

Estado de la publicación: No informado por el autor que envía

IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS QUE PERMITAN DISTINGUIR SUJETOS CON Y SIN ESTOMATITIS AFTOSA RECURRENTE

Angela Paz Vergara Pérez, César Andrés Rivera Martínez, Paola Andrea Camargo Ayala

<https://doi.org/10.1590/SciELOPreprints.5009>

Enviado en: 2022-11-04

Postado en: 2022-11-08 (versión 1)

(AAAA-MM-DD)

Identification of proteins that allow to distinguish subjects with and without Recurrent Aphthous Stomatitis

Angela Vergara-Pérez¹, Paola Andrea Camargo-Ayala², César Rivera¹

1 Departamento de Estomatología, Facultad de Odontología, Universidad de Talca, Talca, Chile. 2 Departamento de Ciencias Básicas Biomédicas, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad de Talca, Talca, Chile.

Angela Vergara-Pérez vergara.perez.angela@gmail.com

ORCID 0000-0003-0001-3541

Paola Andrea Camargo-Ayala andreacamargo91@hotmail.com

ORCID 0000-0002-5066-8370

César Rivera cerivera@utalca.cl

ORCID 0000-0002-5491-4233

Correspondencia: Dr. César Rivera, DDS, MSc, PhD, Departamento de Estomatología, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad de Talca Campus Norte, Edificio de Ciencias Biomédicas, Avenida Lircay S/N, Oficina 8, Talca, Región del Maule 3460000, Chile. Tel +56 71 2418855. Fax +56 71 2418855. Email cerivera@utalca.cl.

RESUMEN

La estomatitis aftosa recurrente es la enfermedad más común de la mucosa oral. Actualmente las alternativas terapéuticas son sólo paliativas y limitadas, debido a la escasa comprensión del proceso etiopatogénico. El objetivo de este estudio es identificar proteínas que permitan distinguir entre grupos de sujetos con y sin estomatitis aftosa recurrente, para comprender los procesos que controlan los estados de salud y enfermedad. En este estudio de casos y controles, evaluamos mediante proteómica basada en espectrometría de masas la saliva de controles sanos y pacientes con estomatitis aftosa recurrente durante la presencia y ausencia de lesiones. Cuantificamos las proteínas, utilizando los recuentos espectrales informados por PEAKS Studio X+, y preparamos una base de datos utilizando SPSS. Determinamos las proteínas expresadas diferencialmente entre los grupos con el software Perseus mediante un análisis de ANOVA y un agrupamiento jerárquico. La proteína factor de transcripción

dependiente de AMP cíclico salival ATF-6 beta (ATF6B), destaca con un mejor perfil de clasificación, por lo que su presencia permite distinguir entre la presencia y ausencia de lesiones ulcerosas en pacientes con y sin estomatitis aftosa recurrente. Nuestro análisis reveló que ATF6B está relacionada con la respuesta al estrés del retículo endoplásmico en los queratinocitos orales. Desde una perspectiva clínica, sugerimos que esta proteína está relacionada con varios procesos biológicos principalmente referentes con una respuesta anti-muerte celular, determinada por el estrés del retículo endoplásmico que podría ser la causa del daño que resulta en la liberación de este marcador al medio oral.

Palabras clave: estomatitis aftosa recurrente, proteómica, estrés del retículo endoplásmico

ABSTRACT

Recurrent aphthous stomatitis (RAS) is the most common ulcerative disease of the oral mucosa. Currently, the therapeutic alternatives are only palliative and limited, due to a poor understanding of the etiopathogenic process. The objective of this study is to identify proteins that allow distinguishing between groups of subjects with and without Recurrent Aphthous Stomatitis, to understand the processes that control health and disease states. In this case-control study, we evaluated by means of proteomics based on mass spectrometry the saliva of healthy controls and patients with recurrent aphthous stomatitis during the presence and absence of lesions. We quantified the proteins, using the spectral counts reported by PEAKS Studio X+, and we prepared a database using SPSS statistics. We determined the differentially expressed proteins between the conditions with Perseus software using ANOVA analysis and hierarchical clustering. The salivary cyclic AMP-dependent transcription factor protein ATF-6 beta (ATF6B), stands out with a better classification profile, so its presence allows us to distinguish between the presence and absence of ulcerative lesions in patients with and without recurrent aphthous stomatitis. Our analysis revealed that ATF6B is related to the endoplasmic reticulum stress response in oral keratinocytes. From a clinical perspective, we suggest that this protein is related to several biological processes, mainly related to an anti-cell death response, determined by the stress of the endoplasmic reticulum, which could be the cause of the damage that results in the release of this marker into the oral environment.

Keywords: recurrent aphthous stomatitis; proteomics; endoplasmic reticulum stress

INTRODUCCIÓN

La estomatitis aftosa recurrente (RAS) es la afección ulcerosa más común de la mucosa oral (1). Sus manifestaciones clínicas se caracterizan por episodios recurrentes de úlceras dolorosas solitarias o múltiples sin asociación con una condición sistémica (2). Las lesiones de la RAS son autolimitadas, pueden persistir durante 2 semanas, con episodios recurrentes entre 1 y 4 meses (3).

Actualmente las alternativas terapéuticas son sólo paliativas y limitadas (4,5). No existe tratamiento curativo ni preventivo eficaz para estas lesiones debido a la escasa comprensión del proceso etiopatogénico (6). Por esta razón se hace necesario comprender la enfermedad a través de la identificación de proteínas, con potencial de biomarcador que permitan caracterizar a las poblaciones (1,7). Debido a que las proteínas intervienen en prácticamente todos los procesos y ejercen una diversidad casi inagotable de funciones (8).

La saliva es la fuente ideal para localizar y evaluar perfiles completos de proteínas, dado que un gran porcentaje de las proteínas humanas se expresan en las glándulas salivales (9,10). Además, contiene un conjunto de biomoléculas que recubren estructuras orales y está en íntimo contacto con las úlceras. Su recolección no es invasiva y no tiene complicaciones asociadas en comparación con la biopsia incisional o excisional (11). Por lo que, actualmente el proteoma salival permite monitorear enfermedades bucales de distinta índole (12,13).

Teniendo en cuenta estos antecedentes, el objetivo de este estudio fue caracterizar el proteoma salival de pacientes con estomatitis aftosa recurrente mediante proteómica basada en espectrometría de masas y evaluar su utilidad clínica en la identificación de procesos biológicos y moleculares más representativos durante el curso de las lesiones. Con el fin de comprender los procesos que controlan los estados de salud y enfermedad y así poder distinguir sujetos con o sin estomatitis aftosa recurrente (14).

MÉTODOS

Diseño General. Se realizó un estudio de casos y controles, en el que se recolectó prospectivamente 118 muestras salivales de 68 voluntarios. Se evaluó y caracterizó el proteoma salival de pacientes con estomatitis aftosa recurrente en presencia y ausencia de lesiones, a través de herramientas de proteómica y bioinformática basada en espectrometría de masas. A partir de lo anterior, se obtuvo una base de datos de las proteínas detectadas en las muestras de saliva, la cual fue recepcionada para ser cargada en una plataforma bioinformática que analiza datos proteómicos. Todos los procedimientos se realizaron de acuerdo con la Declaración de Helsinki. Este estudio fue autorizado por el Comité de Ética de la Universidad de Antofagasta (protocolo #156/2018) y el Comité de Ética en Investigación del Servicio de Salud del Maule (referencia #22-11-2018) <https://doi.org/10.6084/m9.figshare.20288775>.

Participantes. Los voluntarios fueron seleccionados de una cohorte de pacientes con RAS del Centro de Clínicas Odontológicas-Universidad de Talca (Chile). Al momento del examen, los pacientes no deben haber presentado úlceras por más de 3 días. Los criterios de exclusión fueron el uso de medicamentos para el tratamiento de úlceras durante los 2 días anteriores y el uso de corticoides tópicos o sistémicos durante el mes anterior al ingreso al estudio. Otros criterios de exclusión fueron la presencia de otro tipo de lesiones de la mucosa oral, enfermedades con dolor agudo o crónico, tabaquismo, consumo excesivo de alcohol (más de tres veces por semana) y enfermedades relacionadas con deficiencias hematológicas. También se excluyeron los pacientes con síndromes autoinflamatorios, estados de inmunodeficiencia, trastornos gastrointestinales y déficits hematínicos. Para su inclusión como controles, los voluntarios nunca debieron presentar úlceras orales, y salvo la ausencia de lesiones, este grupo compartió los mismos criterios de inclusión y exclusión.

El número de participantes se ajustó a una pérdida probable del 20%, estableciéndose un mínimo de 31 voluntarios por estadio de la enfermedad. Después de obtener el consentimiento informado se recolectó prospectivamente 118 muestras salivales de 68 voluntarios después de obtener el consentimiento informado. Los sujetos se dividieron en controles sanos ($n = 31$; personas sin antecedentes de úlceras orales) y estomatitis aftosa recurrente ($n = 36$). Este último grupo fue evaluado al ingreso al estudio, durante la etapa ulcerativa y cuando las lesiones desaparecieron (etapa de remisión, $n = 36$). Además, de recolectar muestras de recurrencias que ocurrieron después de la fase de remisión ($n = 15$).

Biopsia salival. Se solicitó a los sujetos que no comieran ni bebieran durante al menos 30 minutos antes de la recolección de la película salival. Las muestras fueron depositadas en hielo y un cóctel de inhibidores de proteasas (cOmplete Tablets EASYpack, Roche) (15), para ser centrifugadas y así eliminar los componentes no disueltos y los restos celulares (16). Con el fin de evaluar la concentración de proteína total en los sobrenadantes se utilizó el kit de ensayo de proteína BCA (Thermo Scientific) siguiendo las instrucciones del fabricante para los procedimientos de microplacas. Las muestras se almacenaron a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ para su posterior procesamiento.

Identificación y priorización de proteínas. Usando un sistema nanoElute LC emparejado con un espectrómetro de masas timsTOF Pro (Bruker Daltonics), los datos de espectrometría de masas se obtuvieron examinando 500 ng de péptidos después de la digestión trípica y el fraccionamiento de péptidos. Todas las muestras de MS/MS se analizaron con PEAKS Studio X+ (v.10.5, Bioinformatics Solutions) de acuerdo con los protocolos anteriores (17). Para todas las búsquedas, se utilizó una base de datos de secuencias de proteínas de proteínas humanas revisadas (74.823 entradas, UniProt) asumiendo la enzima de digestión tripsina .

Para la cuantificación de proteínas, utilizamos los recuentos espectrales informados por PEAKS Studio X+. El número de eventos de fragmentación (es decir, los recuentos espectrales) medidos para todos los péptidos que pertenecen a la misma proteína en cada muestra se sumaron, lo que dio como resultado la cuantificación relativa de la proteína en las diferentes condiciones (18). Los valores de los recuentos espectrales se normalizaron previo al análisis comparativo (19). Preparamos una base de datos utilizando la función reestructurar casos a variables en SPSS estadístico (v.23, IBM). Los valores de los recuentos espectrales se utilizaron para determinar la abundancia diferencial de proteínas entre las condiciones en el software Perseus (v.1.6.15.0, Instituto Max Planck de Bioquímica) (20). La base de datos generada se encuentra públicamente disponible en <https://www.ebi.ac.uk/pride/archive/projects/PXD026401>.

Fuentes de información. La base de datos fue procesada con el Software Perseus (https://maxquant.net/download_asset/perseus/latest) con el propósito de realizar un análisis integrador de los datos proteómicos, filtrando y normalizando los datos adecuadamente para asegurar que las diferentes muestras fuesen comparables, y así realizar el análisis estadístico y

bioinformático, para guiar la identificación de proteínas que sean funcionalmente relevantes (20).

Identificación de proteínas diferenciales. Una vez obtenida la base de datos que cuantificaba las proteínas detectadas en las muestras de saliva procedimos a descargar e instalar el software Perseus. A continuación, seleccionamos y cargamos en el programa la base de datos en formato archivo de texto, luego Perseus mostró las variables presentes en las columnas del archivo y seleccionamos las variables principales a analizar. En este caso las variables principales a examinar fueron Healthy1, Healthy2, Healthy3; Ulcer1, Ulcer2, Ulcer3; Remission1, Remission2, Remission3; Recurrence1, Recurrence2, Recurrence3.

Ejecutado lo anterior, visualizamos la matriz sin procesar, donde todas las muestras se presentan como columnas y todas las proteínas como filas. Posteriormente, le especificamos al programa que todas las muestras pertenecientes a una condición debieran poseer la misma anotación para así asignar el mismo valor a cada uno de los parámetros a analizar y así generar una matriz más informativa. Después, removimos las columnas que contienen a las variables Recurrence1, Recurrence2, Recurrence3, debido a que la condición de recurrencia es indicativa de que a los pacientes ya estaban cursando la etapa ulcerativa de la estomatitis aftosa recurrente. Luego, filtramos las filas basadas en valores válidos para así mantener solo a las proteínas que fueron identificadas en las muestras por lo menos en 3 grupos. Donde el número mínimo en el que debían estar presentes las proteínas de las 3 columnas principales era en al menos 1 grupo, con el objetivo de reducir la matriz.

Realizamos una prueba de muestras múltiples, con la finalidad de establecer un test de hipótesis con datos predefinidos donde la hipótesis nula corresponde a todas las medias son iguales a 0 y la hipótesis alternativa es que al menos una de las medias es distinta de 0, con un nivel de confianza del 95%. Filtramos las filas de acuerdo con su eventual relevancia biológica, establecido por el nivel de significancia de ANOVA positivo en los contrastes, manteniendo solo las comparaciones significativas, de tal manera que el programa redujera nuevamente la matriz.

Posteriormente, ejecutamos Post hoc Tukey's, una prueba de rango que determinó la homogeneidad de las distancias medias entre las variables con un nivel de confianza del 95%. Además, le solicitamos a Perseus realizar un agrupamiento jerárquico de las filas y/o columnas

para crear 3 grupos a través de la selección de distancias mediante Clustering. El programa utilizó la distancia euclidiana para determinar la similitud entre cada variable y así generar un diagrama basado en intensidades de color.

Análisis de procesos biológicos. Para comprender el conjunto de proteínas clínicamente relevantes, realizamos un análisis de enriquecimiento para orientar el conocimiento biológico previo, respecto a función, características, anotaciones, taxonomía, ubicaciones, entre otros. Comenzamos con la base de datos biológica UniProt (<https://www.uniprot.org/>) con el objetivo de consultar y obtener información detallada de las secuencias de proteínas identificadas en las muestras de saliva (21). Seguido de la base de datos QuickGO (<https://www.ebi.ac.uk/QuickGO/>) para entender las funciones moleculares que frecuentemente ejecutan estas proteínas, los procesos biológicos en los que éstas están involucradas y sus componentes celulares (22). Utilizamos la herramienta The Human Protein Atlas (<https://www.proteinatlas.org/>) para ayudar a vislumbrar la distribución espacial de cada proteína a nivel de órganos, tejidos, células y otros, con el propósito de comprender la biología humana en salud y enfermedad, para así categorizar según su nivel de expresión y distribución en las glándulas salivales (23). También, consultamos a Enrichr (<https://maayanlab.cloud/Enrichr/>) con la finalidad de buscar algún tipo de asociación con una vía, línea celular o enfermedad para así aumentar la probabilidad de identificar procesos biológicos pertinentes al tema de estudio (24,25). Finalmente, se indagamos en NCATS BioPlanet (<https://tripod.nih.gov/bioplanet/>), REACTOME (<https://reactome.org/>) y STRING (<https://string-db.org/>) para analizar y explorar las conexiones de las rutas de cada proteína, sin embargo, no se obtuvieron resultados con relevancia biológica (26,27, 28).

RESULTADOS

Identificación de proteínas salivales durante la estomatitis aftosa recurrente. Para identificar las proteínas salivales presentes en la estomatitis aftosa recurrente, cargamos la base de datos en la plataforma bioinformática Perseus, la cual generó una matriz sin procesar, con un total de 3.086 proteínas a analizar. Le solicitamos al programa realizar una agrupación de genes en función de su expresión bajo determinadas condiciones mediante Clusters. Las proteínas detectadas fueron: el factor de transcripción dependiente de AMP cíclico ATF6 beta (ATF6B), neurobeachin (NBEA), proteína FAM83E (FAM83E), receptor alfa-1 de la familia

GDNF (GFRA1), proteína de choque térmico mitocondrial de 75 kDa (TRAP1) y variable pesada de inmunoglobulina 3-21 (HV321) (Fig.1).

Al distinguir los perfiles de expresión de las proteínas, logramos apreciar en el diagrama que la proteína ATF6B presenta una mayor intensidad de color. Esto nos indica que ATF6B destaca como la proteína con un mejor perfil de clasificación, por lo que su presencia permite distinguir entre la presencia y ausencia de lesiones ulcerosas en pacientes con y sin estomatitis aftosa recurrente (Fig.1).

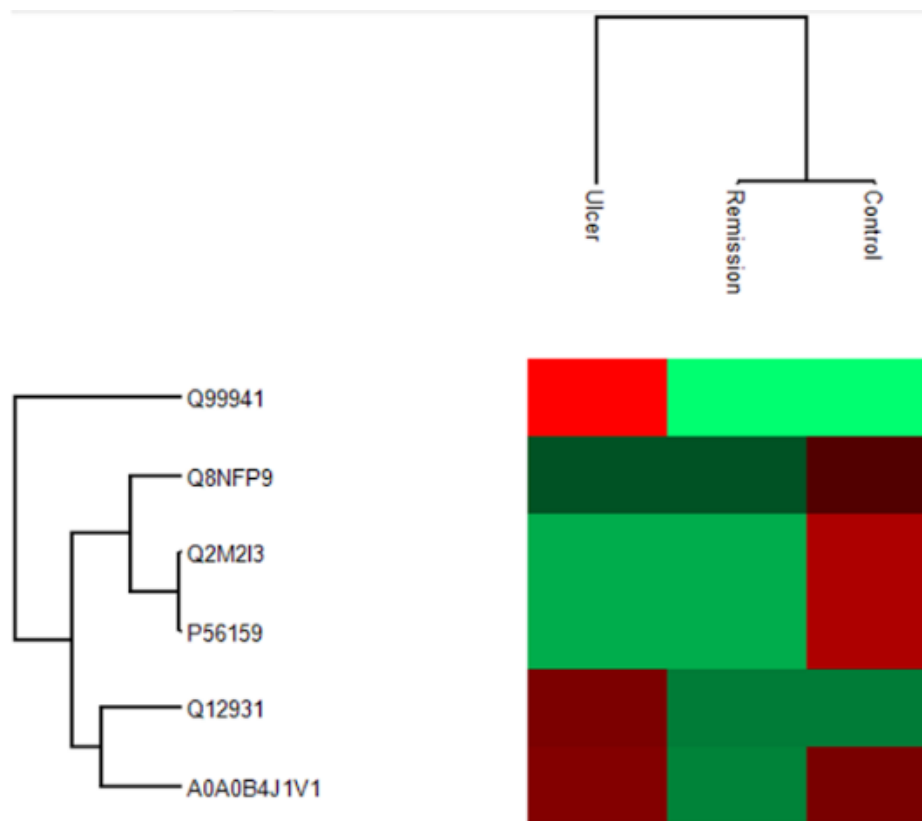


Figure 1. Clustering para el estudio de la expresión genética. La agrupación se generó empleando el método de distancia euclidiana. Al observar los dendogramas, se puede apreciar a la izquierda a las seis proteínas más relevantes presentes en las muestras, con su respectivo agrupamiento jerárquico, en el cual se puede distinguir que una proteína posee mejor perfil de clasificación, en comparación con las otras proteínas que deben ser consideradas todas juntas. ATF6B (Q99941), NBEA (Q8NFP9), FAM83E (Q2M2I3), GFRA1 (P56159), TRAP1 (Q12931), IGHV3-21 (A0A0B4J1V1). A la derecha en la parte superior, se percibe cómo se agrupan la etapa ulcerativa de la etapa de remisión con controles sanos en la estomatitis aftosa recurrente. El análisis de agrupamiento muestra los perfiles de expresión de las proteínas, el cual reúne los controles sanos con la etapa de remisión y separa a la etapa ulcerativa .

Rol biológico de las proteínas presentes en la estomatitis aftosa recurrente. Para comprender el rol de cada proteína se indagamos en los procesos biológicos y moleculares de las distintas bases de datos de genes humanos (Tabla 1).

Table 1. Proteínas salivales reguladas diferencialmente en la Estomatitis Aftosa Recurrente.

Proteína*	Expresión			Función Molecular**
	Etapa Ulcerativa	Etapa Remisión	Controles Sanos	
ATF6B (Q99941)	(+)	(-)	(-)	Es un factor de transcripción en la vía de respuesta de proteínas desplegadas (UPR) durante el estrés del retículo endoplásmico
NBEA (Q8NFP9)	(-)	(-)	(+)	Se une a las subunidades reguladoras tipo II de la proteína quinasa A y las ancla para dirigirse hacia la membrana.
FAM83E (Q2M2I3)	(-)	(-)	(+)	Activa la actividad de unión de la proteína quinasa. Se predijo que participa en la transducción de señales. Puede desempeñar un papel en la señalización de MAPK.
GFRA1 (P56159)	(-)	(-)	(+)	Juega un rol en el control de la supervivencia y la diferenciación de las neuronas.
TRAP1 (Q12931)	(+)	(-)	(-)	Esta proteína puede funcionar en la regulación de las respuestas del estrés celular.
IGHV3-21 (A0A0B4J1V1)	(+)	(-)	(+)	Se prevé que participa en varios procesos, incluida la activación de la respuesta inmunitaria; respuesta de defensa a otro organismo; y fagocitosis.

*Nombre del Gen con acceso a base de datos UniProt. (+) regulado al alza/sobre expresado, (-) regulado a la baja/ baja expresión. Se obtuvieron funciones moleculares de las bases de datos UniProt, QuickGO, The Human Protein Atlas

DISCUSIÓN

El proteoma salival de los sujetos en estudio evidenció proteínas diferenciales entre estos. Esto fue confirmado por el software Perseus al cual le solicitamos crear tres grupos de clasificación, donde éste determinó solo dos grupos, en el cual el grupo control sano y etapa de remisión quedaron en la misma agrupación, diferenciándose de aquellos en etapa ulcerativa. Esta diferenciación podría estar relacionada a la integridad epitelial y a la muerte celular, exponiendo distintas proteínas en el medio oral. Asimismo, al analizar los perfiles de expresión de las proteínas, sólo la proteína ATF6B aportó por sí sola la información que permite distinguir entre muestras en presencia y ausencia de lesiones en la mucosa oral, ya que ésta destaca como la proteína con un mejor perfil de clasificación. Este análisis revela que el grupo etapa ulcerativa está relacionado con varios procesos biológicos, principalmente referentes con una respuesta anti- muerte celular. Por lo tanto, en futuros estudios sería interesante determinar si realmente existe una respuesta anti- muerte celular atribuible a la proteína ATF6B, y en qué grupo ésta se expresa en mayor o menor medida.

Una de las razones que explican la aparición de ATF6B es que cuando las células se exponen a ciertas condiciones ambientales como lo es un desequilibrio celular o algún tipo de alteración metabólica, el proceso de plegamiento de las proteínas se ve comprometido (29). Esto produce la acumulación de proteínas mal plegadas, las cuales desencadenan un estrés celular a nivel del retículo endoplásmico (RE). Para intentar corregir este estrés del RE, se desarrolla una respuesta adaptativa que involucra la activación de tres vías de señalización: vía proteína quinasa RE (PERK), enzima 1 que requiere inositol (IRE1 α), factor de transcripción activador 6 (ATF6) que buscan estimular la respuesta proteína desplegada (UPR) (30), con la finalidad de inducir una respuesta inflamatoria, generar un efecto antiapoptótico y así mantener la integridad epitelial. Sin embargo, si el estrés no puede ser resuelto, las señales de la UPR pasan a ser pre- apoptóticas y por lo tanto inducen la muerte celular, que en este caso se ve reflejado como la destrucción del epitelio.

A través de la respuesta proteína desplegada (UPR) las células intentan corregir este exceso de estrés. Y es así como, durante la respuesta al estrés del RE, la vía de señalización ATF6, genera 2 formas escindidas y activadas que corresponden a los fragmentos ATF6 α y ATF6 β , los cuales se translocan al núcleo, para adherirse a regiones reguladoras particulares y afectar la forma en que se expresan los genes de respuesta al estrés del RE. Esto aumenta la supervivencia celular al ayudar a resolver el estrés. ATF6 α es un activador transcripcional

potente y rápidamente degradado, mientras que ATF6 β es un activador débil que es degradado lentamente (31). De modo que la presencia de ATF6 β está relacionada con la respuesta al estrés del RE en las células epiteliales orales.

Es importante ampliar las investigaciones sobre la etiopatogenia de la estomatitis aftosa recurrente, ya que al revelar qué moléculas constituyen los principales eslabones de esta enfermedad, va a proporcionar la oportunidad de tratar de esclarecer si existe un agente etiopatogénico asociado o algún factor prevenible con el propósito de encontrar nuevas terapias que sea efectivas para lograr curar la EAR. En vista de que a la fecha aún sigue siendo desconocido y que, además, el diagnóstico está basado solo en la clínica y en la anamnesis.

La comprensión de las bases biológicas y cadenas proteicas es fundamental, por esto se torna necesario continuar estudios que comprendan la etiopatogenia de esta enfermedad, ya que podría llevar a posibilidades terapéuticas no solo para esta enfermedad sino también para otras que hoy no tienen cura.

DECLARACIÓN DE APROBACIÓN DEL COMITÉ DE ÉTICA

Este estudio fue autorizado por el Comité de Ética de la Universidad de Antofagasta (protocolo #156/2018) y el Comité de Ética en Investigación del Servicio de Salud del Maule (referencia #22-11-2018) <https://doi.org/10.6084/m9.figshare.20288775>.

CONFLICTOS DE INTERÉS

Todos los autores declaran no tener conflictos de interés en relación con este trabajo.

DECLARACIÓN DE CONTRIBUCIÓN DE LOS AUTORES

A.V-P., P.A.C-A. y C.R. contribuyeron a la adquisición de datos y revisaron críticamente el manuscrito A.V-P., P.A.C-A. y C.R. contribuyeron a los análisis e interpretaciones proteómicas. C.R. contribuyó a la concepción, el diseño, la supervisión del proyecto, realizó todos los análisis estadísticos y la interpretación. A.V-P. y C.R. redactaron el manuscrito. Todos los autores dieron su aprobación final y aceptaron ser responsables de todos los aspectos del trabajo.

FINANCIAMIENTO

El financiamiento fue proporcionado por la Agencia Nacional de Investigación y Desarrollo de Chile (ANID) Beca de doctorado #21220448 (a P.A.C-A), ANID FONDECYT Iniciación núm. #11180170 (a C.R.) y Concurso de Proyectos de Investigación de Alto Nivel en Odontología, Red Estatal de Odontología núm. #REO19-012 (a C.R.).

DISPONIBILIDAD DE DATOS Y MATERIALES

Todos los conjuntos de datos generados o analizados durante el estudio se incluyen en el preprint publicado. Los datos proteómicos de espectrometría de masas se han depositado en ProteomeXchange Consortium a través del repositorio de socios PRIDE con el identificador de conjunto de datos PXD026401 (<https://www.ebi.ac.uk/pride/archive/projects/PXD026401>).

REFERENCIAS

1. Chavan M, Jain H, Diwan N, Khedkar S, Shete A, Durkar S. Recurrent aphthous stomatitis: a review. *J Oral Pathol Med* [Internet]. septiembre de 2012 [citado 07 de diciembre de 2022];41(8). Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22413800/>
2. Rivera, César. Essentials of recurrent aphthous stomatitis (Review). *Biomedical Reports* [Internet]. 1 de agosto de 2019 [citado 7 de diciembre de 2021];11(2):47–50. Disponible en: <http://www.spandidos-publications.com/10.3892/br.2019.1221/abstract>
3. Sunday O. Akintoye MSG. Recurrent Aphthous Stomatitis. *Dent Clin North Am* [Internet]. abril de 2014 [citado 7 de diciembre de 2021];58(2):281. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3964366/>
4. Belenguer-Guallar I, Jiménez-Soriano Y, Claramunt-Lozano A. Treatment of recurrent aphthous stomatitis. A literature review. *J Clin Exp Dent* [Internet]. abril de 2014;6(2):e168–74. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.4317/jced.51401>
5. Efficacy and safety of Chinese patent medicines in the treatment of recurrent aphthous stomatitis: A systematic review. *The Journal of the American Dental Association* [Internet]. 1 de enero de 2017 [citado 25 de mayo de 2022];148(1):17–25. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.adaj.2016.08.025>

6. Brocklehurst P, Tickle M, Glenny AM, Lewis MA, Pemberton MN, Taylor J, et al. Systemic interventions for recurrent aphthous stomatitis (mouth ulcers). *Cochrane Database Syst Rev* [Internet]. 12 de septiembre de 2012 [citado 16 de octubre de 2022];(9). Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22972085/>
7. Ventura TM da S, Ribeiro NR, Dionizio AS, Sabino IT, Buzalaf MAR. Standardization of a protocol for shotgun proteomic analysis of saliva. *J Appl Oral Sci* [Internet]. 11 de junio de 2018 [citado 9 de agosto de 2021];26. Disponible en: <http://www.scielo.br/j/jaos/a/shMbV5hmTvx9v8XQFYfzdDH/?lang=en&format=pdf>
8. Hemadi AS, Huang R, Zhou Y, Zou J. Salivary proteins and microbiota as biomarkers for early childhood caries risk assessment. *Int J Oral Sci* [Internet]. noviembre de 2017 [citado 01 de junio de 2022];9(11):e1. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5775330/>
9. Lamy E, Mau M. Saliva proteomics as an emerging, non-invasive tool to study livestock physiology, nutrition and diseases. *J Proteomics* [Internet]. 19 de julio de 2012 [citado 1 de junio de 2022];75(14). Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22583933/>
10. Esteves CV, Campos WG de, Souza MM de, Lourenço SV, Siqueira WL, Lemos-Júnior CA. Diagnostic potential of saliva proteome analysis: a review and guide to clinical practice. *Braz Oral Res* [Internet]. 16 de mayo de 2019 [citado 18 de agosto de 2021];33. Disponible en: <http://www.scielo.br/j/bor/a/spSKQ5V9fn33MH5wcmMM9zR/?format=pdf&lang=en>
11. Hernández-Olivos R, Muñoz M, Núñez E, Camargo-Ayala PA, Garcia-Huidobro J, Pereira A, et al. Salivary proteome of aphthous stomatitis reveals the participation of vitamin metabolism, nutrients, and bacteria. *Sci Rep* [Internet]. 2 de agosto de 2021 [citado 31 de mayo de 2022];11(1):1–15. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/s41598-021-95228-8>
12. Bandhakavi S, Stone MD, Onsongo G, Van Riper SK, Griffin TJ. A dynamic range compression and three-dimensional peptide fractionation analysis platform expands proteome coverage and the diagnostic potential of whole saliva. *J Proteome Res* [Internet].

- diciembre de 2009;8(12):5590–600. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1021/pr900675w>
13. Spielmann N, Wong DT. Saliva: diagnostics and therapeutic perspectives. *Oral Dis* [Internet]. mayo de 2011;17(4):345–54. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1601-0825.2010.01773.x>
 14. Esteves CV, Campos WG de, Souza MM de, Lourenço SV, Siqueira WL, Lemos-Júnior CA. Diagnostic potential of saliva proteome analysis: a review and guide to clinical practice. *Braz Oral Res* [Internet]. 16 de mayo de 2019 [citado 18 de agosto de 2021];33. Disponible en: <http://www.scielo.br/j/bor/a/spSKQ5V9fn33MH5wcmMM9zR/?format=pdf&lang=en>
 15. Method development for proteome stabilization in human saliva. *Anal Chim Acta* [Internet]. 2012 Apr 13 [cited 2022 Oct 11];722:63–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2012.02.017>
 16. Zhu N, Zhang D, Wang W, Li X, Yang B, Song J, et al. Un nuevo coronavirus de pacientes con neumonía en China, 2019. *N Engl J Med* [Internet]. 2020;382(8):727–33. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMoa2001017>
 17. Fraga M, Yáñez M, Sherman M, Llerena F, Hernandez M, Nourdin G, et al. Immunomodulation of T Helper Cells by Tumor Microenvironment in Oral Cancer Is Associated With CCR8 Expression and Rapid Membrane Vitamin D Signaling Pathway. *Front Immunol* [Internet]. 2021 [cited 2022 Oct 11];0. Available from: <http://dx.doi.org/10.3389/fimmu.2021.643298>
 18. Cozzolino F, Landolfi A, Iacobucci I, Monaco V, Caterino M, Celentano S, et al. New label-free methods for protein relative quantification applied to the investigation of an animal model of Huntington Disease. *PLoS One* [Internet]. 2020 Sep 4 [cited 2022 Oct 11];15(9):e0238037. Available from: <https://journals.plos.org/plosone/article/file?id=10.1371/journal.pone.0238037&type=printable>
 19. Lundgren DH, Hwang SI, Wu L, Han DK. Role of spectral counting in quantitative proteomics. *Expert Rev Proteomics* [Internet]. 2010 Feb [cited 2022 Oct 11];7(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20121475/>

20. Tyanova S, Temu T, Sinitcyn P, Carlson A, Hein MY, Geiger T, et al. The Perseus computational platform for comprehensive analysis of (prote)omics data. *Nat Methods* [Internet]. 27 de junio de 2016 [citado 26 de julio de 2022];13(9):731–40. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/nmeth.3901>
21. The UniProt Consortium. UniProt: a worldwide hub of protein knowledge. *Nucleic Acids Res* [Internet]. 1 de enero de 2019 [citado 2 de agosto de 2022];47(Database issue):D506. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6323992/>
22. Binns D, Dimmer E, Huntley R, Barrell D, O'Donovan C, Apweiler R. QuickGO: a web-based tool for Gene Ontology searching. *Bioinformatics* [Internet]. 11 de noviembre de 2009 [citado 2 de agosto de 2022];25(22):3045. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2773257/>
23. Thul PJ, Lindskog C. The human protein atlas: A spatial map of the human proteome. *Protein Sci* [Internet]. enero de 2018 [citado 2 de agosto de 2022];27(1):233. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5734309/>
24. Chen EY, Tan CM, Kou Y, Duan Q, Wang Z, Meirelles GV, et al. Enrichr: interactive and collaborative HTML5 gene list enrichment analysis tool. *BMC Bioinformatics* [Internet]. 2013 [citado 2 de agosto de 2022];14:128. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3637064/>
25. Huang DW, Sherman BT, Lempicki RA. Bioinformatics enrichment tools: paths toward the comprehensive functional analysis of large gene lists. *Nucleic Acids Res* [Internet]. enero de 2009 [citado 2 de agosto de 2022];37(1):1. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2615629/>
26. Huang R, Grishagin I, Wang Y, Zhao T, Greene J, Obenauer JC, et al. The NCATS BioPlanet – An Integrated Platform for Exploring the Universe of Cellular Signaling Pathways for Toxicology, Systems Biology, and Chemical Genomics. *Front Pharmacol* [Internet]. 2019 [citado 2 de agosto de 2022];10. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6524730/>
27. Jassal B, Matthews L, Viteri G, Gong C, Lorente P, Fabregat A, et al. The reactome pathway knowledgebase. *Nucleic Acids Res* [Internet]. 1 de enero de 2020 [citado 2 de agosto de 2022];48(D1):D498. Disponible en:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7145712/>

28. Szklarczyk D, Gable AL, Nastou KC, Lyon D, Kirsch R, Pyysalo S, et al. The STRING database in 2021: customizable protein–protein networks, and functional characterization of user-uploaded gene/measurement sets. *Nucleic Acids Res* [Internet]. 1 de enero de 2021 [citado 2 de agosto de 2022];49(D1):D605. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7779004/>
29. Nadanaka S, Yoshida H, Kano F, Murata M, Mori K. Activation of Mammalian Unfolded Protein Response Is Compatible with the Quality Control System Operating in the Endoplasmic Reticulum. *Mol Biol Cell* [Internet]. junio de 2004 [citado 13 de septiembre de 2022];15(6):2537. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC420080/>
30. Jakob D, Wikstrom, Ety Bachar-Wikstrom, mansi manchanda, Ritu Bansal, Magnus Karlsson, Paula Kelly-Pettersson, Olof Sköldenbergl. Endoplasmic reticulum stress in human chronic wound healing: Rescue by 4-phenylbutyrate [Internet]. *International Wound Journal*. 2020 [citado 13 de septiembre de 2022]. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1111/iwj.13525>
31. Forouhan M, Mori K, Boot-Handford RP. Paradoxical roles of ATF6 α and ATF6 β in modulating disease severity caused by mutations in collagen X. *Matrix Biol* [Internet]. septiembre de 2018 [citado 13 de septiembre de 2022];70:50. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6090092/>

Este preprint fue presentado bajo las siguientes condiciones:

- Los autores declaran que son conscientes de que son los únicos responsables del contenido del preprint y que el depósito en SciELO Preprints no significa ningún compromiso por parte de SciELO, excepto su preservación y difusión.
- Los autores declaran que se obtuvieron los términos necesarios del consentimiento libre e informado de los participantes o pacientes en la investigación y se describen en el manuscrito, cuando corresponde.
- Los autores declaran que la preparación del manuscrito siguió las normas éticas de comunicación científica.
- Los autores declaran que los datos, las aplicaciones y otros contenidos subyacentes al manuscrito están referenciados.
- El manuscrito depositado está en formato PDF.
- Los autores declaran que la investigación que dio origen al manuscrito siguió buenas prácticas éticas y que las aprobaciones necesarias de los comités de ética de investigación, cuando corresponda, se describen en el manuscrito.
- Los autores declaran que una vez que un manuscrito es postado en el servidor SciELO Preprints, sólo puede ser retirado mediante solicitud a la Secretaría Editorial deSciELO Preprints, que publicará un aviso de retracción en su lugar.
- Los autores aceptan que el manuscrito aprobado esté disponible bajo licencia [Creative Commons CC-BY](#).
- El autor que presenta el manuscrito declara que las contribuciones de todos los autores y la declaración de conflicto de intereses se incluyen explícitamente y en secciones específicas del manuscrito.
- Los autores declaran que el manuscrito no fue depositado y/o previamente puesto a disposición en otro servidor de preprints o publicado en una revista.
- Si el manuscrito está siendo evaluado o siendo preparando para su publicación pero aún no ha sido publicado por una revista, los autores declaran que han recibido autorización de la revista para hacer este depósito.
- El autor que envía el manuscrito declara que todos los autores del mismo están de acuerdo con el envío a SciELO Preprints.