interações. Trata-se de proteínas verificadas apenas nas amostras salivares de indivíduos SS, como: proteína induzida de prolactina (PIP), zinco-alfa2-glicoproteína (AGZP1), mieloperoxidase (MPO),

calgranulina A (S100A8), calgranulina B (S100A9), lipocalina associada a gelatinase neutrofílica (LCN2) e inibidor de matriz metaloprotease 1 (TIMP1), TIMP-2, TIMP-3, Ainda, o inibidor de leucócito elastase e a proteína 57 do lúmen epididimal.

Além de tudo, por meio de agrupamento de termos GO por *ensembl gene ID*, utilizando-se G:Profiler, pode-se observar a distribuição de proteínas por espaço semântico, como indicações de função molecular, participação em processos biológicos e como componentes celulares. Adicionalmente, o *p*-valor de representação e o tamanho do banco de proteínas são representados (Figura 24).

Os principais resultados estão numerados de 1 a 12. Sendo 1 a semelhança com a via do lúpus eritematoso sistêmico; 2, genes envolvidos na deubiquitinação de metaloproteases, como modificações pós-traducionais; 3, 4, 7, 8, 9 e 12, a relação de neutrófilos na resposta imune e a ativação de granulócitos; 5 e 6, morte celular e morte celular programada; 10, degranulação de leucócitos; e 11, expressão genética dependente de estrógeno.

De mais a mais, submetido o banco de proteínas referente aos resultados da espectrometria de massas em *ensembl gene ID*, observou-se expressão de genes relacionados a doenças associadas à transdução do sinal, pelo Reactome. Observa-se, principalmente, acometimento em pâncreas, fígado, estômago e glândulas salivares (Figura 25).



ID	Source	Term ID	Term Name	p _{adj} (query_1)
1	KEGG	KEGG:05322	Systemic lupus erythematosus	7.287×10^{-20}
2	REAC	REAC:R-HSA-5...	Metalloprotease DUBs	1.833×10^{-13}
3	GO:BP	GO:0002283	neutrophil activation involved in immune respo...	1.824×10^{-10}
4	GO:BP	GO:0002446	neutrophil mediated immunity	3.063×10^{-10}
5	GO:BP	GO:0008219	cell death	1.527×10^{-10}
6	GO:BP	GO:0012501	programmed cell death	2.098×10^{-10}
7	GO:BP	GO:0036230	granulocyte activation	4.040×10^{-10}
8	GO:BP	GO:0042119	neutrophil activation	3.063×10^{-10}
9	GO:BP	GO:0043312	neutrophil degranulation	1.580×10^{-10}
10	GO:BP	GO:0043299	leukocyte degranulation	1.340×10^{-9}
11	REAC	REAC:R-HSA-9...	Estrogen-dependent gene expression	2.849×10^{-9}
12	REAC	REAC:R-HSA-6...	Neutrophil degranulation	1.482×10^{-7}

version e98_eg45_p14_bca6d38
date 04/11/2019 13:39:01
organism hsapiens

g:Profiler

Figura 24. Agrupamento de termos GO, pelo G:Profiler. Distribuição por espaço semântico, p-valor de representação em escala logarítmica e tamanho no banco de proteínas. GO: MF (26) indica função molecular, GO: BP (139) indica processos biológicos, GO: CC (74) indica componentes celulares. KEGG, REAC e WP indicam presença em vias biológicas. TF e miRNA indicam motivos regulatórios. HPA e CORUM indicam bancos de dados de proteínas. HP indica o fenótipo ontológico humano. Os achados mais importantes foram numerados, de acordo com tabela subsequente.

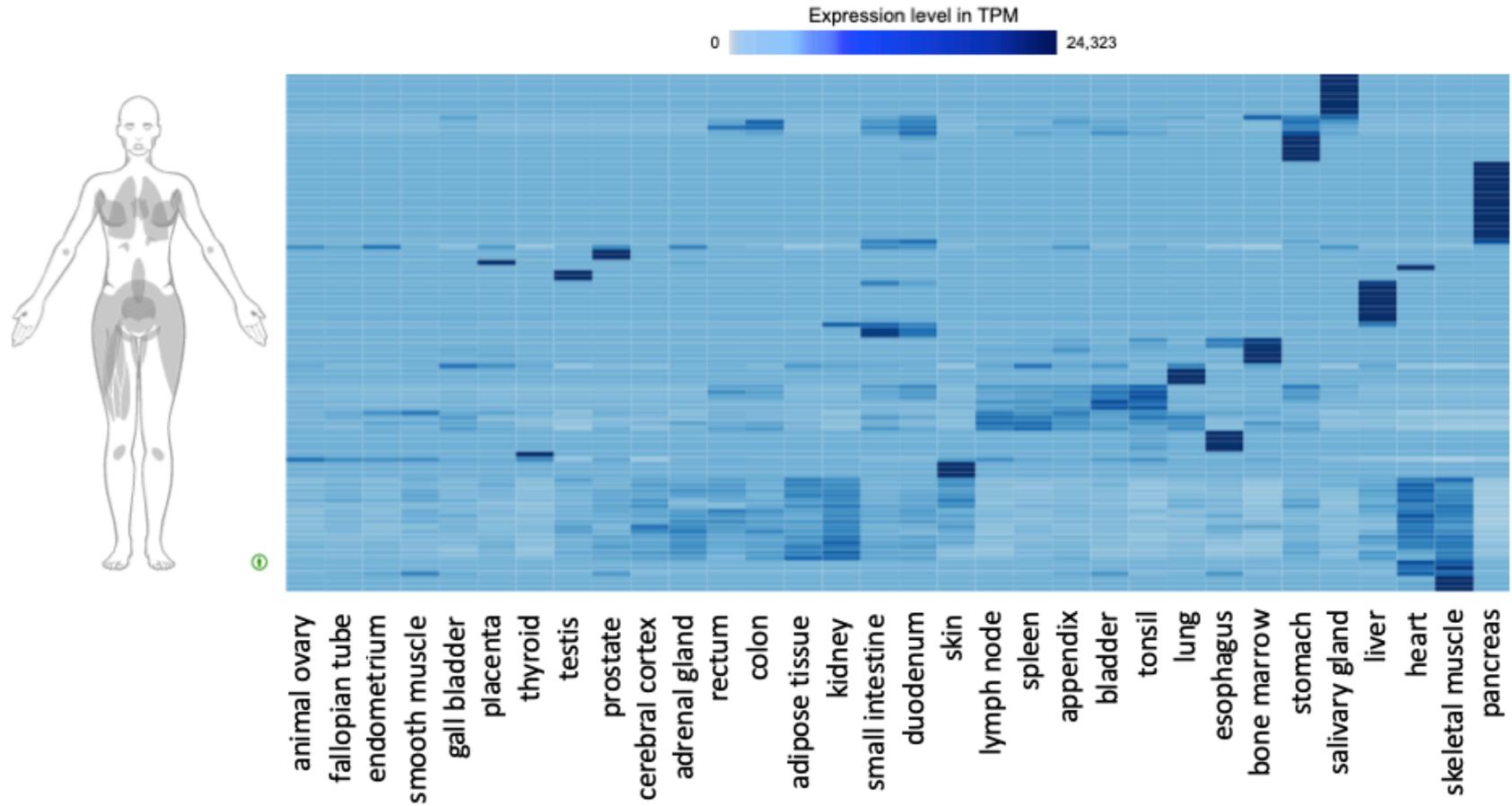


Figura 25. Expressão de genes relacionados a doenças associadas à transdução do sinal, pelo Reactome. A maior expressão de genes envolvidos em doenças associadas à transdução do sinal apresentam-se em tons de azul escuro. Observa-se, principalmente, acometimento em pâncreas, fígado, estômago e glândulas salivares.



DISCUSSÃO

DISCUSSÃO

A Síndrome de Sjögren é uma exocrinopatia que compromete, principalmente, as glândulas salivares e lacrimais (BRITO-ZÉRON et al. 2016). Sendo a saliva um meio diagnóstico potencial em investigações moleculares, capaz de exibir padrões com significados biológicos locais e sistêmicos, o seu uso em SS pode fornecer informações quanto ao processo de inflamação crônica glandular e sua mediação autoimune, bem como informações referentes a órgãos distantes, acometidos pela síndrome (FISCHER; EICH; RUSSELL, 1998).

Para tal, é fundamental que a coleta do fluido salivar seja padronizada e o padrão de secreção proteica em saliva sejam avaliados, a fim de investigar possíveis biomarcadores salivares (HU, 2007). Sendo assim, como o presente estudo é em modelo epidemiológico, ou seja, tem por objetivo analisar como a saliva de uma amostra de populacional ou de conveniência é representada biologicamente (CORTES, 1993), os experimentos de caracterização proteolítica e os ensaios imunoenzimáticos foram realizados em volume de saliva e não em concentração proteica.

É relevante destacar que o uso da saliva total estimulada nos experimentos deste trabalho se assemelha aos estímulos contínuos diários da produção salivar em mastigação e fala. Ainda, a coleta estimulada por meios mastigatórios apresenta menor variação na concentração proteica, além de oferecer maior volume de saliva e baixos níveis de glicoproteínas (JASIN et al. 2016).

Em conformidade com o objetivo deste trabalho, é essencial evidenciar que a análise proteolítica pode apontar para uma via imunológica inflamatória ou para moduladores da resposta imune que estejam mais proeminentes nas amostras salivares (CHMELAR et al, 2007). Logo, os achados proteolíticos em saliva podem destacar situações de homeostase ou desequilíbrio biológico, visto que diversas proteases estão envolvidas em processos fisiológicos ou patológicos, regulando a ativação de cascatas proteolíticas (AMARA et al. 2009).

De acordo com o banco de dados de peptidases *online MEROPS* (merops.sanger.ac.uk), a protease capaz de clivar o peptídeo que possui o aminoácido prolina na posição C terminal, ou seja, em seu sítio de clivagem, é pertencente à família

de serino-proteases. Assim, a protease que hidrolisa a ligação peptídica no substrato Gly-Pro-AMC é uma serino-protease (NEITZEL, 2010). Ainda, trata-se de uma dipeptidase, visto que a protease cliva um substrato formado por dois aminoácidos (BARRETT; RAWLINGS, 1995). Adicionalmente, a literatura relata que a dipeptidil peptidase IV (DPP-IV), exopeptidase pertencente à família proil-oligopeptidase, da classe de serino-proteases (Figura 25), possui especificidade pelo substrato Gly-Pro-AMC (POLGÁR et al. 2002).

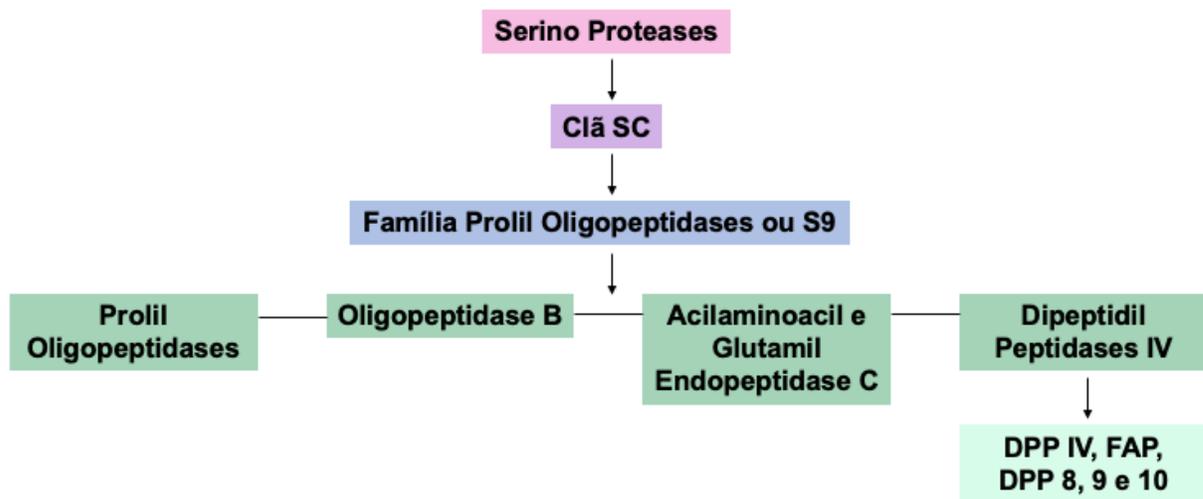


Figura 26. Classe de serino proteases, até a DPP-IV. Adaptado de (BASTOS et al. 2013)

Dessa forma, a hipótese inicial referente à hidrólise do substrato Gly-Pro-AMC por protease presente na saliva é de que seria devido à DPP-IV. No entanto, faz-se necessária a inibição de atividade proteolítica por inibidores de proteases específicos, para, então, caracterizar uma protease (BASTOS et al. 2013).

Portanto, AEBSF como inibidor irreversível e específico de serino-proteases (LAWANDI et al. 2010) e sitagliptina como inibidor altamente seletivo para DPP-IV (WU et al. 2017) mostraram-se capazes de inibir a atividade proteolítica nas amostras de saliva, em presença do substrato fluorogênico Gly-Pro-AMC. É essencial ressaltar que a seletividade por DPP-IV característica da sitagliptina não envolve inibição de proteases que compartilham um grau de semelhança, por pertencerem à mesma família de proteases, com é o caso da DPP-8 e da DPP-9 (AHRÉN, 2007). Por conseguinte, a

presença de serino-proteases é confirmada tendo em vista a inibição por AEBSF, sendo que, dentre elas, especificamente a DPP-IV é a responsável pela proteólise de Gly-Pro-AMC, visto que a sitagliptina foi eficiente em inibir 90% da atividade proteolítica.

A sitagliptina já vem sendo vastamente utilizada como fármaco para inibição de DPP-IV, tendo em vista o controle metabólico, em diabetes mellitus (BAE et al. 2016). Embora os principais inibidores de DPP-IV, sitagliptina e vitagliptina, estejam relacionados com o aumento da secreção de insulina e a redução da degradação de peptídeos (POLGÁR et al. 2002), visto que a peptidase está associada à diabetes e à obesidade (LESSARD et al. 2015), este estudo teve como critério de exclusão em amostra de conveniência os pacientes diabéticos. Por conseguinte, não há interferências da atividade proteolítica da DPP-IV por razão dessa desordem metabólica.

Adicionalmente, a fim de corroborar a caracterização proteolítica, o ensaio imunoenzimático para DPP-IV/CD26 humana, realizado em toda amostra de conveniência, reafirmou a presença da DPP-IV e constatou que a protease está mais expressa ($p < 0,05$) em indivíduos SS. Até então, a expressão elevada da DPP-IV não havia sido relatada na saliva de indivíduos SS. Em estudo de avaliação proteômica em saliva total de indivíduos com SSp (AQRAWI et al. 2017), a DPP-IV não foi identificada por Orbitrap. Contudo, as seguintes proteases mostraram-se reguladas positivamente: Xaa-Pro dipeptidase, a qual cliva Gly-Pro-NHPhNO₂; e DPP-3, a qual se enquadra na família de metaloproteases.

As DPP-IV, também conhecidas como proteínas de superfície celular de linfócitos (CD26), são exopeptidases dispostas em forma dimérica, com peso molecular de 220 kDa. Em atividade, elas liberam dipeptídeos X-Pro ou X-Ala (MENTLEIN, 2005). Estas peptidases agem em hormônios de controle fisiológico do metabolismo glicêmico, como as incretinas GLP-1 e GIP, visto que aumentam a secreção de insulina e reduzem a secreção de glucagon (CAPUANO et al. 2013).

As DPP-IV atuam como receptores e participam da transdução de sinais e da adesão (ZHANG et al. 2015). Assim, são encontradas no citossol, ligadas à membrana celular, o que as diferencia das demais dipeptidil peptidases (PÓLGAR et al. 2002). Essa peptidase tem sido potencial tratamento em desordens neurológicas, hormonais e

metabólicas, como Alzheimer, depressão, pressão sanguínea anormal, doença celíaca e diabetes tipo II (BASTOS et al. 2013).

Sugere-se que as DPP-IV estejam envolvidas em interações de matriz extracelular, particularmente com o colágeno (JOHSON et al. 1993), em domínio não catalítico (LÖSTER et al. 1995). Essas interações são indicativas de processo inflamatório, visto que a hidrólise do colágeno significa comprometimento estrutural do tecido conjuntivo. Além disso, a relação dessa peptidase com processos imunológicos se dá por funcionar como uma exoenzima na superfície de linfócitos (HARSTAD et al. 2013). Portanto, a maior atividade específica total da DPP-IV em pacientes acometidos pela SS no presente estudo pode estar relacionada com processos imunológicos e inflamatórios da patogênese da SS, a qual apresenta infiltrado linfocitário em glândulas salivares (DANIELS, 1984).

No que diz respeito à concentração proteica salivar, embora a saliva total de indivíduos SS tenha se apresentado menos concentrada, a atividade proteolítica sob Gly-Pro-AMC foi mais intensa nessas amostras. Sugere-se, portanto, que a saliva SS tenha sua biossíntese comprometida, visto que as glândulas salivares sofrem progressiva degradação (KROESE; HAACKE; BOMBARDIERI, 2018), no entanto, com maior concentração de DPP-IV ativa, dentre as demais proteínas constituintes nas amostras salivares.

Contudo, é fundamental ressaltar que valores padrão de amplitude de concentração proteica salivar na população mundial não estão claramente determinados (EDGAR; DAWES; O'MULLANE, 2012), já que fatores individuais como idade, enzimas bacterianas e atividade proteolítica, e fatores externos como o método de coleta e o processamento e preservação salivar, afetam a composição salivar. Dessa forma, a literatura aponta que há diferentes concentrações proteicas salivares em condições fisiológicas semelhantes (NUNES; MUSSAVIRA; BINDHU, 2015).

Além da DPP-IV, outras serino-proteases foram identificadas em saliva SS por meio da espectrometria de massas: elastase neutrofílica (ELANE), a catepsina G (CTSG) e a proteinase 3 (PRTN3). Essas proteases compartilham a mesma classificação, em superfamília das quimotripsinas, família SA1 e, além disso, são provenientes de grânulos azurofílicos de neutrófilos polimorfonucleares (PMN). Esses grânulos são secretados em

processo de fagocitose, na resposta imune inata, juntamente a enzimas e espécies reativas de oxigênio (KOBAYASHI et al. 2005), como é o caso da mieloperoxidase, também identificada em saliva SS por espectrometria de massas. É importante destacar que as quimotripsinas realizam hidrólise específica em grupos carboxil compostos por aminoácidos aromáticos, como fenilalanina, tirosina e triptofano (RAO et al. 1998).

Ainda, essas quimotripsinas, juntamente com a mieloperoxidase, compõem o material liberado por neutrófilos nas chamadas armadilhas extracelulares de neutrófilos, também conhecidas como NETs (*neutrophil extracellular traps*). Trata-se de uma morte celular capaz de matar patógenos extracelulares, na qual o DNA é liberado em rede, simultaneamente a moléculas imunoestimulatórias, detendo o patógeno em barreira física e química (BRINKMANN et al. 2004). Essas formações induzem uma potente resposta inflamatória, visto que exibem intensa fonte de autoantígenos (GOEL; KAPLAN, 2019) e já foram reportadas em doenças autoimunes, como artrite reumatoide (KHANDPUR et al. 2013).

Além disso, essas proteases têm papel importante em processo inflamatório e reparo tecidual, por meio da secreção de fatores pró-inflamatórios (RAWLINGS et al. 2008). Com aproximadamente 30kDa, sugere-se que a NE participe do processo de modificações pós-traducionais da MMP-2 (RICE; BANDA, 1995). Dessa forma, a NE produzida por células de defesa pode atuar de forma proteolítica na destruição de cartilagem na artrite reumatoide, doença prevalente em SSs (BAICI et al. 1982). É relevante salientar que a PR3 cliva pro-IL-8 na ligação Ala-Lys e torna a interleucina-8 ativa (KORKMAZ et al. 2010), pois a IL-8 tem sido relatada em elevada concentração nas biópsia de glândulas salivares menores, em SS (CUELLO et al. 1998) e em lágrimas de indivíduos SS com secura ocular, em condições cotidianas de estresse (LÓPEZ-MIGUEL et al. 2016).

De acordo com o *MEROPS*, a sequência de peptídeos Gly-Pro não é hidrolisada pelas serino-proteases ELANE, CTSG ou PRTN3. No entanto, ELANE está relacionada com a digestão de componentes da matriz extracelular, por PMN, como Pro-Gly-Phe-Gly-Gly-Pro-Asn-Cys (laminina subunidade gamma-2) e Leu-Gly-Pro-Val-Thr-Pro-Glu-Ile (matriz metaloprotease-2 ou MMP-2), característica de processos inflamatórios. Ainda, constatou-se em espectrometria de massas a presença de inibidores da atividade de

serinoproteases, como proteína 57 do lúmen epididimal e inibidor de leucócito elastase, o que evidencia que tais proteases são moduladas. Além disso, esses inibidores endógenos são capazes de regular a atividade de ELANE, CTSG e PRTN3 (KORKMAZ et al. 2010).

Quanto às proteínas relevantes ao processo imune inflamatório da doença, identificadas nas análises dos dados da espectrometria de massas, enumeram-se a seguir aquelas que se destacam no cluster obtido pelo STRING, o qual envolve estas serino proteases, a fim de enriquecer a análise de expressão de proteases condizente com este trabalho.

A zinco-alfa2-glicoproteína (ZAG), encontrada tanto em SSp quanto em SSs. Sua estrutura é arranjada em polipeptídios quaternários, semelhantemente à molécula de MHC de classe I (HASSAN et al. 2008), a qual é regulada positivamente em indivíduos SS (SPACHIDOU et al. 2007). Além dessa, as proteínas S100 A-8 (calgranulina A) e S100 A-9 (calgranulina B) são heterodímeros envolvidos em processos inflamatórios agudos e crônicos, já reportadas como mais expressas em indivíduos SS com linfoma (JAZZAR et al. 2018). Essas proteínas ativam leucócitos via TLR-4 (SIMARD et al. 2013), os quais são expressos em células de glândulas submandibulares (KIRIPOLSKY et al. 2017). Além de tudo, essas proteínas vêm sendo descritas como potenciais biomarcadores para artrite reumatoide, doença prevalente em SSs (HOLZINGER; FOELL; KESSEL, 2018).

Quanto às zimografias, considerando que as gelatinases são aptas a degradar componentes da matriz extracelular, como gelatina, fibronectina e laminina, bem como substratos que não compõe a matriz, como as serpinas, inibidor da via do fator tecidual e fator de crescimento semelhante à insulina (BRINCKRHOFF; MATRISIAN, 2002), a variedade de bandas de atividade proteolítica, em toda a amostra de conveniência, está relacionada com a extensa variedade de tipos catalíticos capazes de hidrolisar gelatina, dentre eles as metaloproteases e outras classes de proteases (MACIEJCZYK et al. 2016).

Tendo em vista a diversidade de tipos catalíticos capazes de clivar gelatina e seus resíduos, especialmente da MMP-9, que degrada colágeno tipo IV, V, VII, X, XIV, agrecanos, elastina, fibronectina e gelatina (MACIEJCZYK et al. 2016), é necessária

caracterização de protease envolvendo diversificados inibidores específicos (BERTHONNEAU et al. 2000, LEVIN et al. 2017).

Portanto, utilizou-se para inibições específicas: AEBSF, para de serino proteases; E-64, para cisteíno proteases; e EDTA, para metaloproteases. Percebe-se que não houve inibição evidente nas bandas de atividade referentes a serino e cisteíno proteases. Contudo, a expressiva inibição das bandas de atividade proteolítica em zimografia por EDTA, confirmou a presença de metaloproteases nas amostras salivares, visto que o inibidor atua como agente quelante em protease dependente de cátions bivalentes (SOUZA et al. 2001).

Nota-se que a banda proteolítica de aproximadamente 90 kDa foi claramente inibida por EDTA, na Figura 15, o que apresenta similaridade com o peso molecular da MMP-9 ativa, de 86 kDa. Além disso, considerando as investigações acerca das MMP-9, elas podem ser liberadas de sua biossíntese tanto nas formas de monômeros quanto em dímeros (ROOMI et al. 2014). Assim, as formas diméricas podem tanto estar associadas a progressões tumorais agressivas, quanto à migração celular (DUFOR et al. 2010). Contudo, é possível a formação de oligômeros (COLLIER et al, 2011) e de formas truncadas de MMP-9, com 82 kDa e 65 kDa, já que a protease é formada por múltiplos domínios (BELLINI et al. 2011). Um complexo heteromérico conhecido que protege a MMP-9 de sofrer degradação proteolítica é a lipocalina associada à gelatinase neutrofílica (gelatinase B ou MMP-9), com 125 kDa, (TRIEBEL et al. 1992). Adicionalmente, em modificações pós-traducionais, há 14 potenciais sítios de glicosilações no domínio O-glicosilado (MATTU et al. 2000; VAN DEN STEEN et al. 2006). A variedade de pesos moleculares da MMP-9 ativa pode ser observada na Figura 12.

Dessa forma, as MMP-9 podem exibir pesos moleculares variados, como observados nas zimografias deste trabalho. No âmbito de aproximadamente 220 kDa, sendo um dímero, um complexo com outras proteínas (WOESSNER, 1995) ou um oligômero de MMP-9 (VANDOOREN; VAN DEN STEEN; OPDENAKKER, 2013), a banda de peso molecular referente a > 220 kDa, apresentou atividade mais intensa ($p < 0,05$) em indivíduos SS. Ainda, como as zimografias são géis de atividade e, portanto, não têm suas amostras fervidas para que não haja degradação e desnaturação proteicas, a

massa molecular visualizada nesta técnica é aproximada à massa real (REN; CHEN; KHALIL, 2018).

Contudo, a banda de aproximadamente 40 kDa não foi inibida por EDTA. Possivelmente, a atividade proteolítica também não se relaciona com NE, de 30 kDa, pois, apesar de peso molecular aproximado, esperar-se-ia que essa banda fosse inibida por AEBSF (YAMASHITA et al. 2001). Entretanto, a inibição de serino proteases por AEBSF, embora vastamente utilizada e efetiva, não é absoluta. Observa-se também que CG tem sua atividade proteolítica inibida por AEBSF (SCHUSTER et al. 2007). No entanto, PR3, com 29 kDa, não apresenta registros na literatura. Dessa forma, como no experimento não foi testado o inibidor de ácido aspártico Pepstatina A, é possível que a banda de atividade em questão pertença a essa classe de proteases (TURK; TURK; TURK, 2012).

Adicionalmente, nos achados da espectrometria de massas foi possível determinar a presença de proteína induzida de prolactina. De acordo com o banco de proteínas *online UniProtKB* (www.uniprot.org), trata-se de um polipeptídeo com atividade de endopeptidase do tipo aspártico, a qual é expressa em condições patológicas de glândulas salivares, com papel importante em imunidade inata e adquirida (EDECHI et al. 2019). No entanto, com 15 kDa não há relação com a banda de 40 kDa não inibida por EDTA. Portanto, baseado nos ensaios realizados, não se pôde afirmar a natureza desta protease com peso molecular de aproximadamente 40 kDa.

Subsequentemente, tendo em vista a similaridade com o peso molecular da MMP-9 ativa e a sua predileção catalítica, procedeu-se com teste ELISA para MMP-9 humana. Os dados das dosagens de MMP-9 por imunofluorescência corroboram com o resultado da caracterização proteolítica. Desse modo, o ensaio imunoenzimático reafirmou a presença de metaloprotease e indicou que a MMP-9 está envolvida na proteólise da gelatina, em zimografia. Além disso, sua expressão mostrou-se aumentada ($p < 0,05$) em indivíduos SS, quando comparados o grupo controle e SSp.

As metaloproteases de matriz extracelular (MMP) são endopeptidases dependentes de íons bivalentes, como cálcio e zinco, que hidrolisam proteínas da matriz extracelular. Com mais de 20 famílias identificadas, as MMPs apresentam extensa variedade de tipos catalíticos. Dessa forma, podem ser classificadas por sua estrutura,

levando em consideração o arranjo tridimensional e os domínios em comum, como o pró-domínio, o domínio catalítico, o domínio da hemopexina e o domínio transmembrana. Também podem ser classificadas pelo substrato específico que hidrolisam, sendo: collagenases (MMP-1, MMP-8 e MMP-13), gelatinases (MMP-2 e MMP-9), estromelinas (MMP-3 e MMP-10), matrilisinas (MMP-7 e MMP-26), entre outras (MACIEJCZYK et al. 2016), como observado na Figura 27.

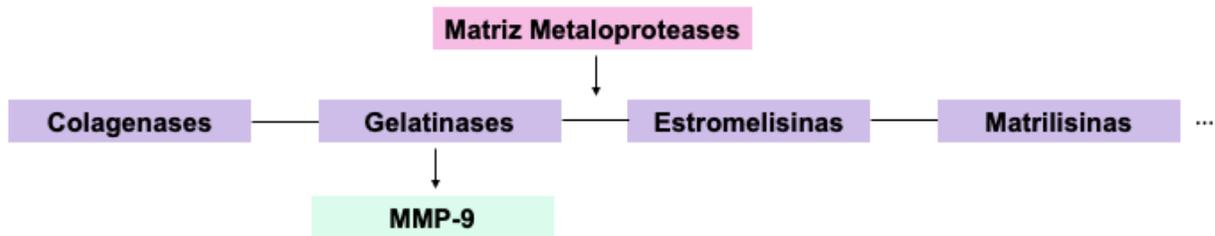


Figura 27. Classe de metaloproteases, até a MMP-9. Adaptado de (MACIEJCZYK et al. 2016).

As MMPs são então sintetizadas em forma inativa, sendo a clivagem do pró-domínio fundamental para que o sítio ativo fique exposto e ela saia da forma de latência, tornando-se uma protease ativa. O domínio transmembrana caracteriza a enzima como tendo sua expressão em superfícies celulares. Assim, as MMP-9 são gelatinases que possuem três domínios de fibronectina tipo II (NAGASE; WOESSER, 1999). Sua expressão é mediada pela citocina pró-inflamatória TNF- α (MANICONE; MCGUIRE, 2008).

Geralmente as MMPs estão envolvidas em processos fisiológicos tissulares de desenvolvimento e reparo. No entanto, o aumento dessas proteases remete a processos inflamatórios e patológicos. Assim, a expressão desregulada dessas proteases provoca aumento de sua atividade proteolítica, a qual mantém forte relação de associação com doenças inflamatórias (GOMIS-RÜTH et al. 1997), como câncer (MCCAWLEY et al. 2000) e doenças autoimunes, como o lúpus (VIRA et al. 2018).

As MMPs tanto são expressas por fatores como quimiocinas, citocinas e fatores de crescimento, quanto também podem degradar tais elementos (SOLOMONOV et al. 2016). Assim, em circunstâncias de desequilíbrio entre a expressão dessas proteases e

de seus inibidores, pode ocorrer um processo patológico no qual se observa resposta inflamatória, remodelação tecidual, migração e crescimento celular (RAO et al. 1998).

No processo inflamatório da SS são liberados MMP-1, MMP-2, MMP3 e MMP-9, dentre essas, as gelatinases são MMP-2 (gelatinase A) e MMP-9 (gelatinase B). Tanto as MMP-2 quanto as MMP-9 são proteases passíveis de serem visualizadas por meio da zimografia de gelatina. As MMP-1 e MMP-3 podem ser visualizadas por meio de outras técnicas, como ensaios imunológicos e ensaios fluorimétricos (MACIEJCZYK et al. 2016).

Há evidências de MMPs em pacientes acometidos por SS, com inflamação crônica glandular (WILDENBERG et al. 2008). Além disso, o aumento da atividade gelatinolítica de MMP-2 e MMP-9 foi observado em saliva total de ratos não obesos diabéticos com SS (LESSARD et al. 2015), e a expressão intensificada de MMP-9 em saliva (AQRAWI et al. 2017) já foi relatada em humanos acometidos por SS.

Ademais, há indícios na literatura que sugerem que as MMP modulam um arranjo de proteases. Isso significa que elas influenciariam uma cadeia de proteases, pelos substratos que clivam e por como essas proteínas interagem entre si, conduzindo ou modificando a sequência de processos enzimáticos (BUTLER; OVERALL, 2009). Sendo assim, a degradação da matriz extracelular, por meio da atividade proteolítica das MMPs, provoca efeitos que influenciam a migração celular, a morfologia, a expressão de genes e a ativação de reações intracelulares em cascata (SOLOMONOV et al. 2016). Dessa forma, as MMP são alvos potencialmente terapêuticos para diversas patologias.

Considerando-se que inibidores de metaloproteases regulam endogenamente as MMPs ativas (LEVIN et al. 2017) e que foram detectados nas salivas SS, em espectrometria de massas, isso demonstra que há modulação da atividade proteolítica nessas amostras salivares. Para mais, estes inibidores em saliva SS, TIMP-1, TIMP-2 e TIMP-3, coíbem a ativação da MMP-9 (RATHNAYAKE et al. 2017). De forma geral, a inibição por TIMP não é seletiva, exceto por TIMP-1 que se considera exibir certa seletividade por MMP-7 (NAGASE; VISSÉ; MURPHY, 2006).

Ainda, a lipocalina associada à gelatinase neutrofílica já foi relatada como regulada positivamente em indivíduos SSp (AQRAWI et al. 2017). Nos resultados adquiridos por este trabalho, a isoforma 2 desta lipocalina foi identificada em indivíduos SSs. De acordo com o banco de proteínas *online UniProtKB* (www.uniprot.org), trata-se de uma lipocalina

que interage seletivamente com MMP-9, de forma não covalente. É envolvida em diversos processos, como em resposta imune inata e em apoptose (KJELDSEN et al, 1994), além de ser bastante expressa em glândulas salivares (COWLAND; BORREGAARD, 1997).

Neste trabalho, não foi possível identificar a DPP-IV e a MMP-9 por espectrometria de massas, possivelmente, por estas proteases representarem baixa concentração endógena frente a outras proteínas constitutivas (RUHL, 2012). Além disso, sabe-se que praticamente todos os processos, fisiológicos ou patológicos, são modulados por modificações pós-traducionais (PTM) (KAMATH et al. 2011). Como as PTM produzem diversas isoformas de proteínas, isso pode dificultar a sua identificação (ONG; MANN, 2005).

Ademais, sabe-se que há proteases que podem ser muito glicosiladas, característica que previne que sofram proteólise. Este é o caso da DPP-IV e, principalmente, da MMP-9, que pode receber até 14 glicosilações em um domínio específico (MATTU et al. 2000; VAN DEN STEEN et al. 2006). Contudo, as glicosilações atrapalham a digestão por tripsina e dificultam a interação com C18. Tendo em vista essas dificuldades previstas no método, recentemente foi desenvolvida uma quimotripsina que cliva após Asn (chymotrypsin, ChyB-Asn). Os resultados apresentados evidenciaram diferenças na detecção de proteínas glicosiladas, em método qualitativo e quantitativo por LC-MS/MS (RAMESH et al. 2019).

Outra hipótese é a de que pode ter ocorrido perda de amostra, devido ao entupimento de coluna de cromatografia. Adicionalmente, como há diversos métodos de preparação de amostra que podem otimizar a identificação e aquisição de proteínas em saliva total, o método de preparação de amostra filtrado (FASP) com *pool* salivar parece ser promissor (ZHANG; SADOWSKI; PUNYADEERA, 2019). Apesar de tudo, os ensaios imunoenzimáticos deste trabalho comprovaram expressão diferenciada da DPP-IV e da MMP-9 nas amostras salivares.

Posteriormente, com a finalidade de analisar se a DPP-IV e a MMP-9 tendem a variar conjuntamente, realizou-se teste de correlação de Spearman. No entanto, o teste não evidenciou significância ($p > 0,05$). Porém, em análise qualitativa, é possível observar correspondência de expressão de proteases no grupo controle, uma vez que as

dosagens mais baixas de MMP-9 estabelecidas seguem o padrão de expressão média de DPP-IV. Esse dado pode indicar que, em homeostase, as proteases tendem a correlacionar-se. No entanto, em condições de doença, estão dispostas em grande variabilidade de dosagens. Todavia, já foi reportada conexão entre essas proteases em câncer de próstata. Os resultados demonstraram que a transdução do sinal iniciada pela DPP-IV, conjuntamente com plasminogênio, regula a expressão de MMP-9 (GONZALEZ-GRONOW, 2001).

Semelhantemente, buscou-se relacionar as dosagens médias de proteases em subgrupos com o uso de medicações. No entanto, com resultado de não correlação, o uso de anti-inflamatórios e imunossupressores, medicações comuns ao tratamento de SS, podem sinalizar a não interferência significativa na expressão das proteases envolvidas.

Em análise dos dados resultantes da espectrometria de massas, por meio do G: Profiler, observa-se a semelhança com a via do lúpus eritematoso sistêmico, de acordo com o que se observa pela Figura 28, obtida pelo KEGG (KANEHISA, M.; GOTO, S. 2010). Sabe-se que o lúpus é uma doença prevalente em SSs e compartilha não apenas os autoanticorpos anti-Ro/SSA e anti-La/SSB, mas também algumas das serino proteases aqui discutidas: a elastase neutrofílica e a catepsina G. Foram 25 genes comuns para ontologia gênica, bem como componentes que sinalizam imunopatogenia (KROEF et al. 2019).

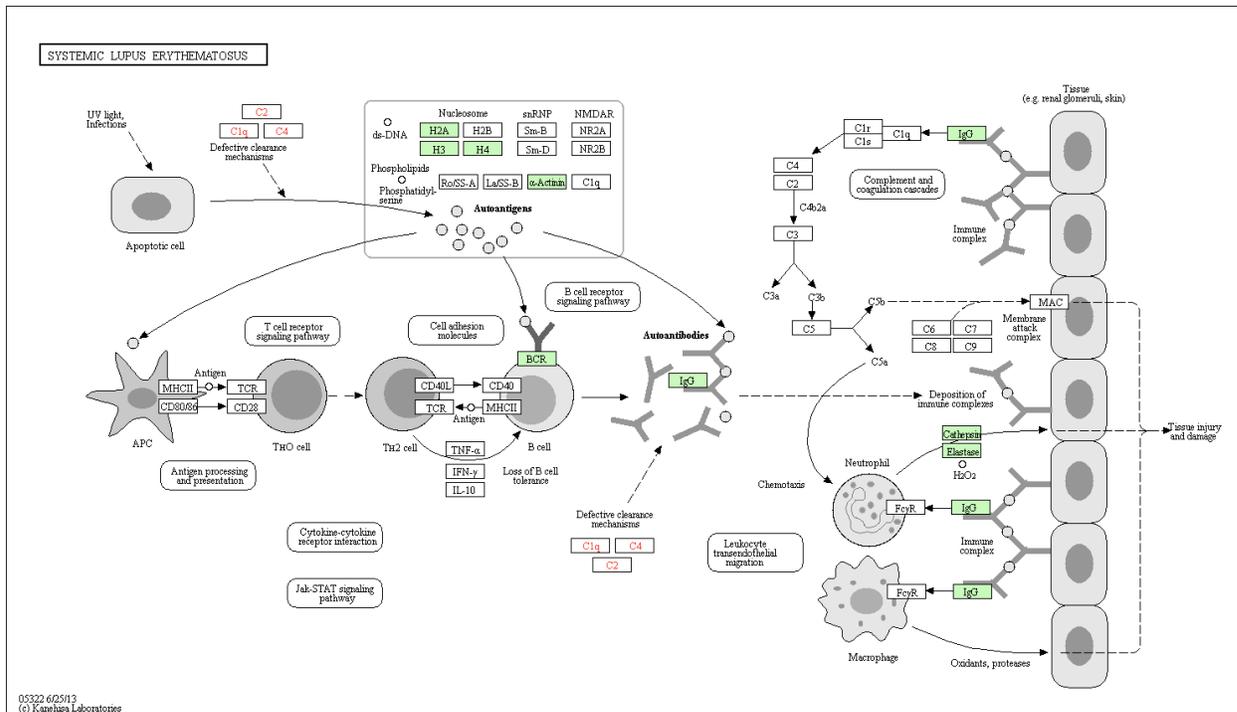


Figura 28. Via do Lupus Eritematoso Sistêmico, disponível no KEGG com componentes salivares encontrados nas amostras deste trabalho. Compartilha não apenas os autoanticorpos anti-Ro/SSA e anti-La/SSB, mas também algumas das serino proteases aqui discutidas: a elastase neutrofílica e a catelpsina G, destacadas em verde.

Observa-se, ainda, que genes envolvidos em enzimas de desubiquitinação do tipo metaloproteases (metaloDUBs) foram detectados na lista de *ensembl gene ID*. Como desubiquitinases, têm-se enzimas reguladoras que controlam o fluxo de ubiquitina de maneira reversível (HAAMED et al. 2019). As metaloDUBs têm o domínio catalítico dependente de íon bivalente, semelhantemente ao de metaloproteases, e seu mecanismo de ação consiste em formar um complexo intermediário e não covalente, entre o sítio ativo da enzima e a ubiquitina, modificando-as (CLAGUE et al. 2013).

Todavia, a desubiquitinação regula a remoção de ubiquitina em proteínas destinadas à degradação e está envolvida com mecanismos ou vias de reparo de DNA e sinalizações no sistema imune inato. Assim, essas regulações podem tanto estar relacionadas a processos biológicos de viabilidade celular, como podem ser o fator desregulador em processos patológicos, uma vez que há associações de DUBs com vias em oncologia, imunologia e neurodegeneração (CLAGUE; URBÉ; KOMANDER, 2019). No presente momento, desconhece-se associação de metaloDUBs a SS.

Adicionalmente, a relação de neutrófilos na resposta imune e na ativação de granulócitos reafirma o possível envolvimento com as NETs (BRINKMANN et al. 2004); a degranulação de leucócitos faz referência à característica clássica de infiltração linfocítica de glândulas salivares em SS (SHIM et al. 2004), além disso, a morte celular e morte celular programada é um evento já reportado em SS (KIRIPOLSKY; KRAMER, 2018). Ainda, observa-se a expressão genética dependente de estrógeno, dado essencial em doença com prevalência em mulheres (MACCOY; SAMPENE; BAER, 2019).

Já em análise dos dados referentes ao resultado da espectrometria de massas, por meio do Reactome, houve indicação de achados em vias de doenças relacionadas à transdução de sinal. Sabe-se que as DPP-IV atuam como receptores e participam dos sinais de transdução e da adesão (ZHANG et al. 2015). Além de tudo, os genes referentes às proteínas carregadas, indicam acometimento em glândulas salivares e, principalmente, em outros órgãos com forte presença de glândulas exócrinas, como pâncreas, fígado e estômago, característico da patogenia da doença (FOX, 2005).



CONCLUSÃO



CONCLUSÃO

Portanto, os resultados apresentados demonstram que:

1. As proteases DPP-IV e MMP-9 foram mais expressas ($p < 0,05$) nas amostras salivares de indivíduos pSS.
2. A DPP-IV e a MMP-9 estão intimamente relacionadas com a transdução do sinal e com a resposta do sistema imune inato.
3. O cluster de serino proteases composto por elastase neutrofílica, catepsina G e proteinase 3 está envolvido na desgranulação de neutrófilos, possivelmente, com as armadilhas extracelulares de neutrófilos (NETs).



PERSPECTIVAS



PERSPECTIVAS

Elaboração de estudo coorte longitudinal, com extensa amostra populacional, a fim de constatar alterações do padrão controle em estágios clínicos progressivos da doença.

Realização de proteômica quantitativa, para análise da expressão diferencial entre os grupos, a fim de somar aos resultados de caracterização proteolítica e dosagem de proteases em ensaio imunoenzimático.

Verificação de polimorfismos genéticos em DPP-IV e MMP-9, a fim de constatar em que base nitrogenada houve alteração genética nos indivíduos estudados, visto que houve regulação positiva da DPP-IV e da MMP-9 em saliva de indivíduos SS.

Abordagem da metabolômica para análise da expressão diferencial de metabólitos em fluido salivar de indivíduos estudados.



REFERÊNCIAS



REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHÉN, B. DPP-4 inhibitors. **Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 21, n. 4, p. 517–533, 2007.

AHIF, D. R. et al. Evaluation of the Compact High-Field Orbitrap for Top-Down Proteomics of Human Cells Dorothy. **J Proteome Res.**, v. 11, p. 4308–4314, 2012.

ALEXANDER, E. L. et al. Primary Sjögren's syndrome with central nervous system disease mimicking multiple sclerosis. **Ann Intern Med.**, v. 104, n. 3, p. 323-30, 1986.

AMARA, U. et al. Interaction between the coagulation and complement system. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 632, n. Davis 2004, p. 71–79, 2008.

AMERONGEN, A. V.; VEERMAN, E. C. Saliva-the defender of the oral cavity. **Oral Dis.**, v. 8, n. 1, p. 12-22, 2002.

AQRAWI, L. A. et al. Identification of potential saliva and tear biomarkers in primary Sjögren's syndrome, utilizing the extraction of extracellular vesicles and proteomics analysis. **Arthritis Research and Therapy**, v. 19, n. 1, p. 1–15, 2017.

AZUMA, M. et al. Suppression of Tumor Necrosis Factor alpha-Induced Matrix Metalloproteinase 9 Production in Human Salivary Gland Acinar Cells by Cepharanthine Occurs via Down-Regulation of Nuclear Factor kB. **Arthritis & Rheumatism**, p. 1585-1594, 2002.

BAE, E. J. DPP-4 inhibitors in diabetic complications: role of DPP-4 beyond glucose control. **Archives of Pharmacal Research**, v. 39, n. 8, p. 1114–1128, 2016.

BAICI, A. et al. Action of collagenase and elastase from human polymorphonuclear leukocytes on human articular cartilage. **Rheumatol Int.**, v. 2, n. 1, p. 11-6, 1982.

BARONE, F.; COLAFRANCESCO, S. Sjögren's syndrome: From pathogenesis to novel therapeutic targets. **Clinical and Experimental Rheumatology**, v. 34, p. 58–62, 2016.

BARRERA, M. J. et al. Salivary mucins induce a Toll-like receptor 4-mediated pro-inflammatory response in human submandibular salivary cells: Are mucins involved in Sjögren's syndrome? **Rheumatology (United Kingdom)**, v. 54, n. 8, p. 1518–1527,



2015.

BARRETT, A. J.; RAWLINGS, N D. Families and clans of serine peptidases. **Arch Biochem Biophys**, v. 318, n. 2, p. 247-50, 1995.

BASTOS, I. M. D. et al. Parasite Prolyl Oligopeptidases and the Challenge of Designing Chemotherapeutics for Chagas Disease, Leishmaniasis and African Trypanosomiasis. **Current Medicinal Chemistry**, v. 999, n. 999, p. 21–25, 2013.

BAUM, B.J. et al. Scientific Frontiers : Emerging Technologies for Salivary Diagnostics. **International & American Associations for Dental Research**, v. 23, n. 4, p. 360-368, 2011.

BECKMAN, K. A.; LUCHS, J.; MILNER, M. S. Making the diagnosis of Sjögren's syndrome in patients with dry eye. **Clin Ophthalmol.**, v. 10, p. 43-53, 2015.

BELLINI, T. et al. Matrix metalloproteinase-9 activity detected in body fluids is the result of two different enzyme forms. **J. Biochem.**, v. 151, n. 5, p. 493–499, 2012.

BEN-CHETRIT, E.; FISCHER, R.; RUBINOW, A. Anti-SSA/Ro and anti-SSB/La antibodies in serum and saliva of patients with Sjogren's syndrome. **Clinical rheumatology**, v. 12, p. 471–474, 1993.

BEROUKAS, D. et al. Selective downregulation of aquaporin-1 in salivary glands in primary Sjögren's syndrome. **Laboratory Investigation**, v. 82, p. 1547–1552, 2002.

BERTHONNEAU, J. et al. Toxoplasma gondii: Purification and characterization of an immunogenic metallopeptidase. **Experimental Parasitology**, v. 95, n. 2, p. 158–162, 2000.

BOLSTAD, A. I.; JONSSON, R. Genetic aspects of Sjögren's syndrome. **Arthritis Research**, v. 4, n. 6, p. 353–359, 2002.

BOLSTAD, A. I.; SKARSTEIN, K. Epidemiology of Sjögren's Syndrome—from an Oral Perspective. **Current Oral Health Reports**, v. 3, n. 4, p. 328–336, 2016.

BONNE, N. J.; WONG, D. T. W. Salivary biomarker development using genomic, proteomic and metabolomic approaches. **Genome Med.**, v. 4, n. 10, p. 82, 2012.

BOURNIA, V.K.; VLACHOYIANNOPOULOS, P.G. Subgroups of Sjögren syndrome patients according to serological profiles. **J Autoimmun.**, v. 39, n. 1-2, p. 15-26, 2012.

BRINCKERHOFF, C. E.; MATRISIAN, L. M. Matrix metalloproteinases: A tail of a

frog that became a prince. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 3, n. 3, p. 207–214, 2002.

BRINKMANN, V. et al. Neutrophil Extracellular Traps Kill Bacteria. **Science**, v. 303, n. 5663, p. 1532-1535, 2004.

BRITO-ZERÓN, P. et al. Systemic activity and mortality in primary Sjögren syndrome: predicting survival using the EULAR-SS Disease Activity Index (ESSDAI) in 1045 patients. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 75, p. 348–355, 2016.

BUTLER, G. S.; OVERALL, C. M. Updated biological roles for matrix metalloproteinases and new “intracellular” substrates revealed by degradomics. **Biochemistry**, v. 48, n. 46, p. 10830–10845, 2009.

CAPUANO, A. et al. Dipeptidyl peptidase-4 inhibitors in type 2 diabetes therapy - focus on alogliptin. **Drug Des Devel Ther.**, v. 7, p. 989–1001, 2013.

CARPENTER, G. H. The Secretion, Components, and Properties of Saliva. **Annual Review of Food Science and Technology**, v. 4, n. 1, p. 267–276, 2013.

CHMELAŘ, J. et al. Protease inhibitors in tick saliva: The role of serpins and cystatins in tick-host-pathogen interaction. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 7, n. MAY, p. 1–16, 2017.

CLAGUE, M. J. et al. Deubiquitylases From Genes to Organism. **American Physiological Society**, V. 93, n. 3, p. 1289-1315, 2013.

CLAGUE, M. J.; URBÉ, S.; KOMANDER, D. Breaking the chains: deubiquitylating enzyme specificity begets function. **Nat Rev Mol Cell Biol.**, v. 20, n. 6, p. 338-352, 2019.

COOPER, G. S.; STROEHLA, B. C. The epidemiology of autoimmune diseases. **Autoimmunity Reviews**, v. 2, n. 3, p. 119–125, 2003.

COLLIER, I. E. et al. Diffusion of MMPs on the Surface of Collagen Fibrils: The Mobile Cell Surface – Collagen Substratum Interface. **PLoS One**, v. 6, n. 9, p. e24029, 2011.

CORTES, J.A. Epidemiologia. Conceitos e princípios fundamentais. São Paulo: Livraria Varela, p. 227, 1993.

COWLAND, J.B.; BORREGAARD, N. Molecular characterization and pattern of tissue expression of the gene for neutrophil gelatinase-associated lipocalin from humans. **Genomics**, v. 45, p. 17-23, 1997.



CUELLO, C. et al. Chemokine expression and leucocyte infiltration in Sjögren's syndrome. **Br J Rheumatol**, v. 37, n. 7, p. 779-83, 1998.

DANIELS, T.E. Labial salivary gland biopsy in Sjögren's syndrome. Assessment as a diagnostic criterion in 362 suspected cases. **Arthritis Rheum.**, v. 27, p. 147-156, 1984.

DEVAUCHELLE-PENSEC, V. et al. Gene expression profile in the salivary glands of primary Sjögren's syndrome patients before and after treatment with rituximab. **Arthritis and Rheumatism**, v. 62, n. 8, p. 2262–2271, 2010.

DUFOUR, A. et al. Role of matrix metalloproteinase-9 dimers in cell migration: Design of inhibitory peptides. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 46, p. 35944–35956, 2010.

EDECHI, C.A. et al. The prolactin inducible protein/gross cystic disease fluid protein-15 deficient mice develop anomalies in lymphoid organs. **Immunobiology**, v. 19, p. 30145-7, 2019.

EDGAR, M.; DAWES, C.; O'MULLANE, D. Saliva and oral health: an essential overview for the health professional. 4th edition. London (UK): **Stephen Hancocks Limited**, 2012.

FABREGAT, A. et al. The Reactome Pathway Knowledgebase. **Nucleic Acids Res.**, v. 46, n. D1, p. D649-D655, 2018.

FEI, H. M. et al. Specific hla-dqa and hla-drb1 alleles confer susceptibility to sjögren's syndrome and autoantibody production. **Journal of Clinical Laboratory Analysis**, v. 5, n. 6, p. 382–391, 1991.

FENN, J.B. et al. Electrospray ionization for the mass spectrometry of large biomolecules. **Science**, v. 246, p. 64–71, 1989.

FISCHER, H. P.; EICH, W.; RUSSEL, I.J. A possible role for saliva as a diagnostic fluid in patients with chronic pain. **Seminars in arthritis and rheumatism**, v. 27, p. 348–359, 1998.

FLEISSIG, Y. et al. Different proteomic protein patterns in saliva of Sjögren's syndrome patients. **Oral Diseases**, v. 15, n. 1, p. 61–68, 2009.

FOX, P. C. Autoimmune Diseases and Sjögren's Syndrome An Autoimmune Exocrinopathy. **Annals of the New York Academy of Sciences**, 2007.

- FOX, R. I. Seminar Sjögren's syndrome. **The Lancet**, v. 366, p. 321–331, 2005.
- G: PROFILER. Elixir's Core Data Resources, version 11.0, 2019.
<https://biit.cs.ut.ee/gprofiler/gost>
- GARRETO, L.; BASTOS, I. M. D.; ACEVEDO, A. C. Avaliação da atividade proteolítica salivar de paciente com Síndrome de Sjögren [TCC]. [Brasília (DF)]: Universidade de Brasília, 2017.
- GOEL, R. R.; KAPLAN, M. J. Deadliest catch: neutrophil extracellular traps in autoimmunity. **Cuur Opin Rheumatol**. doi: 10.1097/BOR.0000000000000667. 2019.
- GOMIS-RÜTH, F. X. et al. Mechanism of inhibition of the human matrix metalloproteinase stromelysin-1 by TIMP-1. **Nature**, v. 389, n. 6646, p. 77-81, 1997.
- GONZÁLEZ, S. et al. Oral manifestations and their treatment in Sjögren's syndrome. **Oral Diseases**, doi:10.1111/odi.12105, 2013.
- GONZALEZ-GRONOW, H. et al. Interaction of plasminogen with dipeptidyl peptidase IV initiates a signal transduction mechanism which regulates expression of matrix metalloproteinase-9 by prostate cancer cells. **Biochem. J.**, v. 355, p. 397–407, 2001.
- GRZYBOWSKI, A.; SAK, J. Jan Mikulicz-Radecki (1850-1905): His impact on modern medicine. **Clinics in Dermatology**, v. 30, n. 1, p. 129–136, 2011.
- GUERRA, E. N. S. et al. Diagnostic capability of salivary biomarkers in the assessment of head and neck cancer: A systematic review and meta-analysis. **Oral Oncology**, v. 51, n. 9, p. 805–818, 2015.
- HAAMED, D. S. et al. Development of a Ubiquitin based probe for metalloprotease deubiquitinases. **Wiley-VCH**. Angewandte Chemie International Edition. 10.1002/anie.201906790. 2019.
- HARSTAD, E. B. et al. DPP8 and DPP9 expression in cynomolgus monkey and Sprague Dawley rat tissues. **Regulatory Peptides**, v. 186, p. 26–35, 2013.
- HASSAN, M. I. et al. Zinc 2-Glycoprotein: A Multidisciplinary Protein. **Molecular Cancer Research**, v. 6, n. 6, p. 892–906, 2008.
- HAUGEN, A. J. et al. Estimation of the prevalence of primary Sjögren's syndrome in two age-different community-based populations using two sets of classification criteria: The Hordaland Health Study. **Scandinavian Journal of Rheumatology**, v. 37, n. 1, p.

30–34, 2008.

HELMERHORST, E. J.; DAWES, C.; OPPENHEIM, F. G. The Complexity of Oral Physiology and its Impact on Salivary Diagnostics. **International Journal of Laboratory Hematology**, v. 38, n. 1, p. 42–49, 2017.

HIDA, A. et al. HTLV-I associated Sjogren's syndrome is aetiologically distinct from anti-centromere antibodies positive Sjogren's syndrome. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 58, n. 5, p. 320–322, 1999.

HIDA, A. et al. Prevalence of Sjogren syndrome among Nagasaki atomic bomb survivors. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 67, n. 5, p. 689-895, 2008.

HOLZINGER, D.; FOELL, D.; KESSEL, C. The role of S100 proteins in the pathogenesis and monitoring of autoinflammatory diseases. **Molecular and Cellular Pediatrics**, v. 20185, p. 7, doi.org/10.1186/s40348-018-0085-2, 2018.

HU, S. et al. Salivary Proteomic and Genomic Biomarkers for Primary Sjögren's Syndrome. **Scand J Rheumatol**, v. 37, p. 30-34, 2007.

HUNG, Y. H. et al. Role of salivary immune parameters in patients with primary sjögren's syndrome. **Annals of Laboratory Medicine**, v. 39, n. 1, p. 76–80, 2019.

JAMES, P. et al. Protein identification by mass profile fingerprinting. **Biochem Biophys Res Commun.**, v. 195, p. 58–64, 1993.

JASIM, H. et al. The proteomic profile of whole and glandular saliva in healthy pain-free subjects. **Scientific Reports**, v. 6, p. 1–10, 2016.

JAZZAR, A. A. et al. Salivary S100A8/A9 in Sjögren's syndrome accompanied by Lymphoma. **Journal of Oral Pathology & Medicine**. v. 47, p. 900-906, 2018.

KASSAN, S. S.; HARALAMPOS, M. D.; MOUTOPOULOS, M. D. Clinical Manifestations and Early Diagnosis of Sjögren Syndrome. **Arch Intern Med.**, v. 164, n. 12, p. 1275-1284, 2004.

KAMATH, K. S.; VASAVADA, M. S.; SRIVASTAVA, S. Proteomic databases and tools to decipher post-translational modifications. **Journal of Proteomics**, v. 75, n. 2011, p. 127–144, 2011.

KANEHISA, M.; GOTO, S. KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes. **Nucleic Acids Res.**, v. 28, n. 1, p. 27-30, 2000.

KANG, Hl. et al. Comparison of HLA class II genes in Caucasoid, Chinese, and Japanese patients with primary Sjögren's syndrome. **The Journal of Immunology**, v. 150, n. 8, p.3615-3623, 1993.

KATSIFIS, G. E. et al. Systemic and local interleukin-17 and linked cytokines associated with Sjögren's syndrome immunopathogenesis. **American Journal of Pathology**, v. 175, n. 3, p. 1167–1177, 2009.

KATSIOUGIANNIS, S.; WONG, D. T. W. The Proteomics of Saliva in Sjögren's Syndrome. **Rheumatic Disease Clinics of North America**, v. 42, n. 3, p. 449–456, 2016.

KHANDPUR, R. et al. NETs are a source of citrullinated autoantigens and stimulate inflammatory responses in rheumatoid arthritis. **Sci Transl Med**, v. 5, n. 178, p. 178ra40, 2013.

KIRIPOLSKY, J.; KRAMER, J. M. Current and Emerging Evidence for Toll-Like Receptor Activation in Sjögren's Syndrome. **Journal of Immunology Research**, v. 2018, p. 1-12, 2018.

KJELDSEN, L. et al. Identification of neutrophil gelatinase-associated lipocalin as a novel matrix protein of specific granules in human neutrophils. **Blood**, v. 83, p. 799-807, 1994.

KOBAYASHI, S.D. et al. Neutrophils in innate immune response. **Arch Immunol Ther Exp (Warsz)**, v. 53, n. 6, p. 505-17, 2005.

KONSTA, O. D. et al. The contribution of epigenetics in Sjögren's syndrome. **Frontiers in Genetics**, v. 5, n. 71, p. 1-9, 2014.

KONSTA, O. D. et al. Defective DNA methylation in salivary gland epithelial acini from patients with Sjögren's syndrome is associated with SSB gene expression, anti-SSB/LA detection, and lymphocyte infiltration. **Journal of Autoimmunity**, v. 68, p. 30–38, 2016.

KORKMAZ, B. et al. Neutrophil Elastase, Proteinase 3, and Cathepsin G as Therapeutic Targets in Human Diseases. **Pharmacological Reviews**, v. 62, n. 04, p. 726–759, 2010.

KORKMAZ, B. et al. Inhibitors and antibody fragments as potential anti-inflammatory therapeutics targeting neutrophil proteinase 3 in human disease. **Pharmacological Reviews**, v. 68, n. 3, p. 603–630, 2016.

KROEF, M. et al. Cytometry by Time of Flight identifies distinct signatures in patients with systemic sclerosis, systemic lupus erythematosus and Sjögren's syndrome. **European Journal of Immunology**. doi:10.1002/eji.201948129, 2019.

KROESE, F. G. M.; HAACKE, E. A.; BOMBARDIERI, M. The role of salivary gland histopathology in primary Sjögren's syndrome: promises and pitfalls. **Clinical and Experimental Rheumatology**, v. 36, p. S222-S233, 2018.

KWOK, S. K. et al. TLR2 ligation induces the production of IL-23/IL-17 via IL-6, STAT3 and NF- κ B pathway in patients with primary Sjögren's syndrome. **Arthritis Research and Therapy**, v. 14, n. 2, p. R64, 2012.

LAWANDI, J. et al. Inhibitors of Prolyl Oligopeptidases for the Therapy of Human Diseases: Defining Diseases and Inhibitors. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 53, n. 9, p. 3423–3438, 2010.

LEE, Y. H.; WONG, D. T. Saliva: An emerging biofluid for early detection of diseases. **American Journal of Dentistry**, v. 22, n. 4, p. 241–248, 2009.

LEE, S. et al. Mikulicz's disease: a new perspective and literature review. **Eur J Ophthalmol.**, v. 16, p. 199-203, 2006.

LESSARD, J. et al. Characterization of dedifferentiating human mature adipocytes from the visceral and subcutaneous fat compartments: Fibroblast-activation protein alpha and dipeptidyl peptidase 4 as major components of matrix remodeling. **PLoS ONE**, v. 10, n. 3, p. 1–18, 2015.

LEVIN, M. et al. Next generation matrix metalloproteinase inhibitors — Novel strategies bring new prospects. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research**, v. 1864, n. 11, p. 1927–1939, 2017.

LIBÉRIO, M. D. S. et al. The crude skin secretion of the pepper frog *Leptodactylus labyrinthicus* is rich in metallo and serine peptidases. **PLoS ONE**, v. 9, n. 6, 2014.

LICHTENFELD, J. L.; KIRSCHNER, R. H.; WIERNIK, P. H. Familial Sjögren's syndrome with associated primary salivary gland lymphoma. **The American Journal of Medicine**, v. 60, n. 2, p. 286–292, 1976.

LIU, J.; DUAN, Y. Saliva: a potential media for disease diagnostics and monitoring. **Oral oncology**, v. 48, p. 569–577, 2012.



LIU, C. C.; MANZI, S.; AHEARN, J. M. Biomarkers for systemic lupus erythematosus: a review and perspective. **Curr. Opin. Rheumatol.**, v. 17, p. 543–549, 2005.

LÓPEZ-MIGUEL, A. et al. Clinical and Molecular Inflammatory Response in Sjögren Syndrome-Associated Dry Eye Patients Under Desiccating Stress. **Am J Ophthalmol.**, v. 161, p. 33-41.e1-2, 2016.

LÖSTER, K. et al. The cysteine-rich region of dipeptidyl-peptidase IV (CD26) is the collagen-binding site. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 217, p. 341–348, 1995.

MACIEJCZYK, M. et al. The significance of matrix metalloproteinases in oral diseases. **Advances in Clinical and Experimental Medicine**, v. 25, n. 2, p. 383–390, 2016.

MADRID, R. M. et al. La saliva como médio de diagnóstico de VIH. **Revista Cubana de Estomatología**, v. 37, n. 3, 2000.

MANICONE, A. M.; MCGUIRE, J. K. Matrix metalloproteinases as modulators of inflammation. **Semin Cell Dev Biol.**, v. 19, n. 1, p. 34–41, 2008.

MAVRAGANI, C. P.; MOUTSOPOULOS, H. M. The geoepidemiology of Sjögren's syndrome. **Autoimmunity Reviews**, v. 9, n. 5, p. A305–A310, 2010.

MATHEWS, S. A.; KURIEN, B. T.; SCOFIELD, R. H. Oral Manifestations of Sjögren's Syndrome. **J Dent Res.**, v. 87, p. 308, 2008.

MATTU, T. S. et al. O-glycan analysis of natural human neutrophil gelatinase B using a combination of normal phase-HPLC and online tandem mass spectrometry: implications for the domain organization of the enzyme. **Biochemistry**, v. 39, n. 51, p. 15695-704, 2000.

MAYADAS, T. N.; CULLERE, X.; LOWELL, C. A. The multifaceted functions of neutrophils. **Annu Rev Pathol.**, v. 9, p. 181-218, 2014.

MCCAWLEY, L.J.; MATRISIAN, L.M. Matrix metalloproteinases: multifunctional contributors to tumor progression. **Mol Med Today.**, v. 6, n. 4, p. 149-56, 2000.

MCCOY, S. S.; SAMPENE, E.; BAER, A. N. Sjögren's Syndrome is Associated With Reduced Lifetime Sex Hormone Exposure: A Case-Control Study. **Arthritis Care Res (Hoboken)**. doi: 10.1002/acr.24014, 2019.

MCNULTY, D. E.; ANNAN, R. S. Hydrophilic Interaction Chromatography Reduces the Complexity of the Phosphoproteome and Improves Global Phosphopeptide Isolation and Detection. **Annan. Molecular & Cellular Proteomics**, v. 7.5, p. 971-980, 2008.

MENTLEIN, R. Therapeutic assessment of glucagon-like peptide-1 agonists compared with dipeptidyl peptidase IV inhibitors as potential antidiabetic drugs. **Expert Opin. Invest. Drugs.**, v. 14, p. 57–64, 2005.

MEROPS: the database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors. Cambridge (UK): EMBL-European Bioinformatics Institute, Cambridge, 2019. merops.sanger.ac.uk

MODESTO, F. M. B. Manifestações bucais e qualidade de vida na Síndrome de Sjögren [tese]. [Brasília (DF)]: Universidade de Brasília, 2015.

MORGAN, W. S. The probable systemic nature of Mikulicz's disease and its relation to Sjögren's syndrome. **N Engl J Med.**, v. 251, p. 5-10, 1954.

NAGASE, H.; VISSE, R.; MURPHY, G. Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. **Cardiovascular research**, v. 69, p. 562-573, 2006.

NAGASE, H.; WOESSNER, J.F. Matrix metalloproteinases. **J. Biol. Chem.**, v. 274, p. 21491–21494, 1999.

NEITZEL, J. J. Enzyme Catalysis: The Serine Proteases. **Nature Education**, v. 3, n. 9, p.21, 2010.

NETEA, M. G. et al. IL-1 β processing in host defense: Beyond the inflammasomes. **PLoS Pathogens**, v. 6, n. 2, 2010.

NOCTURNE, G.; MARIETTE, X. B cells in the pathogenesis of primary Sjögren syndrome. **Nature Reviews Rheumatology**, p. 1-13. doi:10.1038/nrrheum.2018.1, 2018.

NUNES, L. A. S.; MUSSAVIRA, S.; BINDHU, O. S. Clinical and diagnostic utility of saliva as a non-invasive diagnostic fluid: a systematic review. **Biochemia Medica**, v. 25, n. 2, p. 177–92, 2015.

ONG, S. E.; MANN, M. Mass spectrometry-based proteomics turns quantitative. **Nat Chem Biol.**, v. 1, p. 252–262, 2005

OPPENHEIM F. G. Preliminary observations on the presence and origin of serum albumin in human saliva. **Helv Odontol Acta.** v. 14, n. 1, p. 10-7, 1970.

PATEL, R.; SHAHANE, A. The epidemiology of Sjögren's syndrome. **Clinical**

Epidemiology, v. 6, p. 247–255, 2014.

PEDERSEN, A. M. L. et al. Salivary secretion in health and disease. **Journal of Oral Rehabilitation**, v. 45, n. 9, p. 730–746, 2018.

PHAM, C. T. N. Neutrophil serine proteases: Specific regulators of inflammation. **Nature Reviews Immunology**, v. 6, n. 7, p. 541–550, 2006.

PIJPE, J. et al. Rituximab treatment in patients with primary Sjogren's syndrome: an open-label phase II study. **Arthritis Rheum.**, v. 52, n. 13, p. 2740–2750, 2005

PILLEMER, S.R. et al. Incidence of physician- diagnosed primary Sjögren syndrome in residents of Olmsted County, Minnesota. **Mayo Clin Proc.**, v. 76, p. 593–599, 2001.

PLESIVCNİK, N. M. et al. Incidence of primary Sjogren's syndrome in Slovenia. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 63, p. 874–876, 2004.

PÓLGAR, L. The prolyl oligopeptidase family. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 59, n. 2, p. 349–362, 2002.

PORTO-MASCARENHAS, E. C. et al. Salivary biomarkers in the diagnosis of breast cancer: A review. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 110, p. 62–73, 2017.

QUATUCCIO, L. et al. Anti-SSA/SSB-negative Sjogren's syndrome shows a lower prevalence of lymphoproliferative manifestations, and a lower risk of lymphoma evolution, **Autoimmun. Rev.**, v. 14, p. 1019-1022, 2015.

RAMESH, B. et al. Engineered chymotrypsin for mass-spectrometry based detection of protein glycosylation. **ACS Chem Biol**. doi: 10.1021/acscchembio.9b00506. 2019.

RAO, M. B. et al. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 62, n. 3, p. 597-635, 1998.

RATHNAYAKE, NI. et al. Salivary Diagnostics—Point-of-Care diagnostics of MMP-8 in dentistry and medicine. **Diagnostics**, v. 7, n. 1, p. 7, 2017.

RAYMENT, S. A.; OPPENHEIM, F. G.; TROXLER, R. F. Immunoquantification of human salivary mucins MG1 and MG2 in stimulated whole saliva: factors influencing mucin levels. **J Dent Res**, v. 79, n. 10, p. 1765-72, 2000.

RAWLINGS, N. D. et al. MEROPS: The Peptidase Database. **Nucleic Acids Research**, v. 36, p. D320–325, 2008.

RAWLINGS, N. D.; BARRETT, A. J. Families of serine peptidases. **Arch Biochem Biophys.**, v.244, pp.19-61, 1994.

REN, Z.; CHEN, J.; KHALIL, R. A. Zymography as a Research Tool in the Study of Matrix Metalloproteinase Inhibitors. **Methods Mol Biol.**, v. 1626, p. 79–102, 2017.

REVEILLE, J. D. et al. Primary Sjögren's syndrome and other autoimmune diseases in families. Prevalence and immunogenetic studies in six kindreds. **Annals of Internal Medicine**, v. 101, p. 748-756, 1984.

RICE, A.; BANDA, M. J. Neutrophil Elastase Processing of Gelatinase A Is Mediated by Extracellular Matrix. **Biochemistry**, v. 34, n. 28, p. 9249–9256, 1995.

ROEPSTORFF, P. Mass spectrometry based proteomics, background, status and future needs. **Protein and Cell**, v. 3, n. 9, p. 641–647, 2012.

ROOMI, M. W. et al. Effect of a nutrient mixture on matrix metaloproteinase-9 dimers in various human cancer cell lines. **Int J Oncol.**, v. 33, n. 3, p. 986-92, 2014.

RYU, O.H. et al. Identification of parotid salivary biomarkers in Sjögren's syndrome by surface-enhanced laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry and two-dimensional difference gel electrophoresis. **Rheumatology**, v. 45, p.1077–1086, 2006.

RUHL, S. The scientific exploration of saliva in the post-proteomic era: from database back to basic function. **Expert Rev Proteomics**, v. 9, n. 1, p. 85–96, 2012.

SANTANA, J. M. et al. A Trypanosoma cruzi-secreted 80 kDa proteinase with specificity for human collagen types I and IV. **Biochemical Journal**, v. 324, p. 129-137, 1997.

SCHILLING, O.; OVERALL, C. M. Proteomic discovery of protease substrates. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 11, n. 1, p. 36–45, 2007.

SCHUSTER, B. et al. Purification and identification of the STAT5 protease in myeloid cells. **Biochem. J.**, v. 404, n. 1, p. 81-7, 2007.

SCHAFER, C. A. et al. Saliva diagnostics: Utilizing oral fluids to determine health status. **Monographs in Oral Science**, v. 24, n. February, p. 88–98, 2014.

SHAO, B. Z. et al. NLRP3 inflammasome and its inhibitors: A review. **Frontiers in**

Pharmacology, v. 6, n. NOV, p. 1–9, 2015.

SHIM, G. J. et al. Aromatase-deficient mice spontaneously develop a lymphoproliferative autoimmune disease resembling Sjögren's syndrome. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 34, p. 12628–12633, 2004.

SIMARD, J.C. et al. S100A8 and S100A9 Induce Cytokine Expression and Regulate the NLRP3 Inflammasome via ROS-Dependent Activation of NF- κ B1. **PLoS One**, v. 8, n. 8, p. e72138, 2013.

SOLOMONOV, I. et al. Distinct biological events generated by ECM proteolysis by two homologous collagenases. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 113, n. 39, p. 10884–10889, 2016.

SOUZA, A. P.; GERLACH, R. F.; LINE, S. R. P. Inhibition of human gelatinases by metals released from dental amalgam. **Biomaterials**, v. 22, n. 14, p. 2025–2030, 2001.

SPACHIDOU, M. P. et al. Expression of functional Toll-like receptors by salivary gland epithelial cells: increased mRNA expression in cells derived from patients with primary Sjögren's syndrome. **Clin Exp Immunol.**, v. 147, p. 497–503, 2007.

SPIELMANN, N.; WONG, D. Saliva: Diagnostics and therapeutic perspectives. **Oral Diseases**, v. 17, n. 4, p. 345-354, 2011.

STEINFELD, S.D.; YOUINOU, P. Epratuzumab (humanised anti-CD22 anti- body) in autoimmune diseases. **Expert Opin. Biol. Ther.**, v. 6, p. 943–949, 2006.

STRING CONSORTIUM. Elixir's Core Data Resources, version 11.0, 2019. string-db.org

TERADA, K. et al. Prevalence of serum and salivary antibodies to HTLV-1 in Sjögren's syndrome. **Lancet**, v. 344, p. 1116– 1119, 1994.

THE UNIPROT CONSORTION. UniProt: a worldwide hub of protein knowledge. *Nucleic Acids Res.* 47: D506-515, 2019. uniprot.org

TOUMA, Z. et al. Associations among classification criteria items within systemic lupus erythematosus. **Arthritis Care Res (Hoboken)**. doi: 10.1002/acr.24078. 2019.

TRIEBEL, S. et al. A 25 kDa alpha 2-microglobulin-related protein is a component of the 125 kDa form of human gelatinase. **FEBS Lett.**, v. 314, n. 3, p. 386-8, 1992.

TSUBOTA, K. et al. Sjögren's Syndrome. **Investigative Ophthalmology & Visual**

Science, v. 41, n. 7, p. 1666–1673, 2000.

TURK, B.; TURK, D.; TURK, V. Protease signaling: The cutting edge. **EMBO Journal**, v. 31, n. 7, p. 1630–1643, 2012.

VAN DEN STEEN, P. E. et al. The hemopexin and O-glycosylated domains tune gelatinase B/MMP-9 bioavailability via inhibition and binding to cargo receptors. **J Biol Chem.**, v. 281, n. 27, p. 18626-37, 2006.

VANDOOREN, J.; VAN DEN STEEN, P. E.; OPDENAKKER, G. Biochemistry and molecular biology of gelatinase B or matrix metalloproteinase-9 (MMP-9): The next decade. **Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology**, v. 48, n. 3, p. 222-272, 2013.

VIRA, H. et al. Role of polymorphisms in MMP-9 and TIMP-1 as biomarkers for susceptibility to systemic lupus erythematosus patients. **Biomark Med.**, v. 13, n. 1, p. 33-43, 2018.

VITALI, C. et al. Classification criteria for Sjögren's syndrome: a revised version of the European criteria proposed by the American-European Consensus Group C. **Ann Rheum Dis**, v. 61, p. 554–558, 2002.

WALSH, S. J.; RAU, L. M. Autoimmune diseases: A leading cause of death among young and middle-aged women in the United States. **American Journal of Public Health**, v. 90, n. 9, p. 1463–1466, 2000.

WANG, X. et al. Dysregulation of NF- κ B in glandular epithelial cells results in Sjögren's-like features. **PLoS ONE**, v. 13, n. 8, p. 1–9, 2018.

WANG, X. et al. Understanding the Multifaceted Role of Neutrophils in Cancer and Autoimmune Diseases. **Frontiers in Immunology**, v. 9, p. 2456, 2018.

WIECZOREK, G. et al. Blockade of CD40-CD154 pathway interactions suppresses ectopic lymphoid structures and inhibits pathology in the NOD/ShiLtJ mouse model of Sjögren's syndrome. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 78, n. 7, p. 974–978, 2019.

WILDENBERG, M. E. et al. Altered fractalkine cleavage potentially promotes local inflammation in NOD salivary gland. **Arthritis Research and Therapy**, v. 10, n. 3, p. 1–7, 2008.

WOESSNER, J. F. Quantification of matrix metalloproteinases in tissue samples. **Methods Enzymol.**, v. 248, p. 510-28, 1995.



WU, et al. Dipeptidyl peptidase-4 inhibitor sitagliptin prevents high glucose-induced apoptosis via activation of AMP-activated protein kinase in endothelial cells.

Molecular Medicine Reports, v. 15, n. 6, p. 4346-4351, 2017.

WU, C. H.; LI, K. J.; YU, C. L.; TSAI, C. Y.; HSIEH, S. C. Sjögren's Syndrome Antigen B Acts as an Endogenous Danger Molecule to Induce Interleukin-8 Gene Expression in Polymorphonuclear Neutrophils. **PLoS One**. v. 10, n. 4, p. e0125501, 2015.

YAMASHITA, S. et al. Characterization of a protease responsible for truncated actin increase in neutrophils of patients with Bahçet's Disease. **Biol Pharm Bull.**, v. 24, n. 2, p. 119-22, 2001.

YOUINOU, P. et al. Viruses contribute to the development of Sjögren's syndrome. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 141, p. 19–20, 2005.

ZHANG, H. et al. Dipeptidyl peptidase 9 subcellular localization and a role in cell adhesion involving focal adhesion kinase and paxillin. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research**, v. 1853, n. 2, p. 470–480, 2015.

ZISAPEL, M.; PARAN, D.; ELKAYAM, O. Rituximab in Rheumatoid Arthritis – Therapeutic aspects based on 18 years of global experience. **Harefuah**, v. 158, n. 9, p. 595-600, 2019.

**APÊNDICE A**

Protein Group	Protein ID	Accession	-10lgP	Coverage (%)	#Peptides	#Unique	PTM	Avg. Mass	Description
	1	48003	P19961-2	AMY2B_HUMAN	162.14	24	9	3 Y	42021
	3	527	P13645	K1C10_HUMAN	151.49	14	10	7 N	58827
	12	523	Q6NSB3	Q6NSB3_HUMAN	145.36	12	6	1 N	56211
	12	521	P04745	AMY1_HUMAN	145.36	12	6	1 N	57768
	12	520	B7ZMD7	B7ZMD7_HUMAN	145.36	12	6	1 N	57754
	11	614	P35908	K22E_HUMAN	142.48	15	9	5 Y	65433
	6	55287	A0A087WTX5	A0A087WTX5_HUMAN	139.92	34	5	1 Y	25624
	8	55283	A0A087X130	A0A087X130_HUMAN	137.99	34	5	1 Y	25136
	4	539	H6VRG0	H6VRG0_HUMAN	135.40	17	10	1 N	65970
	4	543	P04264	K2C1_HUMAN	135.40	17	10	1 N	66039
	4	540	H6VRF9	H6VRF9_HUMAN	135.40	17	10	1 N	66069
	4	542	H6VRG3	H6VRG3_HUMAN	135.40	17	10	1 N	66111
	4	541	H6VRF8	H6VRF8_HUMAN	135.40	17	10	1 N	66053
	4	544	H6VRG1	H6VRG1_HUMAN	135.40	17	10	1 N	66126
	2	48009	P13646-3	K1C13_HUMAN	125.09	10	7	5 Y	45867
	19	3166	B4DVQ0	B4DVQ0_HUMAN	118.01	12	3	2 N	37349
	19	3169	B4DW52	B4DW52_HUMAN	118.01	11	3	2 N	38633
	19	3170	B4E335	B4E335_HUMAN	118.01	11	3	2 N	39226
	19	3171	B4E3A4	B4E3A4_HUMAN	118.01	11	3	2 N	39800
	19	3172	Q8WVW5	Q8WVW5_HUMAN	118.01	11	3	2 N	40503
	19	3174	Q53G76	Q53G76_HUMAN	118.01	10	3	2 N	41721
	19	4151	P60709	ACTB_HUMAN	118.01	10	3	2 N	41737
	19	3175	Q1KLZ0	Q1KLZ0_HUMAN	118.01	10	3	2 N	41737
	19	3176	Q53GK6	Q53GK6_HUMAN	118.01	10	3	2 N	41723
	19	4152	P63261	ACTG_HUMAN	118.01	10	3	2 N	41793



19	3173	Q53G99	Q53G99_HUMAN	118.01	10	3	2	N	41765
19	3224	V9HVZ7	V9HVZ7_HUMAN	118.01	17	3	2	N	25036
19	3225	B3KWQ3	B3KWQ3_HUMAN	118.01	15	3	2	N	28211
19	3226	Q6PJ43	Q6PJ43_HUMAN	118.01	15	3	2	N	29412
19	3227	B7ZAP6	B7ZAP6_HUMAN	118.01	13	3	2	N	33101
15	571	B4DRR0	B4DRR0_HUMAN	110.21	9	5	1	N	57839
15	610	B4DRU6	B4DRU6_HUMAN	110.21	9	5	1	N	58536
15	578	A8K2I0	A8K2I0_HUMAN	110.21	9	5	1	N	60031
15	574	P02538	K2C6A_HUMAN	110.21	9	5	1	N	60045
15	570	B4DWU6	B4DWU6_HUMAN	107.18	10	5	1	N	55799
15	576	B2R853	B2R853_HUMAN	107.18	9	5	1	N	60027
15	575	P48668	K2C6C_HUMAN	107.18	9	5	1	N	60025
24	538	P35527	K1C9_HUMAN	98.54	8	4	3	N	62064
14	55292	I3L4N8	I3L4N8_HUMAN	90.79	16	3	2	Y	26935
21	1483	P25311	ZA2G_HUMAN	90.71	11	3	3	Y	34259
16	613	P13647	K2C5_HUMAN	90.58	9	5	2	N	62378
22	48022	P01877	IGHA2_HUMAN	90.25	8	2	1	Y	36526
43	4196	P01036	CYTS_HUMAN	83.70	13	1	1	N	16214
29	555	P01876	IGHA1_HUMAN	82.66	7	2	1	N	37655
29	556	Q9UP60	Q9UP60_HUMAN	82.66	7	2	1	N	40947
29	558	Q8NCL6	Q8NCL6_HUMAN	82.66	5	2	1	N	53224
29	559	Q96K68	Q96K68_HUMAN	82.66	5	2	1	N	53088
29	560	Q6ZW64	Q6ZW64_HUMAN	82.66	5	2	1	N	53321
29	561	Q96DK0	Q96DK0_HUMAN	82.66	5	2	1	N	53533
29	563	Q6MZW0	Q6MZW0_HUMAN	82.66	5	2	1	N	54460
29	562	Q6N090	Q6N090_HUMAN	82.66	5	2	1	N	54389
29	564	Q6N092	Q6N092_HUMAN	82.66	5	2	1	N	56424
28	4167	E7EX29	E7EX29_HUMAN	82.26	11	3	1	N	28037
28	4165	P63104	1433Z_HUMAN	82.26	11	3	1	N	27745



28	4166	DOPNI1	DOPNI1_HUMAN	82.26	11	3	1	N	27745
13	56035	F8W0C6	F8W0C6_HUMAN	77.86	23	4	2	Y	20656
44	4197	P01037	CYTN_HUMAN	74.69	13	1	1	N	16388
39	58162	P80748	LV302_HUMAN	73.68	22	2	1	Y	11935
36	4172	Q6NS95	Q6NS95_HUMAN	72.46	10	2	1	N	25148
34	4162	Q5VSP4	LC1L1_HUMAN	72.06	14	2	2	N	17918
34	4163	P31025	LCN1_HUMAN	72.06	12	2	2	N	19250
34	4164	A0A024R8D7	A0A024R8D7_HUMAN	72.06	12	2	2	N	19250
10	58160	A0A087X2I6	A0A087X2I6_HUMAN	70.95	3	2	1	Y	46133
35	4170	Q6EZE9	Q6EZE9_HUMAN	67.22	19	2	2	Y	10245
35	4169	P59665	DEF1_HUMAN	67.22	19	2	2	Y	10201
35	4168	P59666	DEF3_HUMAN	67.22	19	2	2	Y	10245
27	4153	A0A0C4DGN4	A0A0C4DGN4_HUMAN	65.65	16	2	2	N	19600
27	4154	C3PTT6	C3PTT6_HUMAN	65.65	15	2	2	N	21567
27	4156	G8H6I3	G8H6I3_HUMAN	65.65	14	2	2	N	22739
27	4155	Q96DA0	ZG16B_HUMAN	65.65	14	2	2	N	22739
23	55294	D6RD17	D6RD17_HUMAN	63.29	8	2	2	Y	18122
50	4214	F8VV32	F8VV32_HUMAN	60.06	12	1	1	N	11488
50	4215	A0A0B4J259	A0A0B4J259_HUMAN	60.06	9	1	1	N	15329
50	4216	P61626	LYSC_HUMAN	60.06	8	1	1	N	16537
50	4217	B2R4C5	B2R4C5_HUMAN	60.06	8	1	1	N	16537
25	4173	B2MUD5	B2MUD5_HUMAN	58.77	9	2	2	N	20662
25	4174	P08246	ELNE_HUMAN	58.77	6	2	2	N	28518
51	58165	P60174-4	TPIS_HUMAN	55.33	7	1	1	N	17958
51	2214	B4DUI5	B4DUI5_HUMAN	55.33	6	1	1	N	22871
51	2215	V9HWK1	V9HWK1_HUMAN	55.33	5	1	1	N	26669
51	58166	P60174-1	TPIS_HUMAN	55.33	5	1	1	N	26669
51	2216	Q2QD09	Q2QD09_HUMAN	55.33	5	1	1	N	26943
51	2217	Q53HE2	Q53HE2_HUMAN	55.33	5	1	1	N	26713



51	4218	P60174	TPIS_HUMAN	55.33	4	1	1	N	30791
52	4221	P00558	PGK1_HUMAN	49.78	4	1	1	N	44615
52	4222	V9HWF4	V9HWF4_HUMAN	49.78	4	1	1	N	44615
52	4224	P07205	PGK2_HUMAN	49.78	4	1	1	N	44796
52	4223	V9HW85	V9HW85_HUMAN	49.78	4	1	1	N	44895
52	58167	P00558-2	PGK1_HUMAN	49.78	4	1	1	N	41429
52	4220	B4E1H9	B4E1H9_HUMAN	49.78	5	1	1	N	35045
54	58169	P00338-4	LDHA_HUMAN	47.01	4	1	1	N	30205
54	4232	B4DJI1	B4DJI1_HUMAN	47.01	3	1	1	N	33593
54	4234	P00338	LDHA_HUMAN	47.01	3	1	1	N	36689
54	4233	V9HWB9	V9HWB9_HUMAN	47.01	3	1	1	N	36689
54	58170	P00338-3	LDHA_HUMAN	47.01	3	1	1	N	39837
53	4240	P04080	CYTB_HUMAN	46.69	12	1	1	N	11140
53	4241	Q76LA1	Q76LA1_HUMAN	46.69	12	1	1	N	11140
42	4183	P01833	PIGR_HUMAN	43.03	1	1	1	N	83284
41	4180	A4UCS8	A4UCS8_HUMAN	41.91	5	1	1	N	17788
41	4182	K7EM90	K7EM90_HUMAN	41.91	5	1	1	N	21020
41	2318	A0A024R4F1	A0A024R4F1_HUMAN	41.91	2	1	1	N	47169
41	2319	P06733	ENOA_HUMAN	41.91	2	1	1	N	47169
55	4246	B4DQ50	B4DQ50_HUMAN	40.81	2	1	1	N	58794
55	4247	Q08188	TGM3_HUMAN	40.81	2	1	1	N	76632
56	4287	O60218	AK1BA_HUMAN	38.69	3	1	1	N	36020
57	4288	Q6P5S2	LEG1H_HUMAN	36.57	3	1	1	N	37926
58	4252	P08311	CATG_HUMAN	36.24	4	1	1	N	28837
59	4259	A0A0A0MS07	A0A0A0MS07_HUMAN	34.96	4	1	1	N	31983
59	4262	Q6PYX1	Q6PYX1_HUMAN	34.96	3	1	1	N	38162
59	4263	Q86TT2	Q86TT2_HUMAN	34.96	3	1	1	N	39126
59	58173	A0A075B6N8	A0A075B6N8_HUMAN	34.96	3	1	1	N	41335
59	4266	A0A0A0MS08	A0A0A0MS08_HUMAN	34.96	3	1	1	N	43912



59	4267	Q6N093	Q6N093_HUMAN	34.96	3	1	1	N	46061
59	58174	A0A087X1C7	A0A087X1C7_HUMAN	34.96	2	1	1	N	50488
59	4269	Q6MZU6	Q6MZU6_HUMAN	34.96	2	1	1	N	51099
59	58175	A0A087X010	A0A087X010_HUMAN	34.96	2	1	1	N	50823
59	4270	Q6GMX6	Q6GMX6_HUMAN	34.96	2	1	1	N	51083
59	4271	Q6N096	Q6N096_HUMAN	34.96	2	1	1	N	50927
59	4272	S6B291	S6B291_HUMAN	34.96	2	1	1	N	50871
59	4273	Q68CN4	Q68CN4_HUMAN	34.96	2	1	1	N	51536
59	4274	V9HW68	V9HW68_HUMAN	34.96	2	1	1	N	51716
59	4277	Q6MZV7	Q6MZV7_HUMAN	34.96	2	1	1	N	52121
59	58176	A0A087X079	A0A087X079_HUMAN	34.96	2	1	1	N	51913
59	4276	A8K008	A8K008_HUMAN	34.96	2	1	1	N	51597
59	4275	Q6N089	Q6N089_HUMAN	34.96	2	1	1	N	51725
59	58177	A0A087WYE1	A0A087WYE1_HUMAN	34.96	2	1	1	N	52110
59	4278	Q6N095	Q6N095_HUMAN	34.96	2	1	1	N	52360
59	4280	Q5EFE5	Q5EFE5_HUMAN	34.96	2	1	1	N	52363
59	58178	A0A087WYC5	A0A087WYC5_HUMAN	34.96	2	1	1	N	52426
59	4279	Q6MZQ6	Q6MZQ6_HUMAN	34.96	2	1	1	N	52043
59	4281	Q6N094	Q6N094_HUMAN	34.96	2	1	1	N	52613
59	4282	Q6N097	Q6N097_HUMAN	34.96	2	1	1	N	52759
59	4283	Q7Z351	Q7Z351_HUMAN	34.96	2	1	1	N	52852
59	4284	Q8NF17	Q8NF17_HUMAN	34.96	2	1	1	N	56111
59	4285	Q6N030	Q6N030_HUMAN	34.96	2	1	1	N	57020
59	4286	Q5EBM2	Q5EBM2_HUMAN	34.96	2	1	1	N	56813
59	58179	A0A087WVW2	A0A087WVW2_HUMAN	34.96	2	1	1	N	57156
60	4253	A0A0A0MRQ5	A0A0A0MRQ5_HUMAN	34.19	8	1	1	N	10676
60	4255	A0A0A0MSIO	A0A0A0MSIO_HUMAN	34.19	5	1	1	N	18976
60	4256	B2R4P2	B2R4P2_HUMAN	34.19	4	1	1	N	22201
60	4258	Q06830	PRDX1_HUMAN	34.19	4	1	1	N	22110



47	4199	B4E3A8	B4E3A8_HUMAN	31.95	3	1	1	N	38685
47	4200	P30740	ILEU_HUMAN	31.95	3	1	1	N	42742
47	4201	V9HWH1	V9HWH1_HUMAN	31.95	3	1	1	N	42742
45	4188	B4DKL5	B4DKL5_HUMAN	30.76	5	1	1	N	27097
45	4189	P15259	PGAM2_HUMAN	30.76	4	1	1	N	28766
45	4193	Q6FHK8	Q6FHK8_HUMAN	30.76	4	1	1	N	28835
45	4192	Q6P6D7	Q6P6D7_HUMAN	30.76	4	1	1	N	28820
45	4195	Q53G35	Q53G35_HUMAN	30.76	4	1	1	N	28832
45	4190	Q6FHU2	Q6FHU2_HUMAN	30.76	4	1	1	N	28804
45	4194	Q0D2Q6	Q0D2Q6_HUMAN	30.76	4	1	1	N	28792
45	4191	P18669	PGAM1_HUMAN	30.76	4	1	1	N	28804
45	4300	B7Z9E5	B7Z9E5_HUMAN	30.76	9	1	1	N	14550
45	4299	B4DMJ7	B4DMJ7_HUMAN	30.76	9	1	1	N	14526
45	4301	B4DJA4	B4DJA4_HUMAN	30.76	8	1	1	N	16120
45	4302	A4D2J6	A4D2J6_HUMAN	30.76	4	1	1	N	28220
61	4298	O75594	PGRP1_HUMAN	29.17	4	1	1	N	21731
4	614	H6VRG2	K22E_HUMAN	221.14	23	12	8	Y	65433
1	527	P05787-2	K1C10_HUMAN	207.65	21	16	12	N	58827
3	544	B4E1T1	H6VRG1_HUMAN	202.54	18	14	9	N	66126
3	539	P19012-2	H6VRG0_HUMAN	202.54	18	14	9	N	65970
3	543	B4DPR2	K2C1_HUMAN	202.54	18	14	9	N	66039
3	540	B7WNR0	H6VRF9_HUMAN	202.54	18	14	9	N	66069
3	542	D6RHD5	H6VRG3_HUMAN	202.54	18	14	9	N	66111
3	546	H0YA55	H6VRG2_HUMAN	202.54	18	14	9	N	66066
3	541	C9JKR2	H6VRF8_HUMAN	202.54	18	14	9	N	66053
2	48009	P02768-2	K1C13_HUMAN	167.88	18	10	5	Y	45867
7	538	P02768-3	K1C9_HUMAN	137.00	10	7	6	Y	62064
5	56038	A0A087WWT3	K2C8_HUMAN	121.02	9	7	5	Y	56608
8	571	B4DPP6	B4DRR0_HUMAN	115.09	9	5	1	N	57839



8	610	P02768	B4DRU6_HUMAN	115.09	9	5	1	N	58536
8	578	B2RBS8	A8K2I0_HUMAN	115.09	8	5	1	N	60031
8	574	Q56G89	K2C6A_HUMAN	115.09	8	5	1	N	60045
8	570	A8K9P0	B4DWU6_HUMAN	115.09	9	5	1	N	55799
8	575	A0A0C4DGB6	K2C6C_HUMAN	115.09	8	5	1	N	60025
9	612	F6KPG5	B4E1T1_HUMAN	97.54	8	5	2	N	58851
9	613	A0A087WTD7	K2C5_HUMAN	97.54	8	5	2	N	62378
10	50369	A8MYJ1	K1C15_HUMAN	85.73	17	4	2	Y	28602
17	4240	Q12802-4	CYTB_HUMAN	61.38	12	1	1	N	11140
17	4241	Q12802	Q76LA1_HUMAN	61.38	12	1	1	N	11140
14	4183	Q12802-2	PIGR_HUMAN	59.03	2	2	2	N	83284
15	552	V9GZN0	B4DPR2_HUMAN	48.43	3	1	1	N	59574
15	551	Q71UI9-5	B7WNRO_HUMAN	48.43	3	1	1	N	56212
15	550	Q71UI9-2	D6RHD5_HUMAN	48.43	3	1	1	N	52059
15	549	C9J0D1	H0YA55_HUMAN	48.43	3	1	1	N	51578
15	547	P0C0S5	C9JKR2_HUMAN	48.43	4	1	1	N	47287
15	48005	Q96KK5	ALBU_HUMAN	48.43	4	1	1	N	47361
15	48006	A3KPC7	ALBU_HUMAN	48.43	4	1	1	N	45160
15	548	Q71UI9	A0A087WWT3_HUMAN	48.43	4	1	1	N	45148
15	537	Q99878	B4DPP6_HUMAN	48.43	2	1	1	N	70363
15	536	A0A024RAS2	ALBU_HUMAN	48.43	2	1	1	N	69367
15	553	Q9BTM1	B2RBS8_HUMAN	48.43	2	1	1	N	69393
15	535	Q16777	Q56G89_HUMAN	48.43	2	1	1	N	69084
15	534	Q93077	A8K9P0_HUMAN	48.43	2	1	1	N	69268
15	533	Q8IUE6	A0A0C4DGB6_HUMAN	48.43	2	1	1	N	69227
15	532	Q08AJ9	F6KPG5_HUMAN	48.43	3	1	1	N	66531
12	653	B2R5B3	A0A087WTD7_HUMAN	36.39	2	2	2	N	161184
12	654	Q7L7L0	A8MYJ1_HUMAN	36.39	2	2	2	N	161840
12	48060	Q6FI13	AKP13_HUMAN	36.39	1	2	2	N	305280



12	198	A0A024R017	AKP13_HUMAN	36.39	1	2	2	N	307550
12	48061	P20671	AKP13_HUMAN	36.39	1	2	2	N	307845
18	5116	A4FTV9	V9GZNO_HUMAN	25.21	19	1	1	N	5013
18	60664	B2R5B6	H2AV_HUMAN	25.21	14	1	1	N	6892
18	60665	P04908	H2AV_HUMAN	25.21	8	1	1	N	12146
18	5117	P0C0S8	C9J0D1_HUMAN	25.21	7	1	1	N	13163
18	5120	Q96QV6	H2AZ_HUMAN	25.21	7	1	1	N	13553
18	5122	P16104	H2A1H_HUMAN	25.21	7	1	1	N	13906
18	5118	Q9BTM1-2	A3KPC7_HUMAN	25.21	7	1	1	N	13906
18	5119	Q96PG2	H2AV_HUMAN	25.21	7	1	1	N	13509
18	5121	A0A087X0W2	H2A1J_HUMAN	25.21	7	1	1	N	13936
18	5123	I6L9F6	A0A024RAS2_HUMAN	25.21	7	1	1	N	14019
18	5124	B4DR43	H2AJ_HUMAN	25.21	7	1	1	N	14019
18	5125	B3KXJ0	H2A2C_HUMAN	25.21	7	1	1	N	13988
18	5134	B3KQI5	H2A1C_HUMAN	25.21	7	1	1	N	14105
18	5133	J3QR65	H2A2B_HUMAN	25.21	7	1	1	N	13995
18	5128	Q9NYA4	Q08AJ9_HUMAN	25.21	7	1	1	N	14135
18	5136	A1A4E9	B2R5B3_HUMAN	25.21	7	1	1	N	14111
18	5132	A8K2H9	H2A3_HUMAN	25.21	7	1	1	N	14121
18	5130	P05164-2	H2A2A_HUMAN	25.21	7	1	1	N	14095
18	5135	P05164-3	A0A024R017_HUMAN	25.21	7	1	1	N	14105
18	5126	P05164	H2A1D_HUMAN	25.21	7	1	1	N	14107
18	5131	Q86Y46-2	A4FTV9_HUMAN	25.21	7	1	1	N	14091
18	5127	Q14CN4-3	B2R5B6_HUMAN	25.21	7	1	1	N	14137
18	5137	Q14CN4-2	H2A1B_HUMAN	25.21	7	1	1	N	14135
18	5129	P02788-2	H2A1_HUMAN	25.21	7	1	1	N	14091
18	5138	Q9NSB2	H2A1A_HUMAN	25.21	7	1	1	N	14233
18	5140	E9PN25	H2AX_HUMAN	25.21	6	1	1	N	15145
18	60666	E9PPY6	H2AJ_HUMAN	25.21	6	1	1	N	16110



20	5146	E9PI65	M4A10_HUMAN	23.93	3	1	1	N	29747
19	5143	E9PQQ4	A0A087XOW2_HUMAN	23.90	4	1	1	N	32584
19	4650	E9PQK7	I6L9F6_HUMAN	23.90	4	1	1	N	32598
19	5144	E9PK54	B4DR43_HUMAN	23.90	3	1	1	N	39507
19	5145	E9PLF4	B3KXJ0_HUMAN	23.90	2	1	1	N	50169
19	8572	B4DNV4	B3KQI5_HUMAN	23.90	2	1	1	N	61489
13	5147	B4DEF7	J3QR65_HUMAN	23.34	1	1	1	N	126671
13	5148	B4E1T6	MTMR4_HUMAN	23.34	1	1	1	N	133353
8	527	B3KUS2	K1C10_HUMAN	256.36	35	20	16	Y	58827
9	614	B4DNX1	K22E_HUMAN	252.23	37	21	14	Y	65433
6	544	Q53HF2	H6VRG1_HUMAN	247.53	34	21	1	Y	66126
6	539	E9PNE6	H6VRG0_HUMAN	247.53	34	21	1	Y	65970
6	543	B4DXY3	K2C1_HUMAN	247.53	34	21	1	Y	66039
6	542	B4DVU9	H6VRG3_HUMAN	247.53	34	21	1	Y	66111
6	541	B4E388	H6VRF8_HUMAN	247.53	34	21	1	Y	66053
1	48003	B4DFN9	AMY2B_HUMAN	227.46	34	13	2	Y	42021
4	48005	P0DMV8-2	ALBU_HUMAN	221.27	25	13	2	Y	47361
5	48022	B4DI39	IGHA2_HUMAN	211.29	20	10	5	Y	36526
3	48006	B3KTV0	ALBU_HUMAN	209.54	28	13	2	Y	45160
11	532	B4DWK5	F6KPG5_HUMAN	199.30	23	16	2	Y	66531
11	536	E9PKE3	ALBU_HUMAN	199.30	22	16	2	Y	69367
11	535	Q53FA3	Q56G89_HUMAN	199.30	22	16	2	Y	69084
11	537	B2RCQ9	B4DPP6_HUMAN	199.30	22	16	2	Y	70363
10	521	Q53FC7	AMY1_HUMAN	194.76	23	11	1	Y	57768
10	520	B2R6X5	B7ZMD7_HUMAN	194.76	23	11	1	Y	57754
2	48009	B3KSM6	K1C13_HUMAN	185.70	18	16	10	Y	45867
18	538	Q53GZ6	K1C9_HUMAN	153.25	14	8	7	N	62064
17	560	V9HWB4	Q6ZW64_HUMAN	148.26	12	5	1	N	53321
17	561	Q59EJ3	Q96DK0_HUMAN	148.26	12	5	1	N	53533



17	564	A0A087WW55	Q6N092_HUMAN	148.26	11	5	1	N	56424
15	571	Q8WZ42-5	B4DRRO_HUMAN	140.26	14	9	1	N	57839
15	610	Q8WZ42-11	B4DRU6_HUMAN	140.26	14	9	1	N	58536
15	578	Q8WZ42-4	A8K2I0_HUMAN	140.26	14	9	1	N	60031
15	574	Q8WZ42-7	K2C6A_HUMAN	140.26	14	9	1	N	60045
21	613	Q8WZ42-2	K2C5_HUMAN	125.68	10	7	2	N	62378
12	56038	Q8WZ42-8	K2C8_HUMAN	114.37	7	6	2	Y	56608
14	56035	Q8WZ42-13	F8W0C6_HUMAN	114.00	20	6	1	Y	20656
22	581	Q8WZ42-12	A1A4E9_HUMAN	112.04	9	6	1	N	49586
22	583	Q8WZ42-3	A8K2H9_HUMAN	112.04	9	6	1	N	49517
25	55295	Q8WZ42-10	PERM_HUMAN	104.28	6	4	4	Y	73854
25	55296	Q8WZ42-9	PERM_HUMAN	104.28	5	4	4	Y	87249
25	3231	Q5T749	PERM_HUMAN	100.80	5	4	4	Y	83869
30	58178	P08779	A0A087WYC5_HUMAN	98.09	7	3	1	Y	52426
23	50369	A0A087WZW8	K1C15_HUMAN	97.61	12	5	2	Y	28602
24	50368	V9HWI4	K2C73_HUMAN	94.12	6	3	1	Y	41984
24	60661	U3KPS2	K2C72_HUMAN	94.12	4	3	1	Y	51124
24	60662	D6CHE9	K2C72_HUMAN	94.12	4	3	1	Y	55749
29	61887	P24158	TRFL_HUMAN	87.49	4	3	3	Y	73161
32	58174	B9A064	A0A087X1C7_HUMAN	85.51	6	3	1	Y	50488
28	4183	A0A0B4J231	PIGR_HUMAN	83.37	4	4	4	N	83284
26	60663	S6BAP8	KRT84_HUMAN	75.73	3	3	1	Y	64842
38	4170	S6C4Q9	Q6EZE9_HUMAN	65.78	19	2	2	Y	10245
38	4169	A0A087WWC9	DEF1_HUMAN	65.78	19	2	2	Y	10201
38	4168	Q5FWF9	DEF3_HUMAN	65.78	19	2	2	Y	10245
48	56039	A0A087WXC3	E9PN25_HUMAN	44.45	8	1	1	N	14621
48	3410	Q6GMW4	E9PPY6_HUMAN	44.45	8	1	1	N	15153
48	5511	A0A087WWU7	E9PI65_HUMAN	44.45	7	1	1	N	17916
48	9533	A0A087WYN7	E9PQQ4_HUMAN	44.45	6	1	1	N	18727



48	3411	A0A087WWT5	E9PQK7_HUMAN	44.45	6	1	1	N	19466
48	56040	Q5CZ94	E9PK54_HUMAN	44.45	6	1	1	N	20013
48	3413	A0A087WU42	E9PLF4_HUMAN	44.45	6	1	1	N	20369
48	3415	A0A087WYR4	B4DNV4_HUMAN	44.45	5	1	1	N	25279
48	3416	A0A5E4	B4DEF7_HUMAN	44.45	4	1	1	N	30420
48	3417	A0A087X2A1	B4E1T6_HUMAN	44.45	3	1	1	N	43003
48	3418	A0A087WX49	B3KUS2_HUMAN	44.45	3	1	1	N	45139
48	3419	Q6GMW6	B4DNX1_HUMAN	44.45	3	1	1	N	45127
48	3420	Q6PIK1	Q53HF2_HUMAN	44.45	2	1	1	N	53500
48	56041	Q6P5S3	E9PNE6_HUMAN	44.45	2	1	1	N	54976
48	3421	Q6GMV7	B4DXY3_HUMAN	44.45	2	1	1	N	58333
48	3422	Q96E61	B4DVU9_HUMAN	44.45	2	1	1	N	59134
48	3423	C9JDE9	B4E388_HUMAN	44.45	2	1	1	N	61531
48	3424	Q9NR99	B4DFN9_HUMAN	44.45	2	1	1	N	62453
48	56042	P02533	HS71A_HUMAN	44.45	2	1	1	N	63937
48	3425	D5FZW3	B4DI39_HUMAN	44.45	2	1	1	N	67531
48	3426	J7LKS8	B3KTVO_HUMAN	44.45	2	1	1	N	67980
48	3427	Q9H1I6	B4DWK5_HUMAN	44.45	2	1	1	N	67994
48	56043	A9YUX2	E9PKE3_HUMAN	44.45	2	1	1	N	68806
48	3435	Q9UBV6	Q53FA3_HUMAN	44.45	2	1	1	N	70404
48	3436	Q9BXA2	B2RCQ9_HUMAN	44.45	2	1	1	N	70376
48	3438	E9M263	Q53FC7_HUMAN	44.45	2	1	1	N	71004
48	3439	O95408	B2R6X5_HUMAN	44.45	2	1	1	N	70958
48	3440	Q9BWV6	B3KSM6_HUMAN	44.45	2	1	1	N	70972
48	3441	Q8IZI0	Q53GZ6_HUMAN	44.45	2	1	1	N	70899
48	3442	B3VL17	V9HWB4_HUMAN	44.45	2	1	1	N	72333
48	3444	E9NGZ5	Q59EJ3_HUMAN	44.45	2	1	1	N	77496
46	48076	Q3LR79	A0A087WW55_HUMAN	36.99	8	1	1	Y	26622
36	48013	Q52MT0	TITIN_HUMAN	36.32	0	1	1	Y	3652988



36	48014	Q9BWU5	TITIN_HUMAN	36.32	0	1	1	Y	3713499
36	48015	Q6V0K9	TITIN_HUMAN	36.32	0	1	1	Y	3715927
36	48016	B3VL31	TITIN_HUMAN	36.32	0	1	1	Y	3734544
36	48017	Q8IUL9	TITIN_HUMAN	36.32	0	1	1	Y	3805600
36	48018	B3VL05	TITIN_HUMAN	36.32	0	1	1	Y	3829737
36	48019	Q0Z944	TITIN_HUMAN	36.32	0	1	1	Y	3830960
36	48020	Q4TZM4	TITIN_HUMAN	36.32	0	1	1	Y	3994506
36	48010	Q3Y9I8	TITIN_HUMAN	36.32	0	1	1	Y	2992897
36	48011	F8W6P5	TITIN_HUMAN	36.32	0	1	1	Y	3006712
36	48012	Q9UP81	TITIN_HUMAN	36.32	0	1	1	Y	3013913
49	5519	B5ANL9	KPRP_HUMAN	35.26	2	1	1	Y	64136
51	4173	C8C504	B2MUD5_HUMAN	30.14	4	1	1	N	20662
51	4174	D9YZU5	ELNE_HUMAN	30.14	3	1	1	N	28518
3	544	B3VL86	H6VRG1_HUMAN	210.12	30	19	14	Y	66126
3	539	Q14473	H6VRG0_HUMAN	210.12	30	19	14	Y	65970
3	543	F8WCH0	K2C1_HUMAN	210.12	30	19	14	Y	66039
3	542	C9JUM1	H6VRG3_HUMAN	210.12	30	19	14	Y	66111
3	541	C9JZR7	H6VRF8_HUMAN	210.12	30	19	14	Y	66053
2	527	F8WB63	K1C10_HUMAN	203.49	31	19	14	Y	58827
7	614	B8ZZJ2	K22E_HUMAN	194.68	22	13	9	Y	65433
1	48009	A1E282	K1C13_HUMAN	154.40	17	15	10	Y	45867
11	538	K7EM38	K1C9_HUMAN	140.47	22	10	9	Y	62064
8	48022	C9JFL5	IGHA2_HUMAN	121.09	13	4	4	Y	36526
6	55294	F6UVQ4	D6RD17_HUMAN	112.06	20	5	5	Y	18122
17	571	F6QUT6	B4DRR0_HUMAN	102.96	10	6	1	N	57839
17	610	E7EVS6	B4DRU6_HUMAN	102.96	10	6	1	N	58536
17	578	I3L3R2	A8K2I0_HUMAN	102.96	9	6	1	N	60031
17	574	J3KT65	K2C6A_HUMAN	102.96	9	6	1	N	60045
4	55283	I3L3I0	A0A087X130_HUMAN	102.75	20	3	1	Y	25136



12	1473	I3L1U9	K1C16_HUMAN	100.75	13	7	2	N	51268
5	55284	A6NL76	A0A087WZW8_HUMAN	97.00	20	3	1	Y	25601
9	56038	Q13707	K2C8_HUMAN	96.33	7	4	2	Y	56608
21	612	B3KUD3	B4E1T1_HUMAN	92.21	6	4	1	N	58851
21	613	B7Z6P1	K2C5_HUMAN	92.21	6	4	1	N	62378
22	583	B3KW67	A8K2H9_HUMAN	88.08	6	4	1	N	49517
22	581	L0R5C4	A1A4E9_HUMAN	88.08	6	4	1	N	49586
24	50369	H7C013	K1C15_HUMAN	69.04	12	3	1	Y	28602
25	4173	A6NKL6	B2MUD5_HUMAN	68.55	13	4	4	Y	20662
25	4174	B4E262	ELNE_HUMAN	68.55	9	4	4	Y	28518
34	4214	Q9UGM3-9	F8VV32_HUMAN	58.14	12	1	1	N	11488
34	4215	Q9UGM3-8	A0A0B4J259_HUMAN	58.14	9	1	1	N	15329
34	4216	Q9UGM3-5	LYSC_HUMAN	58.14	8	1	1	N	16537
34	4217	Q9UGM3-7	B2R4C5_HUMAN	58.14	8	1	1	N	16537
35	1483	Q9UGM3-6	ZA2G_HUMAN	50.37	3	1	1	N	34259
36	4162	H0YIN9	LC1L1_HUMAN	46.14	7	1	1	N	17918
36	4163	H0YI76	LCN1_HUMAN	46.14	6	1	1	N	19250
36	4164	B4DL32	A0A024R8D7_HUMAN	46.14	6	1	1	N	19250
37	4252	A7MBN2	CATG_HUMAN	44.53	4	1	1	N	28837
38	58169	J3QSU6	LDHA_HUMAN	39.25	4	1	1	N	30205
38	4232	B4DWU0	B4DJI1_HUMAN	39.25	3	1	1	N	33593
38	4233	B4E2J5	V9HWP9_HUMAN	39.25	3	1	1	N	36689
38	4234	C9JA05	LDHA_HUMAN	39.25	3	1	1	N	36689
38	58170	D6RHJ6	LDHA_HUMAN	39.25	3	1	1	N	39837
29	4183	P01591	PIGR_HUMAN	33.54	2	2	2	N	83284
39	5502	Q8N4G4	V9HWI4_HUMAN	33.44	1	1	1	N	78182
26	653	F8W148	A0A087WTD7_HUMAN	31.06	1	1	1	N	161184
26	654	P23280	A8MYJ1_HUMAN	31.06	1	1	1	N	161840
26	48060	B4DUH8	AKP13_HUMAN	31.06	0	1	1	N	305280



26	198	P23280-2	AKP13_HUMAN	31.06	0	1	1	N	307550
26	48061	A0A087WWV8	AKP13_HUMAN	31.06	0	1	1	N	307845
32	4296	A0A087WYL9	U3KPS2_HUMAN	26.31	6	1	1	N	23611
32	4295	C9JM50	D6CHE9_HUMAN	26.31	6	1	1	N	23625
32	4297	K7EPJ9	PRTN3_HUMAN	26.31	5	1	1	N	27807
40	4303	P08727	IGLL5_HUMAN	26.04	4	1	1	N	23063
40	4304	Q04695	A0A0B4J231_HUMAN	26.04	4	1	1	N	23150
40	4306	P19012	S6BAP8_HUMAN	26.04	4	1	1	N	22852
40	4307	B1AN99	S6C4Q9_HUMAN	26.04	4	1	1	N	22858
40	58181	P35030-5	A0A087WWC9_HUMAN	26.04	3	1	1	N	24684
40	4308	P35030-3	Q5FWF9_HUMAN	26.04	3	1	1	N	24795
40	58182	P35030-2	A0A087WXC3_HUMAN	26.04	3	1	1	N	24742
40	4309	P35030-4	Q6GMW4_HUMAN	26.04	3	1	1	N	24855
40	58183	Q08499-6	A0A087WWU7_HUMAN	26.04	3	1	1	N	24792
40	58184	C9JH18	A0A087WYN7_HUMAN	26.04	3	1	1	N	25013
40	58185	Q6Y7W6-4	A0A087WWT5_HUMAN	26.04	3	1	1	N	24979
40	4310	Q6Y7W6-5	Q5CZ94_HUMAN	26.04	3	1	1	N	25002
40	4172	A0A024R4A5	Q6NS95_HUMAN	26.04	3	1	1	N	25148
40	58186	Q6Y7W6	A0A087WU42_HUMAN	26.04	3	1	1	N	24894
40	58187	Q6Y7W6-3	A0A087WYR4_HUMAN	26.04	3	1	1	N	24831
40	4312	I1E4Y6	A0A5E4_HUMAN	26.04	3	1	1	N	24747
40	58189	L8B936	A0A087X2A1_HUMAN	26.04	3	1	1	N	24971
40	58188	Q6URC4	A0A087WX49_HUMAN	26.04	3	1	1	N	24944
40	4311	Q6P5S8	Q6GMW6_HUMAN	26.04	3	1	1	N	24804
40	4313	P04259	Q6PIK1_HUMAN	26.04	3	1	1	N	24858
40	4315	Q9UGM3-4	Q6P5S3_HUMAN	26.04	3	1	1	N	24928
40	4314	Q9UGM3-2	Q6GMV7_HUMAN	26.04	3	1	1	N	24950
40	4316	Q9UGM3-3	Q96E61_HUMAN	26.04	3	1	1	N	24713
27	4270	Q5TZZ9	Q6GMX6_HUMAN	25.52	2	1	1	N	51083



27	58179	P04083	AOA087WVW2_HUMAN	25.52	2	1	1	N	57156
28	48013	P12273	TITIN_HUMAN	24.91	0	1	1	Y	3652988
28	48014	P80188-2	TITIN_HUMAN	24.91	0	1	1	Y	3713499
28	48015	B4DRW1	TITIN_HUMAN	24.91	0	1	1	Y	3715927
28	48016	B4DRS2	TITIN_HUMAN	24.91	0	1	1	Y	3734544
28	48017	P19013	TITIN_HUMAN	24.91	0	1	1	Y	3805600
28	48018	B4DRR7	TITIN_HUMAN	24.91	0	1	1	Y	3829737
28	48019	Q9HC84	TITIN_HUMAN	24.91	0	1	1	Y	3830960
28	48020	A7Y9J9	TITIN_HUMAN	24.91	0	1	1	Y	3994506
43	6348	B2R4M6	C9JDE9_HUMAN	22.89	2	1	1	N	40270
33	628	P06702	MXRA5_HUMAN	22.16	0	1	1	N	312149
3	614	A0A075B6N7	K22E_HUMAN	177.53	18	10	7	Y	65433
2	527	P07355-2	K1C10_HUMAN	172.58	20	13	10	N	58827
1	544	H0YMM1	H6VRG1_HUMAN	166.37	18	13	9	N	66126
1	543	H0YKS4	K2C1_HUMAN	166.37	18	13	9	N	66039
1	540	B4DNH8	H6VRF9_HUMAN	166.37	18	13	9	N	66069
1	542	H0YMD0	H6VRG3_HUMAN	166.37	18	13	9	N	66111
1	546	H0YMU9	H6VRG2_HUMAN	166.37	18	13	9	N	66066
1	541	H0YM50	H6VRF8_HUMAN	166.37	18	13	9	N	66053
1	539	H0YN42	H6VRG0_HUMAN	166.37	18	13	9	N	65970
4	538	A0A024R5Z7	K1C9_HUMAN	115.91	5	4	3	Y	62064
5	1473	P07355	K1C16_HUMAN	87.46	7	4	1	N	51268
5	1472	V9HW65	K1C14_HUMAN	83.77	7	4	1	N	51562
9	55294	Q8NEJ1	D6RD17_HUMAN	84.15	9	2	2	Y	18122
10	56038	S6BGD6	K2C8_HUMAN	50.89	4	2	1	Y	56608
14	6925	S6B2B0	D5FZW3_HUMAN	50.39	32	1	1	N	4550
14	6923	S6BAN6	J7LKS8_HUMAN	50.39	39	1	1	N	3520
14	6922	P04406-2	Q9H1I6_HUMAN	50.39	42	1	1	N	3294
14	66125	A0A087WUS2	A9YUX2_HUMAN	50.39	21	1	1	N	6998



14	66124	P04433	Q9UBV6_HUMAN	50.39	21	1	1	N	6661
14	6929	P05109	Q9BXA2_HUMAN	50.39	22	1	1	N	6463
14	6927	B4DTX2	E9M263_HUMAN	50.39	23	1	1	N	6252
14	6928	V9HW22	O95408_HUMAN	50.39	23	1	1	N	6266
14	6945	B4DI54	Q9BWW6_HUMAN	50.39	12	1	1	N	12234
14	6941	Q6T776	Q8IZIO_HUMAN	50.39	12	1	1	N	11505
14	6935	B7Z1F7	B3VL17_HUMAN	50.39	12	1	1	N	11500
14	9594	P06870-2	E9NGZ5_HUMAN	50.39	12	1	1	N	11494
14	6939	P06870	Q3LR79_HUMAN	50.39	12	1	1	N	11482
14	6938	P10599-2	Q52MT0_HUMAN	50.39	12	1	1	N	11476
14	6940	P10599	Q9BWU5_HUMAN	50.39	12	1	1	N	11501
14	6943	H9ZYJ2	Q6V0K9_HUMAN	50.39	12	1	1	N	11474
14	6936	Q5ZEZ4	B3VL31_HUMAN	50.39	12	1	1	N	11508
14	6937	H0YJ11	Q8IUL9_HUMAN	50.39	12	1	1	N	11548
14	6934	H0YJW3	B3VL05_HUMAN	50.39	12	1	1	N	11494
14	6942	H7C5W8	Q0Z944_HUMAN	50.39	12	1	1	N	11504
14	66127	A1LOV1	Q4TZM4_HUMAN	50.39	13	1	1	N	11023
14	6933	H7C144	Q3Y9I8_HUMAN	50.39	13	1	1	N	10962
14	6932	B3KUX9	F8W6P5_HUMAN	50.39	14	1	1	N	9670
14	6931	O43707-3	Q9UP81_HUMAN	50.39	15	1	1	N	9689
14	66126	F5GXS2	B5ANL9_HUMAN	50.39	15	1	1	N	9470
14	6949	B4DFY0	C8C504_HUMAN	50.39	9	1	1	N	15997
14	66128	B7Z2W3	D9YZU5_HUMAN	50.39	9	1	1	N	15998
14	6948	Q96BG6	B3VL86_HUMAN	50.39	9	1	1	N	14956
14	6950	O43707-2	Q14473_HUMAN	50.39	7	1	1	N	18931
15	3194	B7Z565	F8WCH0_HUMAN	38.12	19	1	1	N	5570
15	55288	H9KV75	C9JUM1_HUMAN	38.12	10	1	1	N	10979
15	55289	P12814-2	C9JZR7_HUMAN	38.12	10	1	1	N	11394
15	3197	A0A024R694	F8WB63_HUMAN	38.12	10	1	1	N	11403



15	3198	P12814	B8ZZJ2_HUMAN	38.12	8	1	1	N	12969
15	3199	P12814-3	A1E282_HUMAN	38.12	8	1	1	N	13539
15	3200	O43707	K7EM38_HUMAN	38.12	8	1	1	N	14522
15	55290	P12814-4	C9JFL5_HUMAN	38.12	7	1	1	N	16271
15	3203	Q8IWM0	F6UVQ4_HUMAN	38.12	7	1	1	N	16759
15	3202	H0YAS8	F6QUT6_HUMAN	38.12	7	1	1	N	16759
15	55291	B4DW11	E7EVS6_HUMAN	38.12	6	1	1	N	17975
15	3205	P10909-3	I3L3R2_HUMAN	38.12	6	1	1	N	18032
15	3206	H0YC35	J3KT65_HUMAN	38.12	5	1	1	N	21804
15	3208	P10909-4	I3L3I0_HUMAN	38.12	5	1	1	N	23845
15	3207	P10909	I3L1U9_HUMAN	38.12	5	1	1	N	23845
15	55292	P10909-5	I3L4N8_HUMAN	38.12	4	1	1	N	26935
15	3164	P10909-2	A6NL76_HUMAN	38.12	4	1	1	N	28165
15	3210	F5H6Q2	Q13707_HUMAN	38.12	3	1	1	N	36807
15	3166	Q5UGI3	B4DVQ0_HUMAN	38.12	3	1	1	N	37349
15	3167	F5H747	B3KUD3_HUMAN	38.12	3	1	1	N	37824
15	3168	Q96MH4	B7Z6P1_HUMAN	38.12	3	1	1	N	38579
15	3169	A8K674	B4DW52_HUMAN	38.12	3	1	1	N	38633
15	3170	L8B4M0	B4E335_HUMAN	38.12	3	1	1	N	39226
15	3171	K7EMA8	B4E3A4_HUMAN	38.12	3	1	1	N	39800
15	3172	Q8IX02	Q8WVW5_HUMAN	38.12	3	1	1	N	40503
15	3176	Q19KS2	Q53GK6_HUMAN	38.12	3	1	1	N	41723
15	3174	B2MV14	Q53G76_HUMAN	38.12	3	1	1	N	41721
15	3173	B7ZAL5	Q53G99_HUMAN	38.12	3	1	1	N	41765
15	3177	E7EQB2	B3KW67_HUMAN	38.12	3	1	1	N	41817
15	3211	B3KSL2	L0R5C4_HUMAN	38.12	2	1	1	N	50338
13	48014	E7ER44	TITIN_HUMAN	28.62	0	1	1	Y	3713499
13	48015	Q2TUW9	TITIN_HUMAN	28.62	0	1	1	Y	3715927
13	48016	P02788	TITIN_HUMAN	28.62	0	1	1	Y	3734544



13	48017	Q5EK51	TITIN_HUMAN	28.62	0	1	1	Y	3805600
13	48018	W8QEY1	TITIN_HUMAN	28.62	0	1	1	Y	3829737
13	48019	A8K494	TITIN_HUMAN	28.62	0	1	1	Y	3830960
13	48020	B3VMW0	TITIN_HUMAN	28.62	0	1	1	Y	3994506
16	585	F2Z393	H7C013_HUMAN	27.66	4	1	1	N	22859
16	549	P37837	H0YA55_HUMAN	27.66	2	1	1	N	51578
16	550	F8WE04	D6RHD5_HUMAN	27.66	2	1	1	N	52059
16	551	P04792	B7WNRO_HUMAN	27.66	1	1	1	N	56212
16	552	V9HW43	B4DPR2_HUMAN	27.66	1	1	1	N	59574
16	532	K7EMV3	F6KPG5_HUMAN	27.66	1	1	1	N	66531
16	533	B4E380	A0A0C4DGB6_HUMAN	27.66	1	1	1	N	69227
16	534	K7EP01	A8K9P0_HUMAN	27.66	1	1	1	N	69268
16	535	B4DEB1	Q56G89_HUMAN	27.66	1	1	1	N	69084
16	536	K7EK07	ALBU_HUMAN	27.66	1	1	1	N	69367
16	553	Q6NXT2	B2RBS8_HUMAN	27.66	1	1	1	N	69393
16	537	Q5TEC6	B4DPP6_HUMAN	27.66	1	1	1	N	70363
17	643	Q71DI3	T200C_HUMAN	25.20	2	1	1	N	63928
18	599	B2R6Y1	B4E262_HUMAN	25.09	2	1	1	N	41092
18	48023	Q16695	DMBT1_HUMAN	25.09	1	1	1	N	124452
18	48024	B2R4P9	DMBT1_HUMAN	25.09	0	1	1	N	180972
18	48026	P84243	DMBT1_HUMAN	25.09	0	1	1	N	258418
18	48027	P68431	DMBT1_HUMAN	25.09	0	1	1	N	273442
18	48028	K7ES00	DMBT1_HUMAN	25.09	0	1	1	N	274464
1	48003	Q5H9B4	AMY2B_HUMAN	206.10	18	12	12	Y	42021
3	527	Q5H9B5	K1C10_HUMAN	88.85	6	3	3	N	58827
2	614	Q5H9A7	K22E_HUMAN	87.87	5	3	2	N	65433
4	542	Q58P21	H6VRG3_HUMAN	77.22	3	2	2	N	66111
4	543	Q6FGX5	K2C1_HUMAN	77.22	3	2	2	N	66039
4	546	B3KQF4	H6VRG2_HUMAN	77.22	3	2	2	N	66066



4	541	P01033	H6VRF8_HUMAN	77.22	3	2	2	N	66053
4	539	P20160	H6VRG0_HUMAN	77.22	3	2	2	N	65970
4	540	Q6B823	H6VRF9_HUMAN	77.22	3	2	2	N	66069
4	544	P62805	H6VRG1_HUMAN	77.22	3	2	2	N	66126
5	571	Q0VAS5	B4DRRO_HUMAN	48.85	4	2	1	N	57839
5	610	B2R4R0	B4DRU6_HUMAN	48.85	3	2	1	N	58536
5	578	B4DKJ0	A8K2I0_HUMAN	48.85	3	2	1	N	60031
5	574	P04746	K2C6A_HUMAN	48.85	3	2	1	N	60045
9	605	Q53F26	H0YIN9_HUMAN	41.33	5	1	1	N	21974
9	606	P19961	H0YI76_HUMAN	41.33	4	1	1	N	23119
9	607	H0YH14	B4DL32_HUMAN	41.33	4	1	1	N	27312
9	612	A8K2U0-2	B4E1T1_HUMAN	41.33	2	1	1	N	58851
9	613	H0YGG5	K2C5_HUMAN	41.33	2	1	1	N	62378
6	617	B3KVV6	A7MBN2_HUMAN	23.38	0	1	1	N	210488
6	2176	A8K2U0	J3QSU6_HUMAN	23.38	0	1	1	N	220851
3	614	H0Y4R5	K22E_HUMAN	144.03	12	6	4	Y	65433
2	527	Q5SNT2	K1C10_HUMAN	137.08	12	8	6	N	58827
1	544	Q8I WV7	H6VRG1_HUMAN	134.35	13	8	5	N	66126
1	543	F8WDP3	K2C1_HUMAN	134.35	13	8	5	N	66039
1	540	C9JFY0	H6VRF9_HUMAN	134.35	13	8	5	N	66069
1	542	F8W921	H6VRG3_HUMAN	134.35	13	8	5	N	66111
1	546	D6RA39	H6VRG2_HUMAN	134.35	13	8	5	N	66066
1	541	C9JQ35	H6VRF8_HUMAN	134.35	13	8	5	N	66053
1	539	F8W9W7	H6VRG0_HUMAN	134.35	13	8	5	N	65970
4	48003	X6R3X1	AMY2B_HUMAN	87.63	6	2	2	Y	42021
8	538	X5DR89	K1C9_HUMAN	76.57	4	3	2	N	62064
9	613	A8K1R1	K2C5_HUMAN	71.55	6	3	2	N	62378
5	1465	Q5T4F4-6	B4DWU0_HUMAN	71.39	17	3	1	N	15724
5	1466	B7Z6J9	B4E2J5_HUMAN	71.39	12	3	1	N	21469



5	1472	Q5T4F4-8	K1C14_HUMAN	71.39	5	3	1	N	51562
5	1473	A0A0A0MR62	K1C16_HUMAN	71.39	5	3	1	N	51268
12	4241	I6L9I9	Q76LA1_HUMAN	62.37	12	1	1	N	11140
12	4240	F8W7S5	CYTB_HUMAN	62.37	12	1	1	N	11140
11	48005	A1A5C5	ALBU_HUMAN	56.72	6	2	2	N	47361
11	547	A0A0A0MTG6	C9JKR2_HUMAN	56.72	6	2	2	N	47287
11	549	A0A087WVV2	HOYA55_HUMAN	56.72	5	2	2	N	51578
11	550	A1A5C4	D6RHD5_HUMAN	56.72	5	2	2	N	52059
11	551	A0A0A0MRV0	B7WNR0_HUMAN	56.72	5	2	2	N	56212
11	552	A7BI36	B4DPR2_HUMAN	56.72	4	2	2	N	59574
11	532	Q9Y6F6-6	F6KPG5_HUMAN	56.72	4	2	2	N	66531
11	533	Q9Y6F6-3	A0A0C4DGB6_HUMAN	56.72	4	2	2	N	69227
11	534	H0YI08	A8K9P0_HUMAN	56.72	4	2	2	N	69268
11	535	Q9Y6F6-5	Q56G89_HUMAN	56.72	4	2	2	N	69084
11	536	Q9Y6F6	ALBU_HUMAN	56.72	4	2	2	N	69367
11	553	Q9Y6F6-2	B2RBS8_HUMAN	56.72	4	2	2	N	69393
13	1483	Q9Y6F6-4	ZA2G_HUMAN	53.07	3	1	1	N	34259
14	4162	Q9Y6F6-9	LC1L1_HUMAN	49.75	7	1	1	N	17918
14	4163	Q9Y6F6-7	LCN1_HUMAN	49.75	6	1	1	N	19250
14	4164	Q5T3N1	A0A024R8D7_HUMAN	49.75	6	1	1	N	19250
15	3212	Q8TCD0	C9JA05_HUMAN	43.28	17	1	1	N	8168
15	55294	Q0KKI6	D6RD17_HUMAN	43.28	8	1	1	N	18122
15	3214	B4DL17	D6RHJ6_HUMAN	43.28	8	1	1	N	17679
15	3215	A4F255	IGJ_HUMAN	43.28	8	1	1	N	18099
16	4243	Q9Y509	Q8N4G4_HUMAN	35.32	4	1	1	N	19672
16	4161	Q6ZP87	F8W148_HUMAN	35.32	4	1	1	N	21063
16	1458	S6BAP0	CAH6_HUMAN	35.32	3	1	1	N	35367
16	1459	S6BAQ4	B4DUH8_HUMAN	35.32	3	1	1	N	35789
16	58159	S6AWG0	CAH6_HUMAN	35.32	3	1	1	N	35365



17	4170	S6BGD4	Q6EZE9_HUMAN	29.47	10	1	1	Y	10245
17	4169	S6C4S4	DEF1_HUMAN	29.47	10	1	1	Y	10201
17	4168	S6AWF0	DEF3_HUMAN	29.47	10	1	1	Y	10245
3	614	S6B2B6	K22E_HUMAN	183.92	15	8	5	Y	65433
2	544	S6C4S0	H6VRG1_HUMAN	170.10	15	12	8	N	66126
2	543	S6BAP4	K2C1_HUMAN	170.10	15	12	8	N	66039
2	540	S6BGE0	H6VRF9_HUMAN	170.10	15	12	8	N	66069
2	542	S6B2A6	H6VRG3_HUMAN	170.10	15	12	8	N	66111
2	546	S6BAN1	H6VRG2_HUMAN	170.10	15	12	8	N	66066
2	541	S6BGE5	H6VRF8_HUMAN	170.10	15	12	8	N	66053
2	539	S6C4R7	H6VRG0_HUMAN	170.10	15	12	8	N	65970
1	527	S6BGF9	K1C10_HUMAN	165.63	17	11	10	N	58827
4	613	S6AWE6	K2C5_HUMAN	85.26	8	5	3	N	62378
5	538	S6B286	K1C9_HUMAN	82.23	4	3	2	N	62064
11	585	A4UCT1	H7C013_HUMAN	26.34	4	1	1	N	22859
11	549	Q5ZEY3	HOYA55_HUMAN	26.34	2	1	1	N	51578
11	550	V9HVZ4	D6RHD5_HUMAN	26.34	2	1	1	N	52059
11	551	Q2TSD0	B7WNR0_HUMAN	26.34	1	1	1	N	56212
11	552	P04406	B4DPR2_HUMAN	26.34	1	1	1	N	59574
11	532	E7EUT5	F6KPG5_HUMAN	26.34	1	1	1	N	66531
11	533	Q0QET7	A0A0C4DGB6_HUMAN	26.34	1	1	1	N	69227
11	534	B4DF70	A8K9P0_HUMAN	26.34	1	1	1	N	69268
11	536	V9HW12	ALBU_HUMAN	26.34	1	1	1	N	69367
11	535	P32119	Q56G89_HUMAN	26.34	1	1	1	N	69084
11	553	Q14222	B2RBS8_HUMAN	26.34	1	1	1	N	69393
11	537	Q96C29	B4DPP6_HUMAN	26.34	1	1	1	N	70363
1	48003	Q8TBL1	AMY2B_HUMAN	237.48	18	7	7	Y	42021
2	48022	Q6P082	IGHA2_HUMAN	179.25	11	3	2	Y	36526
4	527	Q96CD8	K1C10_HUMAN	126.38	4	2	2	N	58827



5	614	Q6P4C9	K22E_HUMAN	124.42	4	2	1	N	65433
3	544	Q504Z0	H6VRG1_HUMAN	116.79	3	2	2	N	66126
3	543	B4E2C5	K2C1_HUMAN	116.79	3	2	2	N	66039
3	540	Q59GP5	H6VRF9_HUMAN	116.79	3	2	2	N	66069
3	542	Q8IUB0	H6VRG3_HUMAN	116.79	3	2	2	N	66111
3	546	Q53HR1	H6VRG2_HUMAN	116.79	3	2	2	N	66066
3	541	B4DNE0	H6VRF8_HUMAN	116.79	3	2	2	N	66053
3	539	Q96RE1	H6VRG0_HUMAN	116.79	3	2	2	N	65970
8	538	Q16577	K1C9_HUMAN	85.72	2	1	1	N	62064
13	4183	Q9NZS6	PIGR_HUMAN	51.61	1	1	1	N	83284
12	48010	Q53G89	TITIN_HUMAN	51.45	0	1	1	Y	2992897
12	48011	P68104-2	TITIN_HUMAN	51.45	0	1	1	Y	3006712
12	48012	A0A087WVQ9	TITIN_HUMAN	51.45	0	1	1	Y	3013913
12	48013	A8K9C4	TITIN_HUMAN	51.45	0	1	1	Y	3652988
12	48014	Q53G85	TITIN_HUMAN	51.45	0	1	1	Y	3713499
12	48015	Q6IPN6	TITIN_HUMAN	51.45	0	1	1	Y	3715927
12	48016	Q53HQ7	TITIN_HUMAN	51.45	0	1	1	Y	3734544
12	48017	Q53GE9	TITIN_HUMAN	51.45	0	1	1	Y	3805600
12	48018	Q53HM9	TITIN_HUMAN	51.45	0	1	1	Y	3829737
12	48019	Q53HR5	TITIN_HUMAN	51.45	0	1	1	Y	3830960
12	48020	Q6IPS9	TITIN_HUMAN	51.45	0	1	1	Y	3994506
2	527	Q6IPT9	K1C10_HUMAN	130.99	11	7	6	N	58827
3	543	Q53GA1	K2C1_HUMAN	124.32	9	6	5	N	66039
3	540	Q5VTE0	H6VRF9_HUMAN	124.32	9	6	5	N	66069
3	542	Q05639	H6VRG3_HUMAN	124.32	9	6	5	N	66111
3	546	P01598	H6VRG2_HUMAN	124.32	9	6	5	N	66066
3	541	A0N5G1	H6VRF8_HUMAN	124.32	9	6	5	N	66053
3	539	P01602	H6VRG0_HUMAN	124.32	9	6	5	N	65970
3	544	A0A0B4J2D9	H6VRG1_HUMAN	124.32	9	6	5	N	66126



4	55294	H3BR70	D6RD17_HUMAN	109.69	8	2	2	Y	18122
1	55285	E5RGE1	A0A087WV8_HUMAN	108.76	19	3	3	Y	25571
1	55286	Q6LD62	A0A087WYL9_HUMAN	108.76	19	3	3	Y	25631
1	55287	Q4VY20	A0A087WTX5_HUMAN	108.76	19	3	3	Y	25624
5	614	Q3YBA8	K22E_HUMAN	89.70	4	2	1	N	65433
6	538	E5RIR4	K1C9_HUMAN	80.18	4	3	2	N	62064
11	4214	E9PD24	F8VV32_HUMAN	62.42	12	1	1	N	11488
11	4215	B4DJF2	A0A0B4J259_HUMAN	62.42	9	1	1	N	15329
11	4217	Q53RR5	B2R4C5_HUMAN	62.42	8	1	1	N	16537
11	4216	E7EVZ2	LYSC_HUMAN	62.42	8	1	1	N	16537
9	1483	Q4VY19	ZA2G_HUMAN	49.38	3	1	1	N	34259
10	48010	I3L3T1	TITIN_HUMAN	38.58	0	1	1	Y	2992897
10	48011	K7EIT4	TITIN_HUMAN	38.58	0	1	1	Y	3006712
10	48012	E7ESK7	TITIN_HUMAN	38.58	0	1	1	Y	3013913
10	48013	E9PG15	TITIN_HUMAN	38.58	0	1	1	Y	3652988
10	48014	A2IDB2	TITIN_HUMAN	38.58	0	1	1	Y	3713499
10	48015	Q59EQ2	TITIN_HUMAN	38.58	0	1	1	Y	3715927
10	48016	B4DE78	TITIN_HUMAN	38.58	0	1	1	Y	3734544
10	48017	B4DHC4	TITIN_HUMAN	38.58	0	1	1	Y	3805600
10	48018	B5BU24	TITIN_HUMAN	38.58	0	1	1	Y	3829737
10	48019	V9HWD6	TITIN_HUMAN	38.58	0	1	1	Y	3830960
10	48020	B2R6N6	TITIN_HUMAN	38.58	0	1	1	Y	3994506
12	3194	A0A024R1K7	F8WCHO_HUMAN	34.21	19	1	1	N	5570
12	55288	B3KNB4	C9JUM1_HUMAN	34.21	10	1	1	N	10979
12	55289	V9HW98	C9JZR7_HUMAN	34.21	10	1	1	N	11394
12	3197	G9K389	F8WB63_HUMAN	34.21	10	1	1	N	11403
12	3198	G9K388	B8ZZJ2_HUMAN	34.21	8	1	1	N	12969
12	3199	A0A087X0P6	A1E282_HUMAN	34.21	8	1	1	N	13539
12	3200	A0A075B6S2	K7EM38_HUMAN	34.21	8	1	1	N	14522



12	55290	A0A0A0MRZ7	C9JFL5_HUMAN	34.21	7	1	1	N	16271
12	3203	A2NJV5	F6UVQ4_HUMAN	34.21	7	1	1	N	16759
12	3202	B7ZMG8	F6QUT6_HUMAN	34.21	7	1	1	N	16759
12	55291	Q7Z3Y5	E7EVS6_HUMAN	34.21	6	1	1	N	17975
12	3205	A0A075B6S6	I3L3R2_HUMAN	34.21	6	1	1	N	18032
12	3206	A0A075B6P5	J3KT65_HUMAN	34.21	5	1	1	N	21804
12	3208	A0A075B6S3	I3L3I0_HUMAN	34.21	5	1	1	N	23845
12	3207	A2IPI1	I3L1U9_HUMAN	34.21	5	1	1	N	23845
12	55292	P06309	I3L4N8_HUMAN	34.21	4	1	1	N	26935
12	3164	P01614	A6NL76_HUMAN	34.21	4	1	1	N	28165
12	3210	Q9UL80	Q13707_HUMAN	34.21	3	1	1	N	36807
12	3166	A2NB45	B4DVQ0_HUMAN	34.21	3	1	1	N	37349
12	3167	P01617	B3KUD3_HUMAN	34.21	3	1	1	N	37824
12	3168	A0A075B6R1	B7Z6P1_HUMAN	34.21	3	1	1	N	38579
12	3169	A0A087WW87	B4DW52_HUMAN	34.21	3	1	1	N	38633
12	3170	A0A087X0Q4	B4E335_HUMAN	34.21	3	1	1	N	39226
12	3171	A0A0A0MTQ6	B4E3A4_HUMAN	34.21	3	1	1	N	39800
12	3172	P06310	Q8WVW5_HUMAN	34.21	3	1	1	N	40503
12	3176	Q7Z3Y8	Q53GK6_HUMAN	34.21	3	1	1	N	41723
12	3174	E9PC84	Q53G76_HUMAN	34.21	3	1	1	N	41721