



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA**

Amanda Ribeiro dos Santos

**Identificação de biomarcadores na fibrogênese
pulmonar da paracoccidioidomicose**

Dissertação apresentada à
Faculdade de Medicina,
Universidade Estadual Paulista “Júlio
de Mesquita Filho”, Câmpus de
Botucatu, para obtenção do título de
Mestre(a) em Doenças Tropicais.

Orientador(a): Prof. Dr. James Venturini
Coorientador(a): Prof. Dr. Ricardo de Souza Cavalcante

**Botucatu
2018**

Amanda Ribeiro dos Santos

Identificação de biomarcadores na fibrogênese
pulmonar da paracoccidioidomicose

Dissertação apresentada à
Faculdade de Medicina,
Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”,
Câmpus de Botucatu, para
obtenção do título de Mestre
em Doenças Tropicais.

Orientador: Prof. Dr. James Venturini
Coorientador: Prof. Dr. Ricardo de Souza Cavalcante

Botucatu
2018

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÊC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRE 8/7500

Santos, Amanda Ribeiro dos.
Identificação de biomarcadores na fibrogênese pulmonar da
paracoccidioidomicose. / Amanda Ribeiro dos Santos. -
Botucatu, 2018

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista
"Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu
Orientador: James Venturini
Coorientador: Ricardo de Sousa Cavalcante
Capes: 40101096

1. Fibrose pulmonar. 2. Proteômica. 3. *Paracoccidioides*.
4. Paracoccidioidomicose. 5. Marcadores bioquímicos.

Palavras-chave: Fibrose pulmonar; *Paracoccidioides* spp;
Proteômica.

Dedicatória

Dedico este trabalho primeiramente a Deus, que me deu força, sabedoria e me guiou para que eu chegasse até aqui.

*Em segundo, dedico a minha avó, **Maria Martins Ribeiro** (in memoriam), um exemplo de mulher, de força e de fé, sendo a minha raiz forte, possibilitou eu me tornar no melhor que posso ser e dar meus frutos, entre eles meu filho, **Arthur Ribeiro dos Santos Alpha Corsi**, ao qual também dedico este trabalho, pois além de ser a alegria do meu viver, demonstrou muita paciência e amor para que este trabalho pudesse acontecer.*

Agradecimentos

*Agradeço primeiramente a minha mãe, **Thaís Martins Ribeiro**, que foi e continua sendo meu solo fértil e firme, me suprimdo com tudo o que necessito para crescer, me mantendo sempre em pé mesmo diante das maiores tempestades e me abraçando com carinho e amor diante das noites mais frias. Mãe, obrigada por sempre me lembrar de quem sou quando me esqueço. Com você aprendi a ser forte!*

*Em segundo eu agradeço ao meu pai, **Josué Shalar dos Santos**, que foi, é e sempre será meu sol, que mesmo distante, nunca me deixou faltar o calor do amor. Pai, obrigada por todo o amor, com você eu aprendi o valor da humildade.*

*Em terceiro, eu agradeço a minha querida e amada irmã, **Ana Carolina Ribeiro dos Santos**, que é o lindo girassol que cresce ao meu lado, dividimos o solo, o sol, a chuva, a seca, as pragas e somos o suporte uma da outra quando murchamos e entortamos para o lado. Irmã, obrigada por todo cuidado, com você aprendi o valor da verdadeira amizade.*

*E é com admiração e uma gratidão infinita em meu coração que agradeço meu orientador, **James Venturini**, que é um ótimo jardineiro, sabe exatamente a quantidade de água que cada flor precisa, sem matar de excesso nem de falta. As vezes eu chorava e achava que ia morrer de sede, mas depois que passava eu reconhecia o quanto havia crescido. E assim ele me ensinou a ser resiliente. E a resiliência é umas das características mais determinantes para a sobrevivência de uma planta em ambientes diferentes. James, obrigada por sempre acreditar em mim, as vezes mais do que eu mesma.*

*A minha querida tia, **Lilian Martins Ribeiro**, que é a estrela mais brilhante das minhas noites escuras e solitárias, tem o dom de encher os meus momentos de alegria e presença! Tia, obrigada por fazer parte da minha essência, com você aprendi o valor da família.*

*A minha querida prima, **Letícia Ribeiro dos Santos**, que é o girassol que cresce do meu outro lado, de características completamente diferentes, mas de infinita importância. Juntas já passamos e ainda passaremos por dias difíceis e incrivelmente prazerosos, sem nunca deixar de ajudar, amar e respeitar uma a outra. Prima, obrigada por estar sempre do meu lado, com você aprendi o dom do companheirismo.*

*Agradeço também a minha eterna priminha, **Giovana Ribeiro dos Santos**, que é a florzinha mais nova do nosso jardim, da qual eu ajudo a proteger e amar. Com ela, nasceu uma infinita alegria, simpatia e beleza. Gi, obrigada por toda a ajuda! Com você aprendi o quanto é bom cuidarmos uns dos outros.*

*A minha Madrasta, **Marcia Aparecida dos Santos**, e meus irmãos, **Luzia Shalar dos Santos**, **Felipe Shalar dos Santos** e **Carla Franciele da Silva**, por nos acolher sempre com tanto carinho e consideração. Vocês são minha segunda família e fazem parte de quem eu sou.*

*Ao meu tio, **Jonas Shalar dos Santos**, e primos **Leonardo Ribeiro dos Santos** e **João Victor Ribeiro dos Santos** por todo cuidado, carinho, amor e ensinamentos. Com vocês aprendi que cada um é único em seu jeito de ser e que temos que nos amar, respeitar e nunca deixar de estarmos juntos!*

*Ao meu melhor amigo e pai do meu filho, **Danilo de Freitas Alpha Corsi**, por partilhar comigo uma das missões mais difíceis e belas dessa vida, a de criar um filho. Obrigada por todo amor, amizade, paciência, cuidado, compreensão e respeito dedicados a mim durante todos esses anos. Sem você eu com certeza, não seria quem sou hoje e não teria chego até aqui. Você me ensinou a ser forte e segura, gratidão por todos esses presentes!*

*A também aos meus queridos **Rubens Alpha Corsi** e **Ivaneide de Freitas Leite**, por todo apoio, cuidado, carinho, amor, respeito e compreensão durante todos esses anos. Vocês também foram fundamentais na minha caminhada até aqui.*

*A **Prof^a. Dr^a. Maria Sueli Parreira de Arruda**, exemplo de mulher, artista, professora e pesquisadora, com sua garra e sabedoria tornou possível a existência e crescimento do Laboratório de Imunopatologia Experimental (LIPE), lugar onde conheci pessoas incríveis e mais aprendi nesses últimos anos.*

*As minhas eternas veteranas de LIPE, **Thais Fraga**, **Camila Marchetti** e **Luíza Mimura**, por me ensinarem tanto e além disso, por se tornarem amigas tão especiais. Vocês foram e serão sempre um exemplo de pessoas e profissionais para mim.*

*Agradeço com o coração cheio de amor, as minhas amigas, veteranas de Unesp e parceiras de laboratório, **Débora de Fátima** e **Ângela Finato**, por toda a amizade, parceria, risadas, broncas e aprendizados. Débora, com você aprendi a cultivar o amor e a bondade pelo próximo, e aceitar cada um como é. Ângela, com você aprendi a encarar minhas derrotas com a cabeça erguida e a graça de um adulto e não com a tristeza de uma criança.*

*A todos os estagiários e agregados que passaram pelo LIPE nesses sete anos, **Nara, Flávia, Júlia, Laysla, Pedro, Bruno Donanzan, Barbara Folcato, Dani, Rodolfo, Barbara Mello, Victor, Gabryelle, Caio, Raul, Ângela, Adriely, Beatriz, Augusto, Thainá, Silas, Jonatas**, e em especial a **Barbara Amorin**.*

Cada um de vocês com seu jeito único e especial me marcaram. Todos os momentos de aprendizados e ensinamentos, diversão e trabalho duro que passei com cada um de vocês ficará guardado para sempre em meu coração. Aprendi muito com todos!

*Gostaria de agradecer em especial, a **Karoline Reis**, que é uma ótima profissional e amiga querida, com a qual tive a oportunidade de passar mais tempo nesse último ano, me ajudou e esteve ao meu lado em momentos de mudanças difíceis. Obrigada por acreditar em mim, com você aprendi a confiar em minhas convicções e seguir firme, mas nunca sozinha. Um agradecimento especial também ao **Luiz Gustavo** e a **Vitória**, que me ajudaram nos experimentos desse trabalho e são jovens incrivelmente maduros e interessados. Obrigada pela admiração e carinho, com vocês tomei a consciência da importância de admirar quem queremos nos tornar.*

*À **Profª. Titular Marília Afonso Rabelo Buzalaf** (Faculdade de Odontologia de Bauru – FOB-USP) e **Drª. Mileni da Silva Fernandes** pela parceria e ensinamentos e ajuda nos experimentos com a proteômica.*

*Ao meu co-orientador **Prof. Dr. Ricardo de Souza Cavalcante** e aos colaboradores do estudo, **Prof. Titular Rinaldo “Tietê” Poncio Mendes** e **Prof. Dr. Sérgio Marrone Ribeiro** (Departamento de Doenças Tropicais e Diagnóstico por Imagem da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP) por todos os ensinamentos, pela ajuda através da classificação dos parâmetros de fibrose e seleção dos pacientes.*

*Ao grupo de micoses sistêmicas da Faculdade de Medicina de Botucatu. **Thati, Drica, Lari, Bia e Camila** por toda a ajuda e amizade nas disciplinas do mestrado.*

*Ao **Carlos Roberto Oliveira** pela grande ajuda na coleta do grupo controle e a todos que fizeram parte do meu grupo controle, em especial meu primo **Eduardo Borges Ribeiro**, meu tio **Jonas Shalar dos Santos**, os professores **Luiz Carlos da Silva Filho, Francisco Gouvêa, Fábio Negrã e Fernando Marar**, e os amigos **Sebastião Piante, Alberto Carvalho Junior e Thiago Luz**.*

*Aos funcionários da seção técnica de pós-graduação e à **Bruna Quirino Jorgetto** pela atenção a nós destinada.*

*Ao programa de **Pós-Graduação em Doenças Tropicais** e a todos os*

funcionários da Faculdade de Medicina de Botucatu por toda atenção e ajuda quando necessário.

Aos funcionários da Faculdade de Ciências da UNESP de Bauru.

*À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)** pela concessão da bolsa de estudos.*

*Ao **Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)** pelo suporte financeiro (chamada CNPq/MS/SCTIE/DECIT 34/2014 - Pesquisas sobre Doenças Pulmonares Crônicas)*

Epígrafe

*“Não cruzarás o mesmo rio duas vezes, porque outras
são as águas que correm nele.”*

Heráclito de Éfeso

Resumo

Paracoccidioidomicose (PCM) é uma micose sistêmica causada por fungos do gênero *Paracoccidioides*; suas principais formas clínicas são aguda/subaguda, crônica (FC) e residual. A maioria dos pacientes com a FC da doença, mesmo após tratamento eficaz, apresenta sequelas, principalmente fibrose pulmonar (FP) e enfisema. Os problemas sociais, econômicos e psicológicos desencadeados pela FP são subestimados. Apesar da fibrogênese na PCM ser reconhecida como um processo precoce, seus mecanismos não são totalmente conhecidos. No presente estudo, determinamos o perfil proteômico sérico de pacientes com PCM-FC com diferentes desfechos de FP. Vinte e nove pacientes com PCM pulmonar foram acompanhados periodicamente e as amostras de soro sanguíneo foram coletadas em quatro momentos: antes do tratamento (M0), cura clínica (M1), cura sorológica (M2) e cura aparente (M3). O grupo controle foi constituído por amostras de quinze indivíduos fumantes, pareados com idade e sexo dos pacientes avaliados. Ao final do tratamento (M3), os pacientes foram submetidos à avaliação de tomografia computadorizada e dois grupos de pacientes foram formados com base nos resultados de PF: PF menor (n = 17) e PF maior (n = 12). As proteínas de elevada abundância no soro foram removidas e, em seguida, submetidas à análise proteômica *shotgun* através do sistema nanoACQUITY UPLC-Xevo QTof MS. A identificação e quantificação das proteínas foram realizadas usando o software PLGS Expression E. Análise de enriquecimento e análise de rede de interação proteína-proteína (PPI) foram realizadas usando o software String. Antes do tratamento, os pacientes com PF menor, em comparação aos controles, apresentavam 91 proteínas diferencialmente expressas (60 sub-reguladas 31 superreguladas). Soro de pacientes com maior PF apresentaram 70 proteínas diferencialmente expressas (66 sub-reguladas 4 reguladas). A maioria dessas proteínas estavam envolvidas na regulação do processo celular e resposta inflamatória. Nas condições ensaiadas, o estudo permitiu identificar as proteínas APOH, A2M, GC e SERPINA1 como alvos envolvidos nos mecanismos moleculares da fibrogênese pulmonar na paracoccidioidomicose. Foi observado, ainda, que o momento de cura clínica apresentou maior atividade pró-fibrótica durante o seguimento dos pacientes. Além disso, foram identificadas 20 proteínas candidatas a biomarcadores no prognóstico da fibrose pulmonar, conforme segue: família das hemoglobulinas (HBB, HBD, HBG2, HBE1, HBG1, HBA1), ENO3, A2M, APOH, GC, IGHG-1, -2 e 3, IGLC1, -2 e -3, HP, SERPINA1, LRG1 e PZP. Nossos achados fornecem novos alvos para estudos futuros envolvendo a FP na PCM, assim como biomarcadores séricos em potencial.

Abstract

Paracoccidioidomycosis (PCM) is systemic mycosis caused by fungi of the genus *Paracoccidioides*; its main clinical forms are acute / subacute, chronic (CF) and residual. Most FC-PCM patients, even after effective treatment, present sequelae, mainly pulmonary fibrosis (PF) and emphysema. The social, economic and psychological problems triggered by PF are underestimated. Although fibrogenesis in PCM is recognized as an early process, its mechanisms are not fully known. In the present study, we aimed to determine the serum proteomic profile of patients with FC-PCM with different (PF) outcomes. Twenty-nine patients with pulmonary PCM patients were followed up periodically, and blood serum samples were collected in four moments: before treatment (M0), clinical cure (M1), serological cure (M2), and apparent cure (M3). For control group (n=15), serum samples of sex and age-matched smokers were also collected. At the end of treatment (M3), the patients were submitted to CT Scan evaluation and two groups of patients were formed based on PF outcomes: minor PF (n=17) and major PF (n=12). High-abundance proteins were removed from serum and submitted to shotgun proteomic assay using a nanoACQUITY UPLC-Xevo QToF MS system. The identification and quantification of proteins were performed using PLGS Expression E software. Enrichment analysis and protein-protein interaction (PPI) network analysis were performed using String software. Before treatment, patients with minor PF, in comparison to controls, showed 91 differentially expressed proteins (60 down-regulated and 31 up-regulated). Serum of patients with major PF exhibited 70 differentially expressed proteins (66 down-regulated and 4 up-regulated). Most of these proteins are involved in the regulation of cellular process and inflammatory response. The results allowed the identification of APOH, A2M, GC and SERPINA1 as targets involved in the molecular mechanisms of pulmonary fibrogenesis in paracoccidioidomycosis. It was also observed that the clinical cure presented greater pro-fibrotic activity during the follow-up of the patients. In addition, 20 candidate biomarkers were identified in the prognosis of pulmonary fibrosis, as follows: hemoglobin family (HBB, HBD, HBG2, HBE1, HBG1, HBA1), ENO3, A2M, APOH, GC, IGHG-1, -2 and 3, IGLC1, -2 and -3, HP, SERPINA1, LRG1 and PZP. Our findings provide new targets for further studies involving mechanisms of PF in PCM, as well as for promising potential biomarkers.

Sumário

Revisão de Literatura	12
Justificativa do estudo	40
Objetivos	41
Material e Métodos.....	42
Resultados	48
Discussão.....	82
Conclusão	93
Referências	94
Anexos.....	109

1.REVISÃO DE LITERATURA

1.1. Paracoccidioidomicose: aspectos epidemiológicos, clínicos e dos seus agentes etiológicos

A paracoccidioidomicose (PCM) é uma micose sistêmica granulomatosa causada por fungos termo-dimórficos do gênero *Paracoccidioides*. O número de espécies desse gênero ainda não é consenso entre os pesquisadores. *P. brasiliensis* e *P. lutzii* são as espécies melhores definidas do ponto de vista molecular, morfológico e clínico - com implicações no diagnóstico laboratorial (1,2). Até recentemente, a espécie *P. brasiliensis* era composta por um complexo de cinco agrupamentos filogenéticos classificados como espécies crípticas S1a, S1b, PS2, PS3, E PS4 (2–4).

As espécies filogenéticas S1a e S1b são encontradas predominantemente na América do Sul, especialmente no sudeste e sul do Brasil, Argentina e Paraguai. A espécie PS2 é menos frequente e tem uma distribuição esporádica. A espécie PS3 é exclusivamente endêmica na Colômbia e a PS4 na Venezuela. Turissini et al. (6), baseado em estudos de genealogia genética nuclear e mitocondrial, propuseram mais três novas espécies: *P. americana* para PS2, *P. restripiensis* para PS3, e *P. venezuelensis* para PS4. Os autores propuseram, ainda, restringir *P. brasiliensis* para S1.

Na América Latina, a PCM representa grande impacto na saúde pública, sendo o Brasil, a Venezuela e a Colômbia os países com maior prevalência, sendo

estimados cerca de 15.000 casos entre 1930 e 2012 (7). No Brasil, a PCM foi considerada a oitava maior causa de mortalidade dentre todas as doenças crônicas e parasitárias, apresentando a maior mortalidade entre as micoses sistêmicas (8).

Um dos principais fatores de risco para se adquirir a infecção é a profissão ou atividades relacionadas ao manejo do solo contaminado com o fungo, como agricultores, trabalhadores rurais, preparadores de solo, jardineiros e transportadores de produtos vegetais. A falta de higiene, desnutrição, tabagismo e consumo de álcool também são fatores de risco para a PCM (9,10). A infecção ocorre através da inalação de conídios e/ou fragmentos de hifas (forma infectante) que atingem os pulmões e se transformam em formas leveduriformes (forma patogênica) (11). Uma vez dentro do hospedeiro, pode ocorrer disseminação do fungo a partir do parênquima pulmonar para os linfonodos regionais (complexo primário), podendo também se disseminar via corrente sanguínea e/ ou linfática (12).

As principais formas clínicas são a forma aguda/subaguda (FA), forma crônica (FC) e forma residual (FR). A FA é caracterizada por acometer principalmente crianças, adolescentes e adultos jovens, apresenta história clínica de curta duração (mediana de dois meses) e atinge órgãos ricos em sistema fagocítico mononuclear como fígado, baço e linfonodos. A FC acomete em geral adultos com 30 anos ou mais, apresenta história clínica de longa duração (acima de 6 meses) e acomete principalmente pulmões e mucosa das vias aero-digestivas (13). Pacientes que apresentam sequelas após o tratamento são classificados como FR (14).

O diagnóstico padrão-ouro da PCM é a visualização do fungo nas amostras biológicas. *Paracoccidioides* spp podem ser visualizados sob microscopia óptica em amostras de escarro, fragmentos de lesões cutâneas ou materiais dos linfonodos. A detecção também pode ser feita por exames histopatológicos de fragmentos de tecido recolhidos através de biópsia (2). Os testes sorológicos para a detecção de anticorpos anti-*P. brasiliensis* são úteis para o diagnóstico; além disso, os títulos dos anticorpos séricos, detectados na imunodifusão dupla em gel de ágar, são utilizados para determinar a gravidade da doença e como critério de cura (2,15–17).

No tratamento da PCM, são utilizados os derivados azólicos, tais como itraconazol (ITC) e cetoconazol, associação sulfametoxazol-trimetoprim (ou cotrimoxazol- CMX), e os derivados poliênicos. Em estudo recente realizado por Cavalcante et al. (18), foi demonstrado que o ITC apresentou maior eficácia no tratamento da PCM (menor tempo para os pacientes com a forma crônica alcançarem a cura clínica) em comparação com o CMX. A partir desses achados, o ITC tem sido recomendado como droga de primeira escolha no tratamento da PCM (13). Apesar disso, nos casos de toxicidade por esse azólico e naqueles com acometimento de sistema nervoso central, o ITC não deve ser utilizado. O CMX, devido o baixo custo e pelo fato de ser distribuído gratuitamente no Brasil, é uma das drogas mais utilizadas. A anfotericina B é reservada para casos mais graves e que exigem internação, em casos em que o paciente está recebendo terapia parenteral e em que há comprometimento intestinal grave, seu uso deve ser monitorado devido ao potencial efeito nefrotóxico da anfotericina B (2). Cabe

ressaltar que o tratamento da PCM é longo, podendo ultrapassar dois anos; assim, é importante que os pacientes sejam acompanhados com frequência e que exames bioquímicos sejam realizados periodicamente para avaliar possíveis toxicidades. Recentemente, Levorato et al. (19) estudaram uma coorte não concorrente de 200 pacientes tratados com ITC ou CMX, acompanharam os níveis séricos dos parâmetros bioquímicos das lesões no sistema hepatobiliar durante o tratamento e observaram que, apesar do ITC induzir alterações mais persistentes, não há necessidade de descontinuação da terapia.

Apesar do tratamento eficaz, a PCM é uma doença sistêmica granulomatosa crônica associada a um processo fibrosante que causa mudanças anatômicas nos órgãos afetados (13). Essas mudanças chamadas de sequelas são, muitas vezes, irreversíveis e observadas em múltiplos órgãos, com uma maior incidência nos pulmões, pele, laringe, traqueia, mucosa do trato aerodigestivo superior, sistema nervoso central e linfático (23,24). Na laringe, observa-se fibrose nas cordas vocais, levando a inúmeras consequências entre elas a disфонia e consequentemente, dificuldade de socialização pela alteração na voz e aumento do risco de infecção pulmonar pela aspiração (22). Quando ocorre na traqueia, há obstrução do ar levando a insuficiência respiratória necessitando, as vezes, de traqueostomia ou até correção cirúrgica para estenose traqueal (13). Nas glândulas adrenais, alguns pacientes desenvolvem a doença de Addison, que requer terapia de reposição hormonal frequente pelo resto da vida (23,24). As sequelas do sistema linfático abdominal podem levar à icterícia obstrutiva, como resultado do envolvimento de linfonodos no hÍlo hepático (25) e síndrome de má absorção de

proteínas e gorduras (26).

A qualidade de vida dos pacientes com PCM foi recentemente avaliada por Santos (2015) (27). Utilizando o questionário *Saint Georges's Respiratory Questionnaire* (SGRQ), a pesquisadora observou significativa piora na qualidade de vida dos pacientes com a forma pulmonar da doença, confirmando a sobrecarga causada pela doença no dia-a-dia dos mesmos. A pesquisadora destaca, ainda, o relato de dificuldades encontradas por alguns pacientes em realizar pequenos esforços para algumas atividades, principalmente as laborais. Apesar disso, não é incomum que exames de função pulmonar e raio-X apresentem-se sem grandes alterações e, com isso, esses pacientes enfrentam dificuldades na obtenção de afastamento de trabalho ou aposentadoria pela Previdência Social. Como já citado anteriormente, a PCM é uma doença negligenciada, que acomete indivíduos em sua maioria de baixa renda, com pouco acesso à saúde e educação, mostrando, assim, a importância de uma maior conscientização e atenção da população brasileira em relação a doença.

1.2. Resposta Imunológica na PCM

Sabe-se que a PCM é uma doença endêmica e afeta indivíduos saudáveis, ou seja, sem condições imunossupressoras como neoplasias ou uso de drogas que deprimem a resposta imune. A resposta imune adaptativa, deficiente para os antígenos específicos do *Paracoccidioides* e, é preservada para outros antígenos (28) e é dependente da idade, estado nutricional, quantidade de inóculo inalado e

tabagismo (10). Ou seja, a instalação, progressão e forma clínica da PCM são influenciados por fatores ambientais e resposta imune do hospedeiro (29).

A morte do *Paracoccidioides* spp ocorre pela ação do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) produzido pelos macrófagos (30) que é potencializada através da polarização da resposta imune para o tipo T *helper* 1 (Th1) (31). Linfócitos efetores Th1 são recrutados para o local da infecção e secretam IFN- γ que aumenta a ativação dos macrófagos. Algum distúrbio nesse mecanismo pode causar a progressão da doença.

O período de incubação do fungo não é muito bem estabelecido na PCM. Algumas evidências têm mostrado que essa incubação é curta em pacientes com a FA, variando entre poucas semanas até quatro ou seis meses (32), enquanto que na FC essa incubação pode variar de poucos meses até alguns anos ou décadas (33). Independentemente das formas clínicas, o hospedeiro organiza uma resposta adaptativa e na admissão do paciente essa resposta já está polarizada.

Os pacientes com PCM apresentam um grande espectro de manifestações clínicas que correspondem ao tipo de resposta imune desenvolvida (34,35). A resposta imune adaptativa envolve um grande número de interações específicas entre as células imunes e fatores solúveis como anticorpos, citocinas e antígenos fúngicos. Em geral, formas clínicas da PCM apresentam diferenças na resposta imune Th1/Th17, pois pacientes com a FC apresentam este tipo de resposta bem desenvolvida, enquanto pacientes com a FA apresentam a mesma pouco desenvolvida, apesar de produzir bastante anticorpos.(34,35)

Na FA, os perfil Th2/Th9 é bem característico (35), marcada por elevada

produção de IL-4, IL-5 e IL-9 e ausência de reatividade ao teste cutâneo da paracoccidioidina, o que reflete em uma depressão na resposta imune celular. Além disso, esses pacientes produzem grande quantidade de IgA, IgE e IgG4 antígenos específicos (36). Esses isotipos de anticorpos apresentam capacidade reduzida de fixação do complemento, baixa afinidade com os receptores FcR presentes nos fagócitos, resultando baixo nível de fagocitose pelos macrófagos e subsequente multiplicação e disseminação fúngica.

Na FC, depois da quebra de um prolongado equilíbrio entre o fungo e o hospedeiro, há reativação de focos latentes (reinfecção endógena) resultando progressão da doença. Mesmo assim, a resposta Th1 é mais preservada nesses pacientes, desde que são reativos aos testes cutâneos com paracoccidioidina, exceto aqueles que apresentam a forma grave da doença. Além disso, esses pacientes apresentam intensa produção de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α , IL-1 β , IL-17, e ainda, peróxido de hidrogênio. Apesar desses mediadores serem importantes para a eliminação do fungo, isto reflete a inabilidade do hospedeiro de impedir a infecção pela capacidade de lise não ser suficiente para evitar o crescimento fúngico. Além disso, essas citocinas estão envolvidas em efeitos deletérios, como anorexia, caquexia e morte celular (37). Níveis de anticorpos também podem ser elevados e são caracterizados pelos isotipos IgG1 e IgG2(36), que apresentam maior capacidade de fixação do complemento e possuem afinidade com os receptores FcR (IgG1 > IgG2 > IgG4) dos macrófagos.

Ativação da resposta imune regulatória está presente nas duas formas clínicas e vem sendo caracterizada pela expressão do FoxP3 nas lesões teciduais e

elevada produção de IL-10 e TGF- β 1 pelas células mononucleares do sangue periférico. Células T reguladoras (Treg) atuam contrabalanceando a resposta imune durante a infecção persistente com o objetivo de promover o controle da resposta imune enquanto evita uma reação inflamatória exagerada. Por outro lado, estudos também apontam para um papel prejudicial na defesa do hospedeiro, dificultando a eliminação microbiana (38).

Apesar de poucos estudos sobre a resposta imune após o tratamento antifúngico, observou-se que após a introdução deste, a resposta imune se modifica. Os títulos dos anticorpos circulantes diminuem durante o tratamento, à medida que a imunidade celular é recuperada (34). Um processo lento que é dependente, apesar de outros fatores, da redução da quantidade de antígenos causada pela terapia antifúngica efetiva. A recuperação da imunidade celular é essencial para evitar recaídas, causadas pela proliferação de leveduras quiescentes após o tratamento (39,40). Além disso, pacientes com a FC, apresentam resposta inflamatória inespecífica persistente durante e após o tratamento antifúngico bem sucedido, caracterizado por intensa produção de TNF- α (41), ativação do inflamassoma NLRP3 (Amorim, submetido), maior quantidade de monócitos inflamatórios CD14⁺CD16⁺⁺(41) e TCD4⁺ circulantes (42) e diminuição na contagem de células dendríticas plasmocitóides sanguíneas (42). Alterações imunológicas observadas nos pacientes com a forma crônica, durante e após o tratamento, podem estar associadas com a hipóxia durante a FP e enfisema. A ativação de alguns fatores de transcrição como fatores induzidos por hipóxia (HIF) (43) induz sinalização de fatores de crescimento, secreção de citocinas pró-

inflamatórias, expressão de moléculas co-estimulatórias e proliferação de linfócitos (44,45).

1.3. Fibrose Pulmonar (FP) na PCM

As sequelas pulmonares são as de maior prevalência na PCM e incluem a FP e o enfisema. Apesar da FP, observada em outras doenças, estar associada a um padrão restritivo na espirometria; os pacientes com PCM apresentam, principalmente, padrão obstrutivo na avaliação da sua função pulmonar. Esse comportamento deve-se ao aprisionamento de ar devido à associação da seqüela peribronquial fibrótica com o histórico do cigarro (enfisema), já que 100% deles são fumantes (46). Nos exames de imagens por tomografia computadorizada de tórax, a maioria dos pacientes, mesmo após finalizar o tratamento antifúngico, apresenta distorção da arquitetura (90%), espessamento septal e reticular (88%), enfisema centrolobular e paraseptal (82%), espessamento brônquico (82%), bandas parenquimatosas (74%), cicatrizes em áreas de enfisema (66%), nódulos < 3 cm (62%) e cistos pulmonares (10%) (46). Na gasometria, pode ocorrer um aumento do gradiente de CO₂ alveolar-arterial, hipoxemia e hipercapnia, com o último sinal de maior gravidade (13).

Os achados necroscópicos de pacientes com PCM revelam que a FP é caracterizada por extensas áreas de depósito de colágeno próximas à região hilar, envolvendo outras estruturas como linfonodos, brônquios e artérias. As fibras colágenas se encontram na periferia dos granulomas e se estendem a brônquios e

vasos sanguíneos próximos. Além disso, Tuder et al. (47) observaram proliferação de fibras reticulares em áreas distintas do processo granulomatoso, indicando que o próprio fungo ou seus componentes podem induzir a produção de colágeno.

Apesar da sua importância, poucos estudos têm focado especificamente na fibrogênese pulmonar que ocorre na PCM. Cock et al. (48) demonstraram em modelo experimental murino que esse processo é precoce. Araujo (51), em estudos necroscópicos, demonstrou a presença de fibrose em pacientes que não receberam tratamento antifúngico, mais recentemente, Venturini et al. (50) demonstraram que a produção de TGF- β 1 e FGF por monócitos de pacientes com a FC já se encontra elevada no momento do diagnóstico. Em geral, durante a evolução da PCM, a função pulmonar encontra-se alterada observando-se hipoxemia com predominância da perfusão sobre a ventilação pulmonar (51). De acordo com esses autores, é possível que o envolvimento pulmonar ocorra na fase precoce da doença, uma vez que pacientes com padrão obstrutivo e misto apresentam envolvimento precoce das vias respiratórias com alterações na difusão e ventilação. Mesmo com a regressão das lesões radiológicas após o tratamento, não há recuperação da função pulmonar, sendo comum a dispneia a grandes ou pequenos esforços (52).

1.4. Aspectos celular e moleculares da FP

Durante a homeostase, diversos tipos celulares produzem proteínas em todo o sistema respiratório para manter as funções biológicas do proteoma. No entanto, microrganismos e substâncias inócuas ou tóxicas inaladas podem alterá-lo levando

ao estabelecimento de alguma doença (53). Alguns mecanismos e proteínas-chaves vêm emergindo por participar, favorecer e, ou, desencadear a FP em diversas condições patológicas. De modo geral, a FP é o resultado de constantes lesões do tecido pulmonar e subsequente reparo tecidual. Esses processos são constantes e, desse modo, ao longo do tempo induzem hiperplasia de miofibroblastos e intensa deposição de colágenos na parede da árvore brônquica, vasos sanguíneos e no próprio parênquima pulmonar (na PCM, a deposição no parênquima é observada estão na periferia dos granulomas). Essas alterações estruturais levam ao declínio da função pulmonar, podendo ser progressivo ou não (54).

A exposição respiratória a agentes patogênicos, alérgenos, poluentes do meio ambiente e fumaça de cigarro, estimula a liberação de fatores de crescimento(55), sendo o principal deles, o fator transformador de crescimento beta (TGF- β 1). O TGF- β 1 induz re-epitelização, reparação da mucosa e diferenciação das células-tronco (56,57), sua regulação positiva também é observada na asma grave e na doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) (58,59).

As células epiteliais podem se transformar em células mesenquimais pela ação do TGF β 1. Essas células epiteliais sofrem, portanto, uma reprogramação transcriptacional global, onde as mesmas perdem as junções aderentes, a polaridade apical-basal, reorganizam seu citoesqueleto, secretam proteínas de matriz extracelular (ECM) e assim, transdiferenciam em células mesenquimais móveis. Este processo é conhecido como transição epitelial para mesenquimatosa (EMT) (60). Em condições normais, as EMT's desempenham um papel central nas

respostas às lesões, na remodelação e no reparo de tecidual. Porém, quando estão desreguladas, elas causam ruptura da barreira epitelial, superprodução de colágeno, expansão da população de fibroblastos e remodelação das vias aéreas, características da fibrose pulmonar idiopática (FPI) (61), asma (62) e DPOC (63).

Para que este processo de transição ocorra nas células epiteliais, o TGF- β 1 se liga ao complexo receptor serina/treonina (TGF β R) situado na membrana plasmática e ativa, de forma coordenada, duas vias de sinalização intracelular separadas, a via de sinalização canônica dependente de SMAD e a via independente de SMAD (64,65). Na primeira delas, a via TGF β -SMAD, são ativados fatores de transcrição como o SNAIL1 o ZEB1 e a TWIST1. Esses fatores de transcrição diminuem a expressão da E-caderina (CDH1) fazendo com que as EMT do epitélio desestabilizem as junções aderentes, induzam a expressão de proteínas como a vimentinas, que são proteínas do filamento intermediário mesenquimatoso, ativem as GTPases, que induz motilidade, e aumentem a expressão das matrizes metaloproteinases (MMPs) e colágeno para induzir fibrogênese. Na via não canônica, as vias de sinalização são as PI3 quinase (PI3K)-AKT, ERK/MAPK, p38 MAPK, WNT, NOTCH, Hedgehog e NF- κ B (64). A ativação coordenada dessas vias envolve o equilíbrio entre a regulação do ciclo celular e inflamação, ou seja, sinais de sobrevivência, apoptose e divisão celular, assim como sinais pró-inflamatórios podem ser desencadeados. As duas vias de sinalização, as canônicas e as não canônicas são necessárias para coordenar as alterações genéticas complexas relacionadas à EMT (64).

Em situações patológicas, já foram identificadas diversas desregulações em

vários dos mecanismos das vias canônicas. Sabe-se que há efeitos sinérgicos entre as vias de sinalização do TGF- β /SMAD e da WNT/ β -catenina em várias funções celulares, especialmente na formação de cicatrizes patológicas(66). A via de WNT/ β -catenina é uma via reguladora chave para a diferenciação, proliferação e polaridade celular e sabe-se que sua ativação sustentada é necessária para a patogênese de distúrbios fibróticos (67). Além disso, esta via canônica mostrou-se estar ativada na FP induzida por bleomicina através da regulação positiva da β -catenina e do TGF- β 1. A inibição desta via utilizando siRNA de TGF- β 1 resultou baixa expressão de β -catenina e na inibição de FP (68,69).

A via PI3K/AKT/mTOR, uma das vias de sinalização intracelular não-canônica, é importante na regulação do ciclo celular. A ativação PI3K fosforila e ativa o AKT, localizando-o na membrana plasmática. Em estudo proteômico da FP murina, as vias PI3K/AKT e WNT foram identificadas como as vias pró-fibróticas mais significativas (70).

As proteínas MAPK (proteínas-quinases ativadas por mitógenos) são uma subfamília de proteínas-quinases específicas de serina/treonina que respondem a estímulos extracelulares (mitógenos) e regulam várias atividades celulares, como expressão gênica, mitose, diferenciação, sobrevivência celular e apoptose. As proteínas ERK5 são membros da família das MAPK e, recentemente, foram identificadas como moléculas reguladoras positivas na sinalização de TGF- β 1. De fato, a inibição do complexo de proteínas ERK5 diminuiu a FP induzida por bleomicina em camundongos (71) e, em outro estudo proteômico com o mesmo modelo experimental, as proteínas mTOR e a ERK foram identificadas como

mediadores fundamentais da resposta pró-fibrótica. Além disso, o complexo ERK foi identificado como moléculas de maior interação (nó central) nas redes de interação protéica (70). A P38 MAPK é outro membro da família MAPK que desempenha um papel essencial na regulação de muitos processos celulares, incluindo inflamação, fibrose e apoptose (72). Além disso, sabe-se que a ativação p38 MAPK regula a ativação de NF- κ B(73).

Além desses mecanismos desencadeados pela ativação do TGF- β 1, sabe-se que as lesões e reparação da mucosa nessas vias é um processo multicelular e envolve também a ativação de macrófagos alveolares residentes que, quando ativados por microrganismos invasores, se tornam intensos produtores de fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), uma citocina pleiotrópica que induz a sinalização inflamatória (74). Nas células epiteliais, o TNF- α induz a expressão de quimiocinas, amplificando a resposta inflamatória. Nas células epiteliais, a sinalização intracelular do TNF- α é mediada principalmente pela kinase I κ B, que é responsável pela ativação do fator de transcrição NF- κ B de suas formas inativas (75). Desta forma, a inflamação induzida por TNF α é responsável pelo recrutamento de leucócitos e linfócitos levando à lesão tecidual oxidativa (76). As vias do TGF β e TNF α compartilham reguladores comuns e participam de extensas vias cruzadas. Achados recentes sugerem que a sinalização TNF α pode estabilizar o SNAI1 através da ativação da via NF- κ B (77), e TGF β pode induzir a ativação das vias do NF- κ B (78).

A ativação do NF- κ B está relacionado com sinais pró inflamatórios e sabe-se que a FPI é também caracterizada por alterações imunológicas. Em estudo

proteômico realizado em pacientes com FPI, foi demonstrado que a progressão da doença estava associada a disfunção na sinalização dos processos imunes, de angiogênese e proteólise (79). Outros estudos demonstraram que os pacientes com FPI apresentam leucócitos ativados (80). Em células TCD4⁺ de pacientes com FPI, foi observado menor expressão de CD28(81) e maior expressão de MHC classe I, CD154, além de elevada expressão do gene V β oligoclonal(82). Foi observado, ainda, contagem aumentada de TCD8⁺ periféricos e ativação aumentada dessas células, caracterizada pela expressão de CXCR3; esses achados foram associados com a forma progressiva da FPI (83). Em relação as Tregs, os dados são conflitantes, existem estudos que demonstraram elevada contagem e fenótipos ativados de Tregs em pacientes com FPI (84); e outros estudos em que pacientes com FPI apresentaram contagem reduzidas dessas células (85,86) e ainda com insuficiência da função da Treg (86).

Ainda em relação a participação de linfócitos T, diversos estudos têm apontado a participação efetiva da molécula co-estimulatória ICOS, pertencente à super-família CD28. Esta molécula intensifica a sinalização CD28 durante o estabelecimento da resposta imune e induz funções efetoras nas células T (87). Na fibrose cutânea e pulmonar induzida por bleomicina, camundongos deficientes de ICOS apresentam fibrose atenuada (88). Ashley e colaboradores correlacionaram níveis elevados de ICOS no plasma com a progressão de pacientes com IPF (79).

A participação das colectinas também tem sido amplamente observada na FP, principalmente as proteínas surfactantes pulmonares SP-A e SP-D (89–91). Esses componentes participam da defesa do hospedeiro nos pulmões e modulam a

resposta imune se ligando e eliminando uma variedade de patógenos bacterianos, fúngicos e virais e podem ainda induzir ativação de células imunes (92). Polimorfismos genéticos de algumas proteínas tensoativas como SP-C estão ligados à FPI intersticial. Em vários estudos, foi observado níveis diminuídos de SP-A e SP-D em lavado broncoalveolar de pacientes com FPI (93,94). Já em soro de pacientes com FP, observou-se níveis aumentados dessas mesmas proteínas (95,96). Em modelos experimentais e murinos e em humanos observou-se que as proteínas surfactantes escapam para o espaço vascular quando há ferimento na membrana alvéolo-capilar (97), o que pode explicar a inversão da quantidade dessa proteínas no pulmão e no soro. Sabe-se ainda que polimorfismos genéticos associados ao surfactante aumentam a chances de desenvolvimento da FPI (98,99). Em estudo recente realizado por nosso grupo, foi observado elevados níveis séricos de SP-D em pacientes com a forma crônica da PCM, em todos os momentos do tratamento realizado, indicando seu possível papel como biomarcador na FP (42).

1.5. O uso da proteômica na descoberta de biomarcadores

A proteômica é o estudo sistemático das proteínas e de suas diversas propriedades com o objetivo de fornecer descrições detalhadas da estrutura, função e controle dos sistemas biológicos, nas condições de saúde e de doença (100). Assim, a proteômica visa caracterizar o conjunto de proteínas expressas em um dado momento (101). O início da proteômica foi marcado pela caracterização de perfis protéicos que, posteriormente, passou a focar outros aspectos como a

quantificação de proteínas, suas interações e as modificações pós-traducionais.

Há dois tipos de análises para se identificar o proteoma de uma amostra: a proteômica *bottom-up*, que é a análise a partir de peptídeos, e a proteômica *top-down*, que parte de proteínas intactas. Na primeira, proteômica *bottom-up*, a mistura de proteínas é digerida e os peptídeos são analisados por espectrometria de massas (MS), as restrições dessa estratégia são: as perdas das modificações pós traducionais (MPT's), a cobertura incompleta da sequência das proteínas as degradações como resultado da digestão proteolítica. Na segunda, análise *top-down*, as proteínas não são digeridas, sendo analisadas inteiras, permitindo, assim, identificar a estrutura primária da proteína e grande parte das MPT's (102), a única limitações dessa estratégia é a aplicação restrita, pois a energia de colisão necessária para fragmentação só atende proteínas até 50KDa, com isso, a purificação torna-se um pré-requisito para esta técnica (103).

O processo experimental comumente utilizado na proteômica constitui-se na extração, separação, quantificação e, por fim, identificação de proteínas. Após a extração das proteínas, obtêm-se uma mistura complexa que necessita ser separada em porções simples de proteínas individuais ou em uma mistura simples de proteínas que serão posteriormente identificadas. Na proteômica *bottom-up* de misturas complexas, essa separação pode ocorrer de duas formas: 1) através da técnica de géis desnaturantes na eletroforese bidimensional (2D), em que utiliza-se a massa e a carga das proteínas para separá-las (essa separação resulta em *spots* contendo proteínas únicas ou misturas simples de proteínas) (104) e, 2) por cromatografia líquida, que a partir de uma coluna bifásica ou de colunas com

propriedades distintas, utiliza-se das diversas características das proteínas para separá-las. Nesta última técnica, devido ao seu potencial de automação, observa-se uma maior eficiência e melhor reprodutibilidade quando comparada à técnica de eletroforese bidimensional (105).

No contexto da proteômica *shotgun*, em que o objetivo é conseguir uma maior resolução dos proteomas para facilitar a identificação de proteínas menos abundantes-perdidas quando se utiliza separação por géis, desenvolveu-se métodos com automação completa onde a fração derivada da separação das proteínas por cromatografia líquida pode ser diretamente acoplada ao espectrômetro de massas. Essa técnica de separação por cromatografia líquida de fase reversa acoplada à espectrometria de massas em tandem (LC/ MS/MS) é chamada de MudPIT (*Multidimensional Protein Identification Technology*)(102).

Após a separação das proteínas em frações, há a caracterização dos componentes da fração. Para isso, existem duas técnicas: a técnica por espectrometria de massas e a técnica de *fingerprint* (ou de peptídeos fragmentados em tandem ou MS/MS). Na espectrometria de massas a coleção de peptídeos são ionizados por eletronebulização ou por dessorção a laser auxiliada por matriz (104) e detectados pelos analisadores de massas onde serão analisados quanto a relação massa/carga (m/z) e seus espectros resultantes. A identificação das proteínas se dá pela relação da abundância dos fragmentos versus a relação m/z confrontados nos bancos de dados. A espectrometria de massas é mais indicada quando se objetiva a construção de mapas proteômicos, já que esta técnica tem a capacidade de processar centenas de amostras em uma única análise.

Na técnica de *fingerprint*, os íons de peptídeos encontram-se intactos obtendo-se somente os valores m/z onde são posteriormente correlacionados às proteínas de um banco de dados específico (102). Nesta técnica, só é possível a identificação de proteínas de espécies com genomas sequenciados, enquanto que na MS em tandem a sequência de aminoácidos é identificada possibilitando o estudo de genomas não sequenciados e moléculas novas(106).

Dependendo do objetivo do estudo, se faz necessário, além da identificação, a quantificação das proteínas possibilitando, assim, a estimativa da expressão relativa das mesmas. Determinando-se a intensidade dos picos de íons medidos é possível correlacionar com a abundância das proteínas, possibilitando assim, a quantificação sem nenhuma marcação, chamada quantificação *label-free* (107).

Há possibilidade, ainda, da quantificação através de técnicas que utilizam marcação com isótopos que podem ser radioativos, fluorescentes ou leves/pesados. A marcação com isótopos torna possível a análise simultânea de diferentes grupos aumentando a relevância estatística do estudo e a acurácia do dado proteômico. As principais técnicas da proteômica quantitativa utilizando marcações são: o iCAT (*Isotopic coded affinity tag*)(108), o iTRAQ (*isobaric tags*)(109) e H₂O¹⁸ (molécula de água que contém um forma isotópica de oxigênio-18)(110). A base dessas técnicas consiste em marcação de proteínas de diferentes grupos com etiquetas de identificação por MS, onde peptídeos iguais marcados diferentemente são identificados pela sobreposição dos picos que apresentam m/z distintos devido ao tipo de isótopo ligado, sendo a relação entre a área dos dois picos uma medida

relativa da expressão daquela proteína. O que muda de uma técnica para outra são: os locais de ligação das etiquetas nas proteínas, a quantidade de amostras possíveis para marcação e as moléculas que servirão de etiquetas (102).

Um dos problemas encontrados na proteômica de alto rendimento, onde milhares de proteínas são identificadas em um pouco espaço de tempo, é a alta variabilidade dos dados obtidos, dificultando assim, as análises. As causas dessa variabilidade são a elevada heterogeneidade das amostras biológicas, as variações no preparo das amostras, na separação das proteínas, nos limites de detecção e identificação de proteína/peptídeo das várias técnicas de proteômica ou imprecisões de quantificação do software de gerenciamento de dados. Há um alto nível de ruídos de dados nos estudos de proteômica, quando comparados a aqueles encontrados nos estudos de *microarrays* de DNA, em consequência, os dados experimentais proteômicos tornaram-se difíceis de repetir já que os métodos estatísticos desenvolvidos para a aplicação na genômica são ineficazes nesta área. Com isto, o uso da bioinformática na análise dos dados obtidos além de filtrar as identificações de proteína ruidosas, perdidas na primeira fase de análise estatística, pode ajudar a extrair informações funcionais e biológicas da longa lista de proteínas identificadas. Por tanto, o conhecimento funcional da proteína, entre eles, a abundância de proteínas, locais celulares, complexos de proteínas e vias reguladoras de genes/proteínas, deve ser incorporado na segunda fase da análise proteômica, já que as técnicas de análise da rede e das vias podem ajudar a resolver o desafio na interpretação dos resultados de proteômica e aumentar a relevância estatística dos dados (111).

1.6. Biomarcadores nas doenças pulmonares crônicas

Um dos principais objetivos do uso de proteômica na pesquisa médica é detectar proteínas associadas à doença para intervenção terapêutica, assim como identificar novos biomarcadores (112,113). Biomarcador é uma molécula mensurável que reflete o processo da doença e que pode ser encontrado em fluidos corporais ou tecidos. Assim, o estabelecimento de novos biomarcadores é de suma importância já que estes possuem uma variedade de aplicações na medicina respiratória, incluindo detecção precoce e monitoramento de doenças, estratificação de risco dos pacientes e desenvolvimento de terapias direcionadas e efetivas que podem adaptar as necessidades dos pacientes. Até o momento, o impacto da proteômica em medicamentos respiratórios personalizados é limitado. Por outro lado, novos biomarcadores moleculares estão começando emergir (114).

1.6.1. Fibrose pulmonar idiopática (FPI)

A IPF é uma pneumonia intersticial fibrosante crônica que leva à insuficiência respiratória. Alguns níveis protéicos vêm sendo observados como elevados ou diminuídos em soro e, ou, lavado broncoalveolar (LBA) de pacientes com FPI através de técnicas de medidas simples, como ELISA e *Western Blotting*, e tem sido sugerido como potenciais biomarcadores, tanto para diagnósticos quanto para prognóstico dessa doença. Utilizando esses métodos, que tem como

alvo uma única proteína, possivelmente envolvida nos processos fisiopatológicos da doença, foram identificados em amostra de LBA, elevados níveis de matriz metaloproteinase-8 (MMP-8), Proteína 1 tipo quitina-3-like (CHI3L1 ou YKL-40), proteína de ligação ao cálcio A9 (S100A9) e proteína 14 relacionada ao fator de inibição da migração (MRP14)(115–119). Já em soro de pacientes, foram observados elevados níveis de fator de crescimento vascular endotelial (VEGF), MMP-8, SP-A, SP-D, mucina Krebs von den Lungen-6 (KL-6), CC-quimiocina ligante 18 (CCL-18) e Napsina A(90,91,115,118,120–124).

Utilizando abordagens proteômicas, em que não há um direcionamento na seleção de alvos, um número maior de biomarcadores para IPF tem sido identificado a partir de amostras do parênquima pulmonar, LBA e soro desses pacientes. Carleo et al.(89), estudando as diferenças entre os casos esporádicos e familiares de IPF em LBA de pacientes, identificaram que nos casos familiares as proteínas do receptor de imunoglobulina polimérica (pIgR), a proteína A2 associada ao surfactante pulmonar (PSP-A2), a *Transthyretin* (TTR), a actina citoplasmática, a cadeia gama do fibrinogênio (FGG), o componente 3 do complemento (C3), a *Glutathione S-transferase Mu 1* (GSTM1), a Hemopexina (HPX), e a glicoproteína alfa-1-beta (A1BG) estavam mais expressas quando comparadas ao grupo de FPI esporádica. Levando em consideração que essas proteínas estão envolvidas principalmente na resposta imune e lesão, sistema de coagulação e homeostase de íons, os autores sugerem que o estresse do retículo endotelial provavelmente desempenha um papel central na patogenética da FPI familiar. Já nos casos de FPI esporádicos, as proteínas super expressas foram o

fator B do complemento (CFB), o isocitrato desidrogenase NADP citoplasmático, a peroxiredoxina 1 (PRDX1), a proteína ligante do selênio 1 (SELENBP1) e a antitrombina III (ANT3) que estão relacionadas com a resposta ao estresse oxidativo. As proteínas que tiveram maior destaque como biomarcadores neste estudo foram as envolvidas em danos e lesões no pulmão que juntas indicam alterações na resposta reparativa sendo indicada como uma das possíveis causas da FPI.

Ashley et al.(79), com o objetivo de encontrar biomarcadores que indiquem a progressão da FPI, realizaram seguimento de 60 pacientes por um período de 80 semanas, utilizando amostras plasmáticas. Os pesquisadores demonstraram que houve associação entre a progressão da doença e a baixa expressão do receptor 2 do fator de crescimento endotelial vascular solúvel (VEGFsR2), da ficolina-2 (FCN-2), da *legumain* (LGMN) e da catepsina-S (cath-S) e, ainda, aumento da expressão do co-estimulador induzível de células T (ICOS) e da tripsina-3 (TRY-3).

Niu et al.(125), utilizando a ferramenta de marcação isobárica (iTRAQlabeling) para identificar proteínas diferencialmente expressas em soro de pacientes com FPI, identificaram nove biomarcadores que foram validados pelo ensaio de ELISA. Dentre as apresentaram expressão aumentadas estão a subunidade beta da hemoglobina (HBB), a proteína C reativa (CRP), a antitripsina-alfa-1 (SERPINA1), e as que estava expressão diminuídas foram: a apolipoproteína A-II (APOA2), a alfa-2-HS-glicoproteína (AHSG), a kininogenio-1 (KNG1) e a alfa-1-microglobulina/precursora de bikunina (AMBP). Após

realização de testes de acurácia, as proteínas AHSB, CRP, SERPINA1, AMBP e KNG1 apresentaram resultados compatíveis como biomarcadores para FPI(125). As expressões diferenciais das proteínas identificadas como possível biomarcador na FPI estão sumarizadas no Quadro 1.

Quadro 1. Distribuição de proteínas identificadas como possíveis biomarcadores na fibrose pulmonar idiopática de acordo com o tipo de amostra biológica.

Tipo de Biomarcador	Amostra biológica	Expressão aumentada	Expressão diminuída	Referência
Diagnóstico	Soro	SP-A E SP-D		(100)
	LBA	S100A9		(115)
	Soro e LBA	MMP-8		(116)
	Soro e LBA	YKL-40		(118)
	LBA	MRP14		(119)
	Soro	NAPSIN A		(124)
	Soro	CRP, SERPINA1	AHSG, AMBP e KNG1	(125)
Prognóstico	Soro	ICOS, TRY-3	VEGFsR2, FCN-2, LGMN, Cath-S	(79)
	Soro	KL-6 eSP-D;		(90)
	Soro	SP-D		(91)
	Soro	VEGEF		(121)
	Soro	KL-6		(122)
	Soro	CCL8		(123)
	Soro	NAPSIN A		(124)
Casos familiares	LBA	pIgR, PSP-A2, TTR, FGG, C3, GSTM1, HPX, A1BG		(89)

SP-A, B, C, D (proteína surfactante A, B, C e D); S100A9 (proteína de ligação ao cálcio A9); MMP-8 (matriz metaloproteinase-8); YKL-40 (Chitinase-3-like protein1); MRP14 (proteína 14 relacionada ao fator de inibição da migração); CRP (Proteína C reativa); SERPINA1 (Antitripsina-Alfa-1); AHSG (Alfa-2-HS-glicoproteína); AMBP (Alfa-1-microglobulina/precursora de bikunina); KNG1 (Kininogenio-1); ICOS (co-estimulador induzível de células T); TRY-3 (tripsina-3); VEGFsR2 (receptor 2 do fator de crescimento endotelial vascular solúvel); FCN-2 (ficolina-2); LGMN (*Legumain*); cath-S (cathepsina-S); KL-6 (Krebs von den Lungen-6); VEGF (Fator de crescimento vascular endotelial); CCL-18 (CC-quimiocina ligante -18); pIgR (receptor de imunoglobulina polimérica); PSP-A2 (Proteína A2 associada ao surfactante pulmonar); TTR (Transtiretina); FGG (Cadeia de gama do fibrinogênio); C3 (Componente 3 do complemento); GSTM1 (Glutathione S-transferase Mu 1); HPX (Hemopexina); A1BG (Glicoproteína alfa-1-beta).

1.6.2. Doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC)

A doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) é uma doença heterogênea e irreversível, caracterizada pela limitação do fluxo de ar nas vias respiratórias, bronquite crônica e doença obstrutiva crônica nas vias aéreas e pode ser desencadeada por diversos fatores como cigarro, infecções causadas por microrganismos, poluição do ar, poeira, e desordens genéticas.

Ohlmeyer et al.(126), com o objetivo de encontrar um biomarcador específico para DPOC e ainda para associar com a forma grave e leve da doença, realizaram análise proteômica do tecido pulmonar de pacientes com as formas grave e leve da DPOC e compararam com grupos de fumantes, de pacientes com deficiência de 1- α -antitripsina (AATD) e pacientes com FPI. Os resultados revelaram que as proteínas catepsina D (CTSD), proteína 2 relacionada a dihidropirimidinase (DPYSL2), a transglutaminase tecidual (TGM2) e a tripeptidil-peptidase 1 (TPP1) como específicas para DPOC. A proteína TGM2, além de ser específica para DPOC, foi também correlacionada com a gravidade da doença e, por isso, foi sugerida nesse estudo como um potencial biomarcador para o prognóstico da doença.

Também utilizando tecido pulmonar de pacientes, o aumento da expressão da proteína SP-A foi identificada como específica para DPOC quando comparada a pulmões apenas fibróticos (127). Em amostra de escarro, foram identificadas 15 proteínas associadas a DPOC (128), sendo quatro principais: SERPINA1, proteína ligante da vitamina D (VDBP ou CG), serotransferrina (TF) e transtiretina (TTR).

Sabe-se que algumas dessas proteínas, como a SP-A (91), SERPINA1 (125) e a TTR (89), já foram, também, associadas a FPI. Além disso, as proteínas CAPG, CTSD, DPYSL2 e TPP1, que foram identificadas como específicas para DPOC, já foram observadas como sendo fumantes dependente (126). Levando em consideração que doenças pulmonares compartilham mecanismos patológicos e fatores de risco similares e que um dos mais amplamente reconhecidos são o ato de fumar, esses dados reforçam o conceito de que marcadores exclusivamente específicos para uma doença são muito raros.

As expressões diferenciais das proteínas identificadas como possível biomarcador na DPOC estão sumarizadas no Quadro 2.

Quadro 2. Distribuição de proteínas identificadas como possíveis biomarcadores na DPOC de acordo com o tipo de amostra biológica.

Tipo de Biomarcador	Amostra biológica	Expressão aumentada	Referência
Diagnóstico	Tecido pulmonar	CTSD, DPYSL2, TPP1, TGM2	(126)
	Tecido pulmonar e escarro	SP-A	(127)
	Escarro	SERPINA1, VDBP, TF e TTR	(128)
Prognóstico	Tecido pulmonar	TGM2	(126)

CTSD (catepsina D); DPYSL2 (proteína 2 relacionada a dihidropirimidinase); TGM2 (transglutaminase tecidual); TPP1 (tripeptidil-peptidase 1); SERPINA1 (Antitripsina-Alfa-1), VDBP (proteína ligante da vitamina D), TF (serotransferrina); TTR (transtiretina).

2. JUSTIFICATIVA DO ESTUDO

A PCM é uma doença endêmica da América Latina, e apesar de representar problemas na saúde pública, continua sendo considerada uma doença negligenciada. Mesmo após o tratamento antifúngico, a maior parte dos pacientes portadores da FC apresenta sequelas, dentre elas a FP e enfisema. Como consequência, esses pacientes apresentam problemas respiratórios que acabam incapacitando-os muitas vezes de exercerem suas profissões e atividades. Em alguns casos, essa condição pode desencadear problemas psicológicos, e intensificar o quadro de alcoolismo já frequente nesses pacientes.

Dentre esses pacientes, é possível observar que a intensidade da FP é diferente e, do mesmo modo, suas consequências no dia a dia desses indivíduos. Assim, essas diferenças, quando bem caracterizadas, podem ser empregadas como uma estratégia de estudo para identificar moléculas envolvidas na fibrogênese e também biomarcadores. A utilização da estratégia proteômica em soro permite a obtenção de informações que irão possibilitar identificar efeitos sistêmicos das sequelas observadas na PCM e a identificação de biomarcadores.

3. OBJETIVO GERAL

Identificar proteínas-chave envolvidas na fibrogênese e possíveis biomarcadores séricos de pacientes com FP pulmonar na PCM.

3.1. Objetivos específicos

1. Identificar proteínas-chave envolvidas nos mecanismos moleculares da fibrogênese pulmonar da paracoccidiodomicose.
2. Identificar o(s) momento(s) do seguimento clínico em que os pacientes com PCM apresentam maiores alterações do perfil proteômico sérico relacionado ao reparo tecidual.
3. Identificar proteínas séricas candidatas a biomarcadores preditoras de fibrose pulmonar.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Pacientes. Foram estudados 29 pacientes com a FC da PCM confirmada pela identificação de formas típicas da fase leveduriforme em materiais clínicos ou de anticorpos séricos específicos pesquisados pela reação de imunodifusão dupla em gel de ágar (IDD), atendidos na Disciplina de Moléstias Infecciosas e Parasitárias da Faculdade de Medicina de Botucatu - UNESP. O critério de inclusão utilizado foi a presença de comprometimento pulmonar paracoccidióidico, e os critérios de exclusão foram a presença de outra co-morbidade de origem infecciosa, inflamatória ou neoplásica e, a utilização de medicação imunossupressora.

4.2. Indivíduos fumantes. Foram estudados 15 indivíduos fumantes, distribuídos na mesma proporção de gênero e idade com o grupo de pacientes.

4.3. Definição dos casos de FP maior e menor. Os pacientes foram classificados em dois grupos de acordo com a intensidade da FP (menor e maior), no momento de cura aparente (M3). A classificação foi feita por um radiologista e um infectologista com base nos achados de imagem por tomografia computadorizada dos pulmões.

4.4. Momentos de coleta durante o tratamento antifúngico. Para este estudo, foram utilizados soros dos pacientes coletados em quatro momentos durante o tratamento antifúngico: anterior ao tratamento antifúngico (M0), cura clínica (M1),

cura sorológica (M2) e cura aparente (M3), de acordo com Mendes et al. (2). Resumidamente, a cura clínica (M1) é definida como o momento em que o paciente está sob o tratamento antifúngico e que apresenta o desaparecimento da sintomatologia apresentada e a normalização da velocidade de hemossedimentação (VHS). A cura sorológica (M2) é o momento que o paciente que tinha sorologia positiva e ficou pelo menos um ano com sorologia negativa. A cura aparente (M3) é definida como o momento em que o paciente apresenta cura clínica, cura sorológica, conclusão do tratamento antifúngico e sem sinal de reativação da doença pelo período de dois anos na ausência de tratamento.

4.5. Delineamento experimental. As análises de proteômica foram realizadas em três etapas (Figura 1). Etapa 1: caracterização do perfil proteômico de pacientes com FP já estabelecida (PF maior e menor na cura aparente – M3). Etapa 2: identificação de proteínas-chave na fibrogênese através da evolução do perfil proteômico do soro de pacientes com ao longo do tratamento. Etapa 3: identificação de possíveis biomarcadores séricos através da comparação do perfil proteômico de pacientes que desenvolveram PF maior e aqueles com FP menor.

Delineamento experimental

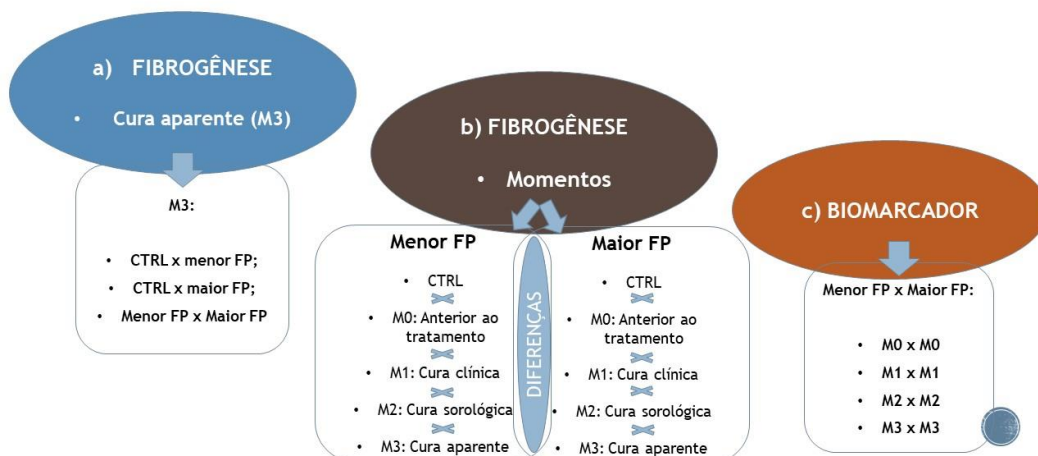


Figura 1. Representação esquemática do delineamento experimental do estudo.

4.6. Processamento das amostras. As amostras de soro foram mantidas em freezer -80°C e foram tratadas para a remoção das proteínas em abundância, albumina e imunoglobulina G, utilizando o kit ProteoPrep^Ò Blue Albumin and IgG Depletion (Sigma-Aldrich, St Louis, USA) conforme instruções do fabricante.

4.7. Análise Proteômica. Após a remoção das proteínas em abundância, as proteínas foram quantificadas com auxílio do Kit *Quick Start Bradford* (Bio-Rad). As amostras de proteína ($50\ \mu\text{g}$) foram então transferidas para um microtubo e a estas adicionados $10\ \mu\text{L}$ de bicarbonato de amônio $50\ \text{mM}$ e $25\ \mu\text{L}$ de RapiGest[®] $0,2\%$ (Waters). Em seguida, as amostras foram reduzidas através da incubação a 40°C com ditionitrito (DTT) $100\ \text{mM}$. Em seguida, adicionou-se iodoacetamida (IAA) $300\ \text{mM}$ por $30\ \text{min}$ em temperatura ambiente, para devida alquilação das

amostras. Após a alquilação foi realizada a digestão com a adição de 150 ng de tripsina grade MS (Promega) e incubação a 37°C por 14 h. Ao fim das 14 h, a ação da enzima foi paralisada pela adição de 5 µL de ácido fórmico 3%. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 14000 g durante 10 min. O sobrenadante contendo os peptídeos foram então destinados à análise por UPLC-MS. A análise dos peptídeos tripticos foi realizada no sistema nanoACQUITY UPLC (Waters, Milliford, USA) acoplado ao espectrômetro de massas Xevo Q-TOF G2 (Waters, Milliford, USA). Para tanto, o sistema UPLC nanoACQUITY foi equipado com uma coluna do tipo HSS T3 (Acquity UPLC HSS T3 column 75 mm x 150 mm; 1,8 µm, Waters), previamente equilibrada com 7% da fase móvel B (100% ACN + 0,1 % ácido fórmico). Os peptídeos foram separados através de um gradiente linear de 7-85 % de fase móvel B durante 70 min com fluxo de 0,35 µL/min e a temperatura da coluna mantida a 45°C. O MS foi operado em modo íon positivo, com o tempo de aquisição de dados de 75 min. Os dados obtidos foram processados através do software *Protein Lynx Global Server* (PLGS) versão 3.03 (Waters, Milliford, USA). A identificação das proteínas foi obtida através do algoritmo de contagem de íons incorporado ao software. Os dados obtidos foram buscados no banco de dados da espécie *Homo sapiens* baixado do catálogo do UniProt (Universal Protein Resource) em fevereiro de 2017.

4.7.1. Quantificação livre de marcadores (*label-free*). A quantificação livre de marcadores foi feita utilizando o Software ProteinLynx Global Service (PLGS, v.2.2.5, Waters). Todas as proteínas identificadas com *score* com confiança maior

que 95% foram inclusas na análise quantitativa. Os peptídeos de cada triplicata por amostra foram agrupados com base na precisão de massa (<10ppm) e em uma tolerância de tempo de retenção <0,25 min, usando o *software* de agrupamento incluso no PLGS v. 2.3. Foi feita uma normalização usando a função de autonormalização do PLGS. A significância das razões de expressão relativa foi calculada usando o algoritmo Monte-Carlo e expressa como $p < 0,05$ para as proteínas sub-reguladas e $p > 0,95$ para as proteínas super-reguladas, respectivamente. Apenas proteínas identificadas em duas das três corridas foram selecionadas para as análises subsequentes.

4.7.2. Construção da rede regulatória e análises de enriquecimento funcional.

O conjunto de proteínas diferencialmente expressas foi mapeado pela ferramenta de pesquisa on-line para o Banco de dados de Recuperação de Genes de Interação (STRING) (<http://string-db.org>) para identificar possíveis conexões entre proteínas e visualizar a rede PPI (interação proteína-proteína). A rede PPI foi construída estabelecendo o escore mínimo de interação requerido para o meio confiança (0,4). Os parâmetros de configuração para o número máximo de interações para mostrar para o primeiro *shell* e segundo *shell* foi respectivamente “*none/query protein only*” e “*none*”. As análises de enriquecimento funcional da rede de proteínas da PPI foram realizadas pelo “Gene Ontology” (GO) diretamente on-line e, a taxa de corte de descoberta falsa (FDR) para os termos GO atribuídos ao conjunto de proteínas nas categorias da “função molecular”, “processo biológico” e “componente celular” foi de <0,05.

4.8. Aspectos Éticos. Todos os procedimentos foram executados de acordo com as normas éticas vigentes no projeto aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP (CAAE:65525317.9.3001.5398).

4.9. Análises estatísticas dos resultados. A determinação da homogeneidade dos grupos de pacientes foi realizada utilizando-se os testes de frequência de Qui-quadrado (ou Fisher), teste U de Mann-Whitney e curva de Kaplan-Meier (log-ranktest) para tempo de cura aparente e cura sorológica. Os testes estatísticos foram realizados utilizando-se os softwares EpiInfo ou GraphPad InStat versão 3.0 para Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) e o nível de significância estabelecido para rejeitar a hipótese de nulidade foi de 5,0%.

4.10. Levantamento Bibliográfico. O levantamento bibliográfico foi realizado por meio de MEDLINE, produzido pela *National Library of Medicine*, de Washington e da Literatura Latino-Americana em Ciências da Saúde(LILACS), produzida pelo Centro Latino-Americano e do Caribe de Informações em Ciências da Saúde (B.I.R.E.M.E) de São Paulo. Também foram levantados os trabalhos referidos em cada publicação selecionada. Essa revisão bibliográfica foi realizada no período correspondente aos últimos 15 anos e foi atualizada durante o desenvolvimento do projeto. A Bibliografia foi formatada de acordo com as normas Vancouver.

5. RESULTADOS

5.1. Aspectos clínicos dos pacientes

Todos os pacientes selecionados para o estudo apresentavam casos confirmados de PCM pulmonar crônica, sendo 79,3% deles com a forma moderada da doença enquanto que 6,9% e 13,8% apresentavam a forma leve e grave, respectivamente. A mediana das idades foi de 50 anos. A maioria apresentava, além do pulmão, pelo menos mais um órgão comprometido pela doença, entre eles a adrenal (10,3%), sistema nervoso central (10,3%), mucosa (51,7%), pele (3,4%), laringe (17,2%), linfonodo (13,8%) e osso (3,4%). A mediana do título de anticorpos pela imunodifusão dupla (IDD) foi de 1:16. Dentre os tratamentos, 58,6% fizeram o tratamento somente com cotrimoxazol (CMX); 13,8% começaram o tratamento com CMX e depois trataram com itraconazol (CMX-ITC); 10,3% trataram somente com ITC; 6,9% iniciaram o tratamento com ITC e depois mudaram para CMX (ITC-CMX); e 10,3% trataram algum tempo com cetoconazol (CTZ) ou fluconazol (FLU) além do CMX e o ITC. A mediana do tempo de tratamento foi de 38 meses, do tempo para a cura clínica foi de 142 dias e do tempo para a cura sorológica foi de 530 dias.

As características clínicas e demográficas dos grupos de pacientes com FP menor e maior foram semelhantes ($p > 0.05$). Para confirmar semelhança entre a mediana do número de dias para a cura sorológica dos pacientes com FP menor e maior foi realizada a curva de Kaplan-Meier e não foi observada diferença

estatística entre esses dois grupos (Log-Rank 0.554; $p = 0.4561$). As características clínicas dos pacientes estudados estão apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1. Aspectos clínicos dos pacientes com PCM de acordo com a intensidade de fibrose pulmonar. N (%)

Aspectos Clínicos		Pacientes (n=29)	FP menor (n=17)	PF maior (n=12)	Valor de <i>p</i>	
Idade (anos)¹		50	56	57	<i>0,8003</i>	
Gravidade²	Leve	2 (6,9)	2 (11,7)	0 (0)		
	Moderada	23 (79,3)	13 (76,4)	10 (83,3)	<i>1,000</i>	
	Grave	4 (13,8)	2 (11,7)	2 (16,6)		
Órgão comprometidos²	Adrenal	3 (10,3)	1 (5,88)	2 (16,6)	<i>0,367</i>	
	SNC	3 (10,3)	3 (17,6)	0 (0)	<i>0,186</i>	
	Mucosa	5 (51,7)	9(52,9)	6 (50)	<i>0,586</i>	
	Pele	1 (3,4)	1 (5,88)	0 (0)	<i>0,586</i>	
	Pulmão	29 (100)	17 (100)	12 (100)	<i>NR</i>	
	Laringe	5 (17,2)	2 (11,7)	3(25)	<i>0,329</i>	
	Linfonodo	4 (13,8)	4 (23,5)	0 (0)	<i>0,100</i>	
	Ossos	1 (3,4)	0 (0)	1 (8,33)	<i>0,413</i>	
	Tratamento²	CMX	17 (58,6)	11 (64,7)	6 (50)	
		CMX – ITC	4 (13,8)	4 (23,5)	0 (0)	
ITC		3 (10,3)	1 (5,88)	2 (16,6)	<i>0,5368</i>	
ITC- CMX		2 (6,9)	0 (0)	2 (16,6)		
Outros		3 (10,3)	2 (11,7)	1 (8,3)		
Tempo de tratamento (meses)¹		38	28	44	<i>0,2871</i>	
Cura clínica (dias)¹		142	149	126	<i>0,2687</i>	
Cura sorológica (dias)^{1,3}		530	314,5	825	<i>0,2679</i>	
IDD¹		1:16	1:16	1:8	<i>0,9463</i>	

¹ Teste de Mann-Whitney

² Teste de Fisher

³ Curva de Kaplan-Meier

PF = fibrose pulmonar; NR = não-realizado; CMX = cotrimoxazol; ITC = itraconazol; IDD = imunodifusão dupla em gel de ágar

5.2. Caracterização do perfil proteômico dos pacientes com FP menor e maior na PCM

No presente estudo, iniciamos a apresentação dos resultados proteômicos pela caracterização do perfil proteômico de soro dos pacientes com PCM que apresentaram como desfecho maior ou menor FP, isto é, que foram avaliados no momento de cura aparente, já que é nesse momento que se espera que o quadro de FP esteja bem estabelecido. Além disso, foi no momento da cura aparente que os pacientes foram categorizados.

Primeiramente, foi determinado o número de proteínas diferencialmente expressas entre esses grupos de pacientes e entre indivíduos saudáveis fumantes. A comparação com o grupo controle revelou que pacientes com FP menor exibiu 79 proteínas diferencialmente expressas, das quais 76 estavam sub-reguladas e 3 super-reguladas (Fig.2A). O grupo de pacientes com FP maior exibiu 83 proteínas diferencialmente expressas, sendo todas sub-reguladas (Fig.3A), em relação ao grupo controle. A comparação entre os pacientes com PF menor e maior revelou 61 proteínas diferencialmente expressas, das quais 6 estavam sub-reguladas e 55 super-reguladas (Fig. 4A).

Characterization of Minor Fibrosis (CTRL vs. minorPF)

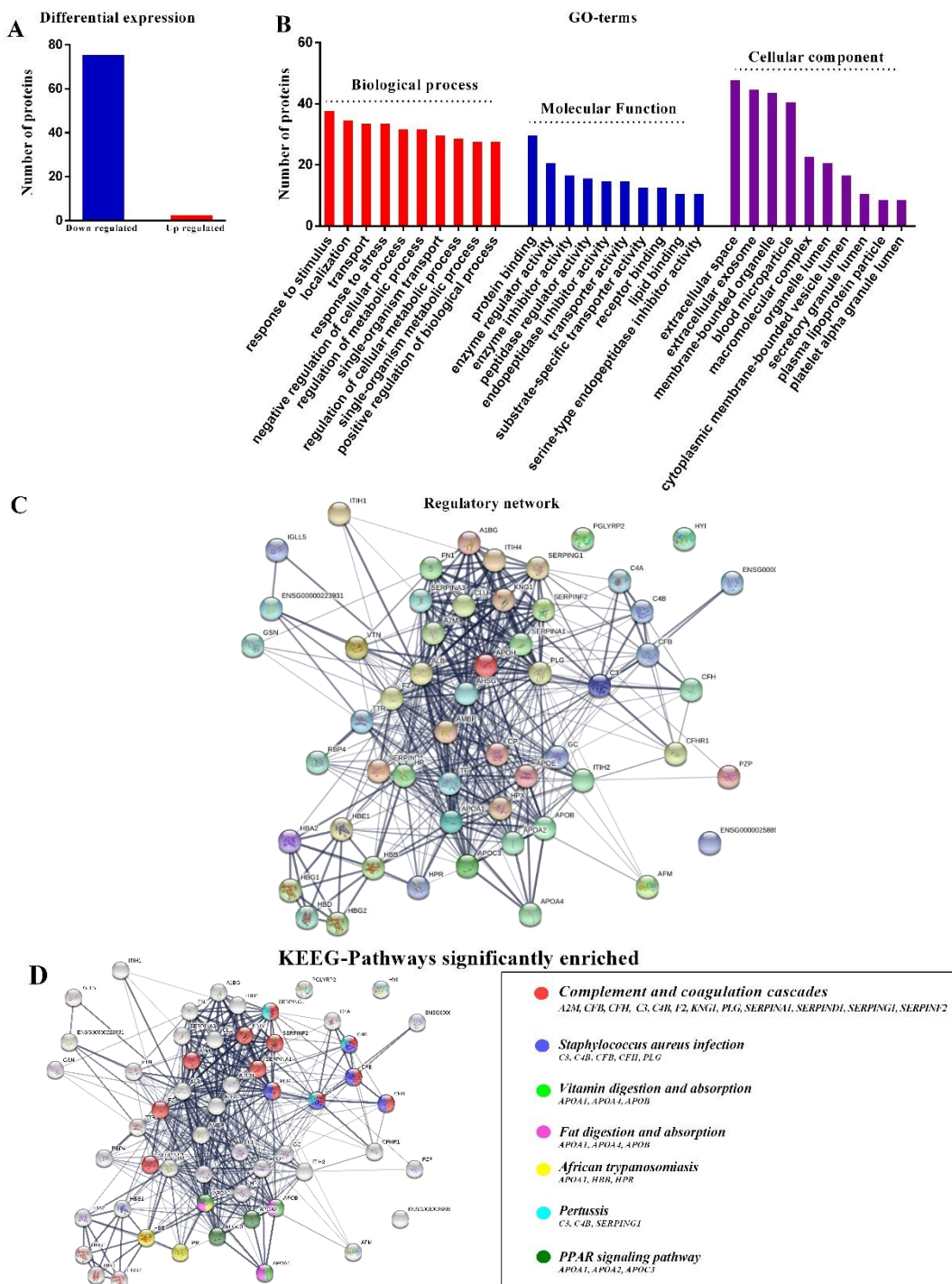


Figura 2. Proteínas diferencialmente expressas obtidas na comparação de pacientes com FP menor, na cura aparente, em comparação com o grupo controle. **A.** Número de proteínas sub-reguladas (coluna azul) ou super-reguladas (coluna vermelha). **B.** Classificação das proteínas diferencialmente expressas de acordo com sua participação em processo biológico, função molecular e componente celular. A classificação das proteínas foi obtida de acordo com as anotações depositadas da base de dados *Gene Ontology* (GO). **C.** Rede regulatória de interação entre proteínas diferencialmente expressas. Linhas mais grossas representam associações mais fortes. **D.** Vias de sinalização significativamente enriquecidas. A distribuição de cores indica as diferentes vias.

Characterization of Major Fibrosis (CTRL vs. majorPF)

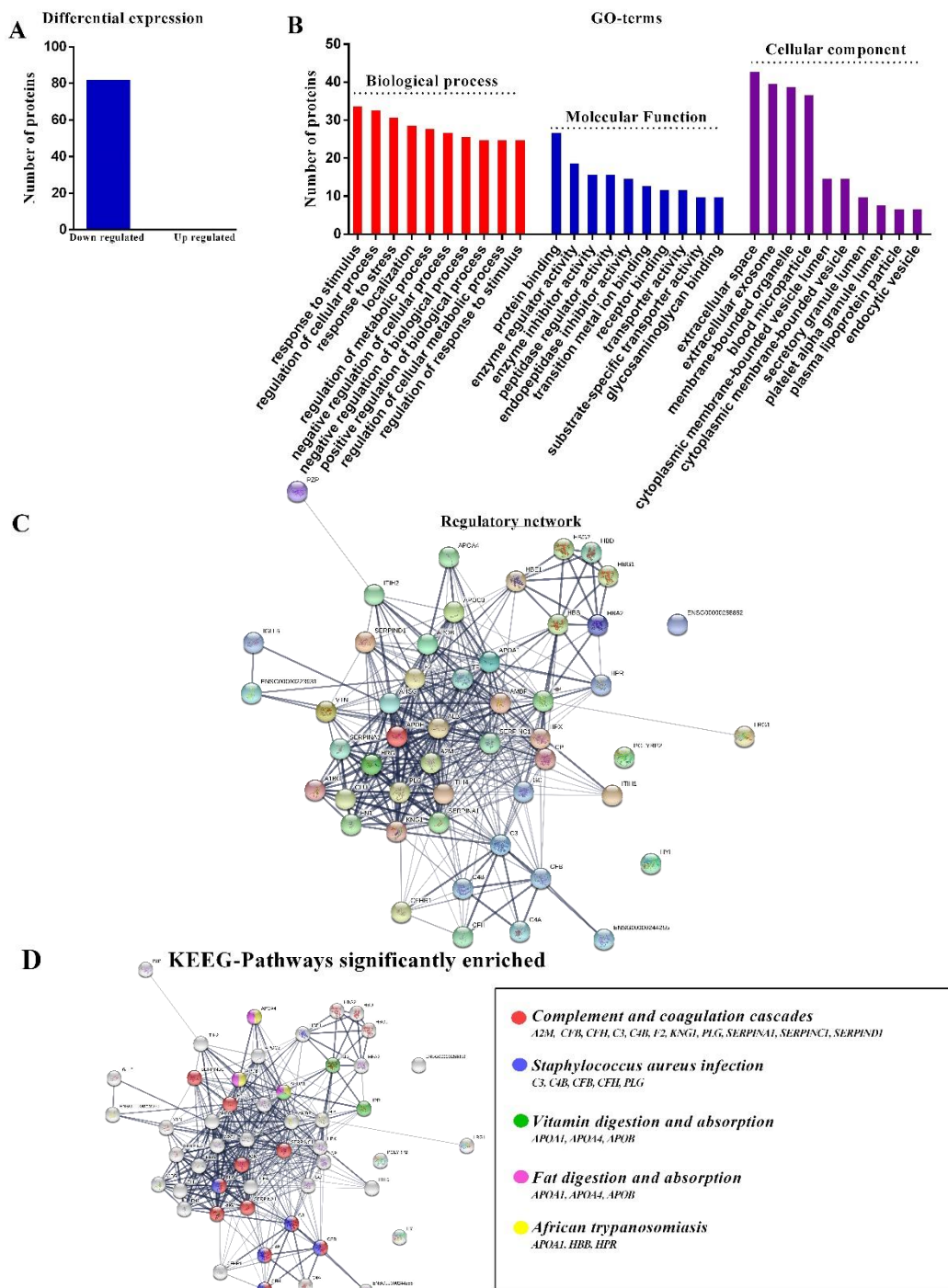


Figura 3. Proteínas diferencialmente expressas obtidas na comparação de pacientes com FP maior, na cura aparente, em comparação com o grupo controle. **A.** Número de proteínas sub-reguladas (coluna azul) ou super-reguladas (coluna vermelha). **B.** Classificação das proteínas diferencialmente expressas de acordo com sua participação em processo biológico, função molecular e componente celular. A classificação das proteínas foi obtida de acordo com as anotações depositadas da base de dados *Gene Ontology* (GO). **C.** Rede regulatória de interação entre proteínas diferencialmente expressas. Linhas mais grossas representam associações mais fortes. **D.** Vias de sinalização significativamente enriquecidas. A distribuição de cores indica as diferentes vias.

Characterization of Minor PF vs. Major PF

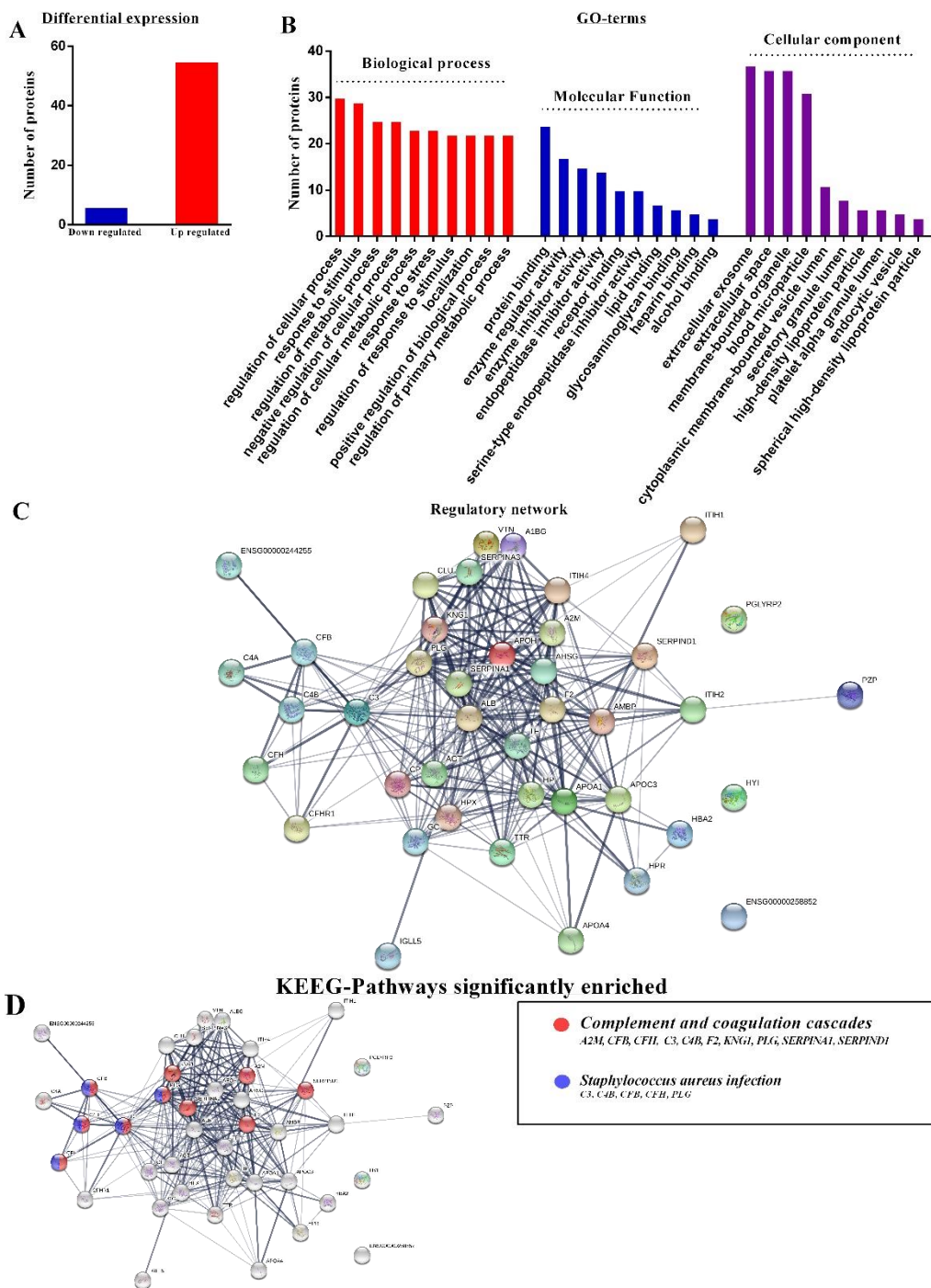


Figura 4. Proteínas diferencialmente expressas obtidas na comparação de pacientes com FP menor em comparação com pacientes com FP maior, na cura aparente. **A.** Número de proteínas sub-reguladas (coluna azul) ou super-reguladas (coluna vermelha). **B.** Classificação das proteínas diferencialmente expressas de acordo com sua participação em processo biológico, função molecular e componente celular. A classificação das proteínas foi obtida de acordo com as anotações depositadas da base de dados *Gene Ontology* (GO). **C.** Rede regulatória de interação entre proteínas diferencialmente expressas. Linhas mais grossas representam associações mais fortes. **D.** Vias de sinalização significativamente enriquecidas. A distribuição de cores indica as diferentes vias.

O diagrama de Venn (Fig. 5) revelou 69 proteínas diferencialmente expressas em comum entre os grupos de pacientes com FP menor e maior, 10 proteínas presentes no grupo de pacientes com FP menor e 14 proteínas presentes no grupo de pacientes com FP maior. Para essa análise, foram excluídas as proteínas que estavam similarmente expressas com o grupo controle.

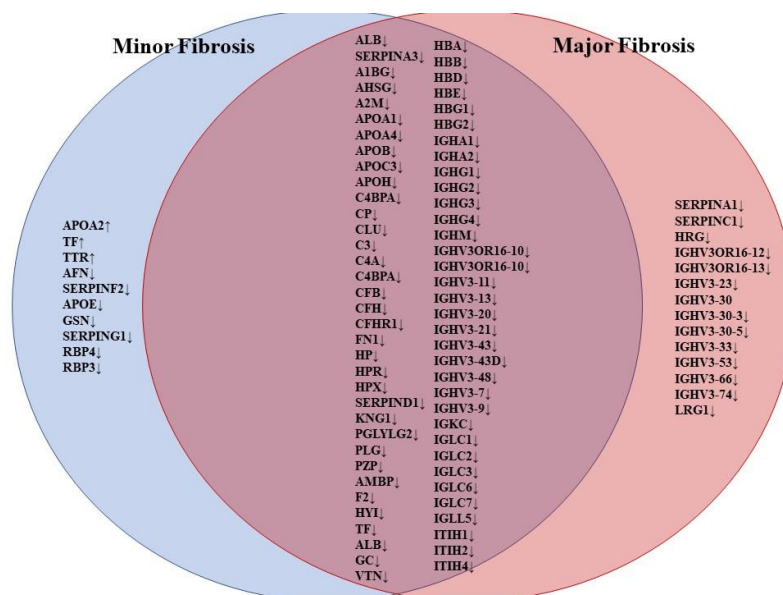


Figura 5. Diagrama de Venn exibe as proteínas associadas a menor ou maior fibrose pulmonar no momento de cura aparente comparadas ao grupo controle. Somente os códigos dos genes estão demonstrados. ↓ proteína sub-regulada; ↑ proteína super-regulada.

A partir desses resultados, foi realizado o enriquecimento funcional. Essa estratégia de análise por bioinformática se baseia na transformação dos dados brutos em um conjunto de genes divididos em categorias conhecidas (Termos de Ontologia do gene - *GO terms*) de modo a permitir a identificação dos números de genes observados e esperado; se a diferença entre os números observados e esperados forem estatisticamente diferentes, a categoria é relatada como enriquecida. Esse passo é importante pois ele funciona como um segundo filtro

para as proteínas encontradas, uma vez que descarta eventos aleatórios (ruído de dados) e, assim, aumenta a relevância estatística dos dados e proporciona um potencial informativo mais confiável (129). Utilizando essa estratégia, é possível identificar quatro categorias funcionais: 1) processos biológicos, 2) funções moleculares, 3) componentes celulares 4) vias. As vias de sinalização foram detectadas usando a Enciclopédia de Quioto em Genes e Genomas (KEGG) e serão analisadas separadamente.

Das 79 proteínas diferencialmente expressas no grupo com FP menor, em comparação com o grupo controle, foram identificados 215 termos na categoria processos biológicos (Anexo 4), 38 termos na categoria funções moleculares (Anexo 6), 28 termos na categoria componentes celulares (Anexo 6) e 7 termos na categoria de vias (Anexo7). A Fig. 1B apresenta os 10 termos de cada categoria que continham os maiores números de proteínas diferencialmente expressas. Os resultados da análise de enriquecimento funcional das demais comparações (FP maior *vs.* controle e FP maior *vs.* FP menor) estão demonstrados nas Figuras 2B e 3B e Anexos 8 a 15.

Em seguida, foi realizada a construção da rede de interação proteína-proteína (PPI). Esse passo tem por objetivo auxiliar no melhor entendimento sobre a relação entre as proteínas diferencialmente expressas, onde a espessura da linha nos indica o nível de associações entre mais fracas e mais fortes. Além disso, a rede tem o potencial de informar, qual a proteína com maior número de interações, indicando uma proteína potencialmente chave do processo, visto que uma vez afetada, pode comprometer todo o processo em que a mesma está

envolvida. A validação de que as linhas de interações entre as proteínas formam uma rede, isto é, estão envolvidas em atividades cooperativas, requer um tratamento estatístico, conforme proposto por Antonov, et al. (129). Assim, no grupo com menor FP, comparada ao grupo controle, obtivemos uma rede com 55 *nodes* (nós, em tradução livre) regulatórios, 449 ligações e a proteína com maior número de ligações (*query protein*) foi a apolipoproteína H (APOH) (Fig. 1C), com nível de significância de $p < 0,001$, que se encontrava sub-regulada no grupo de pacientes (*ratio*: 0,711). A partir das proteínas diferencialmente expressas no grupo com FP maior, comparada ao grupo controle, formou-se uma rede regulatória com 50 *nodes* regulatórios e 383 ligações, e a *query protein* também foi a APOH ($p < 0,001$) (Fig.2 C), que se encontrava sub-regulada no grupo de pacientes (*ratio*: 0,543). Na comparação entre os grupos FP menor e maior, a rede regulatória resultou em 41 nós regulatórios e 297 ligações, a proteína com maior número de ligações foi a APOH, e a rede obteve valor de $p < 0,001$ (Fig.3 C). Essa proteína encontrava-se super-regulada no grupo de pacientes com FP maior (*ratio*: 1,271).

Em seguida, foram determinadas as vias significativamente enriquecidas, que consiste na análise dos dados com o objetivo de identificar vias ativadas ou módulos de via. As vias biológicas compreendem vias de sinalização, caminhos reguladores de genes e caminhos metabólicos. A partir das proteínas diferencialmente expressas, a análise probabilística da bioinformática utiliza estratégia de agrupamento de proteínas de acordo com a(s) via(s) da(s) qual(is) faz(em) parte. Desse modo, a partir de uma longa lista de proteínas

diferencialmente expressas, uma lista menor de mapas de conhecimento facilita a interpretação dos mecanismos moleculares subjacentes a essas proteínas alteradas ou suas expressões (111). Os resultados revelaram que no grupo com menor FP, em comparação com o grupo controle, sete vias encontravam-se significativamente enriquecidas (Fig. 2D), conforme segue: 1) complemento e cascata da coagulação, 2) infecção por *Staphylococcus aureus*, 3) digestão e absorção de vitaminas, 4) digestão e absorção de gorduras e 5) infecção por trypanossoma africano, 6) PPAR (receptores ativados por proliferador de peroxissoma) e 7) pertussis. A comparação do grupo de FP maior com o grupo controle revelaram cinco vias (Fig. 3D), conforme segue: 1) complemento e da cascata da coagulação, 2) infecção por *Staphylococcus aureus*, 3) digestão e absorção de vitaminas, 4) digestão e absorção de gorduras e 5) infecção por trypanossoma africano. Na comparação entre os grupos com FP menor e maior, duas vias foram identificadas (Fig. 4D), conforme segue: 1) complemento e da cascata da coagulação e 2) infecção por *Staphylococcus aureus*. Em seguida, a expressão das proteínas em uma cada das vias foi analisada de acordo com o padrão de similaridade hierárquica, conforme demonstrada pelos *heatmaps* na Figura 6.

De modo geral, foi possível observar que o padrão de similaridade da expressão das proteínas foi maior entre os pacientes com FP menor e maior em comparação com o grupo de controles (Fig. 6). Contudo, na via PPAR, a similaridade foi observada entre o grupo com FP maior e o grupo controle e o grupo FP menor e maior. Assim, essa via constitui um elemento chave para caracterizar o padrão fisiopatológico de cada grupo durante a cura aparente. Em

relação as similaridades entre as proteínas da via PPAR, a apolipoproteína A2 (APOA2) foi a que apresentou menor similaridade de expressão nos diferentes grupos, na respectiva via (Fig. 6E).

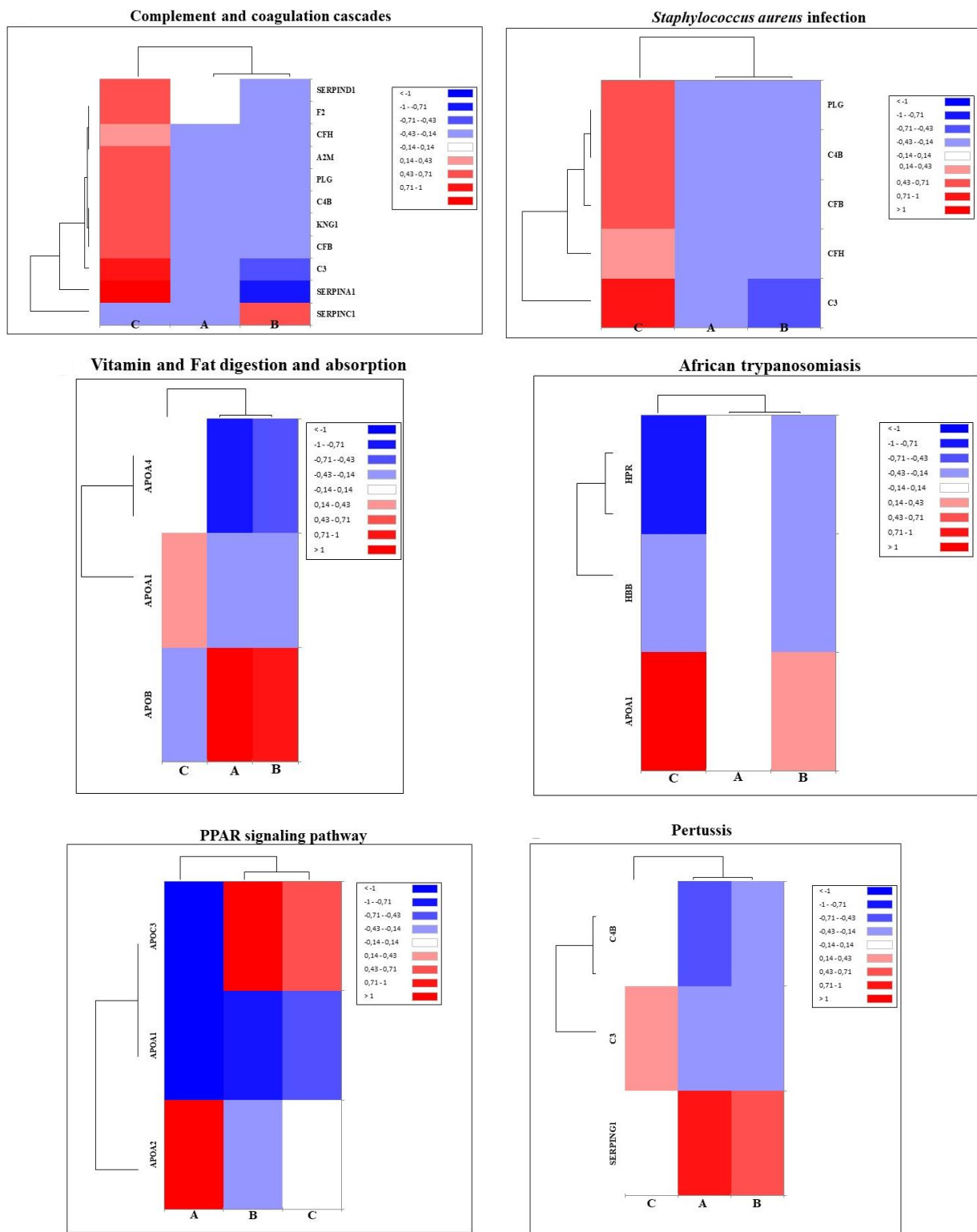


Figura 6. Avaliação das similaridades entre as proteínas diferencialmente expressas nas vias enriquecidas e os grupos de pacientes, com FP maior e menor, em cura aparente e grupo controle, utilizando *Heatmaps* e dendrogramas. **A.** Comparação FP menor vs. controle. **B.** Comparação FP maior vs. Controle. **C.** Comparação FP menor vs. FP maior. A distribuição de cores indica nível de expressão mais baixa (tons azuis) ou elevado (tons avermelhados).

5.3. Identificação de proteínas-chave na fibrogênese pulmonar na PCM

Visando compreender o processo de desenvolvimento da FP nos pacientes com PCM, nós avaliamos as proteínas diferencialmente expressas em pacientes ao longo do tratamento, nos quatro momentos definidos. Essas análises foram realizadas comparando-se, inicialmente, o grupo de pacientes com menor FP com o grupo controle no M0 (antes do tratamento). Em seguida, foi realizada análise de evolução (seguimento), isto é, comparando-se o M0 com M1 (cura clínica), M1 com M2 (cura sorológica) e M2 com M3 (cura aparente). Do mesmo modo, foi realizada a análise do grupo de pacientes com FP maior.

5.3.1. Caracterização do perfil proteômico do soro de pacientes com FP menor durante o tratamento

Primeiramente, determinamos o número de proteínas diferencialmente expressas entre o grupo controle e o grupo com menor FP antes do tratamento antifúngico. A comparação do M0 com o grupo controle resultou em 91 proteínas diferencialmente expressas, na qual 60 delas estavam sub-reguladas e 31 super-reguladas. Já a comparação do M0 com o momento seguinte, M1 (cura clínica), observamos 78 proteínas diferencialmente expressas, sendo 67 sub-reguladas e 11 super-reguladas. Na comparação entre o M1 (cura clínica) e M2 (cura sorológica), houve 59 proteínas diferencialmente expressas, na qual 23 estava sub-reguladas e 36 super-reguladas. E por fim, quando comparamos o M2 com o M3 (cura aparente) houve 68 proteínas diferencialmente expressas, onde 44 estavam sub-

reguladas e 24 super-reguladas (Fig. 7). As proteínas estão demonstradas no diagrama de Venn (Fig. 8).

Differential expression proteins

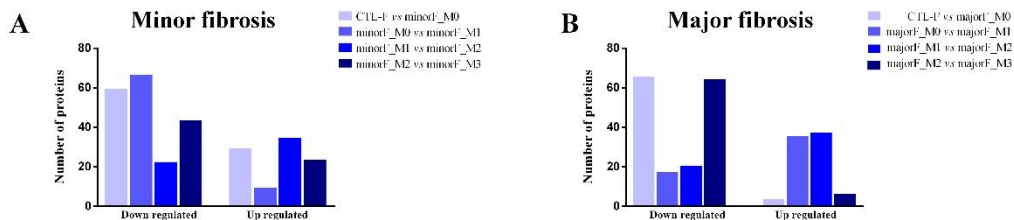
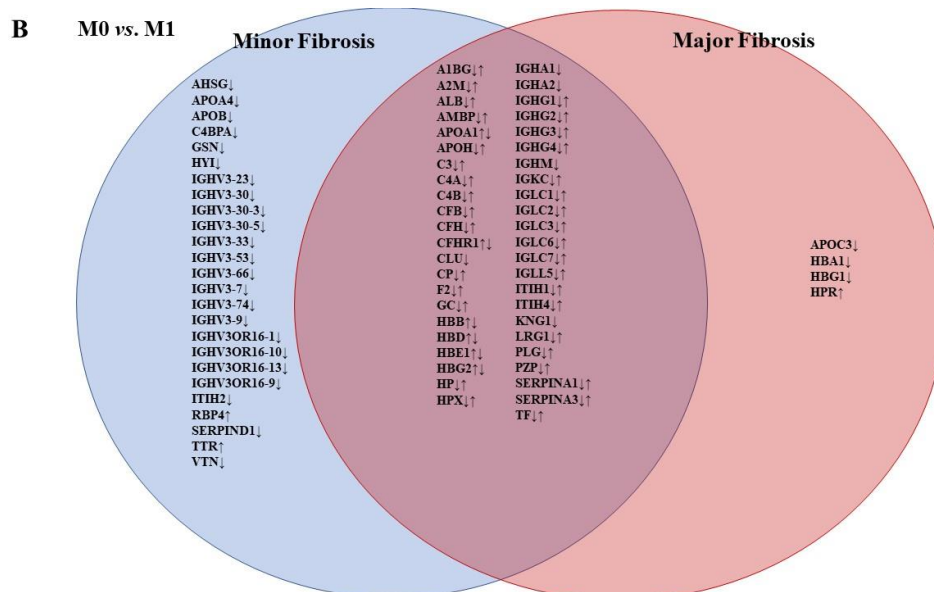
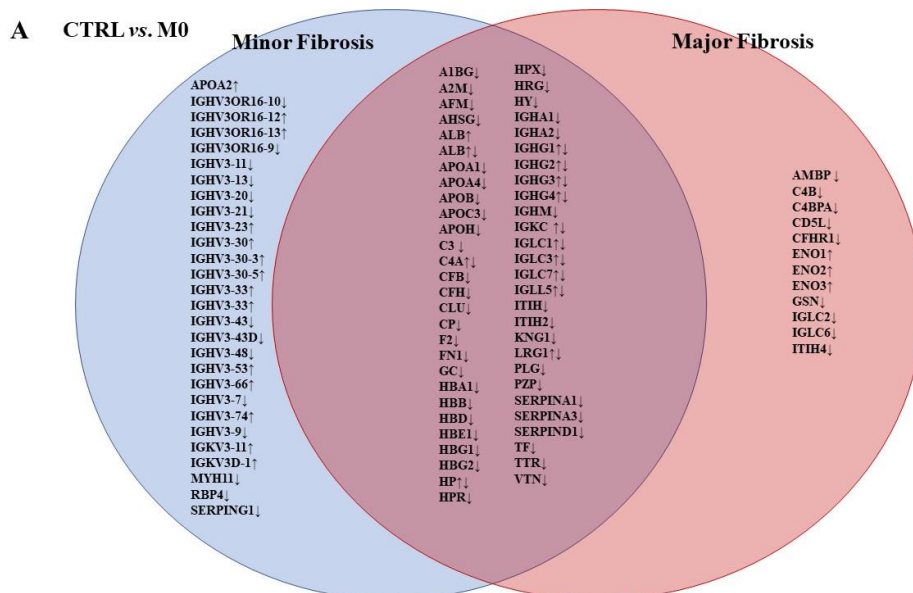


Figura 7. Número de proteínas que estavam sub-reguladas ou super-reguladas nos diferentes momentos do seguimento clínico: Grupo controle vs. pacientes anterior ao tratamento (CTRL vs. M0); anterior ao tratamento vs. cura clínica (M0 vs. M1); cura clínica vs. cura sorológica (M1 vs. M2); cura sorológica vs. cura aparente (M2 vs. M3). **A.** Grupo com FP menor; **B.** Grupo com FP maior



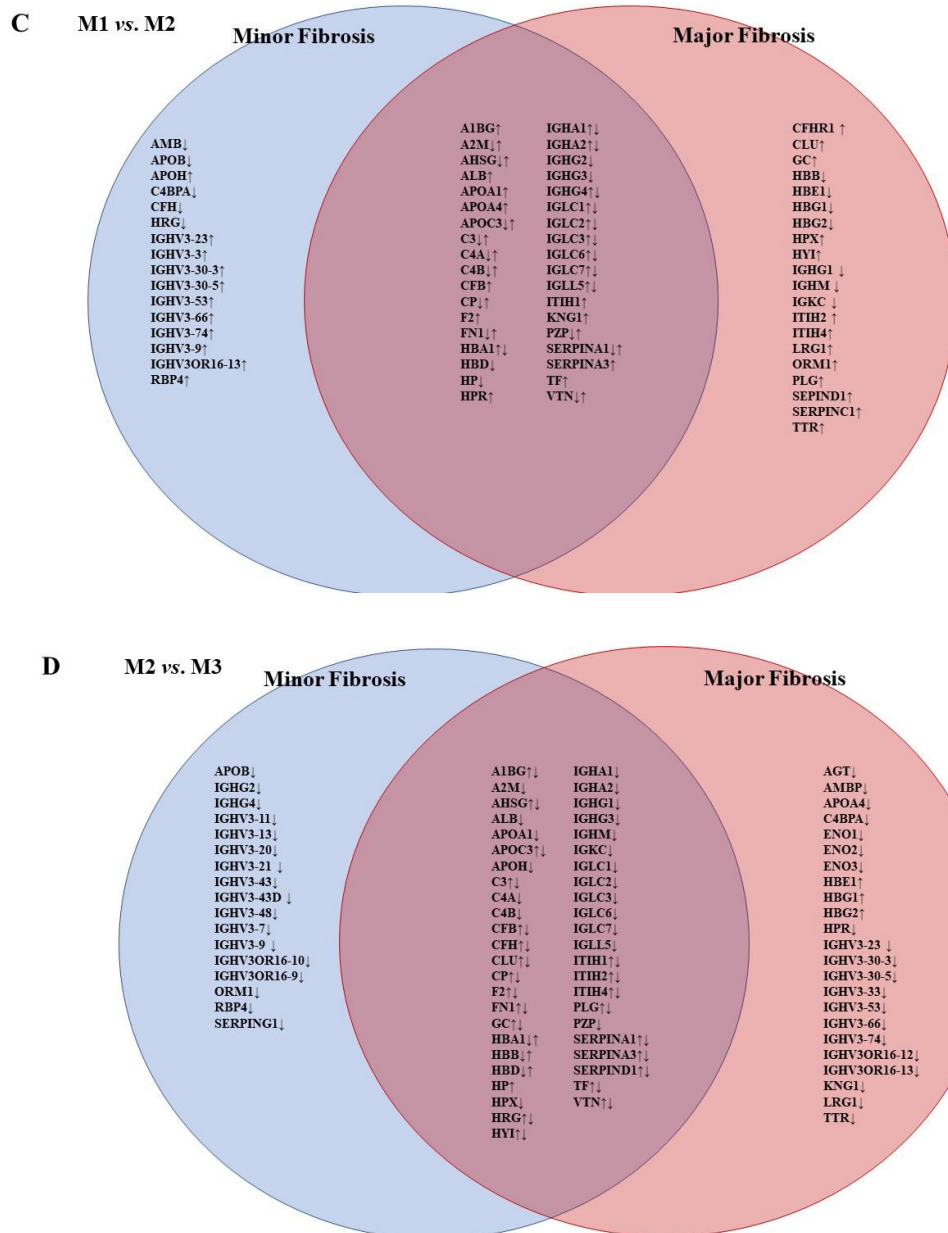


Figura 8. Diagrama de Venn exhibe as proteínas associadas a menor ou maior fibrose pulmonar nos momentos: **A.** Grupo controle comparado ao momento anterior ao tratamento; **B.** momento anterior ao tratamento comparado a cura clínica; **C.** Momento de cura clínica comparada a cura sorológica. **D.** momento de cura sorológica comparada a cura aparente. Somente os códigos dos genes estão demonstrados. ↓ proteína sub-regulada; ↑ proteína super-regulada; ↑↓ proteína super-regulada no grupo com FP menor e sub-regulada no grupo com FP maior; ↓↑ proteína sub-regulada no grupo com FP menor e super-regulada no grupo com FP maior.

Na análise do diagrama de Venn, foi possível observar que quando comparamos os grupos com FP maior e menor, no momento anterior ao tratamento com o grupo controle, das 55 proteínas expressas em comum, 42 apresentavam o mesmo padrão de expressão (sub ou super-reguladas) nos dois grupos. Quando comparamos o momento anterior ao tratamento ao momento de cura clínica, observamos uma grande diferença no padrão de expressão das proteínas em comum nos grupos com menor e maior FP. Das 45 proteínas expressas em comum somente 5 delas estava sub- ou super-reguladas nos dois grupos. Nas comparações seguintes, observamos que essa diferença foi diminuindo. Na comparação entre o momento de cura clínica e cura sorológica 13 proteínas de 36 proteínas em comum estavam expressas igualmente nos dois grupos (sub- ou super-reguladas). E finalmente, na comparação entre a cura sorológica e cura aparente, 21 de 46 proteínas em comum estavam expressas igualmente nos grupos de menor e maior FP. Esses dados indicam que o momento do início do tratamento, ou seja, durante a cura clínica, foi o momento em que os grupos com FP maior e menor mais diferiram.

A partir desses resultados, foi realizado o enriquecimento funcional. A Figura 8 apresenta os 10 termos das categorias de “processos biológicos” e “função molecular” que continham os maiores números de proteínas diferencialmente expressas nas comparações durante o seguimento clínico. Como pode-se observar na Figura 9A, os processos biológicos em que a maioria das proteínas do grupo com FP menor quando comparadas ao grupo controle, estavam envolvidas eram

relacionados com resposta inflamatória e a regulação do processo celular enquanto que as funções eram regulação de enzimas, ligação de íon e metal, e regulação das peptidases. Os resultados da análise de enriquecimento funcional das demais comparações (M0 vs. M1, M1 vs. M2 e M2 vs. M3), estão demonstrados nas Figuras 9C, 9E e 9F. O que pudemos observar na evolução do seguimento clínico, é que não houve mudanças significativas no padrão dos processos biológicos, porém observamos mudanças nas funções após a introdução do antifúngico. Na comparação entre o momento anterior ao tratamento e cura clínica, ao invés da função da ligação de íons e metal, observamos a função de transporte de lipídeos e atividade antioxidante.

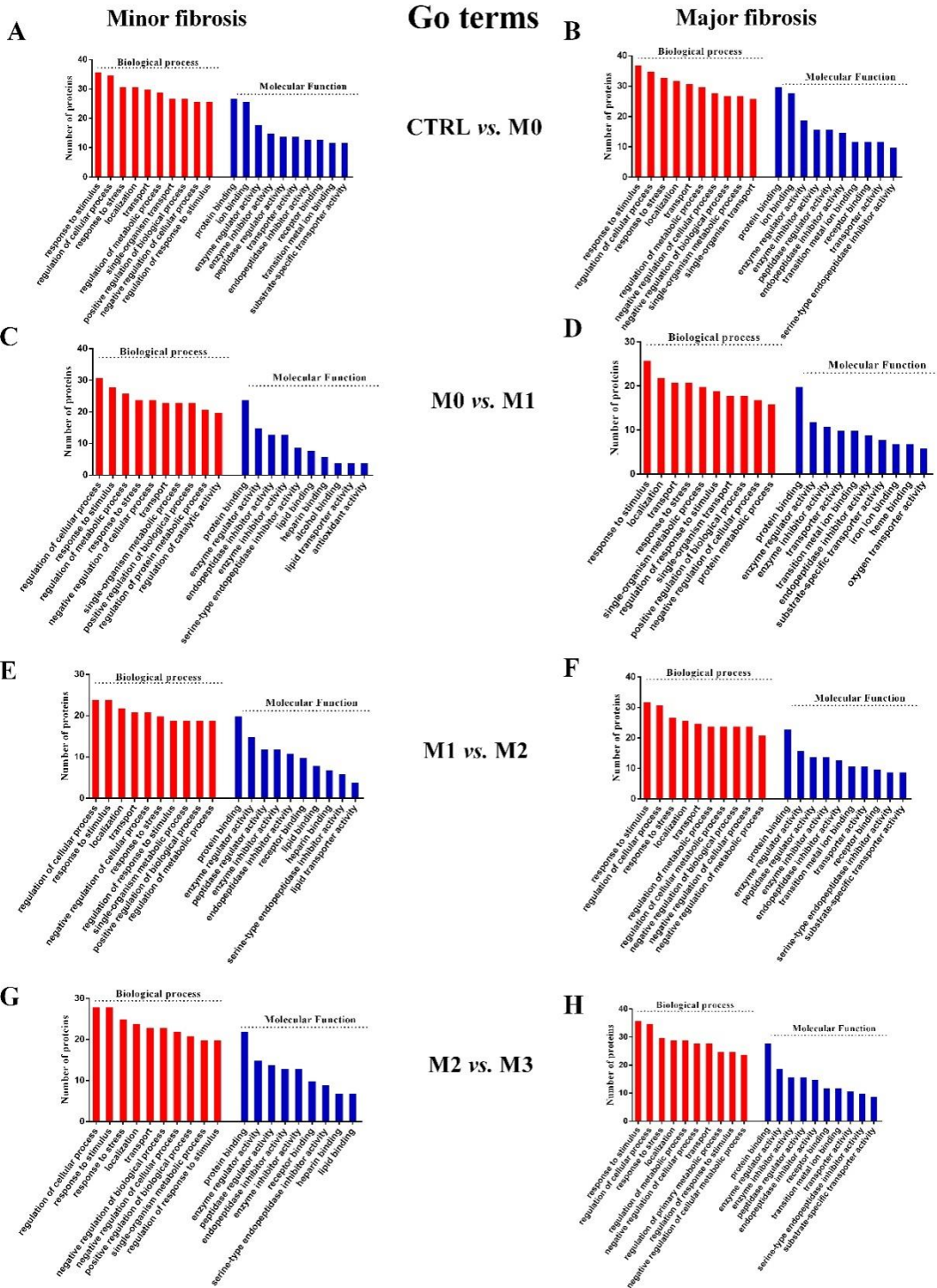


Figura 9. Classificação das proteínas diferencialmente expressas associadas a menor ou maior fibrose pulmonar de acordo com sua participação em processo biológico e função molecular. **A e B:** Grupo controle comparado ao momento anterior ao tratamento; **C e D:** momento anterior ao tratamento comparado a cura clínica; **E e F.** Momento de cura clínica comparada a cura sorológica. **G e H:** momento de cura sorológica comparada a cura aparente. A classificação das proteínas foi obtida de acordo com as anotações depositadas da base de dados *Gene Ontology* (GO).

Em seguida, foi realizada a construção da rede de PPI. As proteínas diferencialmente expressas resultante das comparações entre os diferentes momentos do seguimento clínico, formaram redes de interações com significância estatística ($p < 0,001$), e ainda a *query protein* APOH foi identificada em todos os momentos. As redes resultantes de cada comparação estão demonstradas no Anexo 16.

A determinação das vias que foram enriquecidas pelas proteínas diferencialmente expressas está sumarizada na Figura 10. A expressão das proteínas em uma cada das vias foi analisada de acordo com o padrão de similaridade hierárquica, conforme demonstrada pelos *heatmaps* na Figura 11.

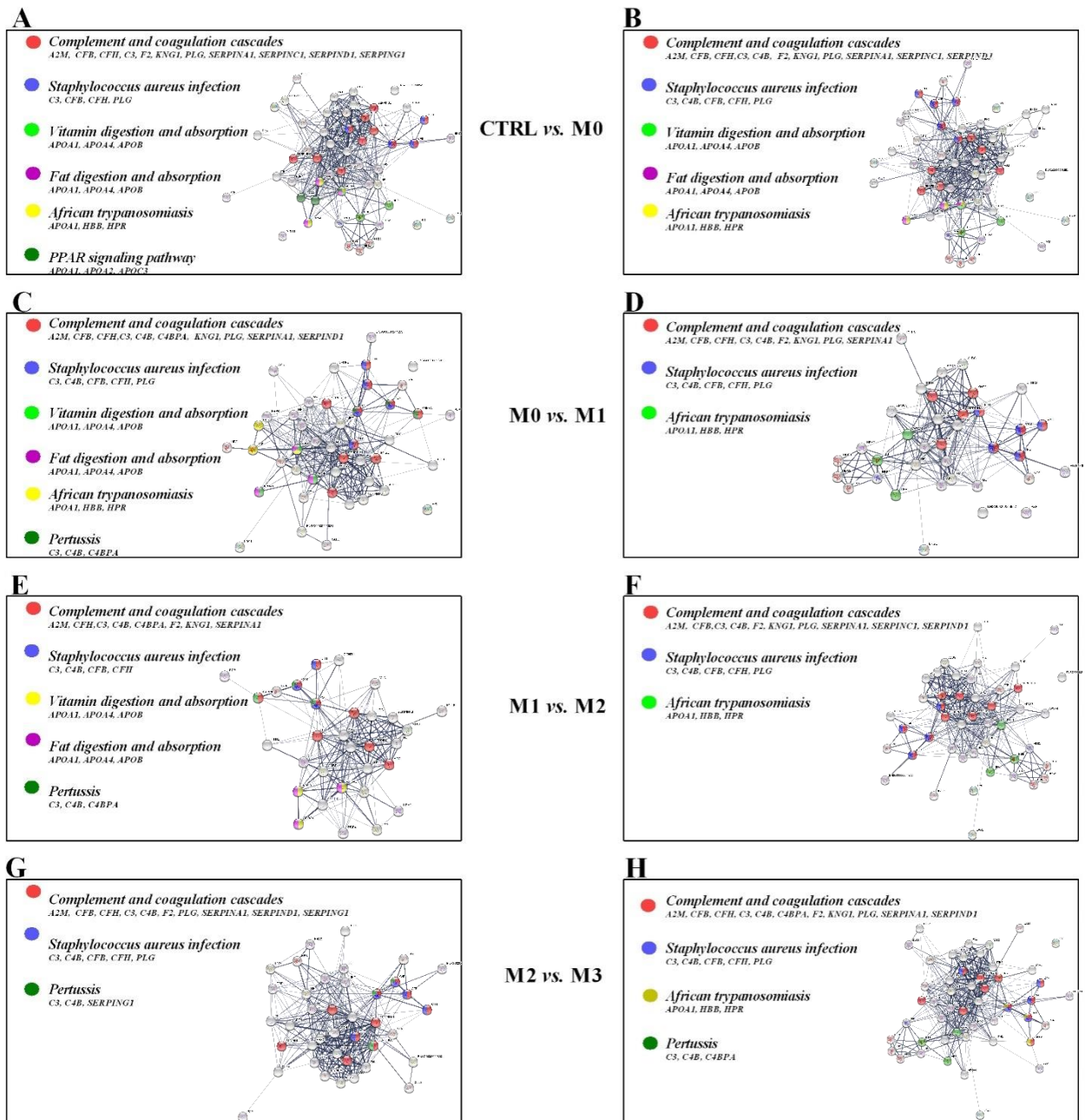


Figura 10. Vias de sinalização significativamente enriquecidas a partir de proteínas diferencialmente expressas associadas a menor ou maior fibrose pulmonar. **A e B:** Grupo controle comparado ao momento anterior ao tratamento; **C e D:** momento anterior ao tratamento comparado a cura clínica; **E e F:** Momento de cura clínica comparada a cura sorológica. **G e H:** momento de cura sorológica comparada a cura aparente. As associações entre as proteínas de sinalização das respectivas vias foram detectadas usando a ferramenta *Kyoto Encyclopedia at Genes and Genomes* (KEGG). A distribuição de cores indica as diferentes vias.

De modo geral, foi possível observar que o padrão de similaridade da expressão das proteínas entre os diferentes momentos foi maior entre o momento anterior ao tratamento (M0) em comparação com o grupo controle e o momento de cura aparente (M3) em comparação com o momento da cura sorológica (M2); demonstrando que os momentos em que os pacientes iniciam o tratamento antifúngico até o momento da cura sorológica há uma mudança na expressão das proteínas na maioria das vias analisadas (Fig. 11A, B, C e F). Entretanto, as proteínas da via da tripanossomíase africana, se comportaram de modo menos similar na comparação entre o momento anterior ao tratamento e a cura aparente, indicando uma alteração na atividade desta via durante o início do tratamento. Em relação às similaridades de expressão das proteínas da via da tripanossomíase africana nos diferentes momentos, observamos que a proteína relacionada à haptoglobulina (HPR) foi a que apresentou menor similaridade, ou seja, mais variou sua expressão nos diferentes momentos (Fig. 11D). Outra via que as proteínas apresentaram padrão diferenciado da maioria, foi a via PPAR. Nesta via, os dois momentos iniciais do seguimento (CTRL vs. M0 e M0 vs. M1) foram similares, assim como os dois momentos finais (M1 vs. M2 e M2 vs. M3) foram similares, indicando que houve variação da expressão das proteínas envolvidas nessa via entre o momento de cura sorológica e cura aparente. Em relação às similaridades entre as proteínas da via PPAR, a apolipoproteína C3 (APOC3) foi a que apresentou menor similaridade entre os momentos da respectiva via, ou seja, a proteína que mais variou expressão nos diferentes momentos (Fig. 11E).

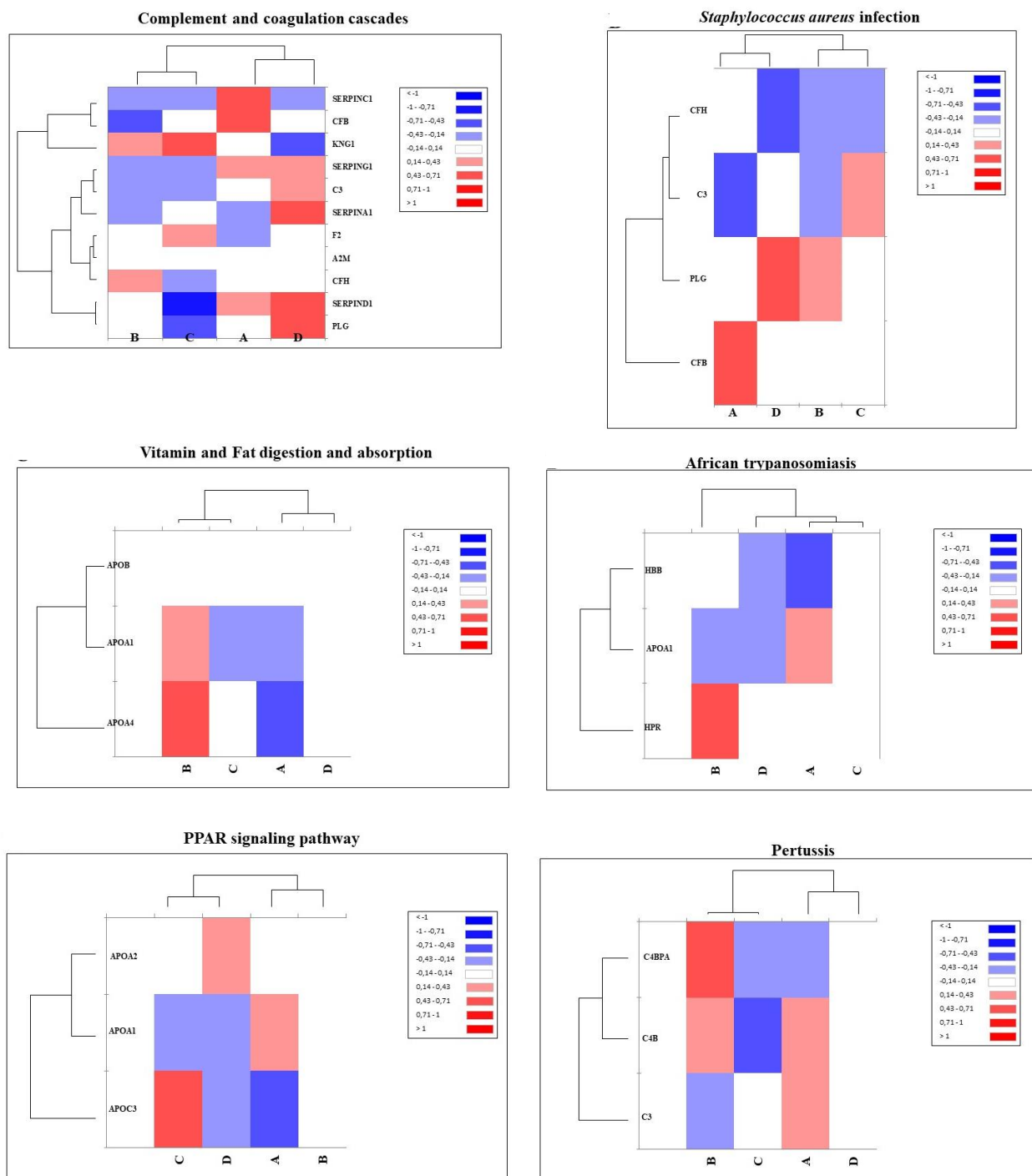


Figura 11. Avaliação das similaridades entre as proteínas diferencialmente expressas nas vias enriquecidas no grupo de pacientes com FP menor nos diferentes momentos do seguimento clínico, utilizando *Heatmaps* e dendrogramas. **A.** Comparação entre o grupo controle e momento anterior ao tratamento; **B.** Comparação entre o momento anterior ao tratamento e cura clínica **C.** Comparação entre o momento da cura clínica e da cura sorológica **D.** Comparação entre o momento da cura sorológica e cura aparente. A distribuição de cores indica nível de expressão mais baixa (tons azuis) ou elevado (tons avermelhados).

5.3.2. Caracterização do perfil proteômico do soro de pacientes com fibrose maior durante o tratamento

Primeiramente, determinamos o número de proteínas diferencialmente expressas entre o grupo controle e o grupo com maior FP antes do tratamento antifúngico. A comparação do momento anterior ao tratamento (M0) com o grupo controle resultou em 70 proteínas diferencialmente expressas, na qual 66 delas estavam sub-reguladas e 4 super-reguladas. Já a comparação do M0 com a cura clínica (M1), observamos 54 proteínas diferencialmente expressas, sendo 18 sub-reguladas e 36 super-reguladas. Na comparação entre o M1 e a cura sorológica (M2), houve 59 proteínas diferencialmente expressas, na qual 21 estava sub-reguladas e 38 super-reguladas. E por fim, quando comparamos o M2 com o momento da cura aparente (M3) houve 72 proteínas diferencialmente expressas, onde 65 estavam sub-reguladas e 7 super-reguladas (Fig. 7B). As proteínas estão demonstradas no diagrama de Venn (Fig. 8).

A partir desses resultados, foi realizado o enriquecimento funcional. A Figura 9 apresenta os 10 termos das categorias de “processos biológicos” e “função molecular” que continham os maiores números de proteínas diferencialmente expressas resultantes das comparações do seguimento clínico dos pacientes com FP maior. Como pode-se observar na Figura 9D, na comparação entre o momento anterior ao tratamento e o momento de cura clínica, diferentemente das outras comparações, observamos que a maioria das proteínas do grupo com FP maior estavam envolvidas com processos biológicos inflamatórios, com ausência de

regulação, além disso, na função molecular, observamos a função de transporte de heme e oxigênio, o que também não foi observado nos outros momentos. Os resultados da análise de enriquecimento funcional das demais comparações (M0 vs. M1, M1 vs. M2 e M2 vs. M3), estão demonstrados nas Figuras 9B, 9F e 9H. À exceção da observação já citada; em geral, nos outros momentos do seguimento clínico, não observamos mudanças no padrão das categorias de enriquecimento, onde os principais processos biológicos foram resposta a estímulo e regulação do processo celular, e as principais funções envolveram a ligação de proteínas, regulação de enzimas e peptidases e transporte de íons. Diferentemente do grupo com FP menor, neste grupo não observamos as funções de transporte de lipídeos entre as principais funções observadas.

Em seguida, foi realizada a construção da rede de PPI. As proteínas diferencialmente expressas resultante das comparações entre os diferentes momentos do seguimento clínico, formaram redes de interações com significância estatística ($p < 0,001$), e ainda a *query protein* APOH foi identificada na maioria das comparações (CTRL vs. M0; M0 vs. M1 e M2 vs. M3), com exceção da comparação entre a cura clínica e a cura sorológica (M1 vs. M2), em que as proteínas diferencialmente expressas formaram uma rede PPI em que a *query protein* foi a SERPIND1. As redes resultantes de cada comparação estão demonstradas no Anexo 17.

A determinação das vias que foram enriquecidas pelas proteínas diferencialmente expressas está sumarizada na Figura 10. A expressão das proteínas em uma cada das vias foi analisada de acordo com o padrão de

similaridade hierárquica, conforme demonstrada pelos *heatmaps* na Figura 12.

Não houve um padrão de similaridade entre as vias enriquecidas no seguimento dos pacientes com maior FP. As proteínas da via do complemento e da cascata da coagulação e as da via da digestão e absorção de vitaminas e gorduras, se comportaram de modo menos similar na comparação entre o momento de cura clínica e a cura sorológica (M1 vs. M2). Em relação as similaridades de expressão entre as proteínas dessas vias, as que apresentaram menor similaridade entre os momentos foi, respectivamente, a proteína SEPIND1 e APOB, ou seja, essas proteínas apresentaram maior variação de expressão entre os diferentes momentos analisados (Fig. 12 A e C). Nas vias da infecção por *Staphylococcus aureus* e a via da pertussis o padrão de similaridade foi maior entre o momento anterior ao tratamento em comparação com o grupo controle e o momento de cura aparente em comparação com o momento anterior (cura sorológica). Em relação as similaridades de expressão entre as proteínas dessas vias, as que apresentaram menor similaridade entre os momentos foi, respectivamente, a proteína C3 e C4BP (Fig. 12B e Fig. 12E).

As proteínas da via da tripanossomíase africana se comportaram de modo menos similar na comparação entre o momento de cura sorológica e cura aparente. Nesta via, a proteína HBB foi a que apresentou menor similaridade entre as proteínas da respectiva via, ou seja, a proteína que mais variou a expressão entre os diferentes momentos. (Fig. 12C).

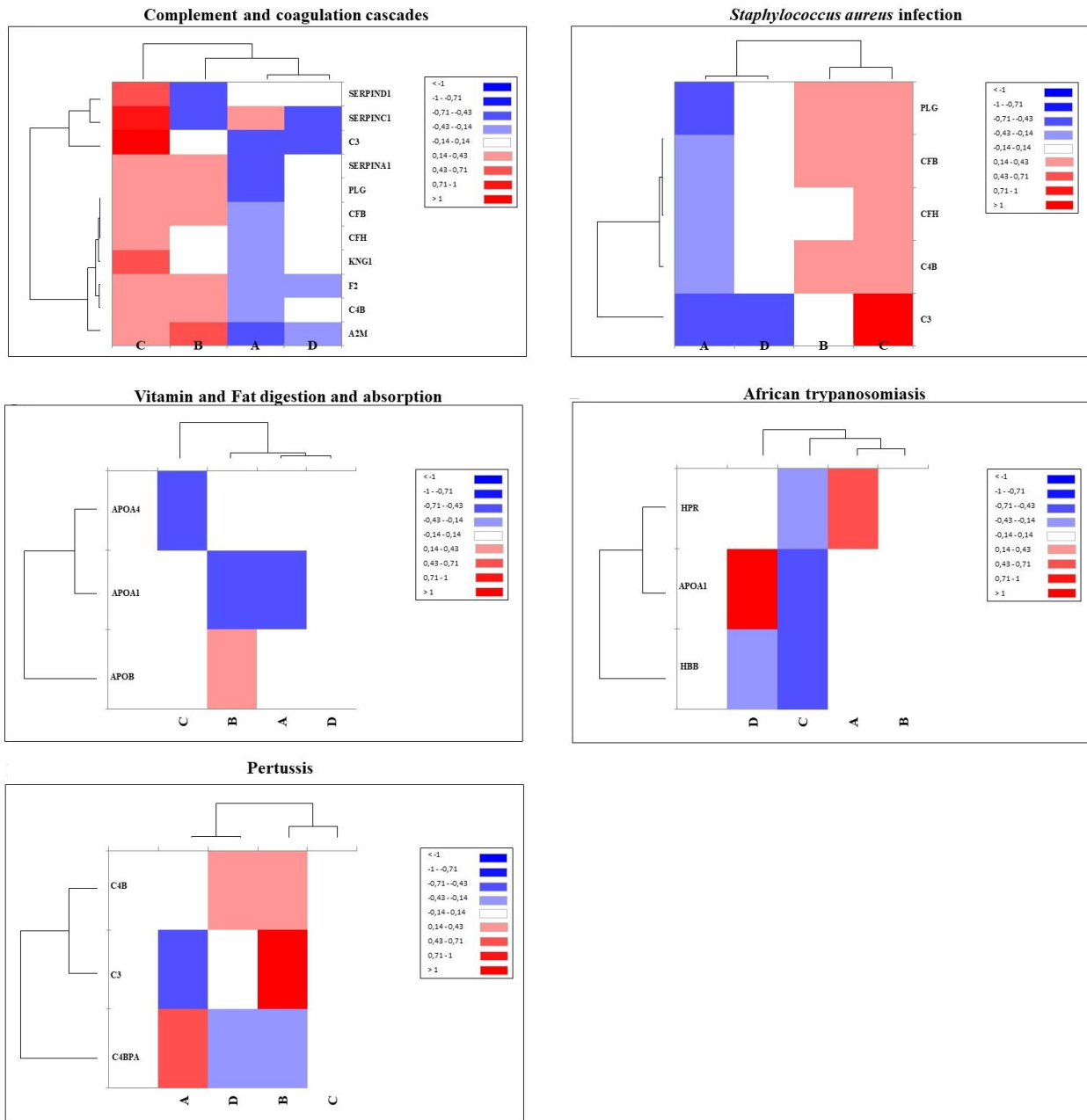


Figura 12. Avaliação das similaridades entre as proteínas diferencialmente expressas nas vias enriquecidas no grupo de pacientes com FP maior nos diferentes momentos do seguimento clínico, utilizando *Heatmaps* e dendrogramas. **A.** Comparação entre o grupo controle e momento anterior ao tratamento; **B.** Comparação entre o momento anterior ao tratamento e cura clínica **C.** Comparação entre o momento da cura clínica e da cura sorológica **D.** Comparação entre o momento da cura sorológica e cura aparente. A distribuição de cores indica nível de expressão mais baixa (tons azuis) ou elevado (tons avermelhados).

Com o objetivo de identificar qual momento do seguimento clínico poderia ocorrer o desenvolvimento da FP em maior grau, nós avaliamos as características do proteoma nos diferentes momentos do seguimento clínico nos grupos de pacientes com FP maior ou menor separadamente. Dentre os diversos aspectos avaliados, a maioria das diferenças foram encontradas no momento anterior ao tratamento até a cura clínica onde observamos: 1) Na análise do diagrama de Venn esse foi o período em que os grupos com FP menor e maior mais diferiram em relação a expressão das proteínas em comum; 2) No enriquecimento funcional, somente o grupo com FP maior não apresentou a regulação do processo celular como um dos principais processos biológicos; 3) Nas vias enriquecidas, somente o grupo com menor FP apresentaram a via da absorção de vitaminas e gorduras e a via da pertussis.

Na categoria das funções moleculares, a partir do momento de cura sorológica, e em todas os momentos posteriores do seguimento clínico, as proteínas diferencialmente expressas do grupo com FP menor, apresentavam como uma das dez principais funções o “transporte ou ligação de lipídeos”. Entretanto, no grupo com FP maior ao invés da função de “transporte ou ligação de lipídeos”, observamos as funções de “transporte ou ligação de ferro, íons ou metal”.

Em seguida, analisamos as vias que foram enriquecidas em cada grupo durante o seguimento clínico. Observamos que na comparação entre o grupo controle e o momento anterior ao tratamento, o grupo com FP menor apresentou a via PPAR enriquecida pelas proteínas diferencialmente expressas, enquanto que o grupo com FP maior não apresentou o enriquecimento dessa via. Na análise de

similaridade de expressão das proteínas das vias enriquecidas nos diferentes momentos do seguimento clínico, observamos que o grupo com FP menor apresentou um padrão similar de expressão das proteínas na maioria das vias, enquanto que o grupo com FP maior não houve um padrão.

Levando em consideração todas as diferenças encontradas no acompanhamento do seguimento clínico dos grupos com FP menor e maior, observamos que as maiores diferenças entre os grupos ocorreram no momento do início do tratamento, ou seja, entre os momentos anteriores ao tratamento e cura clínica, sugerindo que esse seja o momento-chave para o desenvolvimento da FP em maior nível. Buscando entender as proteínas chaves desse processo, observamos na Tabela 2, as proteínas que foram encontradas no decorrer desse tópico, entre as proteínas chaves das redes de PPI e as envolvidas nas vias enriquecidas, e comparamos os grupos com menor e maior FP em relação a expressão de cada uma delas nos momentos do seguimento clínico.

TABELA 2. Proteínas sub- ou superreguladas associadas a fibrogênese pulmonar da PCM nos diferentes momentos do seguimento clínico.

Uniprot	Protein name	Gene	CTRL/M0		M0/M1		M1/M2		M2/M3		Processo biológico	Função Molecular
			Minor FP	Major FP	Minor FP	Major FP	Minor FP	Major FP	Minor FP	Major FP		
P01023	Alpha-2-macroglobulin	A2M	↓	↓	↓	↑	↓	↑	↓	↓	Stem cell differentiation, extracellular matrix disassembly	Anti-inflammatory and pro-fibrotic activity
P02647	Apolipoprotein A-I	APOA1	↓	↓	↑	↓	↑	↑	↓	↓	Cholesterol, Lipid and Steroid metabolism and transport	Anti-inflammatory activity
P02652	Apolipoprotein A-II	APOA2	↑	-	-	-	-	-	-	-	Host-virus interaction, Lipid transport	heat shock protein, high-density lipoprotein and cholesterol binding
P06727	Apolipoprotein A-IV	APOA4	↓	↓	↓	↓	↑	-	-	↓	Lipid transport	Antioxidant activity, cholesterol, lipid binding copper and ion binding
Q0VD83	Apolipoprotein B receptor	APOB	↓	↓	↓	-	↓	-	↓	-	Cholesterol, lipid and Sterol metabolism and transport	Very-low-density lipoprotein particle receptor activity
P02656	Apolipoprotein C-III	APOC3	↓	↓	-	↓	↑	-	↑	↓	Lipid degradation, metabolism and transport	Cholesterol, phospholipid and HDL binding and lipase inhibitor
P02749	Beta-2-glycoprotein 1	APOH	↓	↓	↓	↑	↑	-	↓	↓	Heparin binding	Blood coagulation, fibrinolysis, apoptotic process, cell migration
P01024	Complement C3	C3	↓	↓	↓	↑	↓	↑	↑	↓	Complement pathway, lipid metabolism	C5L2 anaphylatoxin chemotactic receptor binding, serine-type endopeptidase
P0C0L5	Complement C4-B	C4B	-	↓	↓	↑	↓	↑	↓	↓	Complement pathway	Blood group antigen
P04003	C4b-binding protein alpha chain	C4BPA	-	↓	↓	↓	↓	-	-	↓	Complement pathway, Innate immunity	RNA binding
P00751	Complement factor B	CFB	↓	↓	↓	↑	↑	↑	↑	↓	Complement alternate pathway	Hydrolase, Serine protease
P08603	Complement factor H	CFH	↓	↓	↓	↓	↓	-	↑	↓	Complement alternate pathway	heparin binding
P00734	Prothrombin	F2	↓	↓	↓	↑	↑	↑	↑	↓	acute inflammation, wound healing, blood homeostasis	hidrolase, serina-protease
P02774	Vitamin D-binding protein	GC	↓	↓	↓	↑	-	↑	↑	↓	Vitamin D transport and metabolic process	Actin-binding
P68871	Hemoglobin subunit beta	HBB	↓	↓	↑	↓	-	↓	↓	↑	Oxygen transport, Transport	Hypotensive agent, Vasoactive
P00739	Haptoglobin-related protein	HPR	↓	↓	-	↑	↑	↑	-	-	Receptor-mediated endocytosis	Serine protease homolog
P01042	Kininogen-1	KNG1	↓	↓	↓	↓	↑	↑	↑	↓	Blood coagulation, Hemostasis, Inflammatory response	Protease inhibitor, Thiol protease inhibitor, Vasoactive, Vasodilator
P00747	Plasminogen	PLG	↓	↓	↓	↑	↑	↑	↑	↓	Blood coagulation, Fibrinolysis, Tissue remodeling	Hydrolase, Protease, Serine protease
P01009	Alpha-1-antitrypsin	SERPINA1	↓	↓	↓	↑	↓	↑	↑	↓	Acute phase, Blood coagulation, Hemostasis	Protease inhibitor, Serine protease inhibitor
P01008	Antithrombin-III	SERPINC1	-	-	-	-	-	↑	-	-	Blood coagulation, Hemostasis	Heparin-binding, Protease inhibitor, Serine protease inhibitor
P05546	Heparin cofactor 2	SERPIND1	↓	↓	↓	-	-	↑	↑	↓	Blood coagulation, Chemotaxis, Hemostasis	Heparin-binding, Protease inhibitor, Serine protease inhibitor
P05155	Plasma protease C1 inhibitor	SERPING1	↓	-	↓	-	-	-	↓	-	Blood coagulation, Complement pathway, Fibrinolysis, Innate immunity	Protease inhibitor, Serine protease inhibitor

↓ proteína sub-regulada e ↑ proteína superregulada na comparação entre diferentes momentos. O sombreamento nos diferentes tons de cinza representa os diferentes momentos do seguimento clínico. A fileira sombreada em mais cinza escuro representa o momento chave para o desenvolvimento da fibrose em maior grau do grupo com FP maior. As proteínas indicadas em negrito são as que aumentaram a expressão somente no grupo com FP maior durante a cura clínica.

A partir da análise da Tabela 2, pudemos observar no momento do início do tratamento, entre o momento anterior ao tratamento e cura clínica, o grupo com menor fibrose manteve o mesmo padrão de expressão das proteínas da comparação anterior, mantendo sub-reguladas as proteínas pró-inflamatórias e pró-fibróticas, e aumentou a expressão da proteína APOA1, que é uma proteína com funções anti-inflamatória e reguladora. O processo inverso observou-se no grupo com FP maior, onde a proteína reguladora APOA1, manteve-se sub-regulada, enquanto que as proteínas pró-inflamatórias (APOH, C3, C4B, CFH, CFG, F2, GC, HPR) e pró-fibróticas (A2M, APOH, F2e GC) tornaram-se super-reguladas neste momento. No momento seguinte, entre a cura clínica e cura sorológica, observamos o aumento da expressão da APOA1 no grupo com FP maior, acompanhada da diminuição da expressão das proteínas pró-inflamatórias e pró-fibróticas no momento seguinte, na cura aparente. Com essas observações, podemos concluir que a proteína-chave para evitar o desenvolvimento da fibrose em maior grau no grupo com menor FP foi a proteína APOA1.

5.4. Determinação de possíveis biomarcadores prognóstico para desenvolvimento do maior grau de FP da PCM

Na busca por possíveis candidatos a biomarcadores prognóstico para o desenvolvimento da FP maior ou menor, foi comparado o perfil proteômico dos pacientes com FP menor e maior em cada momento do seguimento clínico.

No momento anterior ao início do tratamento (M0), a comparação entre o grupo de pacientes com FP menor e maior, resultou em 73 proteínas diferencialmente expressas, na qual 61 delas estavam super-reguladas e 12 sub-reguladas. No momento de cura clínica, haviam 53 proteínas diferencialmente expressas entre o grupo com FP menor e maior, onde 35 delas estavam super-reguladas e 20 sub-reguladas. No momento seguinte, cura sorológica, havia 64 proteínas diferencialmente expressas entre os pacientes com FP menor e maior, sendo que 33 delas estavam super-reguladas e 31 sub-reguladas. Por fim, no momento da cura aparente, foram observadas 61 proteínas diferencialmente expressas entre o grupo com FP menor e maior, onde 55 estavam super-reguladas e 6 sub-reguladas.

A Tabela 3 apresenta as proteínas candidatas a biomarcadoras em cada momento do seguimento clínico, onde foram selecionadas as proteínas que estavam, pelo menos, duas vezes mais super-reguladas, ou 0,6 vezes sub-regulada no grupo com FP maior. No momento anterior ao tratamento, que seria o momento ideal para predizer o desenvolvimento da FP maior, identificamos 15 proteínas que estavam mais de duas vezes mais expressas no grupo com maior FP. Dentre elas,

as proteínas A2M, APOH, GC e SERPINA1 foram associadas como proteína-chave para o desenvolvimento da FP no tópico anterior. Na análise do conjunto dos resultados, os processos biológicos mais prevalentes associados a essas proteínas foram relacionados a inflamação e ao reparo tecidual, o que nos permite identificar que a maior inflamação e processos pró-fibróticos já estavam aumentados no grupo com FP maior desde o momento anterior ao tratamento. Das proteínas mais sub-reguladas no grupo com FP maior no momento anterior ao tratamento, observamos que o transporte de oxigênio era o processo biológico mais prevalente.

Tabela 3. Potenciais biomarcadores prognósticos para o desenvolvimento da maior FP em pacientes com PCM pulmonar crônica.

Uniprot	Protein name	Gene	Minor FP/Major FP				Biological process	Molecular function
			M0	M1	M2	M3		
P02750	Leucine-rich alpha-2-glycoprotein	LRG1	2,746				Inflammation and fibrogenesis	Transforming growth factor beta receptor binding
P01860	Immunoglobulin heavy constant gamma 3	IGHG3	2,612		2,014		Adaptative immunity	Antigen binding, serine-type endopeptidase activity
P01023	Alpha-2-macroglobulin	A2M	2,509				Stem cell differentiation, extracellular matrix disassembly	Anti-inflammatory and pro-fibrotic activity
P00739	Haptoglobin-related protein	HPR	2,340				hemoglobin binding	Receptor-mediated endocytosis
P01857	Immunoglobulin heavy constant gamma 1	IGHG1	2,340				Adaptative immunity	Antigen binding, serine-type endopeptidase activity
P00738	Haptoglobin	HP	2,316			2,01375	Acute phase, Immunity	Antibiotic, Antimicrobial, Antioxidant, Serine protease homolog
P01859	Immunoglobulin heavy constant gamma 2	IGHG2	2,293				Adaptative immunity	Antigen binding, serine-type endopeptidase activity
P02749	Beta-2-glycoprotein 1	APOH	2,138				Heparin binding	Blood coagulation, fibrinolysis, apoptotic process, cell migration
P20742	Pregnancy zone protein	PZP	2,117				female pregnancy	Protease inhibitor, Serine protease inhibitor
P0DOY3	Immunoglobulin lambda constant 3	IGLC3	2,096				adaptive immune response	Antigen binding
P0CG04	Immunoglobulin lambda constant 1	IGLC1	2,075				adaptive immune response	Antigen binding, serine-type endopeptidase activity
P01011	Alpha-1-antichymotrypsin	SERPINA3	2,034		0,517		Acute phase	Protease inhibitor, Serine protease inhibitor
P01009	Alpha-1-antitrypsin	SERPINA1	2,014		0,320	2,4596	Acute phase, Blood coagulation, Hemostasis	Protease inhibitor, Serine protease inhibitor
P0DOY2	Immunoglobulin lambda constant 2	IGLC2	2,014				adaptive immune response	Antigen binding
P02774	Vitamin D-binding protein	GC	2,014				vitamin D transport and metabolic process	Actin-binding
P02656	Apolipoprotein C-III	APOC3		2,80107			Lipid degradation, metabolism and transport	Cholesterol, phospholipid and HDL binding and lipase inhibitor
P01861	Immunoglobulin heavy constant gamma 4	IGHG4			2,117		adaptive immune response	Antigen binding, serine-type endopeptidase activity
P02647	Apolipoprotein A-I	APOA1				2,22554	Cholesterol, Lipid and Steroid metabolism and transport	Anti-inflammatory activity
P68871	Hemoglobin subunit beta	HBB	0,427				Oxygen transport, Transport	Hypotensive agent, Vasoactive
P02042	Hemoglobin subunit delta	HBD	0,432		2,138		Oxygen transport, Transport	Heme, Iron, Metal-binding
P69892	Hemoglobin subunit gamma-2	HBG2	0,432		2,203		Oxygen transport, Transport	Heme, Iron, Metal-binding
P02100	Hemoglobin subunit epsilon	HBE1	0,436		2,181		Oxygen transport, Transport	Heme, Iron, Metal-binding
P69891	Hemoglobin subunit gamma-1	HBG1	0,440		2,181		Oxygen transport, Transport	Heme, Iron, Metal-binding
P69905	Hemoglobin subunit alpha	HBA1	0,449	0,58275	0,638		Oxygen transport, endocytosis, cellular oxidant detoxification	Heme, Iron, Metal-binding
P13929	Beta-enolase	ENO3	0,468				Glycolysis	Striated muscle development and regeneration.
P02787	Serotransferrin	TF		0,61263			Ion transport, role in stimulating cell proliferation.	Iron, Metal-binding
P00738	Haptoglobin	HP		0,63763	0,607		Antibiotic, Antimicrobial, Antioxidant, Serine protease homolog	Acute phase, Immunity
P10909	Chusterin	CLU			0,619		Chaperone	Apoptosis, Complement pathway, Immunity, Innate immunity
P02751	Fibronectin	FN1			0,432		Acute phase, Angiogenesis, Cell adhesion, Cell shape	Collagen, heparin and integrin binding, peptidase activator
P05155	Plasma protease C1 inhibitor	SERPING1			0,549		Inflammation and fibrogenesis	Protease inhibitor, Serine protease inhibitor
P02766	Transthyretin	TTR			0,651		extracellular matrix organization, cellular protein metabolic process	Hormone, Thyroid hormone

Minor FP/ Major FP: valores da proporção dos níveis das proteínas no grupo com FP menor para o grupo com FP maior (*ratio*). O sombreado nos diferentes tons de cinza representam os diferentes momentos do seguimento clínico. Os valores maior que 2 estão sombreados em cinza escuro e os valores menor que 0,6 estão sombreados de branco. As proteínas indicadas em negrito também foram identificadas no desenvolvimento da fibrogênese do grupo com FP maior durante o momento de cura clínica.

6. DISCUSSÃO

Os objetivos principais desse estudo foram responder duas perguntas: 1) quais proteínas estão envolvidas na FP na PCM e, ainda, se há um momento durante o seguimento que seja relevante no desenvolvimento de uma fibrose maior, ou mais grave. e, 2) se existem proteínas biomarcadoras no soro desses pacientes que possam ser preditoras para a FP maior. Em conjunto, nossos resultados permitem sugerir duas importantes observações: 1) no momento anterior ao tratamento, o grupo com maior FP já apresenta uma resposta inflamatória e pró-fibrótica mais intensa mediada pela super-regulação de proteínas envolvidas com a inflamação e fibrogênese (A2M; APOH; GC; IGHG1, 2 e 3; IGLC1, 2 e 3; HP; LRG1, PZP e SERPINA1) e, 2) Após o início do tratamento, no momento da cura clínica, houve um aumento da resposta pró-inflamatória e pró-fibrótica somente no grupo com FP maior mediada pelas proteínas (A2M, APOH, C3, C4B, CFB, CFH, F2, GC, HPR, PLG e SERPINA1), o que foi diminuindo com o passar no seguimento clínico.

Essas observações corroboram com alguns estudos sobre as sequelas pulmonares observadas nos pacientes com PCM. Tobón et al. (20) estudaram as sequelas pulmonares em um seguimento de pacientes após o tratamento com ITC e observaram que a droga parece não prejudicar a FP, mas que o nível de gravidade da infiltração no momento do diagnóstico influencia no desenvolvimento da mesma, eles observaram uma fibrose foi muito maior no fim do seguimento clínico quando o infiltrado foi caracterizado como muito grave no diagnóstico. Venturini, et al. (42) estudando a resposta inflamatória dos pacientes com PCM durante o seguimento clínico observaram que entre os pacientes com a forma crônica, havia uma porcentagem daqueles com maiores valores de TCD4+ no sangue periférico, e que essa elevação persistia até dois anos após o tratamento; Costa et al. (46)

observaram que em alguns pacientes a seqüela pulmonar tipicamente piora quando a terapia antifúngica é iniciada. Após essas observações e com nossos dados, sugerimos que o momento ideal para o prognóstico do desenvolvimento da FP maior e que uma possível intervenção já poderia ser realizada em conjunto com o início do tratamento antifúngico.

As proteínas APOH, A2M, GC e SERPINA1 foram encontradas com expressão elevada tanto no momento anterior ao tratamento quanto durante a cura clínica no grupo com FP maior. Levando em consideração que estes momentos foram marcados pela resposta inflamatória intensa e ausência de regulação do processo celular, sugerimos o envolvimento dessas proteínas como proteínas-chaves no grupo com FP maior.

A APOH, também conhecida como β 2-glicoproteína I (β 2-GPI) tem sido implicada em uma variedade de vias fisiológicas, incluindo o metabolismo das lipoproteínas, a coagulação e a produção de auto-anticorpos antifosfolipídicos. Além disso, possui um papel importante na migração e proliferação das células endoteliais, na fibrinólise, no processo apoptótico das células mielóides e do músculo liso, na ativação do plasminogênio e na degranulação das plaquetas (130). O aumento da regulação da APOH também foi observado em soro de camundongos com Doença de Chagas, tanto na infecção aguda quanto na infecção crônica por *Trypanosoma cruzi* juntamente com as proteínas APOE, GC e PLG atuando na ativação, ligação e acumulação de macrófagos na Doença de Chagas (131). Em nosso estudo, essas proteínas também estavam aumentadas nos pacientes com FP maior. Não há na literatura trabalhos relacionando a APOH com

doenças pulmonares fibróticas, porém, há alguns indícios da relação do aumento da APOH com o aumento viral na hepatite C (132).

A A2M, é uma inibidora de protease, tendo como função a inibição da tripsina, da trombina e da colagenase. Também é sua função o transporte de citocinas, onde apresenta um potencial inibitório para citocinas pró-inflamatórias, interrompendo as cascatas inflamatórias, além de possuir um papel da diferenciação das células troncos e remodelação da matriz extracelular (133). Apesar do seu papel pró-fibrótico, não há na literatura associação da A2M com doenças fibrótica pulmonares, mas sim em doenças crônica hepáticas como fibrose hepática e hepatite (134,135). Além disso sabe-se que somente o aumento da A2M já é um biomarcador para a fibrose hepática (136). Esses resultados reforçam que a interferência do patógeno é importante, já que a PCM, diferentemente das outras FP, a interação fungo-hospedeiro é prolongada.

A GC é uma proteína plasmática que se liga à vitamina D e seus metabólitos plasmático para transporta aos tecidos alvo(137). Sabe-se que a vitamina D é um importante mediador da resposta imune inata, aumentando as propriedades antimicrobianas de macrófagos e monócitos e estimulando a ativação do complemento, enquanto que diminui a ativação da resposta imune celular, inibindo a apresentação de antígenos pelas células dendríticas, modulando essas células para um perfil tolerogênico, com aumento da produção de IL-10 favorecendo o desenvolvimento de células T regulatórias (138). Interessantemente, a vitamina D vem demonstrando papel importante na fibrose hepática *in vitro*. Foi observado que ligação da vitamina D em miofibroblastos derivados das células estreladas

hepáticas causou inibição dos miofibroblastos através de um mecanismo complexo envolvendo modificações epigenéticas induzidas pela via SMAD (139,140). Em humanos, o aumento da GC em escarro, foi considerado um biomarcador para o diagnóstico de DPOC (129), por outro lado, a GC livre de actina, vem sendo considerada um biomarcador para insuficiência hepática aguda (141,142) e ainda em outro estudo em busca de biomarcadores para fibrose hepática, encontraram que o aumento da A2M e a diminuição da GC e da APOA1 são indicativos de fibrose hepática em pacientes com hepatite C (143).

A SERPINA1 é uma serina inibidora protease, tendo como função inibir a elastase, a plasmina, a trombina, a tripsina e a quimotripsina, sendo porém uma ativadora do plasminogênio, que é uma proteína pró-fibrótica (144). A SERPINA1 foi encontrada super-regulada em plasma de pacientes com FPI (125) e foi indicada como biomarcadora para diagnóstico para DPOC em escarro (128).

Dentre essas quatro proteínas chaves na fibrogênese do grupo com FP maior três delas, a A2M, APOH e a GC possuem relação com lesão hepática. Sabe-se que a PCM pode causar lesão hepática em alguns pacientes. Em uma revisão de 314 pacientes com PCM autopsiados, Levorato et al. (19) observaram que 44,6% deles exibiam lesão hepática e/ou biliar. Além disso, esse estudo mostrou que após o início do tratamento há hepatotoxicidade causada pelo CMX e ITC em alguns pacientes, mas que não é intenso. Nossos achados permitem sugerir novos estudos relacionando danos hepáticos e pacientes com maior intensidade de FP. As proteínas séricas alteradas devido à lesão hepática, tanto pró-inflamatórias quanto pró-fibróticas, por possuir ações sistêmicas, poderiam atuar na lesão pulmonar

paracoccidiosa, aumentando a inflamação e a FP. Apesar da alteração da regulação de algumas proteínas indicarem um dano hepático nos pacientes com FP maior, esse processo precisa ser melhor investigado em estudos futuros.

Dentre as proteínas inflamatórias e pró-fibróticas observadas após o início do tratamento somente no grupo com maior FP, estão a C3, C4B, CFB, CFH, F2, HPR e PLG. Sabe-se do papel pró-inflamatório das proteínas da via do complemento, entretanto, algumas dessas proteínas já foram relacionadas com doenças fibróticas anteriormente, a C3, a PLG e a F2. A C3 é um componente do complemento e desempenha um papel central na ativação do sistema complemento. A sua ativação é necessária tanto para as vias de ativação do complemento clássico quanto para o complemento alternativo. O peptídeo C3a, também conhecido como anafilatoxina C3a, modula a inflamação e possui atividade antimicrobiana (145) e já foi encontrada como super-regulada em casos familiares de FPI em comparação com casos esporádicos (89).

O F2 é clivado proteoliticamente para formar trombina no primeiro passo da cascata de coagulação e também desempenha um papel na manutenção da integridade vascular durante o desenvolvimento e a vida pós-natal. Os peptídeos derivados do C terminal desta proteína têm atividade antimicrobiana contra *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* (146). A F2 foi encontrada super-regulada em plasma de pacientes com FPI (125), mas seu papel na fibrogênese ainda não está claro.

Sabe-se que o PLG é ativado por proteólise e convertido em plasmina e angiostatina. A plasmina dissolve a fibrina nos coágulos sanguíneos e é uma

protease importante em muitos outros processos celulares enquanto a angiostatina inibe a angiogênese (147). O aumento da PLG tem relação com a atividade pró-fibrótica *in vitro*, pois a inibição dessa proteína resultou em atividades anti-fibróticas e apoptóticas em fibroblastos derivados de pulmões fibróticos (148,149). No entanto, o PLG foi encontrado sub regulado no plasma de pacientes com FPI (125).

O perfil das proteínas inflamatórias e pró-fibróticas aumentadas no grupo com FP maior no momento anterior ao tratamento foi diferente daquelas aumentadas no momento após o início do tratamento. Na comparação entre o grupo com FP menor e maior, no momento anterior ao tratamento, as proteínas que estavam mais sub-reguladas no grupo com FP maior e que foram indicadas como possíveis biomarcadoras nesse estudo foram a família das hemoglobulinas (HBB, HBD, HBG2, HBE1, HBG1, HBA1) e a ENO3 e as que estavam mais super-reguladas foram a A2M, a APOH, a GC; as IGHG1, 2 e 3; as IGLC1, 2 e 3; a HP; a SERPINA1; a LRG1 e a PZP.

Não se conhece o papel das hemoglobulinas na fisiopatologia da fibrose, porém, a HBB foi encontrada como super-regulada no plasma de pacientes com FPI (125) e ainda na fibrose cística, em um estudo para o prognóstico de exacerbações da fibrose cística, a sub-regulação da HBA foi encontrada em pacientes sem exacerbações (150). Apesar da HBB e a HBA terem sido encontradas em alguns estudos relacionados a fibrose, nesse estudo sugerimos que a sub-regulação da família das hemoglobulinas nos pacientes com FP maior seja consequência da ação fúngica. Bailão et al. (151) demonstraram que

Paracoccidioides spp. pode usar a hemoglobina como fonte de ferro. Através de diversos experimentos, esse estudo demonstrou que quando há falta de ferro, o fungo é capaz de ativar um receptor que se liga a hemoglobina e, através da endocitose dessa célula, ele capta o ferro e outros compostos necessários para sua sobrevivência.

A diminuição das hemoglobinas nos pacientes com maior FP, devido a captação dessas células pelo fungo, seria uma boa justificativa mecanicista da maior inflamação e processos pró-fibróticos observado nesses pacientes. Já que a falta da hemoglobina, que tem como função o transporte de oxigênio e íons, pode levar a quadros de hipóxia nos tecidos, fazendo com que haja ativação de fatores de transcrição induzidos por hipóxia (HIF) (43). Apesar das proteínas diferencialmente expressas nos pacientes com maior FP indicarem a ocorrência desses processos, a relação do fungo com a diminuição das hemoglobinas precisa ser melhor investigado em futuros estudos.

Ainda em relação ao transporte de oxigênio e íons, observamos no grupo com FP menor, na comparação entre o momento anterior ao tratamento e cura clínica, ao invés da função da ligação de íons e metal, observamos a função de transporte de lipídeos e atividade antioxidante. Sabe-se que o transporte de íons está relacionado com o estresse oxidativo e o transporte de metal está relacionado com as necessidades fisiológicas do fungo (151). A diminuição dessas atividades no início do tratamento pode indicar a morte fúngica.

A ENO3 foi outra proteína encontrada sub-regulada no grupo com FP maior. Sabe-se que esta proteína é uma isoenzima encontrada nas células do

músculo esquelético no adulto, onde pode desempenhar um papel no desenvolvimento muscular e na regeneração (152). Até o momento, não se sabe se essa proteína possui um envolvimento com o processo da fibrogênese.

Entre as proteínas biomarcadoras superreguladas no grupo com FP maior, o papel da A2M, da APOH, da GC e da SERPINA1 já foram discutidos. A família das imunoglobulinas encontradas (IGHG1, 2 e 3; e IGLC1, 2 e 3) podem estar relacionadas com a resposta inflamatória contra o fungo, o que parece ser mais intensa no grupo com FP maior. A proteína HP, que está envolvida com a reciclagem de ferro e hemácias e processos inflamatórios (153), enquanto a proteína PZP é altamente expressa no soro durante a gravidez tardia e é similar, em estrutura e função à proteína A2M (alfa-2-macroglobulina), inibindo a ação de proteinases, apresentando papel pró-fibrótico (154).

A LRG1, foi a proteína que estava mais superregulada no grupo com FP maior, antes do tratamento e possui um papel importante na fibrogênese. Sabe-se que LRG1 é expressa durante a diferenciação de granulócitos, a angiogênese, na regulação positiva da proliferação de células endoteliais, e na regulação positiva da via de sinalização do receptor do TGF- β (155). Sua superregulação tem sido observada em vários tipos de carcinomas, incluindo pancreática, bexiga, ovário e câncer do trato biliar (156–159). Nas células endoteliais, a LGR1 pode se ligar no receptor do TGF- β e através da via da sinalização Smad 1/5/8 ela induz a angiogênese (160). Foi demonstrado ainda, que a LRG1 modula a transição das células epiteliais para mesenquimatosa (EMT) e a angiogênese no câncer colorretal através da ativação do HIF-1 α (161). O papel das EMT e dos efeitos da via de

sinalização do TGF- β /SMAD na formação de cicatrizes patológicas ou fibrogênese já está bem estabelecido (66).

Entre os mecanismos de controle da resposta inflamatória e dos processos pró-fibróticos observados no grupo com FP menor, observamos o papel da via dos PPAR (receptores proliferadores peroxissomais), no momento anterior ao tratamento, e a superregulação da proteína APOA1 no início do tratamento, durante o momento de cura clínica. Os PPARs possuem um papel importante no metabolismo glicídico e lipídico, na diferenciação dos adipócitos e no controle vascular. Além disso, essa via é conhecida por conter a evolução de processos inflamatórios (162). Os PPARs apresentam também um importante papel na sensibilização periférica à insulina por meio da redução na expressão de resistina e TNF α , aumento da expressão da adiponectina e da atividade da lipase lipoprotéica (LLP) (163). Dentre as principais funções das proteínas encontradas no grupo com FP menor, a função de transporte e ligação de lipídeos apareceram em todos os momentos do seguimento clínico, se tornando mais uma evidência da influência da via PPAR nos pacientes com FP menor.

A proteína com papel regulador e anti-fibrótico encontrada no grupo com FP menor durante o início do tratamento, foi a APOA1. Observamos no grupo com FP menor que o aumento da regulação da APOA1 foi acompanhado do controle da resposta inflamatória e pró-fibrótica, enquanto que o grupo com FP maior apresentou o quadro contrário, manteve a APOA1 sub-regulada acompanhado do aumento da regulação das proteínas pró-inflamatórias e fibróticas. A APOA1 vem demonstrando um papel importante no controle da fibrogênese. Em experimentos

in vitro foi demonstrado que APOA1 inibe a transição da célula epitelial para mesenquimatosa (EMT) induzida por TGF- β 1 de células epiteliais alveolares através da inibição da fosforilação de SMAD 2 e 3, bem como a dos mediadores de proteína quinase ativados por mitógenos ERK e p38. Além disso, em um modelo experimental de FP induzida por sílica, a super-regulação da APOA1 reduziu os efeitos mediados pela sílica (164). Em modelo experimental de fibrose induzida por bleomicina, a APOA1, apresentou sub-regulada e o tratamento desses camundongos com esta proteína, via intranasal, diminuiu a inflamação e deposição de colágeno apresentando uma atividade anti-fibrótica (165). Em humanos a APOA2 foi encontrada sub regulada no plasma de pacientes com FPI (125).

A APOA1 é a maior componente do HDL do plasma e promove o efluxo de LDL dos tecidos para excreção no fígado, evitando desta forma, a formação de aterosclerose, protegendo a função endotelial através da remoção dos lipídeos oxidados da LDL, inibição da fixação de moléculas de adesão e monócitos ao endotélio e estimulando a liberação de óxido nítrico (166). Quando há sub-regulação do HDL, a LDL acumula-se na circulação e migra para a camada íntima da artéria onde é oxidada. Essa oxidação altera a LDL de uma forma que as células não conseguem internalizar. Os macrófagos do local são ativados e fagocitam essa substância, o endotélio passa a expressar moléculas de adesão para monócitos, que se ligam a essas moléculas e passam pelo endotélio, chegando na íntima arterial, as células do musculo liso produzem colágeno e elastina na matriz extracelular e acontece a produção de placa de ateroma. As lesões no endotélio levam a agregação plaquetária que pode promover a obstrução completa do vaso (167).

O motivo do aumento da APOA1 e da ativação da via PPAR somente nos pacientes com FP menor ainda continua em aberto, talvez o fator genético possa ser a explicação. Entretanto o papel dessa proteína na proteção do grupo com FP menor ficou bem claro, enquanto que a sub-regulação dessa proteína no grupo com FP maior pode ter influenciado no aumento da FP através da formação da arteroesclerose nos vasos pulmonares somado ao dano da infecção paracoccidiosa. Esta sugestão também precisa de mais evidências para ser comprovada. Além disso, sugerimos que o potencial anti-fibrótico da APOA1 seja mais estudado nos pacientes com PCM pulmonar, com o objetivo de evitar o desenvolvimento da FP maior.

6. CONCLUSÕES

Nas condições ensaiadas, o estudo permitiu identificar as proteínas APOH, A2M, GC e SERPINA1 como alvos envolvidos nos mecanismos moleculares da fibrogênese pulmonar na paracoccidioidomicose. Foi observado, ainda, que o momento de cura clínica apresentou maior atividade pró-fibrótica durante o seguimento dos pacientes.

Além disso, foram identificadas 20 proteínas candidatas a biomarcadores preditores da fibrose pulmonar, conforme segue: família das hemoglobulinas (HBB, HBD, HBG2, HBE1, HBG1, HBA1), ENO3, A2M, APOH, GC, IGHG-1, -2 e 3, IGLC1, -2 e -3, HP, SERPINA1, LRG1 e PZP.

7. REFERÊNCIAS

1. Teixeira M de M, Theodoro RC, Oliveira FFM de, Machado GC, Hahn RC, Bagagli E, et al. *Paracoccidioides lutzii* sp. nov.: biological and clinical implications. *Med Mycol.* janeiro de 2014;52(1):19–28.
2. Matute DR, McEwen JG, Puccia R, Montes BA, San-Blas G, Bagagli E, et al. Cryptic speciation and recombination in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis* as revealed by gene genealogies. *Mol Biol Evol.* janeiro de 2006;23(1):65–73.
3. Muñoz JF, Farrer RA, Desjardins CA, Gallo JE, Sykes S, Sakthikumar S, et al. Genome Diversity, Recombination, and Virulence across the Major Lineages of *Paracoccidioides*. *mSphere.* outubro de 2016;1(5).
4. de Macedo PM, Almeida-Paes R, de Medeiros Muniz M, Oliveira MME, Zancopé-Oliveira RM, Costa RLB, et al. *Paracoccidioides brasiliensis* PS2: First Autochthonous *Paracoccidioidomycosis* Case Report in Rio de Janeiro, Brazil, and Literature Review. *Mycopathologia.* outubro de 2016;181(9–10):701–8.
5. Turissini DA, Gomez OM, Teixeira MM, McEwen JG, Matute DR. Species boundaries in the human pathogen *Paracoccidioides*. *Fungal Genet Biol.* 1º de setembro de 2017;106:9–25.
6. Martinez R. EPIDEMIOLOGY OF PARACOCCIDIOIDOMYCOSIS. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* setembro de 2015;57 Suppl 19:11–20.
7. Prado M, Silva MB da, Laurenti R, Travassos LR, Taborda CP. Mortality due to systemic mycoses as a primary cause of death or in association with AIDS in Brazil: a review from 1996 to 2006. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* maio de 2009;104(3):513–21.
8. Martinez R, Moya MJ. The relationship between *paracoccidioidomycosis* and alcoholism. *Rev Saúde Pública.* fevereiro de 1992;26(1):12–6.
9. dos Santos WA, da Silva BM, Passos ED, Zandonade E, Falqueto A. [Association between smoking and *paracoccidioidomycosis*: a case-control study in the State of Espírito Santo, Brazil]. *Cad Saude Publica.* fevereiro de 2003;19(1):245–53.
10. Bagagli E, Franco M, Bosco SDMG, Hebel-er-Barbosa F, Trinca LA, Montenegro MR. High frequency of *Paracoccidioides brasiliensis* infection in armadillos (*Dasypus novemcinctus*): an ecological study. *Med Mycol.* junho de 2003;41(3):217–23.
11. Franco M, Peracoli MT, Soares A, Montenegro R, Mendes RP, Meira DA. Host-parasite relationship in *paracoccidioidomycosis*. *Curr Top Med Mycol.* 1993;5:115–49.

12. Shikanai-Yasuda MA, Mendes RP, Colombo AL, Queiroz-Telles F de, Kono ASG, Paniago AM, et al. Brazilian guidelines for the clinical management of paracoccidioidomycosis. *Rev Soc Bras Med Trop.* 20 de julho de 2017;0.
13. Shikanai-Yasuda MA, Telles Filho F de Q, Mendes RP, Colombo AL, Moretti ML. [Guidelines in paracoccidioidomycosis]. *Rev Soc Bras Med Trop.* junho de 2006;39(3):297–310.
14. Mendes RP, Cavalcante R de S, Marques SA, Marques MEA, Venturini J, Sylvestre TF, et al. Paracoccidioidomycosis: Current Perspectives from Brazil. *Open Microbiol J* [Internet]. 31 de outubro de 2017 [citado 8 de novembro de 2017];11(1). Disponível em: <https://benthamopen.com/ABSTRACT/TOMICROJ-11-224>
15. NEGRO GMBD, PEREIRA CN, ANDRADE HF, PALACIOS SA, VIDAL MMS, CHARBEL CE, et al. Evaluation of tests for antibody response in the follow-up of patients with acute and chronic forms of paracoccidioidomycosis. *J Med Microbiol.* 2000;49(1):37–46.
16. Do Valle AC, Costa RL, Fialho Monteiro PC, Von Helder J, Muniz MM, Zancopé-Oliveira RM. Interpretation and clinical correlation of serological tests in paracoccidioidomycosis. *Med Mycol.* agosto de 2001;39(4):373–7.
17. Moreto TC, Marques MEA, de Oliveira MLSC, Moris DV, de Carvalho LR, Mendes RP. Accuracy of routine diagnostic tests used in paracoccidioidomycosis patients at a university hospital. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* agosto de 2011;105(8):473–8.
18. Cavalcante R de S, Sylvestre TF, Levorato AD, de Carvalho LR, Mendes RP. Comparison between itraconazole and cotrimoxazole in the treatment of paracoccidioidomycosis. *PLoS Negl Trop Dis.* abril de 2014;8(4):e2793.
19. Levorato AD, Moris DV, Cavalcante R de S, Sylvestre TF, Azevedo D, Zacarias P, et al. Evaluation of the hepatobiliary system in patients with paracoccidioidomycosis treated with cotrimoxazole or itraconazole. *Med Mycol* [Internet]. [citado 8 de novembro de 2017]; Disponível em: <https://academic.oup.com/mmy/article/doi/10.1093/mmy/myx080/4372447>
20. Tobón AM, Agudelo CA, Osorio ML, Alvarez DL, Arango M, Cano LE, et al. Residual pulmonary abnormalities in adult patients with chronic paracoccidioidomycosis: prolonged follow-up after itraconazole therapy. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am.* 1º de outubro de 2003;37(7):898–904.
21. Valle ACF do, Aprigliano Filho F, Moreira JS, Wanke B. Clinical and endoscopic findings in the mucosae of the upper respiratory and digestive tracts in post-treatment follow-up of paracoccidioidomycosis patients. *Rev Inst Med Trop São Paulo.* outubro de 1995;37(5):407–13.

22. Weber S a. T, Brasolotto A, Rodrigues L, Marcondes-Machado J, Padovani CR, Carvalho LR, et al. Dysphonia and laryngeal sequelae in paracoccidioidomycosis patients: a morphological and phoniatic study. *Med Mycol.* maio de 2006;44(3):219–25.
23. Del Negro G, Melo EH, Rodbard D, Melo MR, Layton J, Wachslicht-Rodbard H. Limited adrenal reserve in paracoccidioidomycosis: cortisol and aldosterone responses to 1-24 ACTH. *Clin Endocrinol (Oxf).* dezembro de 1980;13(6):553–9.
24. Colombo AL, Façal S, Kater CE. Systematic evaluation of the adrenocortical function in patients with paracoccidioidomycosis. *Mycopathologia.* agosto de 1994;127(2):89–93.
25. Boccalandro: Icterícia e comprometimento hepático... - Google Acadêmico [Internet]. [citado 7 de novembro de 2017]. Disponível em: https://scholar.google.com/scholar_lookup?title=Icter%C3%ADcia+e+comprometimento+hep%C3%A1tico+na+blastomicose+sul-americana.+A+prop%C3%B3sito+de+10+casos.+Revis%C3%A3o+da+literatura.&author=Boccalandro+I&author=Albuquerque+FJM&publication_year=1960&journal=Rev+Paul+Med&volume=56&pages=350-66
26. Laudanna AA, Bettarello A, Van Bellen B, Kieffer J. South American blastomycosis as a cause of malabsorption and protein-losing enteropathy. *Arch Gastroenterol.* 1975;12(3):195–8.
27. ALINE FERREIRA DOS SANTOS. QUALIDADE DE VIDA E FUNÇÃO PULMONAR DE PACIENTES COM SEQUELA PULMONAR DE PARACOCCIDIOIDOMICOSE. [Campo Grande:]: Universidade Federal de Mato Grosso do Sul; 2015.
28. Benard G, Hong MA, Del Negro GM, Batista L, Shikanai-Yasuda MA, Duarte AJ. Antigen-specific immunosuppression in paracoccidioidomycosis. *Am J Trop Med Hyg.* janeiro de 1996;54(1):7–12.
29. Franco M, Peracoli MT, Soares A, Montenegro R, Mendes RP, Meira DA. Host-parasite relationship in paracoccidioidomycosis. *Curr Top Med Mycol.* 1993;5:115–49.
30. Carmo JPM, Dias-Melicio LA, Calvi SA, Peraçoli MTS, Soares AMVC. TNF-alpha activates human monocytes for *Paracoccidioides brasiliensis* killing by an H₂O₂-dependent mechanism. *Med Mycol.* junho de 2006;44(4):363–8.
31. Calvi SA, Peraçoli MTS, Mendes RP, Marcondes-Machado J, Fecchio D, Marques SA, et al. Effect of cytokines on the in vitro fungicidal activity of monocytes from paracoccidioidomycosis patients. *Microbes Infect Inst Pasteur.* fevereiro de 2003;5(2):107–13.

32. Buccheri R, Khoury Z, Barata LCB, Benard G. Incubation Period and Early Natural History Events of the Acute Form of Paracoccidioidomycosis: Lessons from Patients with a Single Paracoccidioides spp. Exposure. *Mycopathologia*. 19 de dezembro de 2015;181(5–6):435–9.
33. Mendes RP. The gamut of clinical manifestations. In: Franco M, Lacaz CS, Restrepo-Moreno A, Del Negro G Paracoccidioidomycosis. Boca Raton: CRC Press; 1994. p. 233–258.
34. Benard G. An overview of the immunopathology of human paracoccidioidomycosis. *Mycopathologia*. maio de 2008;165(4–5):209–21.
35. de Castro LF, Ferreira MC, da Silva RM, Blotta MH de SL, Longhi LNA, Mamoni RL. Characterization of the immune response in human paracoccidioidomycosis. *J Infect*. novembro de 2013;67(5):470–85.
36. Juvenale M, Del Negro GM, Duarte AJ, Benard G. Antibody isotypes to a Paracoccidioides brasiliensis somatic antigen in sub-acute and chronic form paracoccidioidomycosis. *J Med Microbiol*. fevereiro de 2001;50(2):127–34.
37. Romani L. Immunity to fungal infections. *Nat Rev Immunol*. abril de 2011;11(4):275–88.
38. Rowe JH, Ertelt JM, Way SS. Foxp3+ regulatory T cells, immune stimulation and host defence against infection. *Immunology*. 1º de maio de 2012;136(1):1–10.
39. Mendes RP. Treatment and control of cure. In: Franco M, Lacaz CS, Restrepo-Moreno A, Del Negro G Paracoccidioidomycosis. Boca Raton, FL: CRC Press; 1994. p. 373–92.
40. Shikanai-Yasuda MA, Telles Filho F de Q, Mendes RP, Colombo AL, Moretti ML. [Guidelines in paracoccidioidomycosis]. *Rev Soc Bras Med Trop*. junho de 2006;39(3):297–310.
41. Venturini J, Cavalcante R, de Assis Golim M, Marchetti C, de Azevedo P, Amorim B, et al. Phenotypic and functional evaluations of peripheral blood monocytes from chronic-form paracoccidioidomycosis patients before and after treatment. *BMC Infect Dis*. 16 de outubro de 2014;14(1):552.
42. Venturini J, Cavalcante RS, Sylvestre TF, dos Santos RF, Moris DV, Carvalho LR, et al. Increased peripheral blood TCD4+ counts and serum SP-D levels in patients with chronic paracoccidioidomycosis, during and after antifungal therapy. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. novembro de 2017;112(11):748–55.
43. Wang GL, Jiang BH, Rue EA, Semenza GL. Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 6 de junho de 1995;92(12):5510–4.

44. Jantsch J, Chakravorty D, Turza N, Prechtel AT, Buchholz B, Gerlach RG, et al. Hypoxia and hypoxia-inducible factor-1 alpha modulate lipopolysaccharide-induced dendritic cell activation and function. *J Immunol Baltim Md* 1950. 1º de abril de 2008;180(7):4697–705.
45. Weidemann A, Johnson RS. Biology of HIF-1alpha. *Cell Death Differ*. abril de 2008;15(4):621–7.
46. Costa AN, Benard G, Albuquerque ALP, Fujita CL, Magri ASK, Salge JM, et al. The lung in paracoccidioidomycosis: new insights into old problems. *Clin Sao Paulo Braz*. abril de 2013;68(4):441–8.
47. Tuder RM, el Ibrahim R, Godoy CE, De Brito T. Pathology of the human pulmonary paracoccidioidomycosis. *Mycopathologia*. dezembro de 1985;92(3):179–88.
48. Cock AM, Cano LE, Vélez D, Aristizábal BH, Trujillo J, Restrepo A. Fibrotic sequelae in pulmonary paracoccidioidomycosis: histopathological aspects in BALB/c mice infected with viable and non-viable paracoccidioides brasiliensis propagules. *Rev Inst Med Trop São Paulo*. abril de 2000;42(2):59–66.
49. Araujo S de A. Contribuição ao estudo anátomo-clínico da Paracoccidioiodomycose em Minas Gerais. meio século de experiência - avaliação das necrópsias realizadas no período compreendido entre 1944 até 1999, no departamento de anatomia patológica e medicina legal, da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais. [Internet]. 2011 [citado 28 de outubro de 2015]. Disponível em: <http://www.bibliotecadigital.ufmg.br/dspace/handle/1843/BUOS-8KVLVK>
50. Venturini J, Cavalcante RS, Golim M de A, Marchetti CM, Azevedo PZ de, Amorim BC, et al. Phenotypic and functional evaluations of peripheral blood monocytes from chronic-form paracoccidioidomycosis patients before and after treatment. *BMC Infect Dis*. 16 de outubro de 2014;14:552.
51. Afonso JE, Nery LE, Romaldini H, Bogossian M, Ribeiro-Ratto O. [Pulmonary function in paracoccidioidomycosis (South American blastomycosis)]. *Rev Inst Med Trop São Paulo*. dezembro de 1979;21(6):269–80.
52. Campos EP, Padovani CR, Cataneo AM. [Paracoccidioidomycosis: radiologic and pulmonary study in 58 cases]. *Rev Inst Med Trop São Paulo*. agosto de 1991;33(4):267–76.
53. Priyadharshini VS, Teran LM. Personalized Medicine in Respiratory Disease: Role of Proteomics. *Adv Protein Chem Struct Biol*. 2016;102:115–46.
54. Al-Muhsen S, Johnson JR, Hamid Q. Remodeling in asthma. *J Allergy Clin Immunol*. setembro de 2011;128(3):451-462; quiz 463-464.

55. Knight DA, Holgate ST. The airway epithelium: structural and functional properties in health and disease. *Respirol Carlton Vic.* dezembro de 2003;8(4):432–46.
56. Holgate ST, Holloway J, Wilson S, Bucchieri F, Puddicombe S, Davies DE. Epithelial-mesenchymal communication in the pathogenesis of chronic asthma. *Proc Am Thorac Soc.* 2004;1(2):93–8.
57. Bartram U, Speer CP. The role of transforming growth factor beta in lung development and disease. *Chest.* fevereiro de 2004;125(2):754–65.
58. Chakir J, Shannon J, Molet S, Fukakusa M, Elias J, Laviolette M, et al. Airway remodeling-associated mediators in moderate to severe asthma: effect of steroids on TGF-beta, IL-11, IL-17, and type I and type III collagen expression. *J Allergy Clin Immunol.* junho de 2003;111(6):1293–8.
59. Harris WT, Kelly DR, Zhou Y, Wang D, MacEwen M, Macewen M, et al. Myofibroblast differentiation and enhanced TGF-B signaling in cystic fibrosis lung disease. *PLoS One.* 2013;8(8):e70196.
60. Xu J, Lamouille S, Derynck R. TGF-beta-induced epithelial to mesenchymal transition. *Cell Res.* fevereiro de 2009;19(2):156–72.
61. Willis BC, Borok Z. TGF-beta-induced EMT: mechanisms and implications for fibrotic lung disease. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* setembro de 2007;293(3):L525-534.
62. Mechanisms of airway epithelial damage: epithelial-mesenchymal interactions in the pathogenesis of asthma | European Respiratory Society [Internet]. [citado 25 de outubro de 2017]. Disponível em: http://erj.ersjournals.com/content/22/44_suppl/24s?utm_source=TrendMD&utm_medium=cpc&utm_campaign=_European_Respiratory_Journal_TrendMD_0
63. Nowrin K, Sohal SS, Peterson G, Patel R, Walters EH. Epithelial-mesenchymal transition as a fundamental underlying pathogenic process in COPD airways: fibrosis, remodeling and cancer. *Expert Rev Respir Med.* 1º de outubro de 2014;8(5):547–59.
64. Lamouille S, Xu J, Derynck R. Molecular mechanisms of epithelial–mesenchymal transition. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2014;15(3):178–96.
65. McDonald OG, Wu H, Timp W, Doi A, Feinberg AP. Genome-scale epigenetic reprogramming during epithelial-to-mesenchymal transition. *Nat Struct Mol Biol.* 3 de julho de 2011;18(8):867–74.
66. Sun Q, Guo S, Wang C-C, Sun X, Wang D, Xu N, et al. Cross-talk between TGF-β/Smad pathway and Wnt/β-catenin pathway in pathological scar formation. *Int J Clin Exp Pathol.* 1º de junho de 2015;8(6):7631–9.

67. Akhmetshina A, Palumbo K, Dees C, Bergmann C, Venalis P, Zerr P, et al. Activation of canonical Wnt signalling is required for TGF- β -mediated fibrosis. *Nat Commun.* 13 de março de 2012;3:735.
68. Liu L, Carron B, Yee HT, Yie T-A, Hajjou M, Rom W. Wnt pathway in pulmonary fibrosis in the bleomycin mouse model. *J Environ Pathol Toxicol Oncol Off Organ Int Soc Environ Toxicol Cancer.* 2009;28(2):99–108.
69. Kim TH, Kim S-H, Seo J-Y, Chung H, Kwak HJ, Lee S-K, et al. Blockade of the Wnt/ β -catenin pathway attenuates bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Tohoku J Exp Med.* 2011;223(1):45–54.
70. Kulkarni YM, Dutta S, Iyer AKV, Venkatadri R, Kaushik V, Ramesh V, et al. A proteomics approach to identifying key protein targets involved in VEGF inhibitor mediated attenuation of bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Proteomics.* janeiro de 2016;16(1):33–46.
71. Kim S, Lim JH, Woo C-H. ERK5 inhibition ameliorates pulmonary fibrosis via regulating Smad3 acetylation. *Am J Pathol.* dezembro de 2013;183(6):1758–68.
72. Debacq-Chainiaux F, Boilan E, Dedessus Le Moutier J, Weemaels G, Toussaint O. p38(MAPK) in the senescence of human and murine fibroblasts. *Adv Exp Med Biol.* 2010;694:126–37.
73. Saccani S, Pantano S, Natoli G. p38-Dependent marking of inflammatory genes for increased NF-kappa B recruitment. *Nat Immunol.* janeiro de 2002;3(1):69–75.
74. Beutler B. TNF, immunity and inflammatory disease: lessons of the past decade. *J Investig Med Off Publ Am Fed Clin Res.* junho de 1995;43(3):227–35.
75. Karin M. The beginning of the end: IkappaB kinase (IKK) and NF-kappaB activation. *J Biol Chem.* 24 de setembro de 1999;274(39):27339–42.
76. Lukacs NW, Strieter RM, Chensue SW, Widmer M, Kunkel SL. TNF-alpha mediates recruitment of neutrophils and eosinophils during airway inflammation. *J Immunol Baltim Md 1950.* 15 de maio de 1995;154(10):5411–7.
77. Wu Y, Deng J, Rychahou PG, Qiu S, Evers BM, Zhou BP. Stabilization of snail by NF-kappaB is required for inflammation-induced cell migration and invasion. *Cancer Cell.* 5 de maio de 2009;15(5):416–28.
78. Kalita M, Tian B, Gao B, Choudhary S, Wood TG, Carmical JR, et al. Systems approaches to modeling chronic mucosal inflammation. *BioMed Res Int.* 2013;2013:505864.

79. Ashley SL, Xia M, Murray S, O'Dwyer DN, Grant E, White ES, et al. Six-SOMAmer Index Relating to Immune, Protease and Angiogenic Functions Predicts Progression in IPF. *PLoS One*. 2016;11(8):e0159878.
80. Herazo-Maya JD, Noth I, Duncan SR, Kim S, Ma S-F, Tseng GC, et al. Peripheral Blood Mononuclear Cell Gene Expression Profiles Predict Poor Outcome in Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Sci Transl Med*. 2 de outubro de 2013;5(205):205ra136.
81. Gilani SR, Vuga LJ, Lindell KO, Gibson KF, Xue J, Kaminski N, et al. CD28 down-regulation on circulating CD4 T-cells is associated with poor prognoses of patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *PLoS One*. 29 de janeiro de 2010;5(1):e8959.
82. Feghali-Bostwick CA, Tsai CG, Valentine VG, Kantrow S, Stoner MW, Pilewski JM, et al. Cellular and humoral autoreactivity in idiopathic pulmonary fibrosis. *J Immunol Baltim Md 1950*. 15 de agosto de 2007;179(4):2592–9.
83. Moore BB, Fry C, Zhou Y, Murray S, Han MK, Martinez FJ, et al. Inflammatory leukocyte phenotypes correlate with disease progression in idiopathic pulmonary fibrosis. *Front Med*. 22 de dezembro de 2014;1(56).
84. Reilkoff RA, Peng H, Murray LA, Peng X, Russell T, Montgomery R, et al. Semaphorin 7a+ regulatory T cells are associated with progressive idiopathic pulmonary fibrosis and are implicated in transforming growth factor- β 1-induced pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 15 de janeiro de 2013;187(2):180–8.
85. Shimizu Y, Dobashi K, Endou K, Ono A, Yanagitani N, Utsugi M, et al. Decreased interstitial FOXP3(+) lymphocytes in usual interstitial pneumonia with discrepancy of CXCL12/CXCR4 axis. *Int J Immunopathol Pharmacol*. junho de 2010;23(2):449–61.
86. Kotsianidis I, Nakou E, Bouchliou I, Tzouvelekis A, Spanoudakis E, Steiropoulos P, et al. Global impairment of CD4+CD25+FOXP3+ regulatory T cells in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 15 de junho de 2009;179(12):1121–30.
87. Tesciuba AG, Subudhi S, Rother RP, Faas SJ, Frantz AM, Elliot D, et al. Inducible costimulator regulates Th2-mediated inflammation, but not Th2 differentiation, in a model of allergic airway disease. *J Immunol Baltim Md 1950*. 15 de agosto de 2001;167(4):1996–2003.
88. Tanaka C, Fujimoto M, Hamaguchi Y, Sato S, Takehara K, Hasegawa M. Inducible costimulator ligand regulates bleomycin-induced lung and skin fibrosis in a mouse model independently of the inducible costimulator/inducible costimulator ligand pathway. *Arthritis Rheum*. junho de 2010;62(6):1723–32.

89. Carleo A, Bargagli E, Landi C, Bennett D, Bianchi L, Gagliardi A, et al. Comparative proteomic analysis of bronchoalveolar lavage of familial and sporadic cases of idiopathic pulmonary fibrosis. *J Breath Res.* 15 de abril de 2016;10(2):026007.
90. Nakamura M, Ogura T, Miyazawa N, Tagawa A, Kozawa S, Watanuki Y, et al. [Outcome of patients with acute exacerbation of idiopathic interstitial fibrosis (IPF) treated with sivelestat and the prognostic value of serum KL-6 and surfactant protein D]. *Nihon Kokyuki Gakkai Zasshi.* junho de 2007;45(6):455–9.
91. Greene KE, King TE, Kuroki Y, Bucher-Bartelson B, Hunninghake GW, Newman LS, et al. Serum surfactant proteins-A and -D as biomarkers in idiopathic pulmonary fibrosis. *Eur Respir J.* março de 2002;19(3):439–46.
92. Han S, Mallampalli RK. The Role of Surfactant in Lung Disease and Host Defense against Pulmonary Infections. *Ann Am Thorac Soc.* maio de 2015;12(5):765–74.
93. McCormack FX, King TE, Voelker DR, Robinson PC, Mason RJ. Idiopathic pulmonary fibrosis. Abnormalities in the bronchoalveolar lavage content of surfactant protein A. *Am Rev Respir Dis.* julho de 1991;144(1):160–6.
94. Honda Y, Tsunematsu K, Suzuki A, Akino T. Changes in phospholipids in bronchoalveolar lavage fluid of patients with interstitial lung diseases. *Lung.* 1988;166(5):293–301.
95. Honda Y, Kuroki Y, Matsuura E, Nagae H, Takahashi H, Akino T, et al. Pulmonary surfactant protein D in sera and bronchoalveolar lavage fluids. *Am J Respir Crit Care Med.* dezembro de 1995;152(6 Pt 1):1860–6.
96. Kuroki Y, Takahashi H, Chiba H, Akino T. Surfactant proteins A and D: disease markers. *Biochim Biophys Acta.* 19 de novembro de 1998;1408(2–3):334–45.
97. Robertson B, Curstedt T, Herting E, Sun B, Akino T, Schäfer KP. Alveolar-to-vascular leakage of surfactant protein A in ventilated immature newborn rabbits. *Biol Neonate.* 1995;68(3):185–90.
98. Selman M, Lin H-M, Montañó M, Jenkins AL, Estrada A, Lin Z, et al. Surfactant protein A and B genetic variants predispose to idiopathic pulmonary fibrosis. *Hum Genet.* novembro de 2003;113(6):542–50.
99. Lawson WE, Grant SW, Ambrosini V, Womble KE, Dawson EP, Lane KB, et al. Genetic mutations in surfactant protein C are a rare cause of sporadic cases of IPF. *Thorax.* novembro de 2004;59(11):977–80.
100. Patterson SD, Aebersold RH. Proteomics: the first decade and beyond. *Nat Genet.* março de 2003;33 Suppl:311–23.

101. Wilkins MR, Sanchez J-C, Williams KL, Hochstrasser DF. Current challenges and future applications for protein maps and post-translational vector maps in proteome projects. *ELECTROPHORESIS*. 1º de janeiro de 1996;17(5):830–8.
102. Salvato F, Carvalho MC da CG de. Methods and strategies in proteomics and their applications in plants. *Ciênc Rural*. março de 2010;40(3):727–34.
103. Nesatyy VJ, Suter MJ-F. Analysis of environmental stress response on the proteome level. *Mass Spectrom Rev*. dezembro de 2008;27(6):556–74.
104. Pennington S., Dunn M. *Proteomics: from protein sequence to function*. Oxford: BIOS Scientific Publishers; 2001.
105. Motoyama A, Yates JR. Multidimensional LC Separations in Shotgun Proteomics. *Anal Chem*. 1º de outubro de 2008;80(19):7187–93.
106. Aebersold R, Goodlett DR. *Mass Spectrometry in Proteomics*. *Chem Rev*. 1º de fevereiro de 2001;101(2):269–96.
107. Old WM, Meyer-Arendt K, Aveline-Wolf L, Pierce KG, Mendoza A, Sevinsky JR, et al. Comparison of label-free methods for quantifying human proteins by shotgun proteomics. *Mol Cell Proteomics MCP*. outubro de 2005;4(10):1487–502.
108. Yi EC, Goodlett DR. Quantitative Protein Profile Comparisons Using the Isotope-Coded Affinity Tag Method. In: *Current Protocols in Protein Science* [Internet]. John Wiley & Sons, Inc.; 2001 [citado 8 de novembro de 2017]. Disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/0471140864.ps2302s34/abstract>
109. Schmidt C, Urlaub H. iTRAQ-labeling of in-gel digested proteins for relative quantification. *Methods Mol Biol Clifton NJ*. 2009;564:207–26.
110. Ye X, Luke B, Andresson T, Blonder J. 18O stable isotope labeling in MS-based proteomics. *Brief Funct Genomic Proteomic*. março de 2009;8(2):136–44.
111. Wu X, Hasan MA, Chen JY. *Pathway and Network Analysis in Proteomics*. *J Theor Biol*. 7 de dezembro de 2014;0:44–52.
112. Mikami T, Aoki M, Kimura T. The application of mass spectrometry to proteomics and metabolomics in biomarker discovery and drug development. *Curr Mol Pharmacol*. junho de 2012;5(2):301–16.
113. Tambor V, Fucíková A, Lenco J, Kacerovský M, Reháček V, Stulík J, et al. Application of proteomics in biomarker discovery: a primer for the clinician. *Physiol Res*. 2010;59(4):471–97.

114. Teran LM, Montes-Vizuet R, Li X, Franz T. Respiratory proteomics: from descriptive studies to personalized medicine. *J Proteome Res.* 2 de janeiro de 2015;14(1):38–50.
115. Hara A, Sakamoto N, Ishimatsu Y, Kakugawa T, Nakashima S, Hara S, et al. S100A9 in BALF is a candidate biomarker of idiopathic pulmonary fibrosis. *Respir Med.* abril de 2012;106(4):571–80.
116. Craig VJ, Polverino F, Lacho-Contreras ME, Shi Y, Liu Y, Osorio JC, et al. Mononuclear phagocytes and airway epithelial cells: novel sources of matrix metalloproteinase-8 (MMP-8) in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *PLoS One.* 2014;9(5):e97485.
117. Davis CS, Mendez BM, Flint DV, Pelletiere K, Lowery E, Ramirez L, et al. Pepsin concentrations are elevated in the bronchoalveolar lavage fluid of patients with idiopathic pulmonary fibrosis after lung transplantation. *J Surg Res.* dezembro de 2013;185(2):e101-108.
118. Furuhashi K, Suda T, Nakamura Y, Inui N, Hashimoto D, Miwa S, et al. Increased expression of YKL-40, a chitinase-like protein, in serum and lung of patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Respir Med.* agosto de 2010;104(8):1204–10.
119. Korthagen NM, Nagtegaal MM, van Moorsel CHM, Kazemier KM, van den Bosch JMM, Grutters JC. MRP14 is elevated in the bronchoalveolar lavage fluid of fibrosing interstitial lung diseases. *Clin Exp Immunol.* agosto de 2010;161(2):342–7.
120. Huang H, Peng X, Nakajima J. Advances in the study of biomarkers of idiopathic pulmonary fibrosis in Japan. *Biosci Trends.* agosto de 2013;7(4):172–7.
121. Ando M, Miyazaki E, Ito T, Hiroshige S, Nureki S, Ueno T, et al. Significance of serum vascular endothelial growth factor level in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Lung.* junho de 2010;188(3):247–52.
122. Ohshimo S, Ishikawa N, Horimasu Y, Hattori N, Hirohashi N, Tanigawa K, et al. Baseline KL-6 predicts increased risk for acute exacerbation of idiopathic pulmonary fibrosis. *Respir Med.* julho de 2014;108(7):1031–9.
123. Prasse A, Probst C, Bargagli E, Zissel G, Toews GB, Flaherty KR, et al. Serum CC-chemokine ligand 18 concentration predicts outcome in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 15 de abril de 2009;179(8):717–23.
124. Samukawa T, Hamada T, Uto H, Yanagi M, Tsukuya G, Nosaki T, et al. The elevation of serum napsin A in idiopathic pulmonary fibrosis, compared with KL-6, surfactant protein-A and surfactant protein-D. *BMC Pulm Med.* 11 de setembro de 2012;12:55.

125. Niu R, Liu Y, Zhang Y, Zhang Y, Wang H, Wang Y, et al. iTRAQ-Based Proteomics Reveals Novel Biomarkers for Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *PLoS One*. 2017;12(1):e0170741.
126. Ohlmeier S, Nieminen P, Gao J, Kanerva T, Rönty M, Toljamo T, et al. Lung tissue proteomics identifies elevated transglutaminase 2 levels in stable chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 1º de junho de 2016;310(11):L1155-1165.
127. Ohlmeier S, Vuolanto M, Toljamo T, Vuopala K, Salmenkivi K, Myllärniemi M, et al. Proteomics of human lung tissue identifies surfactant protein A as a marker of chronic obstructive pulmonary disease. *J Proteome Res*. dezembro de 2008;7(12):5125-32.
128. Ohlmeier S, Mazur W, Linja-Aho A, Louhelainen N, Rönty M, Toljamo T, et al. Sputum proteomics identifies elevated PIGR levels in smokers and mild-to-moderate COPD. *J Proteome Res*. 3 de fevereiro de 2012;11(2):599-608.
129. Antonov AV, Dietmann S, Rodchenkov I, Mewes HW. PPI spider: a tool for the interpretation of proteomics data in the context of protein-protein interaction networks. *Proteomics*. maio de 2009;9(10):2740-9.
130. APOH apolipoprotein H [Homo sapiens (human)] - Gene - NCBI [Internet]. [citado 6 de fevereiro de 2018]. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/350#gene-expression>
131. Wen J-J, Garg NJ. Proteome Expression and Carbonylation Changes During *Trypanosoma cruzi* Infection and Chagas Disease in Rats. *Mol Cell Proteomics*. 4 de janeiro de 2012;11(4):M111.010918.
132. Stefas I, Tigrett S, Dubois G, Kaiser M, Lucarz E, Gobby D, et al. Interactions between Hepatitis C Virus and the Human Apolipoprotein H Acute Phase Protein: A Tool for a Sensitive Detection of the Virus. *PLoS ONE* [Internet]. 26 de outubro de 2015 [citado 6 de fevereiro de 2018];10(10). Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4621047/>
133. A2M alpha-2-macroglobulin [Homo sapiens (human)] - Gene - NCBI [Internet]. [citado 20 de janeiro de 2018]. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/2>
134. Li H, Li G, Zhao X, Wu Y, Ma W, Liu Y, et al. Complementary serum proteomic analysis of autoimmune hepatitis in mice and patients. *J Transl Med*. 13 de junho de 2013;11:146.
135. Patel K, Remlinger KS, Walker TG, Leitner P, Lucas JE, Gardner SD, et al. Multiplex Protein Analysis to determine Fibrosis Stage and Progression in Patients with

Chronic Hepatitis C. *Clin Gastroenterol Hepatol Off Clin Pract J Am Gastroenterol Assoc.* dezembro de 2014;12(12):2113–2120.e3.

136. Naveau S, Poynard T, Benattar C, Bedossa P, Chaput JC. Alpha-2-macroglobulin and hepatic fibrosis. Diagnostic interest. *Dig Dis Sci.* novembro de 1994;39(11):2426–32.
137. GC GC, vitamin D binding protein [Homo sapiens (human)] - Gene - NCBI [Internet]. [citado 20 de janeiro de 2018]. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/2638>
138. Mathieu C. Vitamin D and the immune system: Getting it right. *IBMS BoneKey.* abril de 2011;8(4):178–86.
139. Ding N, Yu RT, Subramaniam N, Sherman MH, Wilson C, Rao R, et al. A Vitamin D Receptor/SMAD Genomic Circuit Gates Hepatic Fibrotic Response. *Cell.* 25 de abril de 2013;153(3):601–13.
140. Firrincieli D, Braescu T, Housset C, Chignard N. Illuminating liver fibrosis with vitamin D. *Clin Res Hepatol Gastroenterol.* 1º de fevereiro de 2014;38(1):5–8.
141. Antoniades CG, Berry PA, Bruce M, Cross TJS, Portal AJ, Hussain MJ, et al. Actin-free Gc globulin: a rapidly assessed biomarker of organ dysfunction in acute liver failure and cirrhosis. *Liver Transplant Off Publ Am Assoc Study Liver Dis Int Liver Transplant Soc.* setembro de 2007;13(9):1254–61.
142. Schiødt FV, Bangert K, Shakil AO, McCashland T, Murray N, Hay JE, et al. Predictive value of actin-free Gc-globulin in acute liver failure. *Liver Transplant Off Publ Am Assoc Study Liver Dis Int Liver Transplant Soc.* setembro de 2007;13(9):1324–9.
143. Ho A-S, Cheng C-C, Lee S-C, Liu M-L, Lee J-Y, Wang W-M, et al. Novel biomarkers predict liver fibrosis in hepatitis C patients: alpha 2 macroglobulin, vitamin D binding protein and apolipoprotein AI. *J Biomed Sci.* 15 de julho de 2010;17(1):58.
144. SERPINA1 serpin family A member 1 [Homo sapiens (human)] - Gene - NCBI [Internet]. [citado 20 de janeiro de 2018]. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/5265>
145. C3 complement C3 [Homo sapiens (human)] - Gene - NCBI [Internet]. [citado 20 de janeiro de 2018]. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/718>
146. F2 coagulation factor II, thrombin [Homo sapiens (human)] - Gene - NCBI [Internet]. [citado 22 de janeiro de 2018]. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/2147>

147. PLG plasminogen [Homo sapiens (human)] - Gene - NCBI [Internet]. [citado 20 de janeiro de 2018]. Disponível em:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/5340#gene-expression>
148. Zhang Y-P, Wang W-L, Liu J, Li W-B, Bai L-L, Yuan Y-D, et al. Plasminogen activator inhibitor-1 promotes the proliferation and inhibits the apoptosis of pulmonary fibroblasts by Ca(2+) signaling. *Thromb Res.* janeiro de 2013;131(1):64–71.
149. Marudamuthu AS, Shetty SK, Bhandary YP, Karandashova S, Thompson M, Sathish V, et al. Plasminogen Activator Inhibitor-1 Suppresses Profibrotic Responses in Fibroblasts from Fibrotic Lungs. *J Biol Chem.* 4 de outubro de 2015;290(15):9428–41.
150. Quon BS, Dai DLY, Hollander Z, Ng RT, Tebbutt SJ, Man SFP, et al. Discovery of novel plasma protein biomarkers to predict imminent cystic fibrosis pulmonary exacerbations using multiple reaction monitoring mass spectrometry. *Thorax.* março de 2016;71(3):216–22.
151. Bailão EFLC, Parente JA, Pigosso LL, de Castro KP, Fonseca FL, Silva-Bailão MG, et al. Hemoglobin uptake by *Paracoccidioides* spp. is receptor-mediated. *PLoS Negl Trop Dis.* maio de 2014;8(5):e2856.
152. HP haptoglobin [Homo sapiens (human)] - Gene - NCBI [Internet]. [citado 7 de fevereiro de 2018]. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3240>
153. ENO3 enolase 3 [Homo sapiens (human)] - Gene - NCBI [Internet]. [citado 20 de janeiro de 2018]. Disponível em:
[https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene?term=\(eno3\[gene\]\)%20AND%20\(Homo%20sapiens\[orgn\]\)%20AND%20alive\[prop\]%20NOT%20newentry\[gene\]&sort=weight](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene?term=(eno3[gene])%20AND%20(Homo%20sapiens[orgn])%20AND%20alive[prop]%20NOT%20newentry[gene]&sort=weight)
154. PZP PZP, alpha-2-macroglobulin like [Homo sapiens (human)] - Gene - NCBI [Internet]. [citado 7 de fevereiro de 2018]. Disponível em:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/5858>
155. LRG1 leucine rich alpha-2-glycoprotein 1 [Homo sapiens (human)] - Gene - NCBI [Internet]. [citado 7 de fevereiro de 2018]. Disponível em:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/116844>
156. Furukawa K, Kawamoto K, Eguchi H, Tanemura M, Tanida T, Tomimaru Y, et al. Clinicopathological Significance of Leucine-Rich α 2-Glycoprotein-1 in Sera of Patients With Pancreatic Cancer. *Pancreas.* janeiro de 2015;44(1):93–8.
157. Lindén M, Lind SB, Mayrhofer C, Segersten U, Wester K, Lyutvinskiy Y, et al. Proteomic analysis of urinary biomarker candidates for nonmuscle invasive bladder cancer. *Proteomics.* janeiro de 2012;12(1):135–44.

158. Andersen JD, Boylan KL, Jemmerson R, Geller MA, Misemer B, Harrington KM, et al. Leucine-rich alpha-2-glycoprotein-1 is upregulated in sera and tumors of ovarian cancer patients. *J Ovarian Res.* 10 de setembro de 2010;3:21.
159. Sandanayake NS, Sinclair J, Andreola F, Chapman MH, Xue A, Webster GJ, et al. A combination of serum leucine-rich α -2-glycoprotein 1, CA19-9 and interleukin-6 differentiate biliary tract cancer from benign biliary strictures. *Br J Cancer.* 25 de outubro de 2011;105(9):1370–8.
160. Wang X, Abraham S, McKenzie JAG, Jeffs N, Swire M, Tripathi VB, et al. LRG1 promotes angiogenesis by modulating endothelial TGF- β signalling. *Nature.* 18 de julho de 2013;499(7458):306–11.
161. Zhang J, Zhu L, Fang J, Ge Z, Li X. LRG1 modulates epithelial-mesenchymal transition and angiogenesis in colorectal cancer via HIF-1 α activation. *J Exp Clin Cancer Res CR [Internet].* 9 de fevereiro de 2016 [citado 7 de fevereiro de 2018];35. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4746930/>
162. Brito LF, Toledo RCL, Carvalho IMM, Leite JPV, Ribeiro SMR, Peluzio MCG, et al. The inflammatory process in the metabolic syndrome: PPAR activators of natural products and markers associated with metabolic disorders. *Rev Bras Plantas Med.* 2013;15(3):449–66.
163. Hermsdorff HHM, Monteiro JBR. Gordura visceral, subcutânea ou intramuscular: onde está o problema? *Arq Bras Endocrinol Amp Metabol.* dezembro de 2004;48(6):803–11.
164. Baek AR, Lee JM, Seo HJ, Park JS, Lee JH, Park SW, et al. Apolipoprotein A1 Inhibits TGF- β 1-Induced Epithelial-to-Mesenchymal Transition of Alveolar Epithelial Cells. *Tuberc Respir Dis.* julho de 2016;79(3):143–52.
165. Kim TH, Lee YH, Kim KH, Lee SH, Cha JY, Shin EK, et al. Role of lung apolipoprotein A-I in idiopathic pulmonary fibrosis: antiinflammatory and antifibrotic effect on experimental lung injury and fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 1º de setembro de 2010;182(5):633–42.
166. APOA1 apolipoprotein A1 [Homo sapiens (human)] - Gene - NCBI [Internet]. [citado 20 de janeiro de 2018]. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/335>
167. An abundant dysfunctional apolipoprotein A1 in human atheroma [Internet]. [citado 6 de fevereiro de 2018]. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3923163/>

8. ANEXOS

8. 1. Anexo 1

Tabela 1. Proteínas diferencialmente expressas obtidas através da comparação “CTRL vs FP menor” ou CTRL vs FP maior” no momento de cura clínica.

Down-regulated		Up-regulated	
Minor PF	Major PF	Minor PF	Major PF
Afamin	Albumin_ isoform CRA_k	Apolipoprotein A-II	
Albumin_ isoform CRA_k	Alpha-1-antichymotrypsin	Serotransferrin	
Alpha-1 antichymotrypsin (Fragment)	Alpha-1-antitrypsin	Transthyretin	
Alpha-1B-glycoprotein (Fragment)	Alpha-1B-glycoprotein		
Alpha-2-antiplasmin (Fragment)	Alpha-2-HS-glycoprotein		
Alpha-2-HS-glycoprotein	Alpha-2-HS-glycoprotein		
Alpha-2-macroglobulin (Fragment)	Alpha-2-macroglobulin		
Apolipoprotein A-I	Antithrombin-III		
Apolipoprotein A-IV	Apolipoprotein A-I		
Apolipoprotein B-100	Apolipoprotein A-IV		
Apolipoprotein C-III	Apolipoprotein B-100		
Apolipoprotein E (Fragment)	Apolipoprotein C-III		
Beta-2-glycoprotein 1	Beta-2-glycoprotein 1		
C4b-binding protein alpha chain	C4b-binding protein alpha chain		
	Ceruloplasmin		
Ceruloplasmin	Clusterin		
Clusterin	Complement C3		
Complement C3	Complement C4-A		
Complement C4-A	Complement C4-B		
Complement C4-B	Complement factor B		
Complement factor B	Complement factor H		
Complement factor H	Complement factor H-related protein 1		
Complement factor H-related protein 1	Fibronectin		
Fibronectin	Haptoglobin		
Gelsolin	Haptoglobin-related protein		
Haptoglobin	HCG1745306_ isoform CRA_a		
Haptoglobin-related protein	Hemoglobin subunit alpha		
HCG1745306_ isoform CRA_a	Hemoglobin subunit beta		
Hemoglobin subunit alpha	Hemoglobin subunit delta		
Hemoglobin subunit beta	Hemoglobin subunit epsilon		

Hemoglobin subunit delta	Hemoglobin subunit gamma-1
Hemoglobin subunit epsilon	Hemoglobin subunit gamma-2
Hemoglobin subunit gamma-1	Hemopexin
Hemoglobin subunit gamma-2	Heparin cofactor 2
Hemopexin	Histidine-rich glycoprotein
Heparin cofactor 2	HPX protein
Immunoglobulin heavy constant alpha 1	Immunoglobulin heavy constant alpha 1
Immunoglobulin heavy constant alpha 2	Immunoglobulin heavy constant alpha 2
Immunoglobulin heavy constant gamma 1	Immunoglobulin heavy constant gamma 1
Immunoglobulin heavy constant gamma 2	Immunoglobulin heavy constant gamma 2
Immunoglobulin heavy constant gamma 3	Immunoglobulin heavy constant gamma 3
Immunoglobulin heavy constant gamma 4	Immunoglobulin heavy constant gamma 4
Immunoglobulin heavy constant mu	Immunoglobulin heavy constant mu
Immunoglobulin heavy variable 3/OR16-10	Immunoglobulin heavy variable 3/OR16-10
Immunoglobulin heavy variable 3/OR16-9	Immunoglobulin heavy variable 3/OR16-12
Immunoglobulin heavy variable 3-11	Immunoglobulin heavy variable 3/OR16-9
Immunoglobulin heavy variable 3-13	Immunoglobulin heavy variable 3-11
Immunoglobulin heavy variable 3-20	Immunoglobulin heavy variable 3-13
Immunoglobulin heavy variable 3-21	Immunoglobulin heavy variable 3-20
Immunoglobulin heavy variable 3-43	Immunoglobulin heavy variable 3-21
Immunoglobulin heavy variable 3-43D	Immunoglobulin heavy variable 3-23
Immunoglobulin heavy variable 3-48	Immunoglobulin heavy variable 3-30
Immunoglobulin heavy variable 3-7	Immunoglobulin heavy variable 3-30-3
Immunoglobulin heavy variable 3-9	Immunoglobulin heavy variable 3-30-5
Immunoglobulin kappa constant	Immunoglobulin heavy variable 3-33
Immunoglobulin lambda constant 1	Immunoglobulin heavy variable 3-43
Immunoglobulin lambda constant 2	Immunoglobulin heavy variable 3-43D
Immunoglobulin lambda constant 3	Immunoglobulin heavy variable 3-48
Immunoglobulin lambda constant 6	Immunoglobulin heavy variable 3-53
Immunoglobulin lambda constant 7	Immunoglobulin heavy variable 3-66
Immunoglobulin lambda-like polypeptide 5	Immunoglobulin heavy variable 3-7
Immunoglobulin lambda-like polypeptide 5	Immunoglobulin heavy variable 3-74
Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H1	Immunoglobulin heavy variable 3-9
Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H2	Immunoglobulin kappa constant
Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H4	Immunoglobulin lambda constant 1
ITIH4 protein	Immunoglobulin lambda constant 2
Kininogen-1	Immunoglobulin lambda constant 3
N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase	Immunoglobulin lambda constant 6

Plasma protease C1 inhibitor	Immunoglobulin lambda constant 7
Plasminogen	Immunoglobulin lambda-like polypeptide 5
Pregnancy zone protein	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H1
Protein AMBP	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H2
Prothrombin	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H4
Retinol binding protein 4_ plasma_ isoform CRA_b	ITIH4 protein
Retinol-binding protein =3	Kininogen-1
Serotransferrin	Leucine-rich alpha-2-glycoprotein
Serum albumin	N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase
Vitamin D-binding protein	Plasminogen
Vitronectin	Pregnancy zone protein
	Protein AMBP
	Prothrombin
	Putative hydroxypyruvate isomerase
	Serotransferrin
	Serum albumin
	Vitamin D-binding protein
	Vitronectin

8. 2. Anexo 2

Tabela 1. Proteínas diferencialmente expressas obtidas através da comparação “FP menor vs. FP maior” no momento de cura clínica.

Minor FP vs Major PF	
Down regulated	Up regulated
Albumin_ isoform CRA_k	Alpha-1-antichymotrypsin
isoform CRA_a	Alpha-1-antichymotrypsin
Hemoglobin subunit alpha	Alpha-1-antitrypsin
Hemopexin	Alpha-1B-glycoprotein
Serotransferrin	Alpha-2-HS-glycoprotein
Serum albumin	Alpha-2-HS-glycoprotein
	Alpha-2-macroglobulin
	Angiotensinogen
	Apolipoprotein A-I
	Apolipoprotein A-IV
	Apolipoprotein C-III
	Beta-2-glycoprotein 1
	Ceruloplasmin
	Clusterin
	Complement C3
	Complement C4-A
	Complement C4-B
	Complement factor B
	Complement factor H
	Complement factor H-related protein 1
	Haptoglobin
	Haptoglobin-related protein
	Heparin cofactor 2
	HPX protein
	Immunoglobulin heavy constant alpha 1
	Immunoglobulin heavy constant alpha 2
	Immunoglobulin heavy constant gamma 1
	Immunoglobulin heavy constant gamma 2
	Immunoglobulin heavy constant gamma 3
	Immunoglobulin heavy constant gamma 4
	Immunoglobulin heavy constant mu
	Immunoglobulin kappa constant
	Immunoglobulin lambda constant 1
	Immunoglobulin lambda constant 2

Immunoglobulin lambda constant 3
Immunoglobulin lambda constant 6
Immunoglobulin lambda constant 7
Immunoglobulin lambda-like polypeptide 5
Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H1
Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H2
Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H4
ITIH4 protein
Kininogen-1
N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase
Plasminogen
Pregnancy zone protein
Protein AMBP
Prothrombin
Putative hydroxypyruvate isomerase
Putative hydroxypyruvate isomerase
Serotransferrin
Transthyretin
Vitamin D-binding protein
Vitronectin

8. 3. Anexo 3

Tabela 1. Classificação das proteínas diferencialmente expressas obtidas da comparação entre “CTRL vs FP menor” no momento de cura clínica, de acordo com sua participação em processos biológicos. As classificações das proteínas foram analisadas pelo software STRING de acordo com as anotações depositadas da base de dados *Gene Ontology* (GO).

Biological process		
GO terms	false discovery rate	matching proteins in your network (labels)
negative regulation of hydrolase activity	9.83e-16	A2M,AHSG,AMBP,APOA1,APOA2,APOC3,C3,C4A,ITIH1,ITIH2,ITIH4,KNG1,PZP,SERPINA1,SERPINA3,SERPIND1,SERPINF2,SERPING1,VTN
protein activation cascade	9.83e-16	A2M,APOH,C3,C4A,CFB,CFH,CFHR1,CLU,F2,IGLL5,KNG1,SERPING1
blood coagulation	2.54e-15	A2M,ALB,APOA1,APOB,APOH,C3,CLU,F2,FN1,HBD,HBE1,HBG1,HBG2,KNG1,PLG,SERPINA1,SERPIND1,SERPINF2,SERPING1,TF
negative regulation of endopeptidase activity	2.54e-15	A2M,AHSG,AMBP,C3,C4A,ITIH1,ITIH2,ITIH4,KNG1,PZP,SERPINA1,SERPINA3,SERPIND1,SERPINF2,SERPING1,VTN
regulation of peptidase activity	4.65e-15	A2M,AHSG,AMBP,C3,C4A,FN1,GSN,ITIH1,ITIH2,ITIH4,KNG1,PZP,SERPINA1,SERPINA3,SERPIND1,SERPINF2,SERPING1,VTN
regulation of body fluid levels	6.75e-15	A2M,ALB,APOA1,APOB,APOH,C3,CLU,F2,FN1,GC,HBD,HBE1,HBG1,HBG2,KNG1,PLG,SERPINA1,SERPIND1,SERPINF2,SERPING1,TF
wound healing	7.84e-15	A2M,ALB,APOA1,APOB,APOH,C3,CLU,F2,FN1,GSN,HBD,HBE1,HBG1,HBG2,KNG1,PLG,SERPINA1,SERPIND1,SERPINF2,SERPING1,TF
negative regulation of proteolysis	1.1e-14	A2M,AHSG,AMBP,C3,C4A,F2,ITIH1,ITIH2,ITIH4,KNG1,PZP,SERPINA1,SERPINA3,SERPIND1,SERPINF2,SERPING1,VTN
regulation of endopeptidase activity	3.79e-14	A2M,AHSG,AMBP,C3,C4A,GSN,ITIH1,ITIH2,ITIH4,KNG1,PZP,SERPINA1,SERPINA3,SERPIND1,SERPINF2,SERPING1,VTN
regulation of proteolysis	4.26e-14	A2M,AHSG,AMBP,APOE,CFB,CFH,CLU,F2,FN1,GSN,ITIH1,ITIH2,ITIH4,KNG1,PZP,SERPINA1,SERPINA3,SERPIND1,SERPINF2,SERPING1,VTN
vesicle-mediated transport	4.61e-14	A2M,AHSG,ALB,AMBP,APOA1,APOB,APOE,C4A,CLU,FN1,GSN,HBA2,HBB,HP,HPR,HPX,IGLL5,KNG1,PLG,SERPINA1,SERPINF2,SERPING1,TF,VTN
platelet degranulation	3.09e-13	A2M,ALB,APOA1,CLU,FN1,KNG1,PLG,SERPINA1,SERPINF2,SERPING1,TF
regulation of response to wounding	5.61e-13	A2M,AHSG,APOA1,APOE,APOH,C4A,CFB,CFH,F2,GSN,KNG1,PGLYRP2,PLG,SERPINF2,SERPING1,VTN
response to wounding	5.66e-13	A2M,ALB,APOB,APOH,C3,CLU,F2,FN1,GSN,HBD,HBE1,HBG1,HBG2,KNG1,PLG,SERPINA1,SERPIND1,SERPINF2,SERPING1,TF
transport	2.13e-12	A2M,AFM,AHSG,ALB,AMBP,APOA1,APOA2,APOA4,APOB,APOC3,APOE,APOH,C4A,CLU,CP,FN1,GSN,HBA2,HBB,HBD,HBE1,HBG1,HBG2,HP,HPR,HPX,IGLL5,KNG1,PLG,RBP4,SERPINA1,SERPINF2,SERPING1,VTN
response to stress	2.25e-12	A2M,AHSG,ALB,APOA2,APOA4,APOB,APOE,APOH,C4A,CFB,CFH,CLU,F2,FN1,GSN,HBA2,HBB,HBD,HBE1,HBG1,HBG2,HP,HPR,IGLL5,ITIH4,KNG1,PGLYRP2,PLG,SERPINA1,SERPINA3,SERPIND1,SERPINF2,SERPING1,VTN
negative regulation of catalytic activity	2.45e-12	A2M,AMBP,APOA1,APOA2,APOC3,APOE,C3,C4A,HP,ITIH1,ITIH2,ITIH4,KNG1,PZP,SERPINA1,SERPINA3,SERPIND1,SERPINF2,SERPING1,VTN
regulation of hydrolase activity	3.33e-12	A2M,AHSG,AMBP,APOA1,APOA2,APOA4,APOC3,APOH,C3,C4A,FN1,GSN,ITIH1,ITIH2,ITIH4,KNG1,PZP,SERPINA1,SERPINA3,SERPIND1,SERPINF2,SERPING1,VTN
receptor-mediated endocytosis	4.45e-11	ALB,AMBP,APOA1,APOB,APOE,HBA2,HBB,HP,HPR,HPX,IGLL5,VTN
single-organism transport	6.9e-11	A2M,AFM,ALB,APOA1,APOA2,APOA4,APOB,APOC3,APOE,APOH,C4A,CLU,CP,FN1,GSN,HBA2,HBB,HBD,HBE1,HBG1,HBG2,HPX,IGLL5,KNG1,PLG,RBP4,SERPINA1,SERPINF2,SERPING1,TTR
acute-phase response	7.9e-11	AHSG,F2,FN1,HP,ITIH4,SERPINA1,SERPINA3,SERPINF2
acute inflammatory response	8.54e-11	AHSG,APOA2,F2,FN1,HP,ITIH4,SERPINA1,SERPINA3,SERPINF2
negative regulation of protein metabolic process	9.65e-11	A2M,AHSG,AMBP,APOA4,APOE,C3,C4A,CLU,F2,ITIH1,ITIH2,ITIH4,KNG1,PZP,SERPINA1,SERPINA3,SERPIND1,SERPINF2,SERPING1,VTN
complement activation	1.07e-10	C3,C4A,CFB,CFH,CFHR1,CLU,IGLL5,SERPING1

negative regulation of blood coagulation	1.47e-10	APOE,APOH,F2,KNG1,PLG,SERPINF2,SERPING1,VTN
localization	1.48e-10	A2M,AFM,AHSG,ALB,AMB,P,APOA1,APOA2,APOA4,APOB,APOC3,APOE,APOH,C4A,CLU,CP,F2,FN1,GSN,HBA2,HBB,HBD,HBE1,HBG1,HBG2,HP,HPR,HPX,I,IGLL5,KNG1,PLG,RBP4,SERPINA1,SERPINF2,SERPING1,VTN
platelet activation	2.96e-10	A2M,ALB,APOA1,CLU,F2,FN1,KNG1,PLG,SERPINA1,SERPINF2,SERPING1,TF
endocytosis	3.9e-10	AHSG,ALB,AMB,P,APOA1,APOB,APOE,C4A,GSN,HBA2,HBB,HP,HPR,HPX,I,IGLL5,VTN
regulation of catalytic activity	3.9e-10	A2M,AMB,P,APOA1,APOA2,APOA4,APOC3,APOE,APOH,C3,C4A,CLU,FN1,GSN,HP,ITIH1,ITIH2,ITIH4,KNG1,PZP,SERPINA1,SERPINA3,SERPIND1,SERPINF2,SERPING1,TF,VTN
oxygen transport	8.11e-10	HBA2,HBB,HBD,HBE1,HBG1,HBG2
regulation of biological quality	1.04e-09	A2M,ALB,APOA1,APOA2,APOA4,APOB,APOC3,APOE,APOH,C3,CLU,CP,F2,GC,HBD,HBE1,HBG1,HBG2,HPX,KNG1,PLG,RBP4,SERPINA1,SERPINA3,SERPIND1,SERPINF2,SERPING1,TF,TTR
plasma lipoprotein particle assembly	1.13e-09	APOA1,APOA2,APOA4,APOB,APOC3,APOE
reverse cholesterol transport	1.13e-09	APOA1,APOA2,APOA4,APOC3,APOE,CLU
regulation of response to stress	1.95e-09	A2M,AHSG,AMB,P,APOA1,APOE,APOH,C4A,CFB,CFH,CLU,F2,GSN,HP,HPR,HPX,KNG1,PLG,SERPINF2,SERPING1,TF,VTN
negative regulation of cellular protein metabolic process	2.45e-09	A2M,AHSG,AMB,P,APOE,C3,C4A,F2,ITIH1,ITIH2,ITIH4,KNG1,PZP,SERPINA1,SERPINA3,SERPIND1,SERPINF2,SERPING1,VTN
negative regulation of cellular process	2.81e-09	A2M,AHSG,ALB,AMB,P,APOA1,APOA2,APOA4,APOC3,APOE,APOH,C3,C4A,CLU,F2,FN1,GSN,HBE1,HP,ITIH1,ITIH2,ITIH4,KNG1,PGLYRP2,PLG,PZP,RBP4,SERPINA1,SERPINA3,SERPIND1,SERPINF2,SERPING1,VTN
regulation of humoral immune response	3.42e-09	A2M,C4A,CFB,CFH,HPX,SERPING1,VTN
regulation of protein processing	4.13e-09	A2M,C4A,CFB,CFH,GSN,SERPINF2,SERPING1,VTN
regulation of complement activation	7.46e-09	A2M,C4A,CFB,CFH,SERPING1,VTN
regulation of wound healing	7.46e-09	APOE,APOH,F2,GSN,KNG1,PLG,SERPINF2,SERPING1,VTN
cholesterol transport	8.61e-09	APOA1,APOA2,APOA4,APOB,APOC3,APOE,CLU
plasma lipoprotein particle remodeling	8.94e-09	APOA1,APOA2,APOA4,APOB,APOC3,APOE
defense response	1.1e-08	AHSG,APOA2,APOA4,C3,C4A,CFB,CFH,CLU,F2,FN1,HP,I,IGLL5,ITIH4,KNG1,PGLYRP2,SERPINA1,SERPINA3,SERPINF2,SERPING1,VTN
organic hydroxy compound transport	1.41e-08	ALB,APOA1,APOA2,APOA4,APOB,APOC3,APOE,CLU,RBP4
regulation of protein metabolic process	1.42e-08	A2M,AHSG,AMB,P,APOA1,APOA2,APOA4,APOE,CFB,CFH,CLU,F2,GSN,HPX,ITIH1,ITIH2,ITIH4,KNG1,PZP,SERPINA1,SERPINA3,SERPIND1,SERPINF2,SERPING1,TF,VTN
cholesterol efflux	1.69e-08	APOA1,APOA2,APOA4,APOB,APOC3,APOE
phototransduction, visible light	2.13e-08	APOA1,APOA2,APOA4,APOB,APOC3,APOE,RBP4,TTR
negative regulation of metabolic process	2.4e-08	A2M,AHSG,AMB,P,APOA1,APOA2,APOA4,APOC3,APOE,C3,C4A,CLU,F2,HB E1,HP,ITIH1,ITIH2,ITIH4,KNG1,PZP,SERPINA1,SERPINA3,SERPIND1,SERPINF2,SERPING1,VTN
negative regulation of response to wounding	3.29e-08	APOA1,APOE,APOH,F2,KNG1,PLG,SERPINF2,SERPING1,VTN
regulation of response to external stimulus	4.08e-08	A2M,AHSG,APOA1,APOE,APOH,C4A,CFB,CFH,F2,HPR,KNG1,PGLYRP2,PL G,SERPINF2,SERPING1,VTN
high-density lipoprotein particle remodeling	4.33e-08	APOA1,APOA2,APOA4,APOC3,APOE
regulation of immune effector process	4.72e-08	A2M,APOA1,APOA2,C4A,CFB,CFH,HPR,HPX,PGLYRP2,RBP4,SERPING1,VTN
acylglycerol catabolic process	5.28e-08	APOA1,APOA2,APOA4,APOB,APOC3,APOE
phospholipid efflux	5.91e-08	APOA1,APOA2,APOA4,APOC3,APOE

lipid transport	6.85e-08	ALB,APOA1,APOA2,APOA4,APOB,APOC3,APOE,APOH,CLU,RBP4
inflammatory response	9.31e-08	AHSG,APOA2,C3,C4A,F2,FN1,HP,ITIH4,KNG1,SERPINA1,SERPINA3,SERPINF2
negative regulation of cellular metabolic process	9.96e-08	A2M,AHSG,AMB,P,APOA4,APOC3,APOE,C3,C4A,CLU,F2,HBE1,HP,ITIH1,ITIH2,ITIH4,KNG1,PZP,SERPINA1,SERPINA3,SERPIND1,SERPINF2,SERPING1,VTN
retinoid metabolic process	1.17e-07	APOA1,APOA2,APOA4,APOB,APOC3,APOE,RBP4
regulation of inflammatory response	1.24e-07	A2M,AHSG,APOA1,APOE,C4A,CFB,CFH,PGLYRP2,SERPING1,VTN
blood coagulation, intrinsic pathway	1.51e-07	A2M,APOH,F2,KNG1,SERPING1
lipid localization	1.59e-07	ALB,APOA1,APOA2,APOA4,APOB,APOC3,APOE,APOH,CLU,RBP4
regulation of response to stimulus	2.28e-07	A2M,AHSG,AMB,P,APOA1,APOA2,APOC3,APOE,APOH,C3,C4A,CFB,CFH,CFHR1,CLU,F2,FN1,GSN,HP,HPR,HPX,IPLL5,KNG1,PLG,SERPINF2,SERPING1,TF,VTN
high-density lipoprotein particle assembly	2.41e-07	APOA1,APOA2,APOA4,APOE
response to stimulus	2.9e-07	A2M,AHSG,ALB,APOA1,APOA2,APOA4,APOC3,APOE,APOH,C3,C4A,CFB,CFH,CFHR1,CLU,F2,FN1,GC,HBA2,HBB,HBD,HBE1,HBG1,HBG2,HP,HPR,IPLL5,ITIH4,KNG1,PGLYRP2,PLG,RBP4,SERPINA1,SERPINA3,SERPIND1,SERPING1,TTR,VTN
regulation of plasma lipoprotein particle levels	3.08e-07	APOA1,APOA2,APOA4,APOB,APOC3,APOE
plasma lipoprotein particle clearance	3.26e-07	APOA1,APOA2,APOB,APOC3,APOE
positive regulation of cholesterol esterification	4.52e-07	APOA1,APOA2,APOA4,APOE
regulation of cellular protein metabolic process	6.91e-07	A2M,AHSG,AMB,P,APOA1,APOE,C4A,CLU,F2,GSN,HPX,ITIH1,ITIH2,ITIH4,KNG1,PZP,SERPINA1,SERPINA3,SERPIND1,SERPINF2,SERPING1,TF,VTN
negative regulation of fibrinolysis	7.96e-07	APOH,F2,PLG,SERPINF2
blood coagulation, fibrin clot formation	8.04e-07	A2M,APOH,F2,KNG1,SERPING1
regulation of immune response	9.32e-07	A2M,AMB,P,APOA1,APOA2,C3,C4A,CFB,CFH,CFHR1,CLU,HPX,IPLL5,SERPING1,VTN
triglyceride metabolic process	1.11e-06	APOA1,APOA2,APOA4,APOB,APOC3,APOE,APOH
negative regulation of multicellular organismal process	1.11e-06	AHSG,APOA1,APOA2,APOC3,APOE,APOH,F2,FN1,KNG1,PGLYRP2,PLG,RBP4,SERPINF2,SERPING1,VTN
negative regulation of response to external stimulus	1.33e-06	APOA1,APOE,APOH,F2,KNG1,PLG,SERPINF2,SERPING1,VTN
cholesterol homeostasis	1.47e-06	APOA1,APOA2,APOA4,APOB,APOC3,APOE
regulation of immune system process	1.63e-06	A2M,AMB,P,APOA1,APOA2,C3,C4A,CFB,CFH,CFHR1,CLU,GSN,HPR,HPX,IPLL5,RBP4,SERPING1,VTN
triglyceride-rich lipoprotein particle remodeling	1.82e-06	APOA1,APOA2,APOA4,APOE
complement activation, classical pathway	1.86e-06	C3,C4A,CLU,IPLL5,SERPING1
triglyceride catabolic process	1.86e-06	APOA1,APOA4,APOB,APOC3,APOE
negative regulation of very-low-density lipoprotein particle remodeling	2.11e-06	APOA1,APOA2,APOC3
secretion	2.11e-06	A2M,ALB,APOA1,CLU,FN1,GC,KNG1,PLG,SERPINA1,SERPINF2,SERPING1,TF
negative regulation of macromolecule metabolic process	2.33e-06	A2M,AHSG,AMB,P,APOA4,APOE,C3,C4A,CLU,F2,HBE1,ITIH1,ITIH2,ITIH4,KNG1,PZP,SERPINA1,SERPINA3,SERPIND1,SERPINF2,SERPING1,VTN
humoral immune	3.4e-06	C3,C4A,CLU,IPLL5,SERPING1

response mediated by circulating immunoglobulin		
single-organism metabolic process	4.97e-06	A2M,ALB,AMBP,APOA1,APOA2,APOA4,APOB,APOC3,APOE,APOH,C3,C4A,CFB,CFH,CFHR1,CLU,CP,F2,GC,GSN,HBA2,HBB,HPX,IgLL5,KNG1,RBP4,SERPING1,TF
regulation of cholesterol transport	5.85e-06	APOA1,APOA2,APOA4,APOC3,APOE
positive regulation of response to stimulus	5.92e-06	APOA1,APOH,C3,C4A,CFB,CFH,CFHR1,CLU,F2,GSN,HPR,HPX,IgLL5,PGLYRP2,PLG,SERPINF2,SERPING1,TF,VTN
negative regulation of response to stimulus	6.48e-06	A2M,AHSG,AMBP,APOA1,APOA2,APOE,APOH,CLU,F2,HP,KNG1,PGLYRP2,PLG,SERPINF2,SERPING1,VTN
regulation of Cdc42 protein signal transduction	7.67e-06	APOA1,APOC3,APOE
regulation of lipoprotein lipase activity	8.61e-06	APOA1,APOA4,APOC3,APOH
positive regulation of wound healing	1.2e-05	APOH,F2,PLG,SERPINF2,VTN
fibrinolysis	2.72e-05	F2,PLG,SERPINF2,SERPING1
high-density lipoprotein particle clearance	3.63e-05	APOA1,APOA2,APOE
regulation of lipid metabolic process	4.28e-05	APOA1,APOA2,APOA4,APOB,APOC3,APOE,C3,SERPINA3
negative regulation of immune response	4.28e-05	A2M,AMBP,APOA1,APOA2,PGLYRP2,SERPING1
regulation of lipid biosynthetic process	5.5e-05	APOA1,APOA4,APOB,APOC3,APOE,C3
regulation of intestinal cholesterol absorption	5.95e-05	APOA1,APOA2,APOA4
biological regulation	6.65e-05	A2M,AHSG,ALB,AMBP,APOA1,APOA2,APOA4,APOB,APOC3,APOE,APOH,C3,C4A,CFB,CFH,CFHR1,CLU,CP,F2,GC,HBA2,HBB,HBD,HBG1,HBG2,HP,HPR,IgLL5,ITIH1,ITIH2,ITIH4,KNG1,PLG,PZP,RBP4,SERPINA1,SERPINA3,SERPIND1,SERPINF2,SERPING1,VTN
chemical homeostasis	8.22e-05	APOA1,APOA2,APOA4,APOB,APOC3,APOE,CP,F2,HPX,KNG1,RBP4,TF
regulation of biological process	9.19e-05	A2M,AHSG,ALB,AMBP,APOA1,APOA2,APOA4,APOB,APOC3,APOE,APOH,C3,C4A,CFB,CFH,CFHR1,CLU,F2,HBA2,HBB,HBE1,HP,HPR,HPX,IgLL5,ITIH1,ITIH2,ITIH4,KNG1,PLG,PZP,RBP4,SERPINA1,SERPINA3,SERPIND1,SERPINF2,SERPING1,TF,TTR,VTN
positive regulation of immune response	9.36e-05	C3,C4A,CFB,CFH,CFHR1,CLU,HPX,IgLL5,PGLYRP2,SERPING1
activation of immune response	0.000102	C3,C4A,CFB,CFH,CFHR1,CLU,IgLL5,PGLYRP2,SERPING1
positive regulation of response to wounding	0.000116	APOH,C3,F2,PLG,SERPINF2,VTN
regulation of metabolic process	0.000137	A2M,AHSG,AMBP,APOA1,APOA2,APOA4,APOB,APOC3,APOE,APOH,CFB,CFH,CLU,F2,GSN,HBB,HBE1,HP,HPR,HPX,ITIH1,ITIH2,ITIH4,KNG1,PZP,SERPINA1,SERPINA3,SERPIND1,SERPINF2,SERPING1,TF,VTN
regulation of defense response	0.000145	A2M,AHSG,APOA1,APOE,C4A,CFB,CFH,HPR,HPX,SERPING1,VTN
regulation of triglyceride metabolic process	0.000157	APOA1,APOA4,APOC3,C3
regulation of steroid metabolic process	0.00016	APOA1,APOA2,APOA4,APOB,APOE
positive regulation of biological process	0.00017	AHSG,APOA1,APOA2,APOA4,APOB,APOE,APOH,C3,C4A,CFB,CFH,CFHR1,CLU,F2,HBA2,HBB,HP,HPR,HPX,IgLL5,KNG1,PGLYRP2,PLG,RBP4,SERPINF2,SERPING1,TF,VTN
steroid metabolic process	0.000182	ALB,APOA1,APOA2,APOA4,APOB,APOE,GC
very-low-density lipoprotein particle remodeling	0.000182	APOA1,APOA4,APOE
organic anion transport	0.000201	ALB,APOA1,APOA2,APOA4,APOC3,APOE,HBA2,HBB
homeostatic process	0.000203	ALB,APOA1,APOA2,APOA4,APOB,APOC3,APOE,CP,F2,HPX,KNG1,RBP4,SE

RPINA3,TF		
alcohol metabolic process	0.000223	APOA1,APOA2,APOA4,APOB,APOE,GC,RBP4,TTR
low-density lipoprotein particle remodeling	0.000242	APOA2,APOB,APOE
positive regulation of lipoprotein lipase activity	0.000242	APOA1,APOA4,APOH
organic hydroxy compound metabolic process	0.000274	ALB,APOA1,APOA2,APOA4,APOB,APOE,GC,RBP4,TTR
negative regulation of immune effector process	0.000309	A2M,APOA1,APOA2,PGLYRP2,SERPING1
regulation of triglyceride catabolic process	0.000315	APOA1,APOA4,APOC3
positive regulation of immune system process	0.000358	C3,C4A,CFB,CFH,CFHR1,CLU,HPX,IgLL5,PGLYRP2,RBP4,SERPING1
regulation of cellular metabolic process	0.000381	A2M,AHSG,AMBP,APOA1,APOA2,APOA4,APOC3,APOE,C4A,CLU,F2,GSN,HBB,HBE1,HP,HPR,HPX,ITIH1,ITIH2,ITIH4,KNG1,PZP,SERPINA1,SERPINA3,SERPIND1,SERPINF2,SERPING1,TF,VTN
complement activation, alternative pathway	0.000393	C3,CFB,CFH
negative regulation of cholesterol transport	0.000393	APOA2,APOC3,APOE
regulation of multicellular organismal process	0.000484	AHSG,APOA1,APOA2,APOA4,APOC3,APOE,APOH,C3,CLU,F2,KNG1,PGLYRP2,PLG,RBP4,SERPINF2,SERPING1,TF,VTN
negative regulation of complement activation, lectin pathway	0.000523	A2M,SERPING1
negative regulation of cholesterol import	0.000523	APOA2,APOC3
positive regulation of neurofibrillary tangle assembly	0.000523	APOE,CLU
detection of stimulus	0.000555	APOA1,APOA2,APOA4,APOB,APOC3,APOE,C4A,PGLYRP2,RBP4,TTR
regulation of lipid catabolic process	0.000558	APOA1,APOA2,APOA4,APOC3
negative regulation of lipase activity	0.000594	APOA1,APOA2,APOC3
regulation of primary metabolic process	0.000597	A2M,AHSG,AMBP,APOA1,APOA2,APOA4,APOB,APOC3,APOE,CFB,CFH,CLU,F2,GSN,HBE1,HPX,ITIH1,ITIH2,ITIH4,KNG1,PZP,SERPINA1,SERPINA3,SERPIND1,SERPINF2,SERPING1,TF,VTN
lipid metabolic process	0.000645	ALB,APOA1,APOA2,APOA4,APOB,APOC3,APOE,APOH,C3,CLU,GC,RBP4
cholesterol metabolic process	0.000716	APOA1,APOA2,APOA4,APOB,APOE
immune system process	0.000933	APOA4,APOB,C3,C4A,CFB,CFH,CFHR1,CLU,F2,FN1,HP,IgLL5,PGLYRP2,SERPING1,TF,VTN
regulation of cellular process	0.00121	A2M,AHSG,ALB,AMBP,APOA1,APOA2,APOA4,APOB,APOC3,APOE,APOH,C3,C4A,CLU,F2,HBA2,HBB,HBE1,HP,HPR,HPX,IgLL5,ITIH1,ITIH2,ITIH4,KNG1,PLG,PZP,RBP4,SERPINA1,SERPINA3,SERPIND1,SERPINF2,SERPING1,TF,TTR,VTN
regulation of localization	0.00124	AHSG,APOA1,APOA2,APOA4,APOB,APOC3,APOE,APOH,C3,C4A,F2,FN1,GSN,KNG1,RBP4,TF,VTN
hydrogen peroxide catabolic process	0.00137	APOA4,HBA2,HBB
regulation of tau-protein kinase activity	0.0014	APOE,CLU
macromolecular complex assembly	0.00151	APOA1,APOA2,APOA4,APOB,APOC3,APOE,CLU,FN1,GSN,HBA2,HBB,HBE1
regulation of macromolecule metabolic process	0.00154	A2M,AHSG,AMBP,APOA1,APOA2,APOA4,APOB,APOE,CFB,CFH,CLU,F2,GSN,HBE1,HPX,ITIH1,ITIH2,ITIH4,KNG1,PZP,SERPINA1,SERPINA3,SERPIND1,SERPINF2,SERPING1,TF,VTN
positive regulation of lipid catabolic process	0.00178	APOA1,APOA2,APOA4
regulation of blood vessel	0.00193	APOE,HBB,KNG1,SERPINF2

size		
organic substance transport	0.00199	ALB,APOA1,APOA2,APOA4,APOB,APOC3,APOE,APOH,CLU,HBA2,HBB,HPX,RBP4,TF,TTR
extracellular matrix organization	0.00219	A2M,FN1,GSN,PLG,SERPINF2,TTR,VTN
regeneration	0.00226	APOA2,APOA4,APOE,APOH,GSN
vitamin transport	0.00321	AFM,APOA1,RBP4
hyaluronan metabolic process	0.00392	ITIH1,ITIH2,ITIH4
protein metabolic process	0.00402	A2M,ALB,AMBP,APOA2,APOA4,APOC3,APOH,C3,C4A,CFB,CFH,CFHR1,CLU,F2,FN1,GSN,HPX,IPLL5,KNG1,PLG,SERPING1,TF
negative regulation of cytokine secretion involved in immune response	0.0042	APOA1,APOA2
triglyceride homeostasis	0.0042	APOA1,APOA4,APOC3
positive regulation of beta-amyloid formation	0.0042	APOE,CLU
positive regulation of apoptotic cell clearance	0.0042	C3,C4A
multicellular organismal process	0.00451	A2M,ALB,AMBP,APOA1,APOA2,APOA4,APOB,APOC3,APOE,APOH,C3,CLU,F2,GC,HBD,HBE1,HBG1,HBG2,KNG1,PLG,PZP,RBP4,SERPINA1,SERPINA3,SERPIND1,SERPINF2,SERPING1
regulation of production of molecular mediator of immune response	0.00473	APOA1,APOA2,HPX,RBP4
regulation of fatty acid biosynthetic process	0.00504	APOA1,APOA4,APOC3
innate immune response	0.00518	APOA4,C3,C4A,CFB,CFH,CLU,IPLL5,PGLYRP2,SERPING1,VTN
response to inorganic substance	0.00543	APOA4,APOB,C3,GSN,HBA2,HBB,HP
response to reactive oxygen species	0.00551	APOA4,APOE,HBA2,HBB,HP
negative regulation of protein processing	0.00589	A2M,SERPINF2,SERPING1
regulation of beta-amyloid clearance	0.00595	APOE,CLU
negative regulation of beta-amyloid formation	0.00595	APOE,CLU
regulation of intracellular signal transduction	0.00619	A2M,AMBP,APOA1,APOC3,APOE,C3,CLU,F2,FN1,HPX,SERPINF2,TF
response to external stimulus	0.00694	ALB,APOA2,APOA4,APOC3,C4A,CLU,F2,GC,GSN,HP,PGLYRP2,RBP4,SERPIND1,TTR
regulation of endocytosis	0.00694	AHSG,APOC3,C3,C4A,VTN
cholesterol biosynthetic process	0.00742	APOA1,APOA4,APOE
positive regulation of endocytosis	0.00772	AHSG,C3,C4A,VTN
protein oxidation	0.00805	APOA1,APOA2
chylomicron remnant clearance	0.00805	APOC3,APOE
negative regulation of cytokine secretion	0.00982	APOA1,APOA2,FN1
positive regulation of phagocytosis	0.00982	AHSG,C3,C4A
positive regulation of triglyceride catabolic process	0.0104	APOA1,APOA4
lipoprotein catabolic process	0.0104	APOB,APOE
alcohol biosynthetic	0.0107	APOA1,APOA2,APOA4,APOE

process		
regulation of transport	0.0114	AHSG,APOA1,APOA2,APOA4,APOC3,APOE,C3,C4A,F2,FN1,KNG1,RBP4,VTN
regulation of lipase activity	0.0114	APOA2,APOA4,APOC3,APOH
regulation of phosphorylation	0.0117	AHSG,AMBP,APOA1,APOE,CLU,F2,FN1,HPX,SERPINF2,TF,VTN
lipoprotein metabolic process	0.0126	ALB,APOA2,APOA4,APOC3
very-low-density lipoprotein particle assembly	0.013	APOB,APOC3
single-organism catabolic process	0.0151	AMBP,APOA1,APOA2,APOA4,APOB,APOC3,APOE,HBA2,HBB
immune response	0.0155	APOA4,C3,C4A,CFB,CFH,CFHR1,CLU,IGLL5,PGLYRP2,SERPINF1,VTN
regulation of cytokine production	0.0158	APOA1,APOA2,C3,CLU,FN1,PGLYRP2,SERPINF2
regulation of cell-cell adhesion mediated by cadherin	0.0158	PLG,SERPINF2
single-multicellular organism process	0.0164	A2M,ALB,APOA1,APOA2,APOA4,APOB,APOC3,APOE,APOH,C3,CLU,F2,GC,HBD,HBE1,HBG1,HBG2,KNG1,PLG,RBP4,SERPINA1,SERPINA3,SERPIND1,SERPINF2,SERPINF1
response to oxygen-containing compound	0.0164	APOA2,APOA4,APOB,APOE,C3,GC,GSN,HBA2,HBB,HP,RBP4
positive regulation of lipid biosynthetic process	0.0184	APOA1,APOA4,APOE
positive regulation of multicellular organismal process	0.0184	APOA2,APOE,APOH,C3,CLU,F2,FN1,KNG1,PLG,SERPINF2,TF
negative regulation of defense response	0.0186	A2M,APOA1,APOE,SERPINF1
peptidyl-methionine modification	0.0188	APOA1,APOA2
maintenance of location	0.0201	ALB,APOA1,APOE,GSN
ion homeostasis	0.0206	APOA1,APOE,CP,F2,HPX,KNG1,TF
cellular metal ion homeostasis	0.0217	APOE,CP,F2,HPX,KNG1,TF
positive regulation of cellular component organization	0.0219	AHSG,APOA1,APOE,C3,C4A,CLU,FN1,HPR,SERPINF2,VTN
regulation of reactive oxygen species metabolic process	0.0247	CLU,F2,HBB,HP
regulation of protein phosphorylation	0.0261	AMBP,APOA1,APOE,CLU,F2,FN1,HPX,SERPINF2,TF,VTN
regulation of cell adhesion	0.0263	APOA1,FN1,GSN,KNG1,PLG,SERPINF2,VTN
oligodendrocyte differentiation	0.0278	CLU,GSN,VTN
positive regulation of humoral immune response	0.0295	C3,HPX
regulation of cholesterol biosynthetic process	0.0295	APOB,APOE
positive regulation of cell death	0.0314	APOE,CLU,GSN,HBA2,HBB,HP,KNG1
phosphatidylcholine metabolic process	0.0316	APOA1,APOA2,APOA4
maintenance of gastrointestinal epithelium	0.0334	RBP4,SERPINA3
positive regulation of	0.0334	APOA1,APOA4

fatty acid biosynthetic process		
cellular iron ion homeostasis	0.0356	CP,HPX,TF
blood circulation	0.0357	APOE,HBB,KNG1,SERPINF2,SERPING1
cellular lipid metabolic process	0.0372	APOA1,APOA2,APOA4,APOC3,APOE,APOH,C3,RBP4
negative regulation of platelet activation	0.0373	APOE,F2
regulation of catabolic process	0.0393	APOA1,APOA2,APOA4,APOC3,APOE,CLU,HP,HPR
glycosaminoglycan metabolic process	0.0393	ITIH1,ITIH2,ITIH4,PGLYRP2
regulation of cell communication	0.0398	A2M,AHSG,AMBPAPOA1,APOC3,APOE,CLU,F2,FN1,GSN,HPR,HPX,RBP4,SERPINF2,TF,VTN
establishment of localization in cell	0.0407	A2M,ALB,APOA1,APOE,CLU,FN1,KNG1,PLG,SERPINA1,SERPINF2,SERPING1,TF
regulation of cell-substrate adhesion	0.0408	APOA1,FN1,PLG,VTN
organ regeneration	0.044	APOA1,APOA2,APOH
tissue homeostasis	0.0448	ALB,RBP4,SERPINA3,TF
positive regulation of protein processing	0.0454	C3,GSN
negative regulation of lipid metabolic process	0.0497	APOA2,APOC3,APOE
positive regulation of reactive oxygen species metabolic process	0.0497	CLU,F2,HBB
negative regulation of lipid catabolic process	0.0499	APOA2,APOC3

8. 4. Anexo 4

Tabela 1. Classificação das proteínas diferencialmente expressas obtidas da comparação entre “CTRL vs FP menor” no momento de cura clínica, de acordo com suas funções moleculares. As classificações das proteínas foram analisadas pelo software STRING de acordo com as anotações depositadas da base de dados *Gene Ontology* (GO).

Molecular Function		
pathway description	false discovery rate	matching proteins in your network (labels)
endopeptidase inhibitor activity	1.75e-16	A2M,AHSG,AMBP,C3,C4A,ITIH1,ITIH2,ITIH4,KNG1,PZP,SERPINA1,SERPINA3,SERPIND1,SERPINF2,SERPING1
peptidase regulator activity	1.75e-16	A2M,AHSG,AMBP,C3,C4A,FN1,ITIH1,ITIH2,ITIH4,KNG1,PZP,SERPINA1,SERPINA3,SERPIND1,SERPINF2,SERPING1
enzyme inhibitor activity	5.9e-15	A2M,AMBP,APOA1,APOA2,APOC3,C3,C4A,ITIH1,ITIH2,ITIH4,KNG1,PZP,SERPINA1,SERPINA3,SERPIND1,SERPINF2,SERPING1
serine-type endopeptidase inhibitor activity	5.05e-13	A2M,AMBP,ITIH1,ITIH2,ITIH4,PZP,SERPINA1,SERPINA3,SERPIND1,SERPINF2,SERPING1
enzyme regulator activity	8.06e-13	A2M,AMBP,APOA1,APOA2,APOA4,APOC3,APOE,APOH,C3,C4A,FN1,ITIH1,ITIH2,ITIH4,KNG1,PZP,SERPINA1,SERPINA3,SERPIND1,SERPINF2,SERPING1
oxygen transporter activity	3.85e-10	HBA2,HBB,HBD,HBE1,HBG1,HBG2
cholesterol transporter activity	2.05e-07	APOA1,APOA2,APOA4,APOB,APOE
phosphatidylcholine-sterol O-acyltransferase activator activity	2.61e-07	APOA1,APOA2,APOA4,APOE
glycosaminoglycan binding	5.5e-07	APOB,APOE,APOH,CFH,FN1,KNG1,PGLYRP2,SERPIND1,VTN
lipoprotein particle receptor binding	5.5e-07	APOA1,APOA2,APOB,APOC3,APOE
heparin binding	1.17e-06	APOB,APOE,APOH,CFH,FN1,KNG1,SERPIND1,VTN
alcohol binding	1.17e-06	APOA1,APOA2,APOA4,APOC3,APOE,GC,RBP4
high-density lipoprotein particle receptor binding	4.45e-06	APOA1,APOA2,APOC3
heme binding	7.79e-06	AMBP,HBA2,HBB,HBD,HBE1,HBG1,HBG2
protein binding	9.34e-06	A2M,ALB,AMBP,APOA1,APOA2,APOA4,APOB,APOC3,APOE,APOH,C3,C4A,CFB,CFH,CLU,CP,F2,FN1,GC,GSN,HBB,HP,HPR,KNG1,PLG,SERPINA1,SERPINF2,TF,TTR,VTN
cholesterol binding	1.07e-05	APOA1,APOA2,APOA4,APOC3,APOE
transporter activity	1.28e-05	APOA1,APOA2,APOA4,APOB,APOE,GC,HBA2,HBB,HBD,HBE1,HBG1,HBG2,HPX,RBP4,TF
hemoglobin binding	1.28e-05	HBB,HP,HPR
steroid binding	1.3e-05	APOA1,APOA2,APOA4,APOC3,APOE,GC
oxygen binding	1.58e-05	HBA2,HBD,HBE1,HBG1,HBG2
lipid transporter activity	1.67e-05	APOA1,APOA2,APOA4,APOB,APOE,RBP4
iron ion binding	2.77e-05	HBA2,HBB,HBD,HBE1,HBG1,HBG2,TF
lipid binding	5.8e-05	ALB,APOA1,APOA2,APOA4,APOB,APOC3,APOE,APOH,C3,GC,RBP4
substrate-specific transporter activity	7.52e-05	APOA1,APOA2,APOA4,APOB,APOE,HBA2,HBB,HBD,HBE1,HBG1,HBG2,RBP4,TF
antioxidant activity	0.00011	ALB,APOA4,APOE,HBB,HP

receptor binding	0.000339	A2M,APOA1,APOA2,APOB,APOC3,APOE,C3,F2, FN1, KNG1, PLG, TF, VTN
phosphatidylcholine binding	0.00118	APOA1,APOA2,APOA4
lipase inhibitor activity	0.00118	APOA1,APOA2,APOC3
phospholipid binding	0.00261	APOA1,APOA2,APOA4,APOB,APOC3,APOE,APOH
lipoprotein particle binding	0.00387	APOA1,APOA2,APOE
protease binding	0.00811	A2M, FN1, SERPINA1, SERPINF2
apolipoprotein receptor binding	0.0106	APOA1,APOA2
high-density lipoprotein particle binding	0.0193	APOA1,APOA2
transition metal ion binding	0.0199	ALB,APOA4,CP,HBA2,HBB,HBD,HBE1,HBG1,HBG2, KNG1, PGLYRP2, TF
copper ion binding	0.0346	ALB,APOA4,CP
chaperone binding	0.0457	ALB,CLU,CP
complement binding	0.0475	C4A,CFB
binding	0.0493	A2M,AFM,ALB,APOA1,APOA2,APOA4,APOB,APOC3,APOE,APOH,C4A,CFB, CFH,CLU,CP,F2, FN1, GC, GSN, HBA2, HBD, HBE1, HBG1, HBG2, HP, HPR, HPX, IGL L5, ITIH1, KNG1, PLG, RBP4, SERPINA1, SERPINA3, SERPIND1, SERPINF2, TF, TTR

8. 5. Anexo 5

Tabela 1. Classificação das proteínas diferencialmente expressas obtidas da comparação entre “CTRL vs FP menor” no momento de cura clínica, de acordo com o componente celular. As classificações das proteínas foram analisadas pelo software STRING de acordo com as anotações depositadas da base de dados *Gene Ontology* (GO).

Cellular component		
pathway description	false discovery rate	matching proteins in your network (labels)
blood microparticle	1.78e-82	A1BG,A2M,AFM,AHSG,ALB,AMB,P,APOA1,APOA2,APOA4,APOE,C3,C4A,CFB,CFH,CFHR1,CLU,CP,F2,FN1,GC,GSN,HBA2,HBD,HBE1,HBG1,HBG2,HP,HPR,HPX,I,IGLL5,ITIH1,ITIH2,ITIH4,KNG1,PLG,PZP,SERPINA3,SERPINF2,SERPING1,TF,VTN
extracellular space	2.7e-49	A1BG,A2M,AFM,AHSG,ALB,AMB,P,APOA1,APOA2,APOA4,APOB,APOC3,APOE,APOH,C3,C4A,CFB,CFH,CFHR1,CLU,CP,F2,FN1,GC,GSN,HBA2,HBD,HBE1,HBG1,HBG2,HP,HPR,HPX,I,IGLL5,ITIH1,ITIH2,ITIH4,KNG1,PLG,PZP,RBP4,SERPINA1,SERPINA3,SERPIND1,SERPINF2,SERPING1,TF,TTR,VTN
extracellular exosome	1.57e-28	A1BG,A2M,AFM,AHSG,ALB,AMB,P,APOA1,APOA2,APOA4,APOB,APOC3,APOE,APOH,C3,C4A,CFB,CFH,CFHR1,CLU,CP,F2,FN1,GC,GSN,HBA2,HP,HPR,HPX,I,IGLL5,ITIH1,ITIH2,ITIH4,KNG1,PGLYRP2,PLG,PZP,RBP4,SERPINA1,SERPINA3,SERPIND1,SERPINF2,SERPING1,TF,TTR,VTN
extracellular region part	9.84e-28	A1BG,A2M,AFM,AHSG,ALB,AMB,P,APOA1,APOA2,APOA4,APOB,APOC3,APOE,APOH,C3,C4A,CFB,CFH,CFHR1,CLU,CP,F2,FN1,GC,GSN,HBA2,HBD,HBE1,HBG1,HBG2,HP,HPR,HPX,I,IGLL5,ITIH1,ITIH2,ITIH4,KNG1,PGLYRP2,PLG,PZP,RBP4,SERPINA1,SERPINA3,SERPIND1,SERPINF2,SERPING1,TF,TTR
cytoplasmic membrane-bounded vesicle lumen	4.71e-26	A2M,ALB,APOA1,APOB,APOE,CLU,FN1,HBA2,HBB,HP,HPX,KNG1,PLG,SERPINA1,SERPINF2,SERPING1,TF
extracellular region	1.82e-24	A1BG,A2M,AFM,AHSG,ALB,AMB,P,APOA1,APOA2,APOA4,APOB,APOC3,APOE,APOH,C3,C4A,CFB,CFH,CFHR1,CLU,CP,F2,FN1,GC,GSN,HBA2,HBD,HBE1,HBG1,HBG2,HP,HPR,HPX,I,IGLL5,ITIH1,ITIH2,ITIH4,KNG1,PGLYRP2,PLG,PZP,RBP4,SERPINA1,SERPINA3,SERPIND1,SERPINF2,SERPING1,TF,TTR
secretory granule lumen	1.28e-15	A2M,ALB,APOA1,CLU,FN1,KNG1,PLG,SERPINA1,SERPINF2,SERPING1,TF
plasma lipoprotein particle	4.72e-14	APOA1,APOA2,APOA4,APOB,APOC3,APOE,APOH,CLU,HPR
high-density lipoprotein particle	1.61e-13	APOA1,APOA2,APOA4,APOC3,APOE,APOH,CLU,HPR
chylomicron	2.1e-13	APOA1,APOA2,APOA4,APOB,APOC3,APOE,APOH
platelet alpha granule lumen	4.92e-13	A2M,ALB,CLU,FN1,KNG1,PLG,SERPINA1,SERPINF2,SERPING1
endocytic vesicle lumen	1.01e-12	APOA1,APOB,APOE,HBA2,HBB,HP,HPX
platelet alpha granule	3.51e-12	A2M,ALB,CLU,FN1,KNG1,PLG,SERPINA1,SERPINF2,SERPING1
very-low-density lipoprotein particle	3.51e-12	APOA1,APOA2,APOA4,APOB,APOC3,APOE,APOH

spherical high-density lipoprotein particle	4.25e-10	APOA1,APOA2,APOC3,CLU,HPR
cytoplasmic membrane-bounded vesicle	1.55e-08	A2M,ALB,APOA1,APOB,APOE,CLU,FN1,HBA2,HBB,HP,HPX,KNG1,PLG,SERPINA1,SERPINF2,SERPING1,TF
secretory granule	1.55e-08	A2M,ALB,APOA1,CLU,FN1,KNG1,PLG,SERPINA1,SERPINF2,SERPING1,TF
hemoglobin complex	3.29e-07	HBD,HBE1,HBG1,HBG2
haptoglobin - hemoglobin complex	4,00E-06	HBA2,HBB,HP
endocytic vesicle	4.93e-06	APOA1,APOB,APOE,HBA2,HBB,HP,HPX,TF
intermediate-density lipoprotein particle	9.37e-06	APOB,APOC3,APOE
early endosome	0.00036	APOA1,APOA2,APOA4,APOB,APOC3,APOE,TF
membrane-bounded organelle	0.000404	A1BG,A2M,AFM,AHSG,ALB,APOA1,APOA2,APOA4,APOB,APOC3,APOE,APOH,C3,C4A,CFB,CFH,CFHR1,CLU,CP,F2,FN1,GC,GSN,HBA2,HP,HPR,HPX,IIGLL5,ITIH1,ITIH2,ITIH4,KNG1,PGLYRP2,PLG,PZP,RBP4,SERPINA1,SERPINA3,SERPIND1,SERPINF2,SERPING1,TF,TTR,VTN
endoplasmic reticulum lumen	0.00694	APOA1,APOA2,APOA4,APOB,F2
fibrinogen complex	0.0087	FN1,SERPINF2
macromolecular complex	0.011	ALB,APOA1,APOA2,APOA4,APOB,APOC3,APOE,APOH,CLU,FN1,GSN,HBA2,HBB,HBD,HBE1,HBG1,HBG2,HP,HPR,RBP4,SERPINF2,TTR,VTN
low-density lipoprotein particle	0.0228	APOB,APOE
organelle lumen	0.0239	A2M,ALB,APOA1,APOA2,APOA4,APOB,APOE,CLU,F2,FN1,GC,HBA2,HBB,HP,HPX,KNG1,PLG,SERPINA1,SERPINF2,SERPING1,TF

8. 6. Anexo 6

Tabela 1. Vias de sinalização significativamente enriquecidas identificadas enriquecimento funcional das proteínas diferencialmente expressas obtidas da comparação “CTRL *versus* FP menor” no momento de cura clínica. As associações entre as proteínas de sinalização das respectivas vias foram detectadas usando a ferramenta *Kyoto Encyclopedia at Genes and Genomes (KEEG)*.

KEEG-pathways		
pathway description	false discovery rate	matching proteins in your network (labels)
Complement and coagulation cascades	7.36e-17	A2M,C3,C4B,CFB,CFH,F2,KNG1,PLG,SERPINA1,SERPIND1,SE RPINF2,SERPING1
Staphylococcus aureus infection	3.58e-05	C3,C4B,CFB,CFH,PLG
Vitamin digestion and absorption	0.00342	APOA1,APOA4,APOB
African trypanosomiasis	0.0068	APOA1,HBB,HPR
Fat digestion and absorption	0.00901	APOA1,APOA4,APOB
PPAR signaling pathway	0.0348	APOA1,APOA2,APOC3
Pertussis	0.0348	C3,C4B,SERPING1

8. 7. Anexo 7

Tabela 1. Classificação das proteínas diferencialmente expressas obtidas da comparação entre “CTRL vs FP maior” no momento de cura clínica, de acordo com sua participação em processos biológicos. As classificações das proteínas foram analisadas pelo software STRING de acordo com as anotações depositadas da base de dados *Gene Ontology* (GO).

Biological process		
pathway description	false discovery rate	matching proteins in your network (labels)
blood coagulation	4.65e-16	A2M,ALB,APOA1,APOB,APOH,C3,CLU,F2,FN1,HBD,HBE1,HBG1,HBG2,HRG,KNG1,PLG,SERPINA1,SERPINC1,SERPIND1,TF
negative regulation of endopeptidase activity	4.65e-16	A2M,AHSG,AMBP,C3,C4A,HRG,ITIH1,ITIH2,ITIH4,KNG1,PZP,SERPINA1,SERPINA3,SERPINC1,SERPIND1,VTN
regulation of body fluid levels	9.16e-16	A2M,ALB,APOA1,APOB,APOH,C3,CLU,F2,FN1,GC,HBD,HBE1,HBG1,HBG2,HRG,KNG1,PLG,SERPINA1,SERPINC1,SERPIND1,TF
negative regulation of hydrolase activity	9.16e-16	A2M,AHSG,AMBP,APOA1,APOC3,C3,C4A,HRG,ITIH1,ITIH2,ITIH4,KNG1,PZP,SERPINA1,SERPINA3,SERPINC1,SERPIND1,VTN
negative regulation of proteolysis	2.36e-15	A2M,AHSG,AMBP,C3,C4A,F2,HRG,ITIH1,ITIH2,ITIH4,KNG1,PZP,SERPINA1,SERPINA3,SERPINC1,SERPIND1,VTN
protein activation cascade	7.1e-15	A2M,APOH,C3,C4A,CFB,CFH,CFHR1,CLU,F2,IgLL5,KNG1
wound healing	1.48e-14	A2M,ALB,APOA1,APOB,APOH,C3,CLU,F2,FN1,HBD,HBE1,HBG1,HBG2,HRG,KNG1,PLG,SERPINA1,SERPINC1,SERPIND1,TF
regulation of peptidase activity	1.48e-14	A2M,AHSG,AMBP,C3,C4A,FN1,HRG,ITIH1,ITIH2,ITIH4,KNG1,PZP,SERPINA1,SERPINA3,SERPINC1,SERPIND1,VTN
response to wounding	1.4e-12	A2M,ALB,APOB,APOH,C3,CLU,F2,FN1,HBD,HBE1,HBG1,HBG2,HRG,KNG1,PLG,SERPINA1,SERPINC1,SERPIND1,TF
regulation of proteolysis	1.4e-12	A2M,AHSG,AMBP,CFB,CFH,CLU,F2,FN1,HRG,ITIH1,ITIH2,ITIH4,KNG1,PZP,SERPINA1,SERPINA3,SERPINC1,SERPIND1,VTN
platelet degranulation	7.33e-12	A2M,ALB,APOA1,CLU,FN1,HRG,KNG1,PLG,SERPINA1,TF
vesicle-mediated transport	9.51e-12	A2M,AHSG,ALB,AMBP,APOA1,APOB,C4A,CLU,FN1,HBA2,HBB,HP,HPR,HPX,HRG,IgLL5,KNG1,PLG,SERPINA1,TF,VTN
response to stress	3.75e-11	A2M,AHSG,ALB,APOA4,APOB,APOH,C4A,CFB,CFH,CLU,F2,FN1,HBA2,HBB,HBD,HBE1,HBG1,HBG2,HP,HPR,HRG,IgLL5,ITIH4,KNG1,PGLYRP2,PLG,SERPINA1,SERPINA3,SERPINC1,SERPIND1,VTN
regulation of hydrolase activity	5.4e-11	A2M,AHSG,AMBP,APOA1,APOA4,APOC3,APOH,C3,C4A,FN1,HRG,ITIH1,ITIH2,ITIH4,KNG1,PZP,SERPINA1,SERPINA3,SERPINC1,SERPIND1,VTN
regulation of response to wounding	5.77e-11	A2M,AHSG,APOA1,APOH,C4A,CFB,CFH,F2,HRG,KNG1,PGLYRP2,PLG,SERPINC1,VTN
negative regulation of catalytic activity	7.27e-11	A2M,AMBP,APOA1,APOC3,C3,C4A,HP,HRG,ITIH1,ITIH2,ITIH4,KNG1,PZP,SERPINA1,SERPINA3,SERPINC1,SERPIND1,VTN
negative regulation of protein metabolic process	1.96e-10	A2M,AHSG,AMBP,APOA4,C3,C4A,CLU,F2,HRG,ITIH1,ITIH2,ITIH4,KNG1,PZP,SERPINA1,SERPINA3,SERPINC1,SERPIND1,VTN
receptor-mediated endocytosis	4.76e-10	ALB,AMBP,APOA1,APOB,HBA2,HBB,HP,HPR,HPX,IgLL5,VTN
oxygen transport	7.36e-10	HBA2,HBB,HBD,HBE1,HBG1,HBG2
platelet activation	3.47e-09	A2M,ALB,APOA1,CLU,F2,FN1,HRG,KNG1,PLG,SERPINA1,TF
acute-phase response	3.76e-09	AHSG,F2,FN1,HP,ITIH4,SERPINA1,SERPINA3
complement activation	4.99e-09	C3,C4A,CFB,CFH,CFHR1,CLU,IgLL5
transport	1.08e-08	A2M,AHSG,ALB,AMBP,APOA1,APOA4,APOB,APOC3,APOH,C4A,CLU,CP,FN1,HBA2,HBB,HBD,HBE1,HBG1,HBG2,HP,HPR,HPX,HRG,IgLL5,KNG1,PLG,SERPINA1,VTN

regulation of protein activation cascade	1.19e-08	A2M,C4A,CFB,CFH,SERPINC1,VTN
regulation of catalytic activity	1.83e-08	A2M,AMBP,APOA1,APOA4,APOC3,APOH,C3,C4A,CLU,FN1,HP,HRG,ITIH1,ITIH2,ITIH4,KNG1,PZP,SERPINA1,SERPINA3,SERPINC1,SERPIND1,TF,VTN
endocytosis	2.69e-08	AHSG,ALB,AMBP,APOA1,APOB,C4A,HBA2,HBB,HP,HPR,HPX,IPLL5,VTN
regulation of response to stress	2.69e-08	A2M,AHSG,AMBP,APOA1,APOH,C4A,CFB,CFH,CLU,F2,HP,HPR,HPX,HRG,KNG1,PLG,SERPINC1,TF,VTN
regulation of biological quality	1.57e-07	A2M,ALB,APOA1,APOA4,APOB,APOC3,APOH,C3,CLU,CP,F2,GC,HBD,HBE1,HBG1,HBG2,HPX,HRG,KNG1,PLG,SERPINA1,SERPINA3,SERPINC1,SERPIND1,TF
negative regulation of cellular metabolic process	1.59e-07	A2M,AHSG,AMBP,APOA4,APOC3,C3,C4A,CLU,F2,HBE1,HP,HRG,ITIH1,ITIH2,ITIH4,KNG1,PZP,SERPINA1,SERPINA3,SERPINC1,SERPIND1,VTN
negative regulation of metabolic process	1.7e-07	A2M,AHSG,AMBP,APOA1,APOA4,APOC3,C3,C4A,CLU,F2,HBE1,HP,HRG,ITIH1,ITIH2,ITIH4,KNG1,PZP,SERPINA1,SERPINA3,SERPINC1,SERPIND1,VTN
regulation of response to external stimulus	1.7e-07	A2M,AHSG,APOA1,APOH,C4A,CFB,CFH,F2,HPR,HRG,KNG1,PGLYRP2,PLG,SERPINC1,VTN
defense response	1.84e-07	AHSG,APOA4,C3,C4A,CFB,CFH,CLU,F2,FN1,HP,HRG,IPLL5,ITIH4,KNG1,PGLYRP2,SERPINA1,SERPINA3,VTN
regulation of humoral immune response	1.85e-07	A2M,C4A,CFB,CFH,HPX,VTN
localization	2.8e-07	A2M,AHSG,ALB,AMBP,APOA1,APOA4,APOB,APOC3,APOH,C4A,CLU,CP,F2,FN1,HBA2,HBB,HBD,HBE1,HBG1,HBG2,HP,HPR,HPX,HRG,IPLL5,KNG1,PLG,SERPINA1,VTN
regulation of blood coagulation	3.06e-07	APOH,F2,HRG,KNG1,PLG,SERPINC1,VTN
negative regulation of blood coagulation	3.4e-07	APOH,F2,HRG,KNG1,PLG,VTN
negative regulation of response to wounding	5.81e-07	APOA1,APOH,F2,HRG,KNG1,PLG,SERPINC1,VTN
regulation of complement activation	6.01e-07	A2M,C4A,CFB,CFH,VTN
negative regulation of cellular process	9.49e-07	A2M,AHSG,ALB,AMBP,APOA1,APOA4,APOC3,APOH,C3,C4A,CLU,F2,FN1,HBE1,HP,ITIH1,ITIH2,ITIH4,KNG1,PGLYRP2,PLG,PZP,SERPINA1,SERPINA3,SERPINC1,SERPIND1,VTN
regulation of response to stimulus	9.49e-07	A2M,AHSG,AMBP,APOA1,APOC3,APOH,C3,C4A,CFB,CFH,CFHR1,CLU,F2,FN1,HP,HPR,HPX,HRG,IPLL5,KNG1,LRG1,PLG,SERPINC1,TF,VTN
regulation of inflammatory response	1.5e-06	A2M,AHSG,APOA1,C4A,CFB,CFH,PGLYRP2,SERPINC1,VTN
single-organism transport	1.65e-06	A2M,ALB,APOA1,APOA4,APOB,APOC3,APOH,C4A,CLU,CP,FN1,HBA2,HBB,HBD,HBE1,HBG1,HBG2,HPX,HRG,IPLL5,KNG1,PLG,SERPINA1
regulation of protein metabolic process	2.96e-06	A2M,AHSG,AMBP,APOA1,APOA4,CFB,CFH,CLU,F2,HPX,ITIH1,ITIH2,ITIH4,KNG1,PZP,SERPINA1,SERPINA3,SERPINC1,SERPIND1,TF,VTN
negative regulation of macromolecule metabolic process	3.97e-06	A2M,AHSG,AMBP,APOA4,C3,C4A,CLU,F2,HBE1,HRG,ITIH1,ITIH2,ITIH4,KNG1,PZP,SERPINA1,SERPINA3,SERPINC1,SERPIND1,VTN
regulation of immune response	4.06e-06	A2M,AMBP,APOA1,C3,C4A,CFB,CFH,CFHR1,CLU,HPX,HRG,IPLL5,VTN
response to stimulus	5.66e-06	A2M,AHSG,ALB,APOA1,APOA4,APOC3,APOH,C3,C4A,CFB,CFH,CFHR1,CLU,F2,FN1,GC,HBA2,HBB,HBD,HBE1,HBG1,HBG2,HP,HPR,HRG,IPLL5,ITIH4,KNG1,PGLYRP2,PLG,SERPINA1,SERPINA3,SERPIND1,VTN
inflammatory response	7.99e-06	AHSG,C3,C4A,F2,FN1,HP,ITIH4,KNG1,SERPINA1,SERPINA3
regulation of lipoprotein lipase activity	1.16e-05	APOA1,APOA4,APOC3,APOH
positive regulation of response to stimulus	1.21e-05	APOA1,APOH,C3,C4A,CFB,CFH,CFHR1,CLU,F2,HPR,HPX,HRG,IPLL5,LRG1,PGLYRP2,PLG,TF,VTN

secretion	1.31e-05	A2M,ALB,APOA1,CLU,FN1,GC,HRG,KNG1,PLG,SERPINA1,TF
plasma lipoprotein particle assembly	1.43e-05	APOA1,APOA4,APOB,APOC3
reverse cholesterol transport	1.43e-05	APOA1,APOA4,APOC3,CLU
negative regulation of response to external stimulus	1.58e-05	APOA1,APOH,F2,HRG,KNG1,PLG,SERPINC1,VTN
cholesterol transport	1.68e-05	APOA1,APOA4,APOB,APOC3,CLU
blood coagulation, intrinsic pathway	1.73e-05	A2M,APOH,F2,KNG1
negative regulation of biological process	1.85e-05	A2M,AHSG,ALB,AMBP,APOA1,APOA4,APOC3,APOH,C3,C4A,CLU,F2, FN1,HBE1,HP,ITIH1,ITIH2,ITIH4,KNG1,PGLYRP2,PLG,PZP,SERPINA1, SERPINA3,SERPIND1,VTN
regulation of cellular protein metabolic process	2.56e-05	A2M,AHSG,AMBP,APOA1,C4A,CLU,F2,HPX,ITIH1,ITIH2,ITIH4,KNG1, PZP,SERPINA1,SERPINA3,SERPINC1,SERPIND1,TF,VTN
regulation of immune effector process	4.56e-05	A2M,APOA1,C4A,CFB,CFH,HPR,HPX,PGLYRP2,VTN
plasma lipoprotein particle remodeling	5.31e-05	APOA1,APOA4,APOB,APOC3
blood coagulation, fibrin clot formation	6.17e-05	A2M,APOH,F2,KNG1
positive regulation of immune response	6.52e-05	C3,C4A,CFB,CFH,CFHR1,CLU,HPX,HRG,IGLL5,PGLYRP2
cholesterol efflux	8.33e-05	APOA1,APOA4,APOB,APOC3
negative regulation of response to stimulus	0.000107	A2M,AHSG,AMBP,APOA1,APOH,CLU,F2,HP,HRG,KNG1,PGLYRP2,PL G,SERPINC1,VTN
organic hydroxy compound transport	0.000114	ALB,APOA1,APOA4,APOB,APOC3,CLU
complement activation, classical pathway	0.000121	C3,C4A,CLU,IGLL5
triglyceride catabolic process	0.000121	APOA1,APOA4,APOB,APOC3
regulation of immune system process	0.000144	A2M,AMBP,APOA1,C3,C4A,CFB,CFH,CFHR1,CLU,HPR,HPX,HRG,IGL L5,VTN
negative regulation of fibrinolysis	0.000164	APOH,F2,PLG
lipid transport	0.000167	ALB,APOA1,APOA4,APOB,APOC3,APOH,CLU
regulation of triglyceride metabolic process	0.000167	APOA1,APOA4,APOC3,C3
humoral immune response mediated by circulating immunoglobulin	0.000188	C3,C4A,CLU,IGLL5
positive regulation of lipoprotein lipase activity	0.000296	APOA1,APOA4,APOH
lipid localization	0.000297	ALB,APOA1,APOA4,APOB,APOC3,APOH,CLU
regulation of triglyceride catabolic process	0.00038	APOA1,APOA4,APOC3
biological regulation	0.000429	A2M,AHSG,ALB,AMBP,APOA1,APOA4,APOB,APOC3,APOH,C3,C4A,C FB,CFH,CFHR1,CLU,CP,F2,GC,HBA2,HBB,HBD,HBG1,HBG2,HP,HPR,I GLL5,ITIH1,ITIH2,ITIH4,KNG1,LRG1,PLG,PZP,SERPINA1,SERPINA3,S ERPIND1,VTN
complement activation, alternative pathway	0.00048	C3,CFB,CFH
positive regulation of wound healing	0.000491	APOH,F2,PLG,VTN

triglyceride metabolic process	0.000522	APOA1,APOA4,APOB,APOC3,APOH
regulation of plasma lipoprotein particle levels	0.000529	APOA1,APOA4,APOB,APOC3
regulation of defense response	0.000588	A2M,AHSG,APOA1,C4A,CFB,CFH,HPR,HPX,SERPINC1,VTN
high-density lipoprotein particle remodeling	0.000588	APOA1,APOA4,APOC3
activation of immune response	0.000636	C3,C4A,CFB,CFH,CFHR1,CLU,IgLL5,PGLYRP2
phospholipid efflux	0.000704	APOA1,APOA4,APOC3
single-organism metabolic process	0.000764	A2M,ALB,AMBP,APOA1,APOA4,APOB,APOC3,APOH,C3,C4A,CFB,CFH,CFHR1,CLU,CP,F2,GC,HBA2,HBB,HPX,IgLL5,KNG1,TF
regulation of lipid biosynthetic process	0.000924	APOA1,APOA4,APOB,APOC3,C3
negative regulation of multicellular organismal process	0.000924	AHSG,APOA1,APOC3,APOH,F2,FN1,HRG,KNG1,PGLYRP2,PLG,VTN
positive regulation of biological process	0.00118	AHSG,APOA1,APOA4,APOB,APOH,C3,C4A,CFB,CFH,CFHR1,CLU,F2,HBA2,HBB,HP,HPR,HPX,HRG,IgLL5,KNG1,LRG1,PGLYRP2,PLG,TF,VTN
cholesterol homeostasis	0.00142	APOA1,APOA4,APOB,APOC3
hydrogen peroxide catabolic process	0.00164	APOA4,HBA2,HBB
positive regulation of response to wounding	0.00173	APOH,C3,F2,PLG,VTN
immune system process	0.00175	APOA4,APOB,C3,C4A,CFB,CFH,CFHR1,CLU,F2,FN1,HP,IgLL5,PGLYRP2,TF,VTN
negative regulation of very-low-density lipoprotein particle remodeling	0.00184	APOA1,APOC3
plasma lipoprotein particle clearance	0.00184	APOA1,APOB,APOC3
fibrinolysis	0.00184	F2,HRG,PLG
regulation of metabolic process	0.00194	A2M,AHSG,AMBP,APOA1,APOA4,APOB,APOC3,APOH,CFB,CFH,CLU,F2,HBB,HBE1,HP,HPR,HPX,ITIH1,ITIH2,ITIH4,KNG1,PZP,SERPINA1,SERPINA3,SERPINC1,SERPIND1,TF,VTN
regulation of biological process	0.00196	A2M,AHSG,ALB,AMBP,APOA1,APOA4,APOB,APOC3,APOH,C3,C4A,CFB,CFH,CFHR1,CLU,F2,HBA2,HBB,HBE1,HP,HPR,HPX,IgLL5,ITIH1,ITIH2,ITIH4,KNG1,LRG1,PLG,PZP,SERPINA1,SERPINA3,SERPIND1,TF,VTN
retinoid metabolic process	0.00253	APOA1,APOA4,APOB,APOC3
regulation of multicellular organismal process	0.00278	AHSG,APOA1,APOA4,APOC3,APOH,C3,CLU,F2,HRG,KNG1,LRG1,PGLYRP2,PLG,SERPINC1,TF,VTN
regulation of Cdc42 protein signal transduction	0.00335	APOA1,APOC3
regulation of lipid metabolic process	0.00376	APOA1,APOA4,APOB,APOC3,C3,SERPINA3
regulation of cell-substrate adhesion	0.00427	APOA1,FN1,HRG,PLG,VTN
hyaluronan metabolic process	0.0045	ITIH1,ITIH2,ITIH4
triglyceride homeostasis	0.0049	APOA1,APOA4,APOC3
positive regulation of apoptotic cell clearance	0.00525	C3,C4A

regulation of fatty acid biosynthetic process	0.0058	APOA1,APOA4,APOC3
phototransduction, visible light	0.00615	APOA1,APOA4,APOB,APOC3
regulation of cellular metabolic process	0.0062	A2M,AHSG,AMBP,APOA1,APOA4,APOC3,C4A,CLU,F2,HBB,HBE1,HP,HPR,HPX,ITIH1,ITIH2,ITIH4,KNG1,PZP,SERPINA1,SERPINA3,SERPINC1,SERPIND1,TF,VTN
regulation of endocytosis	0.00692	AHSG,APOC3,C3,C4A,VTN
regulation of cellular process	0.00767	A2M,AHSG,ALB,AMBP,APOA1,APOA4,APOB,APOC3,APOH,C3,C4A,CLU,F2,HBA2,HBB,HBE1,HP,HPR,HPX,IPLL5,ITIH1,ITIH2,ITIH4,KNG1,LRG1,PLG,PZP,SERPINA1,SERPINA3,SERPINC1,SERPIND1,TF,VTN
positive regulation of cell-substrate adhesion	0.00793	APOA1,FN1,HRG,VTN
positive regulation of endocytosis	0.0082	AHSG,C3,C4A,VTN
chemical homeostasis	0.00889	APOA1,APOA4,APOB,APOC3,CP,F2,HPX,KNG1,TF
regulation of cholesterol transport	0.00907	APOA1,APOA4,APOC3
regulation of intestinal cholesterol absorption	0.00978	APOA1,APOA4
high-density lipoprotein particle assembly	0.00978	APOA1,APOA4
regulation of primary metabolic process	0.00978	A2M,AHSG,AMBP,APOA1,APOA4,APOB,APOC3,CFB,CFH,CLU,F2,HBE1,HPX,ITIH1,ITIH2,ITIH4,KNG1,PZP,SERPINA1,SERPINA3,SERPINC1,SERPIND1,TF,VTN
homeostatic process	0.0099	ALB,APOA1,APOA4,APOB,APOC3,CP,F2,HPX,KNG1,SERPINA3,TF
organic anion transport	0.0108	ALB,APOA1,APOA4,APOC3,HBA2,HBB
positive regulation of phagocytosis	0.0108	AHSG,C3,C4A
negative regulation of immune response	0.0109	A2M,AMBP,APOA1,PGLYRP2
positive regulation of cholesterol esterification	0.0124	APOA1,APOA4
positive regulation of triglyceride catabolic process	0.0124	APOA1,APOA4
steroid metabolic process	0.0156	ALB,APOA1,APOA4,APOB,GC
very-low-density lipoprotein particle assembly	0.0156	APOB,APOC3
innate immune response	0.016	APOA4,C3,C4A,CFB,CFH,CLU,IPLL5,PGLYRP2,VTN
very-low-density lipoprotein particle remodeling	0.0191	APOA1,APOA4
multicellular organismal process	0.0213	A2M,ALB,AMBP,APOA1,APOA4,APOB,APOC3,APOH,C3,CLU,F2,GC,HBD,HBE1,HBG1,HBG2,HRG,KNG1,PLG,PZP,SERPINA1,SERPINA3,SERPINC1,SERPIND1
regulation of localization	0.0227	AHSG,APOA1,APOA4,APOB,APOC3,APOH,C3,C4A,F2,FN1,HRG,KNG1,TF,VTN
regulation of macromolecule metabolic process	0.0229	A2M,AHSG,AMBP,APOA1,APOA4,APOB,CFB,CFH,CLU,F2,HBE1,HPX,ITIH1,ITIH2,ITIH4,KNG1,PZP,SERPINA1,SERPINA3,SERPINC1,SERPIND1,TF,VTN
regulation of reactive oxygen species metabolic process	0.0255	CLU,F2,HBB,HP

response to inorganic substance	0.0291	APOA4,APOB,C3,HBA2,HBB,HP
regulation of phosphorylation	0.0302	AHSG,AMBP,APOA1,CLU,F2,FN1,HPX,HRG,TF,VTN
protein metabolic process	0.0309	A2M,ALB,AMBP,APOA4,APOC3,APOH,C3,C4A,CFB,CFH,CFHR1,CLU,F2,FN1,HPX,IgLL5,KNG1,PLG,TF
positive regulation of humoral immune response	0.0357	C3,HPX
lipid metabolic process	0.0373	ALB,APOA1,APOA4,APOB,APOC3,APOH,C3,CLU,GC
immune response	0.0383	APOA4,C3,C4A,CFB,CFH,CFHR1,CLU,IgLL5,PGLYRP2,VTN
cellular iron ion homeostasis	0.0397	CP,HPX,TF
positive regulation of fatty acid biosynthetic process	0.0401	APOA1,APOA4
negative regulation of lipase activity	0.0401	APOA1,APOC3
glycosaminoglycan metabolic process	0.0406	ITIH1,ITIH2,ITIH4,PGLYRP2
response to external stimulus	0.0439	ALB,APOA4,APOC3,C4A,CLU,F2,GC,HP,HRG,PGLYRP2,SERPINC1,SERPIND1
positive regulation of multicellular organismal process	0.0445	APOH,C3,CLU,F2,FN1,HRG,KNG1,LRG1,PLG,TF

8. 8. Anexo 8

Tabela 1. Classificação das proteínas diferencialmente expressas obtidas da comparação entre “CTRL vs. FP maior” no momento de cura clínica, de acordo com suas funções moleculares. As classificações das proteínas foram analisadas pelo software STRING de acordo com as anotações depositadas da base de dados *Gene Ontology* (GO).

Molecular Function		
pathway description	false discovery rate	matching proteins in your network (labels)
endopeptidase inhibitor activity	3.43e-17	A2M,AHSG,AMBP,C3,C4A,HRG,ITIH1,ITIH2,ITIH4,KNG1,PZP,SERPINA1,SERPINA3,SERPINC1,SERPIND1
peptidase regulator activity	3.43e-17	A2M,AHSG,AMBP,C3,C4A,HRG,ITIH1,ITIH2,ITIH4,KNG1,PZP,SERPINA1,SERPINA3,SERPINC1,SERPIND1
enzyme inhibitor activity	2.97e-14	A2M,AMBP,APOA1,APOC3,C3,C4A,HRG,ITIH1,ITIH2,ITIH4,KNG1,PZP,SERPINA1,SERPINA3,SERPINC1,SERPIND1
serine-type endopeptidase inhibitor activity	1.11e-11	A2M,AMBP,ITIH1,ITIH2,ITIH4,PZP,SERPINA1,SERPINA3,SERPINC1,SERPIND1
enzyme regulator activity	2.03e-11	A2M,AMBP,APOA1,APOA4,APOC3,APOH,C3,C4A,HRG,ITIH1,ITIH2,ITIH4,KNG1,PZP,SERPINA1,SERPINA3,SERPINC1,SERPIND1
oxygen transporter activity	2.38e-10	HBA2,HBB,HBD,HBE1,HBG1,HBG2
glycosaminoglycan binding	1.15e-08	APOB,APOH,CFH,FN1,HRG,KNG1,PGLYRP2,SERPINC1,SERPIND1,VTN
heparin binding	2.42e-08	APOB,APOH,CFH,FN1,HRG,KNG1,SERPINC1,SERPIND1,VTN
heme binding	1.77e-07	AMBP,HBA2,HBB,HBD,HBE1,HBG1,HBG2,HRG
hemoglobin binding	1.5e-05	HBB,HP,HPR
oxygen binding	1.64e-05	HBA2,HBD,HBE1,HBG1,HBG2
iron ion binding	2.41e-05	HBA2,HBB,HBD,HBE1,HBG1,HBG2,TF
protein binding	6.12e-05	A2M,ALB,AMBP,APOA1,APOA4,APOB,APOC3,APOH,C3,C4A,CFB,CFH,CLU,CP,F2,FN1,GC,HBB,HP,HPR,HRG,KNG1,PLG,SERPINA1,SERPINC1,TF,VTN
receptor binding	0.0012	A2M,APOA1,APOB,APOC3,C3,F2,FN1,HRG,KNG1,PLG,TF,VTN
transporter activity	0.00134	APOA1,APOA4,APOB,GC,HBA2,HBB,HBD,HBE1,HBG1,HBG2,HPX,TF
cholesterol transporter activity	0.00147	APOA1,APOA4,APOB
transition metal ion binding	0.00269	ALB,APOA4,CP,HBA2,HBB,HBD,HBE1,HBG1,HBG2,HRG,KNG1,PGLYRP2,TF
lipoprotein particle receptor binding	0.00269	APOA1,APOB,APOC3
glycoprotein binding	0.00285	APOH,CFH,HRG,SERPINA1
high-density lipoprotein particle receptor binding	0.00285	APOA1,APOC3
antioxidant activity	0.00292	ALB,APOA4,HBB,HP
steroid binding	0.00672	APOA1,APOA4,APOC3,GC
protease binding	0.00747	A2M,FN1,SERPINA1,SERPINC1
substrate-specific transporter activity	0.00747	APOA1,APOA4,APOB,HBA2,HBB,HBD,HBE1,HBG1,HBG2,TF
alcohol binding	0.00917	APOA1,APOA4,APOC3,GC
lipid binding	0.0107	ALB,APOA1,APOA4,APOB,APOC3,APOH,C3,GC

heparan sulfate proteoglycan binding	0.0107	CFH,HRG
phosphatidylcholine-sterol O-acyltransferase activator activity	0.0107	APOA1,APOA4
cholesterol binding	0.0128	APOA1,APOA4,APOC3
immunoglobulin binding	0.0181	AMB,HRG
copper ion binding	0.0302	ALB,APOA4,CP
cysteine-type endopeptidase inhibitor activity	0.0348	AHSG,HRG,KNG1
chaperone binding	0.0397	ALB,CLU,CP
complement binding	0.045	C4A,CFB

8. 9. Anexo 9

Tabela 1. Classificação das proteínas diferencialmente expressas obtidas da comparação entre “CTRL vs. FP maior” no momento de cura clínica, de acordo com o componente celular. As classificações das proteínas foram analisadas pelo software STRING de acordo com as anotações depositadas da base de dados *Gene Ontology* (GO).

Cellular Component		
pathway description	false discovery rate	matching proteins in your network (labels)
blood microparticle	1.21e-73	A1BG,A2M,AHSG,ALB,AMBP,APOA1,APOA4,C3,C4A,CFB,CFH,CFHR1,CLU,CP,F2, FN1,GC,HBA2,HBD,HBE1,HBG1,HBG2,HP,HPR,HPX,HRG,IGLL5,ITIH1,ITIH2,ITIH4, KNG1,PLG,PZP,SERPINA3,SERPINC1,TF,VTN
extracellular space	2.35e-43	A1BG,A2M,AHSG,ALB,AMBP,APOA1,APOA4,APOB,APOC3,APOH,C3,C4A,CFB,CF H,CFHR1,CLU,CP,F2,FN1,GC,HBA2,HBD,HBE1,HBG1,HBG2,HP,HPR,HPX,HRG,IGL L5,ITIH1,ITIH2,ITIH4,KNG1,LRG1,PLG,PZP,SERPINA1,SERPINA3,SERPINC1,SERPI ND1,TF,VTN
extracellular exosome	1.64e-24	A1BG,A2M,AHSG,ALB,AMBP,APOA1,APOA4,APOB,APOC3,APOH,C3,C4A,CFB,CF H,CFHR1,CLU,CP,F2,FN1,GC,HBA2,HP,HPR,HPX,HRG,IGLL5,ITIH1,ITIH2,ITIH4,KN G1,LRG1,PGLYRP2,PLG,PZP,SERPINA1,SERPINA3,SERPINC1,SERPIND1,TF,VTN
extracellular region part	3.68e-24	A1BG,A2M,AHSG,ALB,AMBP,APOA1,APOA4,APOB,APOC3,APOH,C3,C4A,CFB,CF H,CFHR1,CLU,CP,F2,FN1,GC,HBA2,HBD,HBE1,HBG1,HBG2,HP,HPR,HPX,HRG,IGL L5,ITIH1,ITIH2,ITIH4,KNG1,LRG1,PGLYRP2,PLG,PZP,SERPINA1,SERPINA3,SERPI NC1,SERPIND1,TF
cytoplasmic membrane-bounded vesicle lumen	1.43e-22	A2M,ALB,APOA1,APOB,CLU,FN1,HBA2,HBB,HP,HPX,HRG,KNG1,PLG,SERPINA1,TF
extracellular region	2.87e-21	A1BG,A2M,AHSG,ALB,AMBP,APOA1,APOA4,APOB,APOC3,APOH,C3,C4A,CFB,CF H,CFHR1,CLU,CP,F2,FN1,GC,HBA2,HBD,HBE1,HBG1,HBG2,HP,HPR,HPX,HRG,IGL L5,ITIH1,ITIH2,ITIH4,KNG1,LRG1,PGLYRP2,PLG,PZP,SERPINA1,SERPINA3,SERPI NC1,SERPIND1,TF
secretory granule lumen	4.26e-14	A2M,ALB,APOA1,CLU,FN1,HRG,KNG1,PLG,SERPINA1,TF
platelet alpha granule lumen	2.9e-11	A2M,ALB,CLU,FN1,HRG,KNG1,PLG,SERPINA1
platelet alpha granule	1.68e-10	A2M,ALB,CLU,FN1,HRG,KNG1,PLG,SERPINA1
endocytic vesicle lumen	1.82e-10	APOA1,APOB,HBA2,HBB,HP,HPX
plasma lipoprotein particle	2.82e-10	APOA1,APOA4,APOB,APOC3,APOH,CLU,HPR
high-density lipoprotein particle	2.08e-09	APOA1,APOA4,APOC3,APOH,CLU,HPR
chylomicron	1.04e-08	APOA1,APOA4,APOB,APOC3,APOH
very-low-density lipoprotein particle	7.3e-08	APOA1,APOA4,APOB,APOC3,APOH
secretory granule spherical high-density lipoprotein particle	1.11e-07	A2M,ALB,APOA1,CLU,FN1,HRG,KNG1,PLG,SERPINA1,TF
hemoglobin complex	2.39e-07	HBD,HBE1,HBG1,HBG2
cytoplasmic membrane-	2.69e-07	A2M,ALB,APOA1,APOB,CLU,FN1,HBA2,HBB,HP,HPX,HRG,KNG1,PLG,SERPINA1,TF

bounded vesicle		
haptoglobin-hemoglobin complex	2.99e-06	HBA2,HBB,HP
endocytic vesicle	4.2e-05	APOA1,APOB,HBA2,HBB,HP,HPX,TF
intermediate-density lipoprotein particle	0.00298	APOB,APOC3
membrane-bounded organelle	0.00394	A1BG,A2M,AHSG,ALB,APOA1,APOA4,APOB,APOC3,APOH,C3,C4A,CFB,CFH,CFHR1,CLU,CP,F2,FN1,GC,HBA2,HP,HPR,HPX,HRG,IGLL5,ITIH1,ITIH2,ITIH4,KNR1,LRG1,PGLYRP2,PLG,PZP,SERPINA1,SERPINA3,SERPINC1,SERPIND1,TF,VTN
early endosome	0.0227	APOA1,APOA4,APOB,APOC3,TF

8. 10. Anexo 10

Tabela 1. Vias de sinalização significativamente enriquecidas identificadas enriquecimento funcional das proteínas diferencialmente expressas obtidas da comparação “CTRL vs. FP maior” no momento de cura clínica. As associações entre as proteínas de sinalização das reespectivas vias foram detectadas usando a ferramenta *Kyoto Encyclopedia at Genes and Genomes (KEEG)*.

KEEG-pathway		
pathway description	false discovery rate	matching proteins in your network (labels)
Complement and coagulation cascades	2.27e-15	A2M,C3,C4B,CFB,CFH,F2,KNG1,PLG,SERPINA1,SERPINC1,SERPIND1
Staphylococcus aureus infection	2.2e-05	C3,C4B,CFB,CFH,PLG
Vitamin digestion and absorption	0.00257	APOA1,APOA4,APOB
African trypanosomiasis	0.00511	APOA1,HBB,HPR
Fat digestion and absorption	0.00677	APOA1,APOA4,APOB

8. 11. Anexo 11

Tabela 1. Classificação das proteínas diferencialmente expressas obtidas da comparação entre “menor FP vs. maior FP” no momento de cura clínica, de acordo com sua participação em processos biológicos. As classificações das proteínas foram analisadas pelo software STRING de acordo com as anotações depositadas da base de dados *Gene Ontology* (GO).

Biological process		
pathway description	false discovery rate	matching proteins in your network (labels)
negative regulation of endopeptidase activity	1.16e-15	A2M,AGT,AHSG,AMBP,C3,C4A,ITIH1,ITIH2,ITIH4,KNG1,PZP,SERPINA1,SERPINA3,SERPIND1,VTN
negative regulation of hydrolase activity	1.16e-15	A2M,AGT,AHSG,AMBP,APOA1,APOC3,C3,C4A,ITIH1,ITIH2,ITIH4,KNG1,PZP,SERPINA1,SERPINA3,SERPIND1,VTN
protein activation cascade	1.38e-15	A2M,APOH,C3,C4A,CFB,CFH,CFHR1,CLU,F2,IgLL5,KNG1
negative regulation of proteolysis	2.89e-15	A2M,AGT,AHSG,AMBP,C3,C4A,F2,ITIH1,ITIH2,ITIH4,KNG1,PZP,SERPINA1,SERPINA3,SERPIND1,VTN
regulation of proteolysis	1.36e-11	A2M,AGT,AHSG,AMBP,CFB,CFH,CLU,F2,ITIH1,ITIH2,ITIH4,KNG1,PZP,SERPINA1,SERPINA3,SERPIND1,VTN
negative regulation of catalytic activity	4.9e-11	A2M,AGT,AMBP,APOA1,APOC3,C3,C4A,HP,ITIH1,ITIH2,ITIH4,KNG1,PZP,SERPINA1,SERPINA3,SERPIND1,VTN
negative regulation of protein metabolic process	8.58e-11	A2M,AGT,AHSG,AMBP,APOA4,C3,C4A,CLU,F2,ITIH1,ITIH2,ITIH4,KNG1,PZP,SERPINA1,SERPINA3,SERPIND1,VTN
regulation of response to wounding	1.28e-10	A2M,AGT,AHSG,APOA1,APOH,C4A,CFB,CFH,F2,KNG1,PGLYRP2,PLG,VTN
regulation of hydrolase activity	1.98e-09	A2M,AHSG,AMBP,APOA1,APOA4,APOC3,APOH,C3,C4A,ITIH1,ITIH2,ITIH4,KNG1,PZP,SERPINA1,SERPINA3,SERPIND1,VTN
complement activation	2.28e-09	C3,C4A,CFB,CFH,CFHR1,CLU,IgLL5
platelet degranulation	4.4e-09	A2M,ALB,APOA1,CLU,KNG1,PLG,SERPINA1,TF
vesicle-mediated transport	4.4e-09	A2M,AHSG,ALB,AMBP,APOA1,C4A,CLU,HBA2,HP,HPR,HPX,IgLL5,KNG1,PLG,SERPINA1,TF,VTN
regulation of response to stress	9.1e-09	A2M,AGT,AHSG,AMBP,APOA1,APOH,C4A,CFB,CFH,CLU,F2,HP,HPR,HPX,KNG1,PLG,TF,VTN
regulation of catalytic activity receptor-mediated endocytosis	1.62e-08	A2M,AGT,AMBP,APOA1,APOA4,APOC3,APOH,C3,C4A,CLU,HP,ITIH1,ITIH2,ITIH4,KNG1,PZP,SERPINA1,SERPINA3,SERPIND1,TF,VTN
regulation of protein metabolic process	6.9e-08	ALB,AMBP,APOA1,HBA2,HP,HPR,HPX,IgLL5,VTN
regulation of humoral immune response	8.69e-08	A2M,AGT,AHSG,AMBP,APOA1,APOA4,CFB,CFH,CLU,F2,HPX,ITIH1,ITIH2,ITIH4,KNG1,PZP,SERPINA1,SERPINA3,SERPIND1,TF,VTN
regulation of body fluid levels	9.86e-08	A2M,C4A,CFB,CFH,HPX,VTN
acute-phase response	1,00E-07	A2M,ALB,APOA1,APOH,C3,CLU,F2,GC,KNG1,PLG,SERPINA1,SERPIND1,TF
blood coagulation	1,00E-07	AHSG,F2,HP,ITIH4,SERPINA1,SERPINA3
negative regulation of metabolic process	1.1e-07	A2M,ALB,APOA1,APOH,C3,CLU,F2,KNG1,PLG,SERPINA1,SERPIND1,TF
regulation of response to external stimulus	1.25e-07	A2M,AGT,AHSG,AMBP,APOA1,APOA4,APOC3,C3,C4A,CLU,F2,HP,ITIH1,ITIH2,ITIH4,KNG1,PZP,SERPINA1,SERPINA3,SERPIND1,VTN
negative regulation of cellular metabolic process	1.26e-07	A2M,AGT,AHSG,APOA1,APOH,C4A,CFB,CFH,F2,HPR,KNG1,PGLYRP2,PLG,VTN
negative regulation of cellular process	1.94e-07	A2M,AGT,AHSG,ALB,AMBP,APOA1,APOA4,APOC3,APOH,C3,C4A,CLU,F2,HP,ITIH1,ITIH2,ITIH4,KNG1,PGLYRP2,PLG,PZP,SERPINA1,SERPINA3,SERPIND1,VTN
platelet activation	2.41e-07	A2M,ALB,APOA1,CLU,F2,KNG1,PLG,SERPINA1,TF

regulation of complement activation	3.44e-07	A2M,C4A,CFB,CFH,VTN
regulation of inflammatory response	3.74e-07	A2M,AGT,AHSG,APOA1,C4A,CFB,CFH,PGLYRP2,VTN
defense response	4.79e-07	AHSG,APOA4,C3,C4A,CFB,CFH,CLU,F2,HP,IGLL5,ITIH4,KNG1,PGLYRP2,SERPINA1,SERPINA3,VTN
endocytosis	5.05e-07	AHSG,ALB,AMBP,APOA1,C4A,HBA2,HP,HPR,HPX,IGLL5,VTN
response to stress	5.19e-07	A2M,AGT,AHSG,ALB,APOA4,APOH,C4A,CFB,CFH,CLU,F2,HBA2,HP,HPR,IGLL5,ITIH4,KNG1,PGLYRP2,PLG,SERPINA1,SERPINA3,SERPIND1,VTN
wound healing	9.19e-07	A2M,ALB,APOA1,APOH,C3,CLU,F2,KNG1,PLG,SERPINA1,SERPIND1,TF
regulation of cellular protein metabolic process	9.47e-07	A2M,AGT,AHSG,AMBP,APOA1,C4A,CLU,F2,HPX,ITIH1,ITIH2,ITIH4,KNG1,PZP,SERPINA1,SERPINA3,SERPIND1,TF,VTN
regulation of response to stimulus	1.81e-06	A2M,AGT,AHSG,AMBP,APOA1,APOC3,APOH,C3,C4A,CFB,CFH,CFHR1,CLU,F2,HP,HPR,HPX,IGLL5,KNG1,PLG,TF,VTN
positive regulation of response to stimulus	3.49e-06	AGT,APOA1,APOH,C3,C4A,CFB,CFH,CFHR1,CLU,F2,HPR,HPX,IGLL5,PGLYRP2,PLG,TF,VTN
regulation of immune response	4.37e-06	A2M,AMBP,APOA1,C3,C4A,CFB,CFH,CFHR1,CLU,HPX,IGLL5,VTN
regulation of lipoprotein lipase activity	6.99e-06	APOA1,APOA4,APOC3,APOH
negative regulation of blood coagulation	7.82e-06	APOH,F2,KNG1,PLG,VTN
reverse cholesterol transport	8.6e-06	APOA1,APOA4,APOC3,CLU
blood coagulation, intrinsic pathway	1.04e-05	A2M,APOH,F2,KNG1
regulation of biological quality	1.04e-05	A2M,AGT,ALB,APOA1,APOA4,APOC3,APOH,C3,CLU,CP,F2,GC,HPX,KNG1,PLG,SERPINA1,SERPINA3,SERPIND1,TF,TTR
regulation of immune effector process	1.07e-05	A2M,APOA1,C4A,CFB,CFH,HPR,HPX,PGLYRP2,VTN
transport	1.45e-05	A2M,AGT,AHSG,ALB,AMBP,APOA1,APOA4,APOC3,APOH,C4A,CLU,CP,HBA2,HP,HPR,HPX,IGLL5,KNG1,PLG,SERPINA1,VTN
response to stimulus	1.72e-05	A2M,AGT,AHSG,ALB,APOA1,APOA4,APOC3,APOH,C3,C4A,CFB,CFH,CFHR1,CLU,F2,GC,HBA2,HP,HPR,IGLL5,ITIH4,KNG1,PGLYRP2,PLG,SERPINA1,SERPINA3,SERPIND1,TTR,VTN
inflammatory response	1.81e-05	AHSG,C3,C4A,F2,HP,ITIH4,KNG1,SERPINA1,SERPINA3
response to wounding	2.06e-05	A2M,ALB,APOH,C3,CLU,F2,KNG1,PLG,SERPINA1,SERPIND1,TF
secretion	2.06e-05	A2M,AGT,ALB,APOA1,CLU,GC,KNG1,PLG,SERPINA1,TF
plasma lipoprotein particle remodeling	2.91e-05	AGT,APOA1,APOA4,APOC3
regulation of biological process	3.18e-05	A2M,AGT,AHSG,ALB,AMBP,APOA1,APOA4,APOC3,APOH,C3,C4A,CFB,CFH,CFHR1,CLU,F2,HBA2,HP,HPR,HPX,IGLL5,ITIH1,ITIH2,ITIH4,KNG1,PLG,PZP,SERPINA1,SERPINA3,SERPIND1,TF,TTR,VTN
cell activation	3.32e-05	A2M,AGT,ALB,APOA1,CLU,F2,KNG1,PLG,SERPINA1,TF
blood coagulation, fibrin clot formation	3.32e-05	A2M,APOH,F2,KNG1
secretion by cell	3.93e-05	A2M,AGT,ALB,APOA1,CLU,KNG1,PLG,SERPINA1,TF
positive regulation of response to wounding	4.15e-05	AGT,APOH,C3,F2,PLG,VTN
negative regulation of response to stimulus	6.36e-05	A2M,AGT,AHSG,AMBP,APOA1,APOH,CLU,F2,HP,KNG1,PGLYRP2,PLG,VTN
complement activation, classical pathway	6.56e-05	C3,C4A,CLU,IGLL5
positive regulation of cholesterol esterification	7.31e-05	AGT,APOA1,APOA4
negative regulation of response to wounding	7.31e-05	APOA1,APOH,F2,KNG1,PLG,VTN
regulation of fatty acid biosynthetic process	8.26e-05	AGT,APOA1,APOA4,APOC3

regulation of immune system process	8.44e-05	A2M,AMBP,APOA1,C3,C4A,CFB,CFH,CFHR1,CLU,HPR,HPX,IgLL5,VTN
regulation of triglyceride metabolic process	9.05e-05	APOA1,APOA4,APOC3,C3
humoral immune response mediated by circulating immunoglobulin	9.75e-05	C3,C4A,CLU,IgLL5
localization	9.75e-05	A2M,AGT,AHSG,ALB,AMBP,APOA1,APOA4,APOC3,APOH,C4A,CLU,CP,F2,HBA2,HP,HPR,HPX,IgLL5,KNG1,PLG,SERPINA1,VTN
negative regulation of fibrinolysis	9.75e-05	APOH,F2,PLG
positive regulation of immune response	0.000105	C3,C4A,CFB,CFH,CFHR1,CLU,HPX,IgLL5,PGLYRP2
regulation of defense response	0.000108	A2M,AGT,AHSG,APOA1,C4A,CFB,CFH,HPR,HPX,VTN
activation of immune response	0.000165	C3,C4A,CFB,CFH,CFHR1,CLU,IgLL5,PGLYRP2
positive regulation of lipoprotein lipase activity	0.000177	APOA1,APOA4,APOH
regulation of triglyceride catabolic process	0.000231	APOA1,APOA4,APOC3
positive regulation of wound healing	0.00025	APOH,F2,PLG,VTN
single-organism metabolic process	0.000266	A2M,ALB,AMBP,APOA1,APOA4,APOC3,APOH,C3,C4A,CFB,CFH,CFHR1,CLU,CP,F2,GC,HBA2,HPX,IgLL5,KNG1,TF
regulation of plasma lipoprotein particle levels	0.000266	AGT,APOA1,APOA4,APOC3
complement activation, alternative pathway	0.000282	C3,CFB,CFH
biological regulation	0.000286	A2M,AGT,AHSG,ALB,AMBP,APOA1,APOA4,APOC3,APOH,C3,C4A,CFB,CFH,CFHR1,CLU,CP,F2,GC,HBA2,HP,HPR,IgLL5,ITIH1,ITIH2,ITIH4,KNG1,PLG,PZP,SERPINA1,SERPINA3,SERPIND1,VTN
high-density lipoprotein particle remodeling	0.000348	APOA1,APOA4,APOC3
regulation of lipid biosynthetic process	0.000388	AGT,APOA1,APOA4,APOC3,C3
phospholipid efflux	0.000423	APOA1,APOA4,APOC3
positive regulation of fatty acid biosynthetic process	0.000423	AGT,APOA1,APOA4
single-organism transport	0.000477	A2M,AGT,ALB,APOA1,APOA4,APOC3,APOH,C4A,CLU,CP,HBA2,HPX,IgLL5,KNG1,PLG,SERPINA1,TTR
plasma lipoprotein particle assembly	0.000614	APOA1,APOA4,APOC3
lipid transport	0.000659	ALB,APOA1,APOA4,APOC3,APOH,CLU
organic hydroxy compound transport	0.000724	ALB,APOA1,APOA4,APOC3,CLU
negative regulation of response to external stimulus	0.000753	APOA1,APOH,F2,KNG1,PLG,VTN
regulation of metabolic process	0.000809	A2M,AGT,AHSG,AMBP,APOA1,APOA4,APOC3,APOH,CFB,CFH,CLU,F2,HP,HPR,HPX,ITIH1,ITIH2,ITIH4,KNG1,PZP,SERPINA1,SERPINA3,SERPIND1,TF,VTN
negative regulation of multicellular organismal process	0.000938	AGT,AHSG,APOA1,APOC3,APOH,F2,KNG1,PGLYRP2,PLG,VTN
positive regulation of biological process	0.000956	AGT,AHSG,APOA1,APOA4,APOH,C3,C4A,CFB,CFH,CFHR1,CLU,F2,HBA2,HP,HPR,HPX,IgLL5,KNG1,PGLYRP2,PLG,TF,VTN
regulation of cellular process	0.000956	A2M,AGT,AHSG,ALB,AMBP,APOA1,APOA4,APOC3,APOH,C3,C4A,CLU,F2,HBA2,HP,HPR,HPX,IgLL5,ITIH1,ITIH2,ITIH4,KNG1,PLG,PZP,SERPINA1,SERPINA3,SERPIND1,TF,TTR,VTN
lipid localization	0.00106	ALB,APOA1,APOA4,APOC3,APOH,CLU
negative regulation of very-low-density lipoprotein particle remodeling	0.00129	APOA1,APOC3

regulation of cellular metabolic process	0.00132	A2M,AGT,AHSG,AMBP,APOA1,APOA4,APOC3,C4A,CLU,F2,HP,HPR,HPX,ITIH1,ITIH2,ITIH4,KNG1,PZP,SERPINA1,SERPINA3,SERPIND1,TF,VTN
regulation of lipid metabolic process	0.00133	AGT,APOA1,APOA4,APOC3,C3,SERPINA3
homeostatic process	0.00176	AGT,ALB,APOA1,APOA4,APOC3,CP,F2,HPX,KNG1,SERPINA3,TF
chemical homeostasis	0.00204	AGT,APOA1,APOA4,APOC3,CP,F2,HPX,KNG1,TF
cholesterol efflux	0.00214	APOA1,APOA4,APOC3
regulation of Cdc42 protein signal transduction	0.00234	APOA1,APOC3
hyaluronan metabolic process	0.00259	ITIH1,ITIH2,ITIH4
regulation of primary metabolic process	0.00259	A2M,AGT,AHSG,AMBP,APOA1,APOA4,APOC3,CFB,CFH,CLU,F2,HPX,ITIH1,ITIH2,ITIH4,KNG1,PZP,SERPINA1,SERPINA3,SERPIND1,TF,VTN
triglyceride catabolic process	0.0028	APOA1,APOA4,APOC3
triglyceride homeostasis	0.0028	APOA1,APOA4,APOC3
regulation of endocytosis	0.00282	AHSG,APOC3,C3,C4A,VTN
immune system process	0.00294	APOA4,C3,C4A,CFB,CFH,CFHR1,CLU,F2,HP,IgLL5,PGLYRP2,TF,VTN
phototransduction, visible light	0.00294	APOA1,APOA4,APOC3,TTR
positive regulation of lipase activity	0.00357	AGT,APOA1,APOA4,APOH
positive regulation of apoptotic cell clearance	0.00357	C3,C4A
regulation of multicellular organismal process	0.00359	AGT,AHSG,APOA1,APOA4,APOC3,APOH,C3,CLU,F2,KNG1,PGLYRP2,PLG,TF,VTN
innate immune response	0.00383	APOA4,C3,C4A,CFB,CFH,CLU,IgLL5,PGLYRP2,VTN
positive regulation of endocytosis	0.00392	AHSG,C3,C4A,VTN
triglyceride metabolic process	0.00405	APOA1,APOA4,APOC3,APOH
regulation of cholesterol transport	0.00508	APOA1,APOA4,APOC3
ion homeostasis	0.00534	AGT,APOA1,CP,F2,HPX,KNG1,TF
negative regulation of immune response	0.00535	A2M,AMBP,APOA1,PGLYRP2
regulation of lipase activity	0.00568	AGT,APOA4,APOC3,APOH
protein metabolic process	0.00581	A2M,ALB,AMBP,APOA4,APOC3,APOH,C3,C4A,CFB,CFH,CFHR1,CLU,F2,HPX,IgLL5,KNG1,PLG,TF
positive regulation of phagocytosis	0.00613	AHSG,C3,C4A
regulation of intestinal cholesterol absorption	0.00648	APOA1,APOA4
high-density lipoprotein particle assembly	0.00648	APOA1,APOA4
cellular metal ion homeostasis	0.00673	AGT,CP,F2,HPX,KNG1,TF
response to external stimulus	0.00684	AGT,ALB,APOA4,APOC3,C4A,CLU,F2,GC,HP,PGLYRP2,SERPIND1,TTR
immune response	0.00775	APOA4,C3,C4A,CFB,CFH,CFHR1,CLU,IgLL5,PGLYRP2,VTN
positive regulation of triglyceride catabolic process	0.00834	APOA1,APOA4
lipid metabolic process	0.00861	AGT,ALB,APOA1,APOA4,APOC3,APOH,C3,CLU,GC
regulation of intracellular signal transduction	0.0115	A2M,AGT,AMBP,APOA1,APOC3,C3,CLU,F2,HPX,TF
regulation of reactive oxygen species metabolic process	0.0122	AGT,CLU,F2,HP

very-low-density lipoprotein particle remodeling	0.0128	APOA1,APOA4
positive regulation of homeostatic process	0.0148	AGT,F2,KNG1,TF
cholesterol homeostasis	0.0161	APOA1,APOA4,APOC3
glycosaminoglycan metabolic process	0.0198	ITIH1,ITIH2,ITIH4,PGLYRP2
positive regulation of renal sodium excretion	0.0209	AGT,KNG1
cellular iron ion homeostasis	0.0226	CP,HPX,TF
positive regulation of humoral immune response	0.0239	C3,HPX
retinoid metabolic process	0.0251	APOA1,APOA4,APOC3
female pregnancy	0.0251	AGT,AMBP,GC,PZP
regulation of phosphorylation	0.0265	AGT,AHSG,AMBP,APOA1,CLU,F2,HPX,TF,VTN
negative regulation of lipase activity	0.0266	APOA1,APOC3
organic substance transport	0.0266	AGT,ALB,APOA1,APOA4,APOC3,APOH,CLU,HBA2,HPX,TF,TTR
organic anion transport	0.0301	ALB,APOA1,APOA4,APOC3,HBA2
positive regulation of reactive oxygen species metabolic process	0.0315	AGT,CLU,F2
regulation of localization	0.0337	AGT,AHSG,APOA1,APOA4,APOC3,APOH,C3,C4A,F2,KNG1,TF,VTN
extracellular matrix organization	0.036	A2M,AGT,PLG,TTR,VTN
positive regulation of intracellular signal transduction	0.0439	AGT,APOA1,C3,CLU,F2,HPX,TF
negative regulation of immune effector process	0.0445	A2M,APOA1,PGLYRP2
hydrogen peroxide catabolic process	0.0445	APOA4,HBA2
detection of external biotic stimulus	0.0445	C4A,PGLYRP2
plasma lipoprotein particle clearance	0.0476	APOA1,APOC3
fibrinolysis	0.0476	F2,PLG
ERK1 and ERK2 cascade	0.0476	AGT,TF

Idéias legendas

8. 12. Anexo 12

Tabela 1. Classificação das proteínas diferencialmente expressas obtidas da comparação entre “FP menor vs. FP maior” no momento de cura clínica, de acordo com suas funções moleculares. As classificações das proteínas foram analisadas pelo software STRING de acordo com as anotações depositadas da base de dados *Gene Ontology* (GO).

Molecular Function		
pathway description	false discovery rate	matching proteins in your network (labels)
endopeptidase inhibitor activity	1.03e-16	A2M,AGT,AHSG,AMBP,C3,C4A,ITIH1,ITIH2,ITIH4,KNG1,PZP,SERPINA1,SERPINA3,SERPIND1
enzyme inhibitor activity	2.83e-14	A2M,AGT,AMBP,APOA1,APOC3,C3,C4A,ITIH1,ITIH2,ITIH4,KNG1,PZP,SERPINA1,SERPINA3,SERPIND1
serine-type endopeptidase inhibitor activity	1.25e-12	A2M,AGT,AMBP,ITIH1,ITIH2,ITIH4,PZP,SERPINA1,SERPINA3,SERPIND1
enzyme regulator activity	8.22e-11	A2M,AGT,AMBP,APOA1,APOA4,APOC3,APOH,C3,C4A,ITIH1,ITIH2,ITIH4,KNG1,PZP,SERPINA1,SERPINA3,SERPIND1
protein binding	7.37e-05	A2M,AGT,ALB,AMBP,APOA1,APOA4,APOC3,APOH,C3,C4A,CFB,CFH,CLU,CP,F2,GC,HP,HPR,KNG1,PLG,SERPINA1,TF,TTR,VTN
glycosaminoglycan binding	0.000837	APOH,CFH,KNG1,PGLYRP2,SERPIND1,VTN
heparin binding	0.00368	APOH,CFH,KNG1,SERPIND1,VTN
high-density lipoprotein particle receptor binding	0.00403	APOA1,APOC3
steroid binding	0.00654	APOA1,APOA4,APOC3,GC
hemoglobin binding	0.00689	HP,HPR
receptor binding	0.00789	A2M,AGT,APOA1,APOC3,C3,F2,KNG1,PLG,TF,VTN
alcohol binding	0.00805	APOA1,APOA4,APOC3,GC
cholesterol binding	0.013	APOA1,APOA4,APOC3
phosphatidylcholine-sterol O-acyltransferase activator activity	0.013	APOA1,APOA4
copper ion binding	0.0299	ALB,APOA4,CP
lipid binding	0.0299	ALB,APOA1,APOA4,APOC3,APOH,C3,GC
chaperone binding	0.0382	ALB,CLU,CP
complement binding	0.0477	C4A,CFB
glycoprotein binding	0.0477	APOH,CFH,SERPINA1
antioxidant activity	0.0477	ALB,APOA4,HP

8. 13. Anexo 13

Tabela 1. Classificação das proteínas diferencialmente expressas obtidas da comparação entre “FP menor vs. FP maior” no momento de cura clínica, de acordo com o componente celular. As classificações das proteínas foram analisadas pelo software STRING de acordo com as anotações depositadas da base de dados *Gene Ontology* (GO).

Cellular component		
pathway description	false discovery rate	matching proteins in your network (labels)
blood microparticle	1.93e-61	A1BG,A2M,AGT,AHSG,ALB,AMB,P,APOA1,APOA4,C3,C4A,CFB,CFH,CFHR1,CLU,CP,F2,GC,HBA2,HP,HPR,HPX,IgLL5,ITIH1,ITIH2,ITIH4,KNG1,PLG,PZP,SERPINA3,TF,VTN
extracellular space	1.07e-36	A1BG,A2M,AGT,AHSG,ALB,AMB,P,APOA1,APOA4,APOC3,APOH,C3,C4A,CFB,CFH,CFHR1,CLU,CP,F2,GC,HBA2,HP,HPR,HPX,IgLL5,ITIH1,ITIH2,ITIH4,KNG1,PLG,PZP,SERPINA1,SERPINA3,SERPIND1,TF,TTR,VTN
extracellular exosome	1.73e-26	A1BG,A2M,AGT,AHSG,ALB,AMB,P,APOA1,APOA4,APOC3,APOH,C3,C4A,CFB,CFH,CFHR1,CLU,CP,F2,GC,HBA2,HP,HPR,HPX,IgLL5,ITIH1,ITIH2,ITIH4,KNG1,PGLYRP2,PLG,PZP,SERPINA1,SERPINA3,SERPIND1,TF,TTR,VTN
extracellular region part	8.24e-21	A1BG,A2M,AGT,AHSG,ALB,AMB,P,APOA1,APOA4,APOC3,APOH,C3,C4A,CFB,CFH,CFHR1,CLU,CP,F2,GC,HBA2,HP,HPR,HPX,IgLL5,ITIH1,ITIH2,ITIH4,KNG1,PGLYRP2,PLG,PZP,SERPINA1,SERPINA3,SERPIND1,TF,TTR
extracellular region	2.93e-18	A1BG,A2M,AGT,AHSG,ALB,AMB,P,APOA1,APOA4,APOC3,APOH,C3,C4A,CFB,CFH,CFHR1,CLU,CP,F2,GC,HBA2,HP,HPR,HPX,IgLL5,ITIH1,ITIH2,ITIH4,KNG1,PGLYRP2,PLG,PZP,SERPINA1,SERPINA3,SERPIND1,TF,TTR
cytoplasmic membrane-bounded vesicle lumen	1.05e-15	A2M,ALB,APOA1,CLU,HBA2,HP,HPX,KNG1,PLG,SERPINA1,TF
secretory granule lumen	5.66e-11	A2M,ALB,APOA1,CLU,KNG1,PLG,SERPINA1,TF
high-density lipoprotein particle	8.9e-10	APOA1,APOA4,APOC3,APOH,CLU,HPR
platelet alpha granule lumen	4.64e-08	A2M,ALB,CLU,KNG1,PLG,SERPINA1
spherical high-density lipoprotein particle	8.32e-08	APOA1,APOC3,CLU,HPR
platelet alpha granule	1.67e-07	A2M,ALB,CLU,KNG1,PLG,SERPINA1
chylomicron	1.02e-06	APOA1,APOA4,APOC3,APOH
endocytic vesicle lumen	2.31e-06	APOA1,HBA2,HP,HPX
very-low-density lipoprotein particle	4.3e-06	APOA1,APOA4,APOC3,APOH
secretory granule	5.78e-06	A2M,ALB,APOA1,CLU,KNG1,PLG,SERPINA1,TF
membrane-bounded organelle	4.4e-05	A1BG,A2M,AGT,AHSG,ALB,APOA1,APOA4,APOC3,APOH,C3,C4A,CFB,CFH,CFHR1,CLU,CP,F2,GC,HBA2,HP,HPR,HPX,IgLL5,ITIH1,ITIH2,ITIH4,KNG1,PGLYRP2,PLG,PZP,SERPINA1,SERPINA3,SERPIND1,TF,TTR,VTN
cytoplasmic membrane-bounded vesicle	0.000108	A2M,ALB,APOA1,CLU,HBA2,HP,HPX,KNG1,PLG,SERPINA1,TF
haptoglobin-hemoglobin complex	0.00124	HBA2,HP

endocytic vesicle	0.00322	APOA1,HBA2,HP,HPX,TF
-------------------	---------	----------------------

8. 14. Anexo 14

Tabela 1. Vias de sinalização significativamente enriquecidas identificadas enriquecimento funcional das proteínas diferencialmente expressas obtidas da comparação “FP menor FP vs. FP maior” no momento de cura clínica. As associações entre as proteínas de sinalização das reespectivas vias foram detectadas usando a ferramenta *Kyoto Encyclopedia at Genes and Genomes* (KEEG).

KEEG- Pathway		
pathway description	false discovery rate	matching proteins in your network (labels)
Complement and coagulation cascades	2.45e-14	A2M,C3,C4B,CFB,CFH,F2,KNG1,PLG,SERPINA1,SERPIND1
Staphylococcus aureus infection	7.91e-06	C3,C4B,CFB,CFH,PLG

8. 15. Anexo 15

FP menor- Redes regulatórias

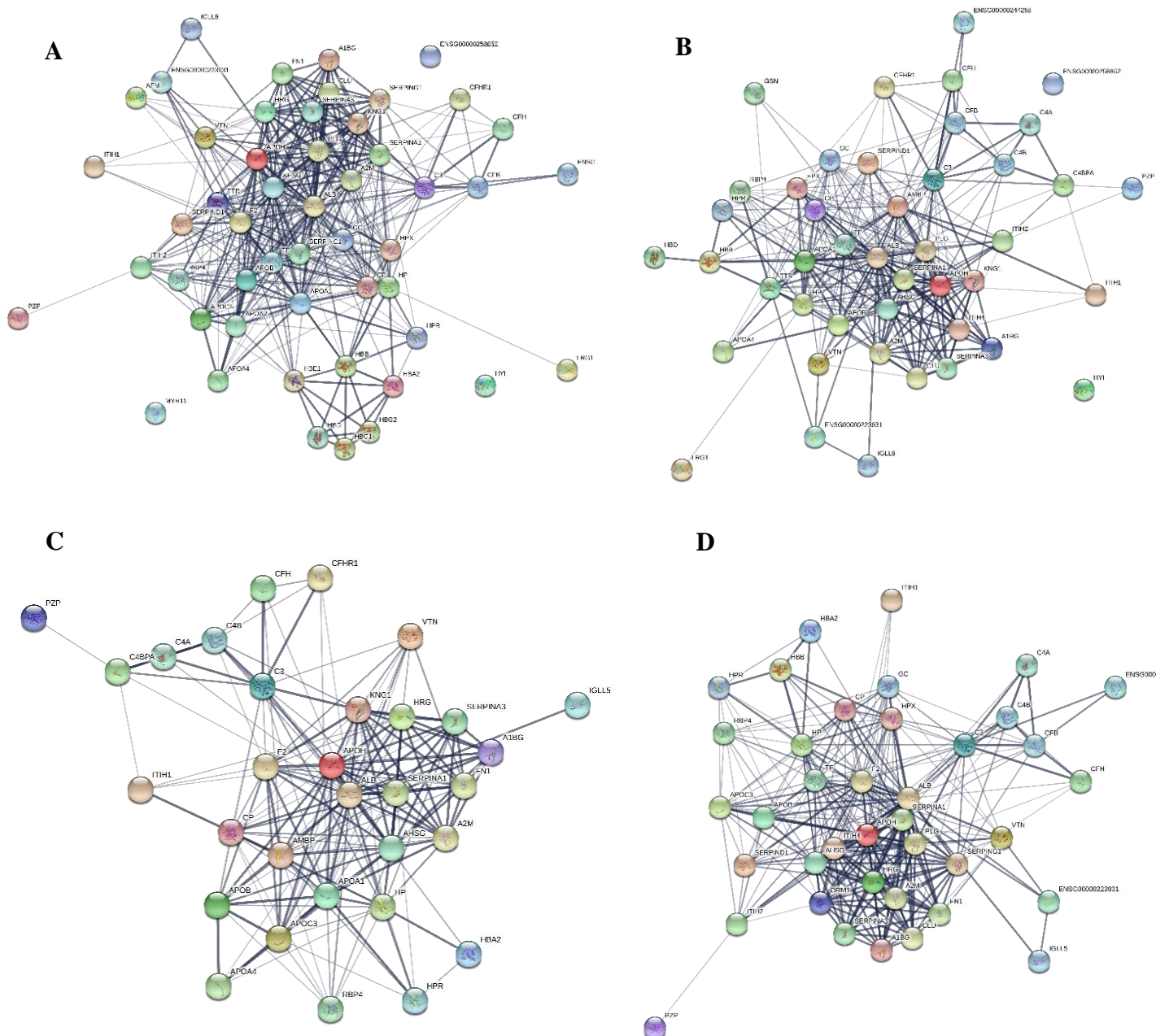


Figura 1. Rede regulatória de interação entre proteínas diferencialmente expressas associadas a menor fibrose pulmonar. Linhas mais grossas representam associações mais fortes. **A:** Grupo controle comparado ao momento anterior ao tratamento; **B:** momento anterior ao tratamento comparado a cura clínica; **C:** Momento de cura clínica comparada a cura sorológica. **D:** momento de cura sorológica comparada a cura aparente.

8. 16. Anexo 16

FP maior- Redes regulatórias

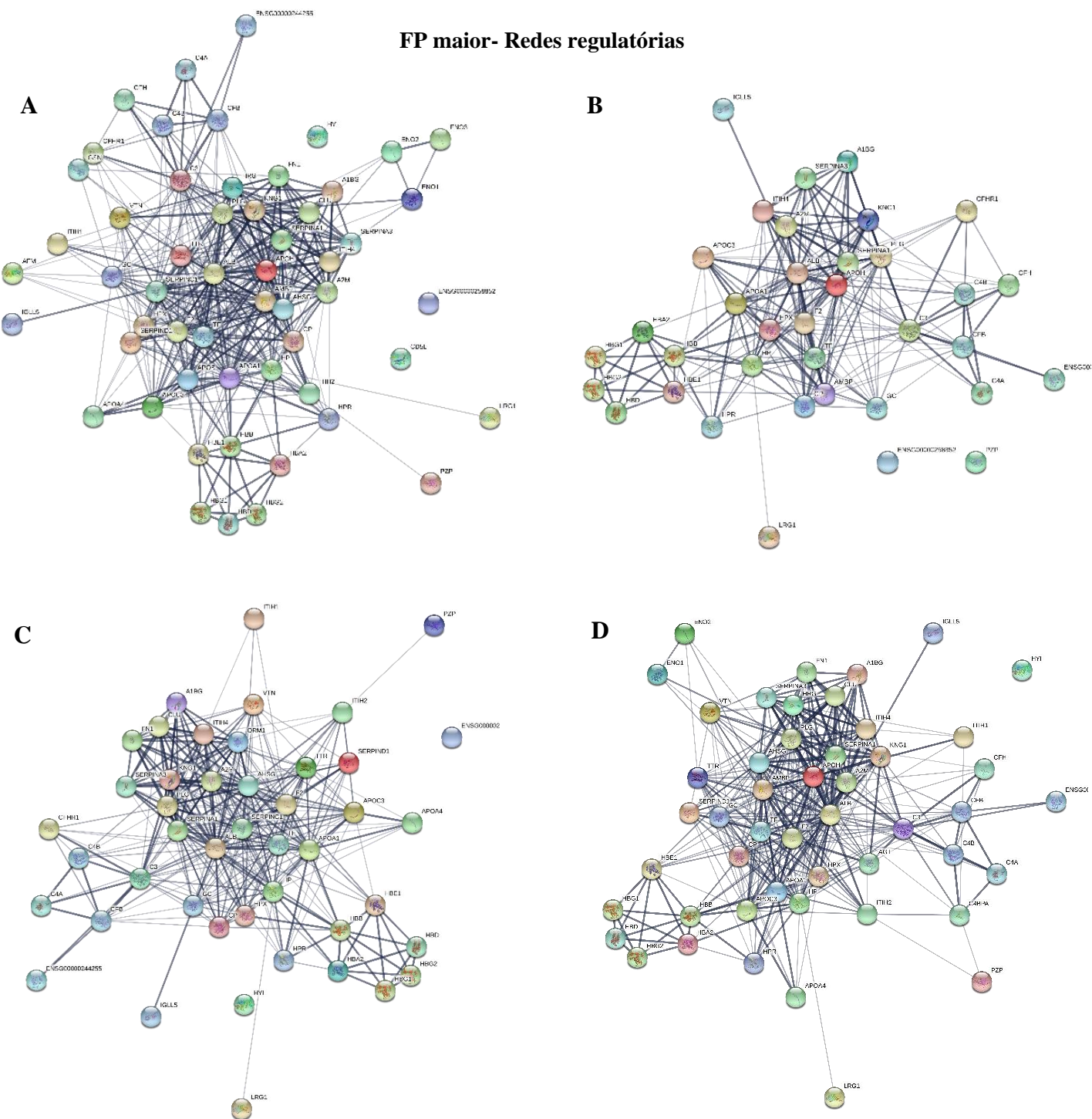


Figura 1. Rede regulatória de interação entre proteínas diferencialmente expressas associadas a maior fibrose pulmonar. Linhas mais grossas representam associações mais fortes. **A:** Grupo controle comparado ao momento anterior ao tratamento; **B:** momento anterior ao tratamento comparado a cura clínica; **C.** Momento de cura clínica comparada a cura sorológica. **D:** momento de cura sorológica comparada a cura aparente.