



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
LABORATÓRIO DE IMUNOPATOLOGIA KEIZO ASAMI
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA APLICADA À SAÚDE

IASMIM LOPES DE LIMA

**UTILIZAÇÃO DE FERRAMENTAS PROTEÔMICAS NA INVESTIGAÇÃO DE
BIOMARCADORES PLASMÁTICOS DO ADENOCARCINOMA COLORRETAL
ESPORÁDICO**

Recife

2019

IASMIM LOPES DE LIMA

**UTILIZAÇÃO DE FERRAMENTAS PROTEÔMICAS NA INVESTIGAÇÃO DE
BIOMARCADORES PLASMÁTICOS DO ADENOCARCINOMA COLORRETAL
ESPORÁDICO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia Aplicada à Saúde do Centro de Biociências da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos parciais para obtenção do título de Mestre em Biologia Aplicada à Saúde.

Orientador: Dr. José Luiz de Lima-Filho

Coorientador: Dr. Roberto Afonso da Silva

Recife

2019

Catálogo na fonte:
Bibliotecário Bruno Márcio Gouveia - CRB-4/1788

Lima, Iasmim Lopes

Utilização de ferramentas proteômicas na investigação de biomarcadores plasmáticos do adenocarcinoma colorretal esporádico / Iasmim Lopes Lima - 2019.

102 folhas: il., fig., tab.

Orientador: José Luiz de Lima-Filho

Coorientadora: Roberto Afonso da Silva

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Biologia Aplicada à Saúde. Recife, 2019.

Inclui referências.

1. Tumores 2. Reto (Câncer) 3. Marcadores biológicos de tumor
I. Lima-Filho, José Luiz de (orient.) II. Silva, Roberto Afonso da (coorient.) III. Título

616.994

CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2019-240

IASMIM LOPES DE LIMA

UTILIZAÇÃO DE FERRAMENTAS PROTEÔMICAS NA INVESTIGAÇÃO DE BIOMARCADORES PLASMÁTICOS DO ADENOCARCINOMA COLORRETAL ESPORÁDICO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia Aplicada à Saúde do Centro de Biociências da Universidade Federal de Pernambuco como parte dos requisitos parciais para obtenção do título de Mestre em Biologia Aplicada à Saúde.

Aprovada em 25/02/2019

BANCA EXAMINADORA

Profº Dr. José Luíz de Lima Filho (Orientador)
Universidade Federal de Pernambuco - Campus Recife (UFPE)

Profº Dr. Fabrício Oliveira Souto (Examinador Interno)
Universidade Federal de Pernambuco-Campus Caruaru (UFPE)

Profº Dr. José Luíz Figueiredo (Examinador Externo)
Universidade Federal de Pernambuco -Departamento de Cirurgia (HC/UFPE)

A todos os pacientes e seus respectivos familiares que enfrentam uma batalha diária contra o câncer colorretal.

Dedico

AGRADECIMENTOS

À *Deus*, pelo amor incondicional, perdão e vida.

Ao meu Orientador, *Dr. José Luiz de Lima Filho* pelas oportunidades, apoio, orientação e experiências compartilhadas ao longo das nossas reuniões, que muito contribuíram para minha formação profissional e pessoal. Um agradecimento especial as colaborações estabelecidas por seu intermédio que tornaram viável a realização deste projeto.

Ao meu Co orientador, *Dr. Roberto Afonso* pelas oportunidades, encorajamento, e orientação conferida desde a iniciação científica e durante todo o mestrado. Além disso gostaria de reconhecer e agradecer com muito apreço todo suporte, sugestões e correções realizadas durante a preparação desse manuscrito.

À Coloproctologista *Dr^a. Camila Rocha da Cruz* pelo importante papel desempenhado nessa pesquisa.

Aos integrantes do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA), em especial aos do Laboratório de Proteômica, Biotecnologia (BT) e Microscopia Eletrônica (ME) por todo apoio. Aos funcionários do LIKA, agradeço pelo suporte técnico oferecido durante esses anos.

Aos integrantes do Laboratório de Proteômica da Diretoria de Metrologia Aplicada às Ciências da Vida (DIMAV-INMETRO-RJ-Xerém), em especial à *Dr^a. Sandra Scapin* pela paciência, colaboração e por ter me recebido tão bem em seu laboratório.

Aos meus pais, *Fernando Pereira de Lima* e *Rosineide Lopes da Silva Lima* pela paciência, dedicação e por abdicarem de interesses pessoais para possibilitar afetivamente e financeiramente a realização de meus sonhos. A toda minha família, pelo incentivo e carinho em todos os momentos. Obrigada por confiarem e acreditarem em mim e auxiliarem a conclusão de projetos pessoais e profissionais.

Às minhas irmãs, *Lídia Lopes* e *Larissa Lopes* pelo amor, carinho e tolerância. Vocês foram presenças essenciais durante a escrita desse documento.

Às minhas amigas *Mileide Rodrigues* e *Natália Brito* pelo companheirismo, constantes intercessões e sábios conselhos.

A todos os amigos do LIKA e da Pós-Graduação em Biologia Aplicada à Saúde. Aprender com vocês foi essencial para meu crescimento acadêmico, profissional e pessoal. Um agradecimento especial à *Dr^a. Cida Seabra* pelos sábios conselhos, suporte e experiências compartilhadas dentro e fora da universidade. À *Dr^a. Daniela Rocha, Joana D'arc* e *Isabella Ralph* pela amizade, auxílio e por terem tornado os dias mais leves.

À FACEPE, ao LIKA e à UFPE pelo suporte financeiro.

“Mas a ciência se esforça confiantemente no esforço de finalmente conhecer a coisa em si, e embora percebamos que essa meta ideal nunca pode ser completamente alcançada, ainda lutamos incansavelmente por ela. E sabemos que a cada passo do caminho, cada esforço será ricamente recompensado. A história da ciência está à mão para confirmar nossa fé nesta verdade”.

(PLANCK, 1932)

RESUMO

O câncer colorretal é o terceiro tipo de câncer mais comum com 1,8 milhões de novos casos em 2018. Além disso, é a segunda principal causa de mortes por câncer no mundo, com 881.000 mortes anuais. No Brasil, são esperados 35.360 novos casos para o biênio de 2018-2019. Ainda, quando comparado por sexo, o câncer colorretal alcança a 3ª posição em homens e a 2ª posição em mulheres. Marcadores moleculares são urgentemente requeridos em resposta a crescente incidência deste tipo de câncer, melhorando o resultado clínico do paciente e aumentando o tempo de sobrevida. Amostras plasmáticas de dez pacientes com adenocarcinoma colorretal e de dez controles saudáveis foram analisadas utilizando cromatografia líquida de ultra performance seguida de ionização por eletro pulverização e espectrometria de massa em tandem (nanoUPLC-ESI-MS^E) com posterior quantificação isenta de marcação. Foram identificadas 98 proteínas plasmáticas com score ≥ 100 e intervalo de confiança $\geq 98\%$. A análise da expressão diferencial das proteínas revelou a presença de 79 proteínas superexpressas e 11 proteínas subexpressas no plasma de pacientes com adenocarcinoma colorretal. De acordo com a análise funcional, o processo biológico, a função molecular e os componentes celulares mais representados foram: regulação negativa da atividade da endopeptidase (22, $p = 6,7E-29$), atividade de inibidor da endopeptidase do tipo serina (15, $p = 9,6E-19$) e região extracelular (64, $p = 5,1E-57$). A via de sinalização mais enriquecida foi relacionada ao Sistema Imunológico (36, $2,0E-07$) e Sistema Imunológico Inato (34, $p = 1,01E-13$). Alterações no perfil e na concentração de proteínas plasmáticas no adenocarcinoma colorretal podem fornecer respostas úteis na prática clínica, desde o diagnóstico até a definição de estratégias terapêuticas. Neste estudo, encontramos proteínas que podem ser promissoras para a composição de um painel de biomarcadores no desenvolvimento de ensaios clínicos para CRC. Entretanto, estudos comparativos utilizando outras plataformas proteômicas são indicados, seguido de validação por técnicas de imunoensaio para melhores definições.

Palavras-chave: Plasma. Proteômica. Biomarcadores. NanoUPLC-MS^E. Adenocarcinoma colorretal.

ABSTRACT

Colorectal cancer is the third most common type of cancer with 1.8 million new cases in 2018. Also, it is the second leading cause of cancer deaths in the world with 881,000 annual deaths. In Brazil, 35.360 new cases are expected for the biennium of 2018-2019. Still, when compared by sex, colorectal cancer reaches the 3rd position in men and the 2nd position in women. Molecular markers are urgently required to respond to the increasing incidence of this type of cancer, improving the patient's clinical outcome and increasing the survival time. Plasma samples from 10 patients with colorectal adenocarcinoma and 10 healthy controls were analyzed using ultra-performance liquid chromatography followed by electrospray ionization and tandem mass spectrometry (nanoUPLC-ESI-MS^E) with subsequent label-free quantification. Were identified 98 human plasma proteins with score ≥ 100 and confidence interval $\geq 98\%$. The analysis of the differential expression of proteins revealed the presence of 79 up-regulated proteins and 11 down-regulated in the plasma. According to functional analysis, the biological process, molecular function and cellular component more overrepresented were: negative regulation of endopeptidase activity (22, $p = 6,7E-29$), serine-type endopeptidase inhibitor activity (15, $p = 9,6E-19$), and extracellular region (64, $p = 5,1E-57$). The most enriched signaling pathways were related to ImmuneSystem (36, $2.00E-07$) and Innate Immune System (34, $p = 1.01E-13$). Changes in the plasma protein profile and concentration in colorectal adenocarcinoma may provide useful responses in clinical practice ranging from diagnosis to the definition of therapeutic strategies. In this study, we found proteins that may be promising for the composition of a panel of biomarkers in the development of clinical trials for CRC. However, comparative studies using other proteomic platforms are indicated, followed by validation by immunoassay techniques for better definitions.

keywords: Plasma. Proteomics. Biomarkers. NanoUPLC-MS^E. Colorectal adenocarcinoma.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Revisão de literatura

Figura 1 –	Hallmarkers do câncer revisitados.....	20
Figura 2 –	Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2018 por sexo.....	23
Figura 3 –	Genes e vias de fatores de crescimento que impulsionam a progressão do câncer colorretal.....	26
Figura 4 –	Proposta de taxonomia do câncer colorretal refletindo diferenças biológicas significativas nos subtipos moleculares baseados na expressão gênica.....	28
Figura 5 –	Principais características dos biomarcadores do CBD.....	31
Figura 6 –	Faixa de concentração das proteínas plasmáticas.....	35
Figura 7 –	Visão geral da complexidade do proteoma.....	38
Figura 8 –	Abordagem triangular na pesquisa de biomarcadores plasmáticos.....	44

Artigo 1

Figura 1 –	Dynamic range of absolute quantification of the differentially expressed plasma proteins in colorectal cancer patients.....	69
Figura 2 –	Top GO terms obtained from GO functional and pathways enrichment analysis of up-regulated plasma proteins in colorectal cancer patients by DAVID and Reactome.....	70
Figura 3 –	GO terms obtained from GO functional and pathways enrichment analysis of down-regulated plasma proteins in colorectal cancer patients by DAVID and Reactome.....	71

LISTA DE TABELAS

Artigo 1

Tabela 1 –	Clinical and histopathological data of patients with colorectal adenocarcinoma.....	72
Tabela 2 –	Up-regulated plasma proteins in adenocarcinoma colorectal patients	73
Tabela 3 –	Down-regulated plasma proteins in adenocarcinoma colorectal patients	77

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2D-PAGE	<i>Two dimensional Poliacrrialamide gel electrophoresis</i> – Gel de Eletroforese Bidimensional
5-FU	5-Fluorouracil
ADH	Álcool desidrogenase
ALT	Alanina Aminotransferase
APC	<i>Adenomatouspolyposis coli</i> - Poliposeadenomatose poli
AST	Aspartato aminotransferase
BCAT1	<i>Branchedchain amino acid transaminase 1</i>
BMP3	<i>Bonemorphogenetic protein 3</i>
BSA	<i>Bovine serum albumin</i> - Albumina bovina sérica
CA125	Cancerantigen 125
CA19.9	Antígeno Carboidrato 19.9
CBD	<i>Colorectal Database</i> – Banco de dados colorretal
CCR	Câncer colorretal
CEA	Antígeno carcionoembrionário
CIMP	<i>CpG island. MethylatorPhenotype</i> - Fenótipo metilador de ilhas CpG
CIN	<i>Chromosomal instability</i> - Instabilidade Cromossômica
COX-2	Ciclo-oxigenase 2
CRC	<i>Colorectal cancer</i>
CTCs	<i>Circuling tumor cells</i> - Células circulantes tumorais
DAVID	<i>Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery</i> – Banco de dados para anotação, visualização e descoberta integrada
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i> -Ácido desoxirribonucleico
DTT	Ditiotreitol
EIA	<i>Enzyme Immunoassay</i> - imunoensaio enzimático
ELISA	<i>Enzyme Linked-Immunsorbent Assay</i> - ensaio de imunoabsorção enzimática
EM	Espectrometria de Massas

EMRTs	<i>Elution mass retention time</i> - Tempo de retenção de massa de eluição
ESI	<i>Electrospray ionization</i> - Ionização por Eletrospray
FDA	<i>Food drug administration</i>
FDR	<i>False Discovery rate</i> - Taxa de falso positivo
FIT	Teste imuno-químico fecal
g-FOBT	<i>guaiac based hemoccult II test</i> - Teste de sangue oculto nas fezes guaiac
GFP	[Glu 1]-fibrinopeptídeo
HPLC	<i>High performance liquid chromatography</i> - Cromatografia líquida de alta resolução
HPPP	<i>Human Plasma Proteome Project</i> - Projeto Proteoma do Plasma Humano
HUPO	<i>Human Proteome Organization</i> - Organização do Proteoma Humano
ICAT	<i>Isotope-Coded Affinity Tag</i> - Tag de Afinidade Codificados por Isótopos
IKZF1	<i>IKAROS Family Zinc Finger</i>
INCA	Instituto Nacional do Câncer
iTRAQ™	<i>Isobaric Tag for Relative and Absolute Quantification</i> – Tag Isobárica para a Quantificação Relativa e Absoluta
JPS	<i>Juvenil Polipose Syndrome</i> - Síndrome da Polipose Juvenil
KRAS	<i>Kristen rat sarcoma viral oncogene homolog</i>
LOH	<i>Loss of heterozygosity</i> - Perda de heterozigosidade
MALDI-TOF	<i>Matrix-assisted laser desorption/ionization</i> – <i>Time of flight</i> - Ionização e Dessorção à Laser Assistida por Matriz- Tempo de Vôo
MLH1	<i>MutL homolog 1</i>
MMR	<i>DNA mismatch repair</i>
MPTs	Modificações Pós-traducionais
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro
MS ^E	Espectrometria de massas de alta energia
MSI	<i>Microsatellite instability</i> - Instabilidade de Microsatélite
MSI-H	<i>high microsatellite instability</i> - Instabilidade de microsatélite alta
MSI-L	<i>low microsatellite instability</i> - Instabilidade de microsatélite baixa
MSS	<i>microsatellite stable</i> - Microsatélite estável
NDGR4	<i>N-Myc downstream – regulated gene 4</i>

NIH	<i>National Institute Health</i> - Instituto Nacional de Saúde
NRAS	<i>Neuroblastoma RAS viral oncongene</i>
PAF	Polipose Adenomatosa Familiar
PCR	Reação em cadeia polimerase
PLGS	<i>Protein Lynx Global Server</i>
RNA	<i>Ribonucleic acid</i> - Ácido ribonucleico
SEPT9	<i>Septin-9</i> - Septina-9
SILAC	<i>Stable Isotope Labeling by/with Amino acids in Cellculture</i> - rotulagem isótopo estável por aminoácidos em cultura de células
SMC	Subclassificação molecular consensual
TFA	Ácido trifluoroacético
TLR4	<i>Toll-like receptor-4</i> – Receptor do tipo Toll 4
TS	Timidilato Sintase
uORFs	<i>upstream open reading frame</i> – Quadro de leitura aberto à montante
UPLC	<i>Ultra Performance Liquid Chromatography</i> - Cromatografia Líquida de Ultra Performance
VEGF	<i>Vascular Endothelial Cel lGrowth Factor Receptor</i> – Receptor do Fator de Crescimento Endotelial Vascular
VEGF-1	<i>Vascular Endothelial Cel lGrowth Factor</i> – Fator de Crescimento Endotelial Vascular 1

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	16
1.1	OBJETIVOS.....	18
1.1.1	Objetivo Geral.....	18
1.1.2	Objetivos específicos.....	18
2	REFERENCIAL TEÓRICO.....	19
2.1	CÂNCER.....	19
2.2	CÂNCER COLORRETAL.....	21
2.2.1	Epidemiologia e Diagnóstico do Câncer Colorretal.....	21
2.2.2	Mecanismos moleculares da Carcinogênese do Câncer Colorretal...	24
2.2.3	Classificação Molecular do Câncer Colorretal.....	27
2.3	BIOMARCADORES.....	29
2.3.1	Biomarcadores moleculares para o Câncer colorretal.....	30
2.3.2	O plasma como fonte de biomarcadores.....	33
2.4	ABORDAGENS PROTEÔMICAS NA BUSCA POR BIOMARCADORES.....	37
2.4.1	<i>Label-Free</i> nanoUPLC-MS^E e Proteômica Quantitativa.....	40
3	METODOLOGIA.....	45
3.1	COLEÇÃO DE PLASMAS.....	45
3.1.1	Formação dos Pools Controle e Experimental.....	45
3.1.2	Depleção de Albumina e IgG.....	45
3.1.3	Quantificação de Proteínas.....	46
3.1.4	Precipitação de Proteínas.....	46
3.1.5	Digestão Tríptica e Preparação de Amostras para LC-MSE.....	47
3.1.6	NanoUPLC e aquisição independente de dados (MSE) livre de marcação (<i>label-free</i>) por espectrometria de massa.....	47
3.1.7	Processamento de Dados, Identificação de Proteína e Quantificação	48
3.1.8	Anotação funcional.....	49
4	PLASMA PROTEIN MODIFICATIONS IN COLORECTAL ADENOCARCINOMA BY LABEL-FREE PROTEOMICS.....	51

5	CONCLUSÃO.....	87
6	PERSPECTIVAS.....	88
	REFERÊNCIAS.....	89
	ANEXO A - CROMATOGRAMAS E ESPECTROS DE MASSAS	
		101
	ANEXO B – TERMO DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE	
	ÉTICA.....	103

1 INTRODUÇÃO

O Câncer Colorretal (CCR) é a terceira neoplasia mais comum com uma incidência anual de 1,4 milhões de casos. Além disso, é a segunda causa de óbito por câncer no mundo com 881.000 mortes por ano (BRAY et al., 2018). No Brasil, são esperados 35.360 novos casos para o biênio de 2018-2019. Ainda, quando comparado por sexo, o câncer colorretal alcança a 3ª posição em homens e a 2ª posição em mulheres (INCA, 2017). Enquanto que vários estudos relatam uma diminuição do número de mortes por CCR em países desenvolvidos, é possível verificar um aumento significativo nas taxas de mortalidade em países com menores rendas do continente Asiático, Africano e na América Latina (ARNOLD et al., 2017; SIEGEL et al., 2017; SOUZA et al., 2014). A tendência é de que, nesses países, em 2035 o número de mortes por CCR duplique (ARNOLD et al., 2017). De maneira geral, apesar da diminuição da taxa de morte em alguns países, o número de mortes relacionados ao câncer colorretal deve aumentar cerca de 70% nos próximos 16 anos (ARNOLD et al., 2017).

O câncer colorretal, origina-se a partir de pequenos pólipos e pode se desenvolver ao longo de vários anos. Nessa fase, a detecção oferece inúmeras vantagens. No entanto, as manifestações clínicas para esse tipo de câncer são tardias, e uma vez que se instala o CCR tem progressão relativamente rápida (TOIYAMA; OKUGAWA; GOEL, 2015).

Em vários países, os programas de triagem para a população considerada de risco vêm tentado minimizar o número de mortes e melhorar a sobrevida dos pacientes. Entretanto, existem enormes diferenças no status e na implementação desses testes. Em adição, nos últimos anos as taxas de câncer colorretal tem aumentando em adolescentes e em adultos com menos de 45 anos (WOLF et al., 2018). Geralmente, esses pacientes não costumam realizar os testes de rastreamento para o câncer colorretal, que é tipicamente iniciado a partir dos 50 anos para homens e mulheres com risco médio (WEINBERG; MARSHALL; SALEM, 2017).

Além do contexto de triagem e diagnóstico, a heterogeneidade e o dinamismo do CCR fazem com que haja divergências importantes na avaliação prognóstica e na eficácia do tratamento, mesmo em pacientes com características histopatológicas semelhantes (FERTE; ANDRE; SORIA, 2010). Por causa disso, a identificação de biomarcadores preditivos e/ou prognósticos é desafiante e necessita de melhorias (SCHIRRIPA; LENZ, 2016). Portanto, em vista da crescente incidência e mortalidade do câncer colorretal, as medidas para minimizar os impactos negativos e melhorar a sobrevida dos pacientes, tornam-se urgentes.

Nos últimos anos, uma série de estudos relatam a importância dos marcadores moleculares na prática clínica. De fato, a incorporação de vários testes utilizando essas moléculas para

avaliação diagnóstica, prognóstica e definições de tratamento trouxeram inúmeros benefícios (VACANTE et al., 2018). No câncer colorretal, além das técnicas tradicionais de rastreo e diagnóstico, alguns biomarcadores como KRAS, BRAF e marcadores de instabilidade de microssatélite (MSI) foram adicionados na clínica a fim de classificar melhor esses tumores e manejar estratégias terapêuticas (SEPULVEDA et al., 2017). Outros comumente utilizados são o CEA e o CA19-9 (KIM et al., 2017).

Os testes de biomarcadores baseados no sangue tem se tornado fortemente atrativos por serem minimamente invasivos e serem integrados facilmente em exames de rotinas (HAUPTMAN; GLAVAČ, 2017; YÖRÜKER; HOLDENRIEDER; GEZER, 2016). Além disso, o sangue é a principal amostra biológica utilizada na prática clínica, devido a sua alta representatividade do estado fisiológico no indivíduo (ANDERSON; ANDERSON, 2002a). Nessa matriz, as proteínas são fortemente representadas e constituem a maior parte dos componentes sólidos do plasma (BLANCO et al., 2017).

Estratégias recentes na descoberta de biomarcadores proteicos do câncer envolvem a identificação e formação de painéis que sejam representativos de determinados estágios que envolvem a carcinogênese (CHUNG et al., 2014; FUNG et al., 2015; RAVIPATY et al., 2017). Esse artifício é embasado no fato de que diferentes marcadores podem detectar diversos tipos morfológicos do câncer, portanto a combinação deles pode aumentar sua precisão geral (BHARDWAJ et al., 2017). Para o CCR, várias assinaturas têm sido propostas, entretanto o valor clínico e desempenho delas sofrem fortes variações entre as populações (BHARDWAJ et al., 2017b). Ainda, as proteínas incluídas nos painéis são funcionalmente diferentes, sendo necessárias validações internas e externas (BHARDWAJ et al., 2017b; TAYLOR; ANKERST; ANDRIDGE, 2008).

A avaliação das alterações na expressão de proteínas plasmáticas no câncer colorretal, é extremamente útil na busca de proteínas potenciais para composição de diferentes assinaturas que poderão ser utilizadas em diferentes contextos clínicos. A partir daí, para identificação dessas moléculas em larga escala no sangue, as plataformas baseadas em espectrometria de massas tem oferecido inúmeras vantagens devido a seu grande potencial analítico (AEBERSOLD; MANN, 2003a; GEYER et al., 2017).

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral

- Avaliar a expressão de proteínas plasmáticas em pacientes com Adenocarcinoma colorretal esporádico por *label-free* nanoUPLC-MS^E.

1.1.2 Objetivos específicos

- Identificar as proteínas plasmáticas de pacientes com adenocarcinoma colorretal esporádico por nanoUPLC-MS^E.
- Comparar as proteínas diferencialmente expressas no plasma de pacientes com adenocarcinoma colorretal esporádico em comparação com o grupo controle através do PLGS Expression^E.
- Identificar e avaliar as anotações funcionais entre as principais proteínas superexpressas e subexpressas nas amostras de pacientes com adenocarcinoma colorretal.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 CÂNCER

A causa mais predominante das mortes globais atuais são derivadas de doenças não-transmissíveis e o câncer constitui-se uma das principais delas. Segundo a Agência Internacional para Pesquisa sobre o Câncer, foram estimados 18,1 milhões de novos casos para essa doença (17 milhões excluindo os cânceres de pele não-melanoma) e 9,6 milhões de mortes (9,5 milhões excluindo os cânceres de pele não-melanoma) em todo o mundo em 2018 (BRAY et al., 2018). Ainda de acordo com essa última pesquisa, para ambos os sexos os tipos de cânceres mais incidentes foram: câncer de pulmão (11,6% do total), câncer de mama feminino (11,6%), câncer colorretal (10,2%) e câncer de próstata (7,1%). O câncer de pulmão possui a maior taxa de morte (18,4% do total de óbitos por câncer), seguido pelo câncer colorretal (9,2%), câncer de estômago (8,2%) e câncer de fígado (8,2%) (BRAY et al., 2018).

No Brasil, a estimativa é que ocorra 600 mil novos casos de câncer para cada ano do biênio 2018-2019, excetuando-se os casos de câncer de pele não-melanoma, o que reforça a magnitude desse problema no país (INCA, 2017). Além disso, os cânceres mais incidentes em homens são os de próstata (32,7%), pulmão (8,7%), intestino (8,1%), estômago (6,3%) e cavidade oral (5,2%). Nas mulheres, o de mama (29,5%), intestino (9,4%), colo do útero (8,1%), pulmão (6,2%) e tireoide (4,0%) estão entre os principais (INCA, 2017).

"Câncer" é um termo amplo que abrange mais de 200 doenças distintas unificadas pelo princípio comum de crescimento celular descontrolado e potencial metastático (INCA, 2011). Quando as células neoplásicas permanecem agrupadas em uma massa única e com células diferenciadas semelhantes ao tecido adjacente, o tumor é considerado benigno. Por sua vez, além de apresentarem alta taxa de proliferação, diferenciação morfológica variada (desde células diferenciadas até indiferenciadas), os tumores malignos possuem capacidade de invasão e metástase (ALBERTS et al., 2004).

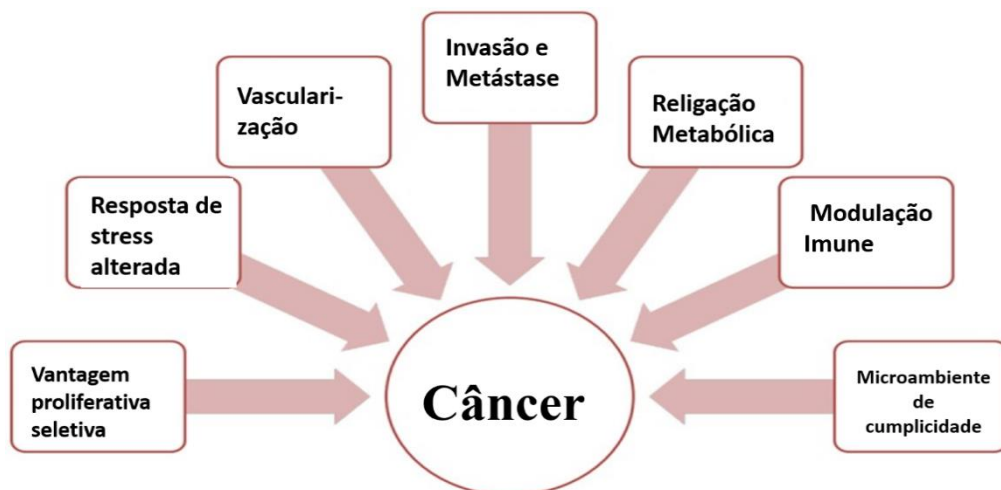
Nas neoplasias, as características adquiridas que são evolutivamente vantajosas promovem a transformação de células fenotipicamente normais em malignas (FOUAD; AANEI, 2017). Nesse processo de transformação, diferentes injúrias agem de forma contínua sobre as células acarretando diversas alterações genéticas e epigenéticas, bem como no arranjo e no número de cromossomos. Em adição, as mudanças heterotípicas celulares promovem ciclos de seleção ao longo da carcinogênese e levam a aquisição de traços competentes ao

câncer (FOUAD; AANEI, 2017). Mutações de ganho e perda de função, bem como o silenciamento genético em três classes principais de genes, nomeadamente proto-oncogenes, supressores e genes de reparo de DNA contribuem coletivamente para o desenvolvimento de genótipo e fenótipo de câncer (HAHN; WEINBERG, 2002).

Segundo Hannah & Weinberg (2011), os tumores não se restringem apenas a uma massa de proliferação de células cancerígenas, mas são tecidos complexos formados por uma série de células distintas que interagem entre si. Deste modo, as características do câncer não envolvem apenas aquelas intrínsecas às células tumorais, abrangendo também as contribuições do microambiente (HANAHAN; WEINBERG, 2011).

As mutações somáticas proporcionam atributos que permitem a evasão de vários mecanismos reguladores que controlam o crescimento celular normal e proliferação (HANAHAN; WEINBERG, 2011). Esses atributos, os *hallmarkers* do câncer, compreendem algumas capacidades biológicas adquiridas durante o desenvolvimento de várias etapas do tumor. Foram propostos pela primeira vez no ano de 2000 pelos autores supracitados e foram atualizados pelos mesmos autores em 2011. Recentemente, Fouad & AAnnei (2017) revisaram esses *hallmarkers* e definiram 7 características principais: crescimento seletivo e vantagem proliferativa, resposta ao estresse alterada favorecendo a sobrevivência global, vascularização, invasão e metástase, religação metabólica, um microambiente de cumplicidade e modulação imune (Figura 1).

Figura 1 – *Hallmarkers* do câncer revisitados.



Fonte: Adaptado de FOUAD & AANEI, 2017.

2.2 CÂNCER COLORRETAL

2.2.1 Epidemiologia e Diagnóstico do Câncer Colorretal

O Câncer Colorretal (CCR) é o terceiro tipo de câncer mais comum, com uma incidência anual de 1,4 milhões de casos. Além disso, é segunda causa de óbito de quase 884.000 pessoas a cada ano. Desde a última atualização do Globocan, o CCR passou do quarto para o segundo tipo de câncer mais letal para ambos os sexos, atrás apenas do câncer de pulmão (BRAY et al., 2018; FERLAY et al., 2015). Nos homens, esse tipo de câncer é o terceiro em incidência e ocupa o quarto lugar no número de mortes. Nas mulheres, o CCR é o segundo tipo de câncer mais incidente depois do câncer de mama e atinge a terceira posição com relação ao número de mortes (BRAY et al., 2018). As tendências nas taxas de mortalidade para o câncer colorretal têm sido heterogêneas geograficamente. Enquanto se tem reportado uma diminuição no número de mortes em países desenvolvidos, em países do continente Asiático, Africano e da América latina a realidade não é a mesma. Apesar disso, é esperado que o número de mortes para o CCR aumente 71,5% em todos os países até 2035, devido ao crescimento e envelhecimento da população (ARAGHI et al., 2018; ARNOLD et al., 2017).

No Brasil, as taxas de incidência acompanham os da população mundial, com 17.380 casos novos de câncer de cólon e reto em homens e 18.980 em mulheres para cada ano do biênio 2018-2019, configurando-se assim, o 3º tipo de câncer mais incidente em homens e o 2º em mulheres (INCA, 2016) (Figura 2). Além disso, é esperado um aumento nas taxas de mortalidade em ambos os sexos para o CCR no Brasil até 2025. As previsões indicam taxas crescentes em mulheres em todo país e nas regiões Norte, Nordeste e Centro-Oeste. Em homens, a previsão é semelhante tanto em nível nacional, quanto por regiões. Apesar disso, as taxas nas regiões sudeste e sul tenderão a decrescer em mulheres, mas para homens, apenas na região Sul (SOUZA et al., 2014).

Alguns fatores de riscos associados ao câncer colorretal envolvem o consumo de álcool, carne processada e vermelha, tabagismo e obesidade (JOHNSON et al., 2013). Além disso, algumas síndromes hereditárias, doenças inflamatórias e alterações no microbioma intestinal possuem forte correlação com o desenvolvimento deste câncer (CHEN, 2018; JASPERSON et al., 2010; TRIANTAFILLIDIS; NASIOULAS; KOSMIDIS, 2009). Dentre os tipos de câncer, o câncer colorretal possui maior proporção de casos familiares, que correspondem a aproximadamente 30% dos eventos. Entre esses, apenas 5% são síndromes hereditárias bem definidas com mutações genéticas altamente penetrantes e características clínicas bem

conhecidas (HADJIPETROU et al., 2017). Esses tipos envolvem a Síndrome de Lynch, Polipose Adenomatosa Familiar (PAF), PAF Atenuada e Polipose Associada ao gene MUTYH. Outras condições que também expressam pólipos são as Síndromes de Peutz-Jeghers (PJS) e Síndrome da Polipose Juvenil (JPS) (JASPERSON et al., 2010). Apesar disso, 70% de todos os casos de CCR são esporádicos, tendo como fatores de risco principais aqueles ambientais/adquiridos. Alguns hábitos saudáveis, incluindo atividades físicas e alimentação rica em fibras, bem como terapia hormonal pós-menopausa e drogas anti-inflamatórias não-esteróides são alguns fatores modificáveis associados à diminuição desse risco (JOHNSON et al., 2013).

O forte ambiente inflamatório intestinal na Colite ulcerativa e Doença de Cronh também predispõe a transformação maligna das células do cólon. Esse evento pode estar associado ao constante “*turnover*” das células epiteliais, aumento da expressão de TLR4 e concomitante aumento de COX-2, dano celular oxidativo, citocinas pró-inflamatórias, ativação crônica de β -catenina, forte regulação do fator nuclear-kappa β (NF- κ β) e do fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) (TRIAFILLIDIS; NASIOULAS; KOSMIDIS, 2009).

Além disso, estudos recentes também têm associado às alterações no microbioma intestinal ao risco de CCR (HANDLEY; DEVKOTA, 2019; KIM et al., 2018; YU, 2018). Esse microbioma é composto principalmente por bactérias, com um número estimado de aproximadamente 10^{14} . No intestino grosso, a disbiose dessas comunidades pode estar relacionada à carcinogênese do câncer colorretal através da produção de genotoxinas, regulação do metabolismo microbiano, modulação de vias de defesa e inflamação do hospedeiro, indução do estresse oxidativo e regulação da defesa anti-oxidativa (GAGNIÈRE et al., 2016). Entretanto, não são apenas as bactérias que estão envolvidas nesse desbalanço. A fração viral do microbioma também tem sido associada ao CRC, principalmente na promoção de novos nichos de colonização das bactérias associadas ao câncer (HANDLEY; DEVKOTA, 2019; HANNIGAN et al., 2018).

Figura 2 – Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2018 por sexo.

Localização Primária	Casos	%	Homens	Mulheres	Localização Primária	Casos	%
Próstata	68.220	31,7%			Mama Feminina	59.700	29,5%
Traqueia, Brônquio e Pulmão	18.740	8,7%			Cólon e Reto	18.980	9,4%
Cólon e Reto	17.380	8,1%			Colo do Útero	16.370	8,1%
Estômago	13.540	6,3%			Traqueia, Brônquio e Pulmão	12.530	6,2%
Cavidade Oral	11.200	5,2%			Glândula Tireoide	8.040	4,0%
Esôfago	8.240	3,8%			Estômago	7.750	3,8%
Bexiga	6.690	3,1%			Corpo do Útero	6.600	3,3%
Laringe	6.390	3,0%			Ovário	6.150	3,0%
Leucemias	5.940	2,8%			Sistema Nervoso Central	5.510	2,7%
Sistema Nervoso Central	5.810	2,7%			Leucemias	4.860	2,4%

*Números arredondados para múltiplos de 10.

Fonte: INCA, 2017.

Como a maioria dos CRCs desenvolve-se lentamente a partir de adenomas ao longo de muitos anos, as oportunidades de triagem e detecção precoce são muito melhores do que na maioria dos outros tipos de câncer (BHARDWAJ et al., 2017). Entretanto, apesar de alguns países desenvolvidos apresentarem diminuição na taxa de mortalidade, associados a exames de triagem, a implementação desses programas precisam ser expandidos em um número maior de países e para um intervalo maior de idade (REX et al., 2017).

Atualmente, aproximadamente 60-70% dos casos de câncer colorretal em populações não rastreadas são diagnosticadas em estágio avançado da doença (MAIDA et al., 2017). Um estudo populacional realizado nos Estados Unidos observou que quase 90% dos pacientes com CCR foram diagnosticados após o desenvolvimento de algum sintoma ou quando uma anormalidade radiológica ou laboratorial foi detectada (MORENO et al., 2016). O diagnóstico tardio está relacionado com uma pior sobrevida. Por outro lado, se diagnosticados em fases iniciais a chance de sobrevida é de 90% (SIEGEL et al., 2017).

As principais categorias dos testes de triagem para o CCR são: Exames baseados em fezes, exames de imagem e endoscópicos. Com o primeiro, é possível reduzir as taxas de mortalidade através da detecção precoce de lesões. Entretanto, através dos exames de imagem e endoscópicos é possível detectar também lesões pré-cancerosas, podendo diminuir a incidência para esse câncer (WINAWER et al., 1993).

Entre os exames baseados em fezes estão o Teste de sangue oculto nas fezes *Guaiac* (gFOBT), Teste Imuno-químico Fecal (FIT) e teste de DNA fecal. (VAN ROSSUM et al.,

2008). Ambos são métodos não-invasivos e de baixo custo e podem reconhecer lesões precoces assintomáticas. O teste de DNA fecal é mais sensível que os anteriores, porque além de identificar sangue oculto nas fezes, ainda é possível detectar de forma qualitativa marcadores de DNA (mutação, instabilidade de microssatélites, reparo de incompatibilidade de DNA alterado e metilação anormal) associados à neoplasia colorretal (DHALIWAL et al., 2015). Entretanto, esses exames possuem baixa sensibilidade para detectar pólipos e adenomas. Além disso, os resultados positivos exigem confirmação através da colonoscopia (GONZALEZ-PONS; CRUZ-CORREA, 2015). Algumas proteínas também têm sido sugeridas na implementação destes testes, embora ainda aguardam validação (DHALIWAL et al., 2015).

Os testes de imagem incluem o enema de bário de duplo contraste, colonografia por tomografia computadorizada e endoscopia da cápsula do cólon. As técnicas endoscópicas compreendem a sigmoidoscopia flexível e colonoscopia, que é padrão-ouro na triagem do CCR (MAIDA et al., 2017; WINAWER et al., 1993). Esses testes, apesar de serem mais sensíveis do que aqueles baseados em fezes possuem maiores desvantagens por serem invasivos, requerer sedação, possuir risco de perfurações (sigmoidoscopia flexível e colonoscopia), ou ainda necessitar de preparo intestinal. Por causa disso, estão relacionadas à baixa aceitação na triagem do CCR.

Neste contexto, biomarcadores sanguíneos podem ser ferramentas práticas, uma vez que o monitoramento de biomarcadores em fluidos biológicos oferecem vantagens como invasão mínima e fácil acessibilidade (YÖRÜKER; HOLDENRIEDER; GEZER, 2016).

2.2.2 Mecanismos moleculares da Carcinogênese do Câncer Colorretal

O câncer colorretal (CCR) surge como resultado do acúmulo de alterações genéticas e epigenéticas adquiridas (GRADY; PRITCHARD, 2014). Há uma sequência bem descrita de eventos mutacionais que caracterizam a transição a partir do epitélio do cólon normal para adenomas pré-malignos e, em seguida, adenocarcinoma invasivo (KHEIRELSEID; MILLER; KERIN, 2013; YAN; GUO, 2014) (Figura 3).

Três principais vias moleculares distintas relacionadas ao CRC foram descritas: Instabilidade Cromossômica (CIN), Instabilidade Microssatélite (MSI) e Fenótipo Metilador das Ilhas CpGs (CIMP) (KHEIRELSEID; MILLER; KERIN, 2013).

A via CIN é a alteração mais frequente em tumores esporádicos (65-70%) e está relacionada a um desequilíbrio numérico cromossomal e a perda de heterozigose (LOH). As causas dessa instabilidade refletem os defeitos na segregação cromossômica, no reparo do DNA

e da função telomérica, além da ativação dos proto-oncogenes KRAS, BRAF, PTEN e PIK3CA e a inativação de supressores tumorais como APC, p53 e SMAD4 (PINO; CHUNG, 2010).

Um dos eventos iniciais da carcinogênese colorretal descrita primariamente por Fearon (1990) se refere à alteração do gene APC (adenomatose polipose). O produto desse gene está relacionado com a via de transdução de sinal Wingless/Wnt ao regular os níveis intracelulares da proteína β -catenina, co-ativadora essencial da transcrição de vários genes e componente das junções aderentes, onde fornece a ligação entre a E-caderina e a α -catenina (BEHRENS et al., 1996; BEN-ZE'EV; GEIGER, 1998). Desde modo, a APC pode controlar também a adesão celular.

Outro evento chave nesse processo é a instabilidade de microssatélite (MSI) causada por reparos de incompatibilidade de DNA (MMR) defeituosos (FLEISHER et al., 2000). O sistema de MMR é um sistema multi-proteína, que age como uma máquina de prova para aumentar a fidelidade de repetições de DNA através de identificações e reparo direto de nucleotídeos incompatíveis (LI, 2008). Os principais genes associados são: *mutL homologue 1* (MLH1), MLH3, *mutS homologue 2* (MSH2), MSHA3, MSH6 e *PMS homologue 2* (PSM2). A inativação de um ou mais genes envolvidos nesse sistema, aumenta a frequência de mutações de 100 a 700 vezes (FLEISHER et al., 2000). Esses erros se acumulam predominantemente em microssatélites, sequências curtas repetitivas de nucleotídeos presentes em todo genoma humano, que estão susceptíveis a expandir-se ou contrair-se durante a replicação do DNA (COLUSSI et al., 2013). Cerca de 10% a 20% dos casos de câncer colorretal possui MSI, incluindo CRC esporádico (12%) e câncer colorretal hereditário sem polipose (HNPCC, síndrome de Lynch 3%) (ABDEL-RAHMAN; PELTOMÄKI, 2008; JASS, 2007).

Ainda de acordo com o MSI, o CCR pode ser classificado em MSI alto (MSI-H), MSI baixo (MSI-L) e MSI estável (MSS). No primeiro, 2 ou mais genes MMR estão mutados e no segundo, apenas uma mutação é encontrada. O MSS não apresenta instabilidade em nenhum loci (COMPTON, 2003).

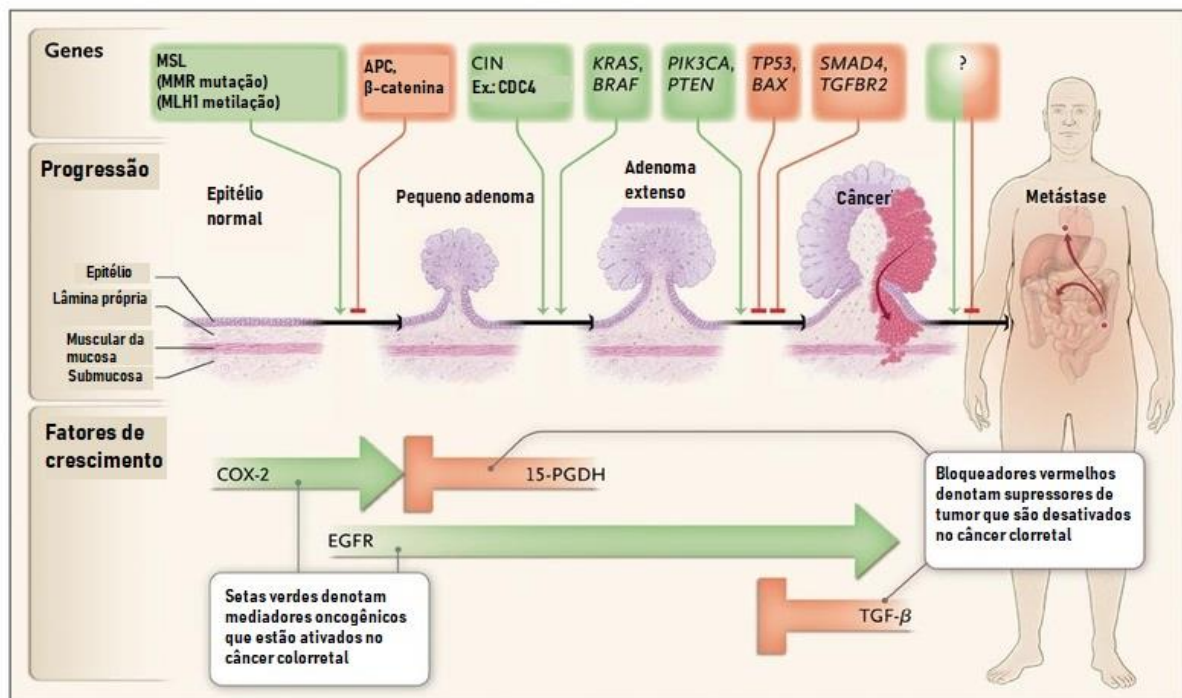
O silenciamento epigenético de supressores de tumor no câncer colorretal é outro fenômeno ligado a carcinogênese e é conhecido como Fenótipo Metilador de Ilhas CpG (Citosina precedida de Guanina) (CIMP). Essas ilhas, são regiões do genoma presentes nos promotores de mais de 50% dos genes humanos e são conhecidas por regular a expressão dos transcritos através da metilação da posição 5' das citosinas (BIRD, 1986). No câncer, elas podem ser hipermetiladas de forma aberrante em alguns genes-chaves implicados com a proliferação, reparo do DNA, invasão e metástase (FRANCIS et al., 2010; MOJARAD et al.,

2013). O gene MLH1 do sistema MMR frequentemente é encontrado hipermetilado no CCR (VILAR; TABERNEIRO, 2013).

Cerca de 15-20% dos CRCs apresentam altos níveis de genes metilados de forma aberrante, já os outros exibem pelo menos um nível baixo de metilação (HUGHES et al., 2012). Esse fenótipo não é exclusivo do CCR, podendo ser encontrado também em outros tipos de cânceres (MARKOWITZ; BERTAGNOLLI, 2009).

Esses três principais eventos não ocorrem de forma exclusiva ou isolada. Subtipos moleculares do CCR com MSI pode exibir CIN e concomitante CIMP (YAMAGISHI et al., 2016).

Figura 3 – Genes e vias de fatores de crescimento que impulsionam a progressão do câncer colorretal.



Fonte: Adaptado de MARKOWITZ & BERTAGNOLLI, 2009.

Na progressão do câncer de cólon, as alterações genéticas visam os genes que são identificados no topo do diagrama. A via de instabilidade de microssatélite (MSI) é iniciada por mutação do gene de reparo incompatível (MMR) ou por metilação aberrante de MLH1 e é ainda associada a mutações a jusante em TGFBR2 e BAX. O ponto de interrogação indica que alterações genéticas ou epigenéticas específicas da progressão metastática não foram identificadas. As principais vias do fator de crescimento que são alteradas durante a neoplasia do cólon são mostradas na parte inferior do diagrama. CIN: Instabilidade Cromossômica, EGFR: Receptor do Fator de Crescimento Epidérmico, 15-PGDH: 15-prostaglandina desidrogenase e TGF-β: fator de crescimento transformador β.

2.2.3 Classificação Molecular do Câncer Colorretal

Apesar de ter suas principais alterações moleculares conhecidas, há muitas inconsistências na classificação do CCR. Isso se deve principalmente à forte heterogeneidade que esse tumor apresenta, que não se limita apenas ao nível genético, mas se manifesta também através de alterações epigenéticas, modificações pós-traducionais, influência do microambiente tumoral, entre outros (SAGAERT; VANSTAPEL; VERBEEK, 2018). A presença dessa heterogeneidade constitui-se como crucial no ambiente clínico, uma vez que afeta de forma direta as decisões de tratamento. Além disso, as pequenas frações tumorais obtidas durante a biópsia geralmente não representam, a nível histopatológico e molecular, toda a população de células existentes no tumor, o que pode gerar um erro importante, principalmente quando o tecido é testado para biomarcadores relacionados à terapia (SAGAERT; VANSTAPEL; VERBEEK, 2018; SWANTON, 2012).

Nos últimos anos, especialistas sub classificaram esse câncer em quatro subtipos moleculares consensuais (SMC) e que exibem características bem distintas: SMC1(MSI Imune), SMC2(canônico), CMS3 (metabólico) e CMS4 (mesenquimal) (GUINNEY et al., 2015) (figura 4).

O primeiro envolve grande parte dos tumores com MSI e apresenta superexpressão de proteínas envolvidas no reparo do dano ao DNA. Ainda, os tumores CMS1 exibem um estado generalizado de hipermetilação (GUINNEY et al., 2015). Nesse subtipo também há um aumento da expressão de genes associados a um infiltrado imunológico difuso, composto principalmente de células Th-1 e citotóxicas, juntamente com uma forte ativação de vias de evasão imune, uma característica das instabilidades por microsatélite no CCR. Clinicamente, o CMS1 é mais comum em tumores no cólon direito e é mais frequente em mulheres, além de estar associado a uma sobrevida muito baixa após recidiva (GUINNEY et al., 2015; LLOSA et al., 2015).

O segundo compreende tumores com maior instabilidade cromossômica (CIN), maior ganho de cópias em oncogenes e perdas em genes supressores tumorais. Nesse grupo, há também diferenciação epitelial e forte regulação positiva dos alvos das vias WNT e MYC, implicados classicamente na carcinogênese do CRC. Em adição, tumores CMS2 mostram um aumento na expressão de miR-17-92, um alvo transcricional direto de MYC (GUINNEY et al., 2015). Esse oncogene, através de miR-17-92 mantém, nas células tumorais, um estado proliferativo e suprimindo senescência e apoptose (LI et al., 2014). O CCR do tipo CMS2 é

encontrado com mais frequência no cólon esquerdo, além de estarem mais relacionados com uma maior sobrevida.

Figura 4 – Proposta de taxonomia do câncer colorretal refletindo diferenças biológicas significativas nos subtipos moleculares baseados na expressão gênica.

CMS1 MSI Imune	CMS2 Canônico	CMS3 Metabólico	CMS4 Mesenquimal
14%	37%	13%	23%
MSI, alto CIMP Hipermutação	SCNA alto	MSI misto, SCNA baixo CIMP alto	SCNA alto
Mutações em <i>BRAF</i>		Mutações em <i>KRAS</i>	
Infiltração e ativação imune	WNT e ativação de MYC	Desregulação metabólica	Infiltração estromal Ativação de TGF- β Angiogênese
Pior sobrevida após recidiva			Pior sobrevida livre de recidiva

Fonte: Modificado de Guinney *et al*, 2015

CIMP, Fenótipo Metilador Ilha CpG; **MSI**, instabilidade de microssatélite; **SCNA**, alterações no número de cópias somáticas; **TGF**, fator de crescimento transformador. * Valores em porcentagens são referentes ao CCR em estágio inicial.

Os tumores CMS3 apresentam perfis genômicos e epigenômicos globais distintos daqueles com Instabilidade Cromossômica, apresentado baixa prevalência de alterações no número de cópias somáticas (SCNAs), cerca de 30% de hipermutação e maior prevalência do Fenótipo de Metilação em ilhas CpG (CIMP). Em adição, demonstram superexpressão de proteínas relacionadas com o metabolismo celular e possuem mutações ativadoras de KRAS relacionadas com a indução da adaptação metabólica, incluindo ativação de glutaminólise e lipidogênese (GUINNEY *et al.*, 2015; YING *et al.*, 2012). Esse fenótipo celular é semelhante com um subtipo metabólico descrito para o câncer gástrico (WIŚNIEWSKI *et al.*, 2014). Outra característica associada a CMS3 é a baixa expressão da família de let-7 miR, que está geralmente relacionada com altos níveis de expressão de KRAS (GUINNEY *et al.*, 2015).

De modo semelhante ao CMS2, o subtipo CMS4 também apresenta forte instabilidade cromossômica. Entretanto, além disso, esses tumores apresentam algumas características particulares como a regulação positiva de genes implicados na transição epitelial mesenquimal (TEM) e assinaturas associadas à ativação da sinalização do fator de crescimento transformante

β (TGF β), bem como angiogênese, remodelação da matriz e sistema inflamatório com forte ativação de plaquetas e do sistema complemento (GUINNEY et al., 2015). Outras características relacionam-se com maior infiltração estromal e superexpressão de proteínas da matriz extracelular (GUINNEY et al., 2015). Nesses tumores, também é possível verificar uma regulação negativa família miR-200, que é envolvida na modulação e regulação da TEM (PARK et al., 2008). Além disso, a maioria dos CMS4 são diagnosticados em estágios mais avançados (III e IV).

Esses 4 subtipos moleculares representam atualmente a melhor descrição da heterogeneidade tumoral a nível de expressão gênica (DIENSTMANN et al., 2017).

2.3 BIOMARCADORES

De acordo com o grupo de trabalho de definição de biomarcadores do *National Institute of Health*- Instituto Nacional de Saúde (NIH), um marcador biológico (biomarcador) é uma característica que é objetivamente medida e avaliada como um indicador de processos biológicos normais, processos patogênicos ou respostas farmacológicas a uma intervenção terapêutica (BIOMARKERS DEFINITIONS WORKING GROUP., 2001).

Os marcadores tumorais são produzidos pelo próprio tumor ou por outros tecidos em resposta à presença do câncer ou de outras condições associadas, como a inflamação, por exemplo (KULASINGAM; DIAMANDIS, 2008). Na prática clínica, eles podem ser usados para rastreio e detecção precoce do câncer, auxílio do diagnóstico, determinar resposta à terapia, indicador de prognóstico e progressão da doença e indicação de recaída durante o monitoramento (NAGPAL et al., 2016).

Quanto à natureza, existem diferentes tipos e formas de marcadores tumorais, que incluem hormônios, RNA, DNA, diferentes subgrupos funcionais de proteínas, tais como enzimas, glicoproteínas, antígenos oncofetais e receptores. Além disso, outras mudanças em tumores, tais como mutações genéticas, amplificações ou translocações e mudanças nos perfis gerados por *microarray* (assinaturas genéticas), também são formas de marcadores tumorais (KULASINGAM; DIAMANDIS, 2008).

Um marcador tumoral ideal deve ter alta especificidade, alta sensibilidade, possuir níveis correlacionados com o tumor, meia-vida curta, baixo custo, além de ser facilmente mensurado através de espécimes obtidos por procedimentos pouco invasivos (SHARMA, 2009). Uma observação intrigante quanto aos marcadores tumorais comumente utilizados é que,

em geral, eles sofrem baixa sensibilidade e especificidade no diagnóstico, isso quer dizer que muitos marcadores podem apresentar-se elevados em diferentes patologias, dificultando a validação do mesmo para apenas uma doença. Somente alguns biomarcadores entraram na rotina clínica, e apenas para um número limitado de tipos de câncer (HULDER, 2014). Na maioria dos casos, os biomarcadores atuais são utilizados em conjunto com exames de imagem e informações de biópsia clínico-patológico associado, antes de ser liberado um parecer clínico.

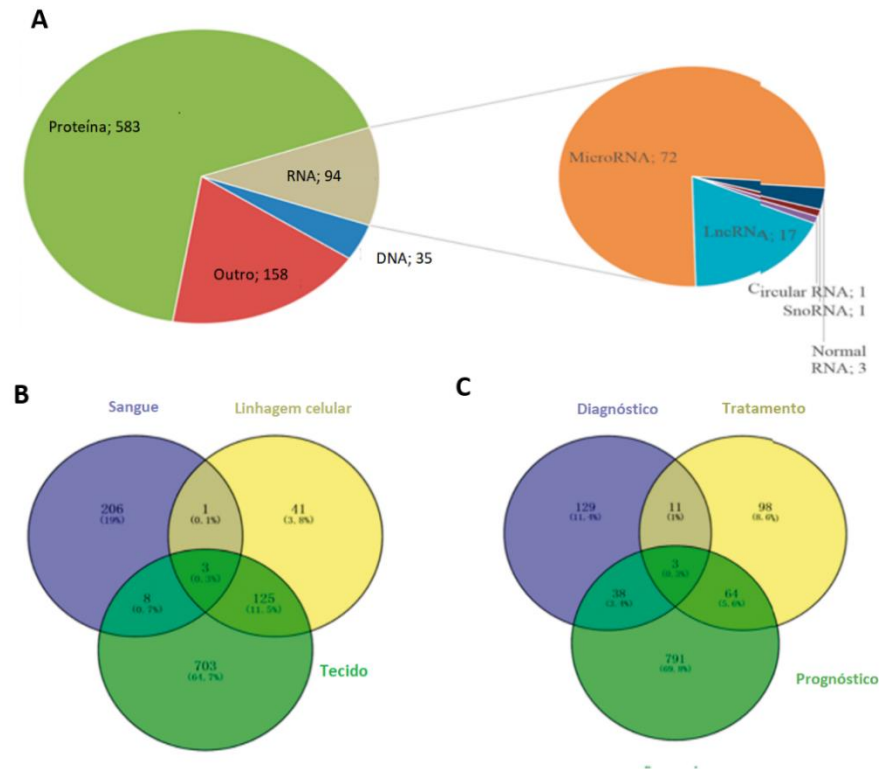
2.3.1 Biomarcadores moleculares para o Câncer colorretal

Com a finalização do projeto Genoma Humano, muitas descobertas no campo de biomarcadores surgiram para uma série de doenças, incluindo o câncer. Desde a elucidação dos principais mecanismos moleculares do câncer colorretal por Fearon & Volgestein (1990) e posterior subclassificação por Guiney *et al.* (2015), vários potenciais biomarcadores para esse câncer foram surgindo. Recentemente, Zhang *et al.* (2018) criaram um banco de dados de biomarcadores para o CRC, o *colorectal database* (CDB). Esse banco compreendeu uma compilação de 1115 artigos, previamente filtrados, de 1986 até 2017. Foram estabelecidos e contabilizados um total de 870 potenciais biomarcadores não-redundantes. Dentre eles, 583 são proteínas, 94 RNAs (MicroRNA, LncRNA, RNAcircular, snoRNA), 35 DNAs e outras 158 moléculas (ZHANG *et al.*, 2018).

Além disso, 64, 7% dessas moléculas foram descobertas em tecido tumoral, 19% no sangue e 3,8% em linhagens celulares. Para uso na prática clínica, 69,8% dos biomarcadores foram sugeridos para prognóstico, 11,4 % para diagnóstico e 8,6% para estratégias terapêuticas. A média de idade dos pacientes incluídos nos estudos foi de 62,82 e a proporção de homens e mulheres foi de 1,2:1 (ZHANG *et al.*, 2018). Apesar de abranger quase todos os continentes, a maioria dos estudos incluídos foram provenientes da Ásia, Europa e América do Norte. Nenhum estudo brasileiro passou pelos critérios de inclusão.

Os principais biomarcadores reportados/utilizados nos países não-asiáticos foram, em ordem de utilização: Timidilato Sintase (TS), Fator de Crescimento Vascular Endotelial (VEGF-1), Antígeno Carcinoembrionário (CEA), marcadores de instabilidade de microssatélite (MSI), Bcl-2, p53, Perda de heterozigidade (LOH), Endotelina-1 (ET-1), p27, Células circulantes tumorais (CTCs), KRAS, Inibidor de Metaloproteinase 1 tecidual, K-67 e Razão neutrófilo:linfócito. Na figura 5, um esquema demonstra as principais características dos biomarcadores incluídos no CDB.

Figura 5 – Principais características dos biomarcadores do CBD.



Fonte: Adaptado de ZHANG et al, 2018.

A: Categoria biológica dos biomarcadores no CDB. B: Principais fontes dos biomarcadores. C: Aplicação dos biomarcadores.

Para além do campo da pesquisa, muitos marcadores moleculares podem ser usados na prática clínica. No contexto do diagnóstico, padrões de metilação foram bem caracterizados. A metilação aberrante nos genes NDGR4 e BMP3 e mutações em KRAS fazem parte de um ensaio quantitativo molecular nas fezes conhecido como Teste Imonoquímico fecal (FIT) para triagem do CRC (IMPERIALE et al., 2014). Alguns marcadores de metilação de DNA também foram propostos para o plasma. O perfil de metilação em SEPT9, BCAT1 e IKF1 foram caracterizados e testados em um ensaio clínico para o rastreio do câncer colorretal (CHURCH et al., 2014; PEDERSEN et al., 2015).

Alguns marcadores da instabilidade de microsatélite (MSI) também têm sido utilizados para classificação dos pacientes no diagnóstico, mas também apresentam valor prognóstico e podem ser úteis para o manejo terapêutico (KAWAKAMI, 2016). Esses marcadores incluem mononucleotídeos - BAT25/26 e três dinucleotídeos - D2S123, D5S346 e D17S250 (LINDOR et al., 2002). O teste é realizado através de comparações do DNA do paciente com controles saudáveis por PCR. Além disso, o MSI pode ser avaliado também pela detecção da perda do

produto proteico dos genes envolvidos. A expressão das proteínas envolvidas no sistema de reparo MMR podem ser avaliadas por imunoquímica e auxiliar inclusive na identificação de pacientes com Síndrome de Lynch (KAWAKAMI; ZAANAN; SINICROPE, 2015).

No contexto da terapia, a enzima timidilato sintase (TS) tem sido utilizada como alvo da quimioterapia padrão em vários tumores, incluindo o câncer colorretal (BERGER; BERGER, 2006; PAPAMICHAEL, 1999). O 5-Fluorouracil (5-FU) inibe a atividade de TS, desligando a síntese de DNA e desencadeando apoptose e outros processos de morte celular (BERGER; BERGER, 2006). Recentemente, novos estudos relataram o valor clínico das enzimas que metabolizam o 5-FU. A co expressão dessas enzimas possui valor prognóstico significativo e pode ser útil como biomarcadores em pacientes com câncer colorretal (GAJJAR et al., 2018).

Outra proteína comumente associada ao CRC, o VEGF-1, é um fator angiogênico predominante nesse câncer e é comumente associado a um mau prognóstico e formação de metástases (ELLIS et al., 2000). Esse marcador também é utilizado como alvo de alguns anticorpos monoclonais (Bevacizumab, Ramucirumabe e Ziv-aflibercept) que tem, em conjunto com outras terapias, favorecido uma melhora na sobrevida global após o diagnóstico do CCR. Outros anticorpos visando o receptor do VRGF também vem sendo utilizados (HOPIRTEAN; NAGY, 2018).

As últimas diretrizes sugeridas da Sociedade Americana de Patologia Clínica recomendam a pesquisa de mutações em KRAS e NRAS para os pacientes que forem considerados para terapia anti-EGFR (SEPULVEDA et al., 2017). Com relação ao prognóstico, a análise mutacional de BRAF a partir de amostras teciduais, pode ser usada para estratificação prognóstica. Mutações nesse gene conferem valor prognóstico adverso e são associados a piores desfechos clínicos (SEPULVEDA et al., 2017; ZARKAVELIS et al., 2017). Além disso, as mutações em BRAF também podem ser usadas para análise de risco na Síndrome de Lynch em tumores deficientes no sistema de reparo MMR com perda do gene MLH1. Ainda, o teste de reparo incompatível em pacientes com CRC foi recomendado para a identificação de pacientes com alto risco de síndrome de Lynch e/ou estratificação prognóstica (SEPULVEDA et al., 2017).

Além de biomarcadores genéticos, proteínas também já são utilizadas no contexto clínico do CRC. Embora com algumas limitações, o antígeno carcinoembrionário (CEA) e o antígeno carboidrato 19-9 (CA19-9) são os principais marcadores associados.

O CEA é um antígeno oncofetal produzido em baixos níveis por células normais da mucosa gastrointestinal (GOLD; FREEDMAN, 1965). Por ser um biomarcador encontrado no sangue, ele representa um teste seguro, não invasivo e potencialmente barato (STAIB; LINK; BEGER, 2000). Altos níveis de CEA estão associados com a progressão do câncer ao aumentar a sobrevivência de células tumorais e favorecer a angiogênese. Os níveis séricos desse antígeno são recomendados para planejamento cirúrgico e como marcador de prognóstico para pacientes que foram submetidos à ressecção cirúrgica (LOCKER et al., 2006). Em um dos estudos mais recentes reportando essa proteína, Kim *et al.* (2017) relataram que os níveis séricos elevados de CEA e CA 19-9 foram significativamente associados ao maior tamanho da lesão e multiplicidade de adenomas, ainda assim eles não são recomendados para testes de triagem do CRC (KIM et al., 2017; LOCKER et al., 2006).

O CA 19-9 comumente tem sido associado ao CEA na prática clínica. Esse antígeno é um ligante de E-selectina que desempenha um papel importante na adesão de células cancerosas a células endoteliais (SISIK et al., 2013). É o segundo marcador mais investigado de tumor gastrointestinal e pode ser usado como marcador adicional para acompanhar o progresso da doença em pacientes com CCR que apresentam níveis normais de CEA, ou em combinação para avaliar fatores prognósticos (SISIK et al., 2013; STIKSMA; GROOTENDORST; VAN DER LINDEN, 2014).

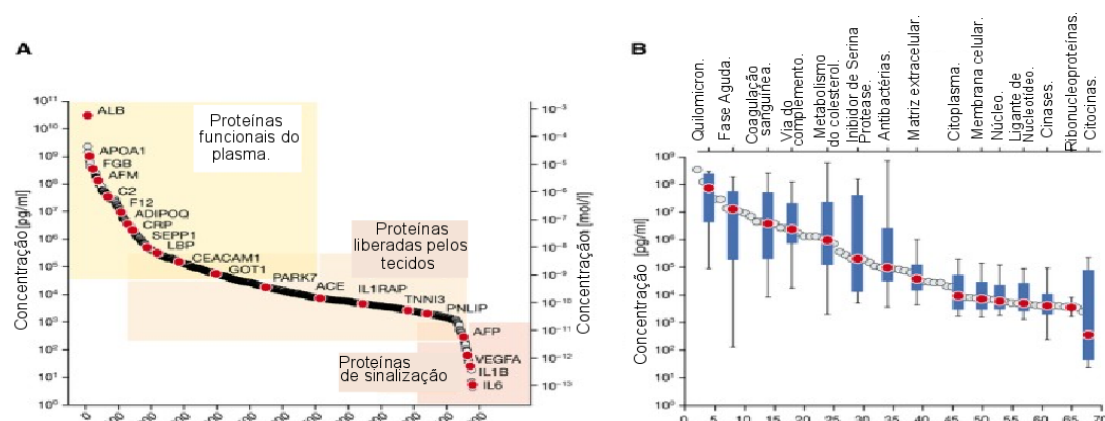
2.3.2 O plasma como fonte de biomarcadores

É bem conhecido que a partir do sangue é possível obter informações abrangentes do estado fenotípico de um indivíduo. O sangue humano é composto por células como eritrócitos, trombócitos (plaquetas) e leucócitos (SZULMAN, 1966). Essas células estão suspensas em uma porção líquida conhecida como plasma. O contato do sangue com todos os órgãos e tecidos permite com que este contenha as impressões fisiológicas do estado normal, de danos celulares e de processos patológicos (SCHWENK et al., 2017). A maioria dessas informações estão presentes no plasma e são representados por células livres, proteínas, lipídios, metabólitos, DNA e RNA livres de células e outras pequenas moléculas. A partir daí é possível obter dados genéticos, epigenéticos, bem como obtenção de perfis lipidômicos, proteômicos e bioquímicos (SCHWENK et al., 2017). As proteínas são os componentes sólidos mais abundantes do plasma, com concentração plasmática total variando de 6 a 8 g/dL (média de 7,2 g/dL) em um ser humano adulto normal (BLANCO et al., 2017). Além de ser a principal amostra clínica utilizada, o plasma configura-se como a maior versão do proteoma humano.

Seguindo a classificação funcional de Putnam (1975), as proteínas plasmáticas são agrupadas de acordo com o design/função, são elas: Proteínas que atuam no plasma e são secretadas por tecidos sólidos (fígado e intestino), Imunoglobulinas, ligantes de receptores locais e de longa distância, passageiros temporárias, proteínas liberadas por tecidos, proteínas de secreção aberrante e proteínas “estrangeiras” (outros organismos) (ANDERSON; ANDERSON, 2002b). De maneira resumida, é possível dividi-las em três grupos principais através de sua ordem de grandeza no plasma normal: proteínas clássicas, proteínas liberadas pelos tecidos e proteínas sinalizadoras. No primeiro grupo estão as proteínas que desempenham funções na circulação sanguínea como a albumina sérica, apolipoproteínas, proteínas de fase aguda da resposta imunitária inata e proteínas da cascata de coagulação. O segundo principal grupo, refere-se as proteínas que extravasam dos tecidos. Dentre elas, ALT, AST e as troponinas teciduais. O terceiro grupo é composto por moléculas de sinalização como citocinas e pequenos hormônios peptídicos (insulina). Geralmente estão em baixa concentração em estado normal e são regulados dependendo da demanda (ANDERSON; ANDERSON, 2002a; GEYER et al., 2017). A figura 6 demonstra o intervalo de concentração das principais proteínas de cada grupo.

A caracterização e identificação destas proteínas teve início em 2002 com o Projeto Proteoma do Plasma Humano (*Human Plasma Proteome Project - HPPP*) organizado pela Organização do Proteoma Humano (Human Proteome Organization – HUPO). As análises dos laboratórios envolvidos na pesquisa identificaram uma faixa de aproximada entre 888 e 960 proteínas com evidências de alta confiança através de espectrometria de massas (DEUTSCH et al., 2005; STATES et al., 2006). A partir daí a busca por biomarcadores proteicos plasmáticos para diversas doenças aumentaram consideravelmente. Nos últimos anos, novas análises realizadas, acrescentaram ainda mais o número de proteínas que podem ser encontradas no plasma, como exemplo, Keshishian *et al.* (2015) relatou a presença de mais de 4600 proteínas presentes no plasma de pacientes com cardiomiopatia hipertrófica (KESHISHIAN et al., 2015).

Figura 6 – Faixa de concentração das proteínas plasmáticas.



Fonte: Adaptado de GEYER et al. 2017

(A) Intervalo de concentração das proteínas plasmáticas com os nomes dos genes de várias proteínas plasmáticas (pontos vermelhos). As concentrações representadas são do soro ou plasma e foram medidas por diversos métodos, conforme recuperado do banco de dados do proteoma do plasma em maio de 2017 (<http://www.plasmaproteomedatabase.org/>) (Nanjappa et al, 2014). (B) Anotação bioinformática por palavra-chave do banco de dados do proteoma do plasma. Os *boxplots* azuis com os desvios de 10 a 90% demonstram a gama das diversas proteínas que contribuem para funções distintas.

Dada essa incrível diversidade de proteínas no plasma, não é de se surpreender que elas compreendam cerca de 42% de moléculas alvo na rotina clínica, tornando-se o analito mais analisado em laboratório (ANDERSON, 2010; HORTIN; CARR; ANDERSON, 2010). Atualmente, existem mais de 100 testes clínicos de para proteínas do plasma ou soro aprovadas pelo FDA (*Food and drug administration*). Dentre eles, 50% fazem parte principalmente da classe funcional mais abundante, 25% dos marcadores de vazamento tecidual (25%), seguido dos ligantes de receptores, imunoglobulinas e proteínas secretadas (ANDERSON, 2010; GEYER et al., 2017). Além disso, historicamente, a maioria dos biomarcadores de câncer aprovados pelo FDA dos EUA foi para medida no soro/plasma (LI; CHAN, 2014). Apesar disso, há ainda certa dificuldade em obter identificação e quantificação de proteínas menos abundantes no plasma devido à faixa dinâmica extremamente alta de proteínas clássicas (STATES et al., 2006). Para isso, algumas abordagens de depleção e fracionamento têm sido utilizadas. Uma delas é a utilização de anticorpos imobilizados direcionados as proteínas mais abundantes no plasma, como Albumina e as Imunoglobulinas (MILLIONI et al., 2011). Entretanto, a fim de otimizar ainda mais a busca de proteínas de baixa abundância, alguns trabalhos utilizam o que é conhecido como “super-depleção”, aonde são separadas cerca de 60 proteínas mais abundantes (QIAN et al., 2008). Outra metodologia utiliza esferas com capacidade de ligação a essas proteínas para normalização do proteoma plasmático

(THULASIRAMAN et al., 2005). Apesar de facilitar a busca, esses métodos podem acabar eliminando alguma proteína alvo importante.

As proteínas clássicas do plasma, apesar de estarem aumentadas em diversas patologias, possuem padrões de expressão distintos em vários tipos de cânceres. (W.W. et al., 2010). Além disso, quando combinada com outras proteínas podem constituir painéis de biomarcadores importantes. Um exemplo disto é o OVA1 (*Vermillion, Inc.*), um teste de diagnóstico multivariado para pacientes com câncer de ovário que utiliza índices de concentração de cinco proteínas: CA125, transtirretina (pré-albumina), apolipoproteína A1, microglobulina beta 2 e transferrina. Com exceção da CA125, as demais proteínas deste painel foram descobertas utilizando a plataforma proteômica SELDI-TOF (ZHANG et al., 2004; ZHANG; CHAN, 2010).

Apesar disso, a busca por biomarcadores plasmáticos para o câncer, tem se constituindo um desafio. Várias proteínas potenciais foram descobertas, mas como mencionado acima, poucas foram validadas, o OVA1 é um dos poucos exemplos de sucesso. Dentre os motivos, além da alta quantidade de proteínas de abundância, problemas com reprodutibilidade, sensibilidade de alguns equipamentos, número de amostras insuficientes tem sido comumente relatados. De maneira geral, os testes aprovados representam apenas 1% dos produtos dos genes definidos como proteoma na prática clínica e nos últimos 15 anos foram aprovados uma média de 1,5 proteínas por ano (CASTAGNINO, 2011).

No câncer colorretal, várias assinaturas de proteínas com base no sangue foram identificadas e formatadas. Em uma revisão sistemática realizada por Bhardwaje colaboradores foram descritas 93 proteínas descobertas no plasma e distribuídas em 36 painéis distintos (BHARDWAJ et al., 2017b). Os autores encontraram vários marcadores inclusos em mais de uma assinatura. Dentre eles o CEA, CA19-9, CA242, CA125, CA153, CA724 e CYFRA21-9. É importante notar que nenhum desses são específicos para o CCR. Outras proteínas como osteoponina, separase, alfa-1ácido glicoproteína, alfa-1antitripsina, componente 9 do complemento, ferritina e proteína de choque térmico 60 também foram incluídas em mais de um painel (BHARDWAJ et al., 2017b). Em adição, alguns marcadores inflamatórios como Fator de Necrose Tumoral-alfa, interleucinas e proteína C-reativa também foram descritos. Entretanto, o desempenho destas assinaturas pode variar em diferentes populações, destacando a necessidade de validações internas e externas dos biomarcadores sugeridos (BHARDWAJ et al., 2017a; TAYLOR; ANKERST; ANDRIDGE, 2008).

As principais técnicas utilizadas para a pesquisa destas proteínas no plasma foram os imunoenaios como ELISA (ensaio de imunoabsorção enzimática) e EIA (imunensaio enzimático) e plataformas baseadas em espectrometria de massas (EM) (BHARDWAJ et al., 2017b). Embora os imunoenaios sejam sensíveis e extremamente úteis na identificação de proteínas, eles funcionam apenas para um alvo de cada vez, enquanto que através da EM é possível identificar inúmeras proteínas por análise. Portanto, as abordagens baseadas em espectrometria de massas são muito importantes na proteômica de descoberta (AEBERSOLD; MANN, 2003b).

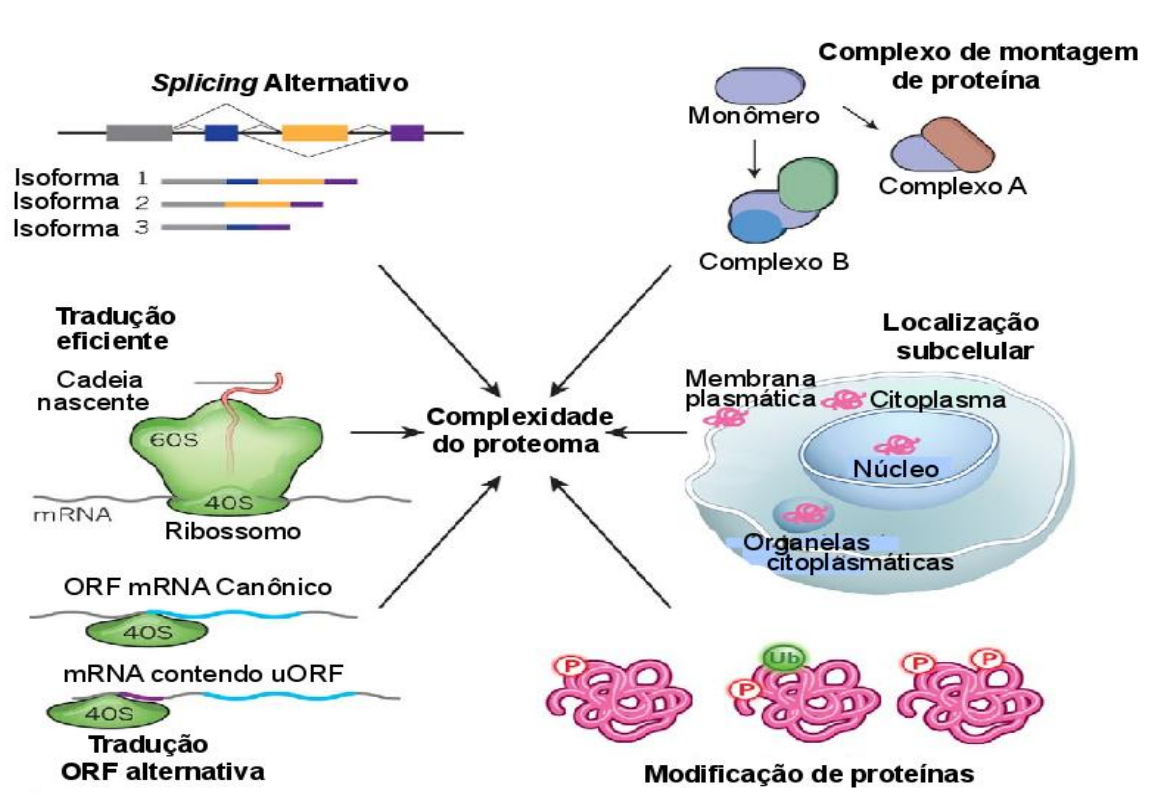
2.4 ABORDAGENS PROTEÔMICAS NA BUSCA POR BIOMARCADORES

Após a era genômica, os estudos baseados na identificação de proteínas aumentaram significativamente ao longo dos anos. O proteoma compreende todas as proteínas expressas em qualquer amostra biológica, seja ela: célula, tecido ou fluido corporal (GARRELS, 2001). A proteômica, por sua vez, trata-se da determinação em larga escala do gene e da função molecular em nível de proteína (AEBERSOLD; MANN, 2003a). A principal busca por estudos baseado em proteomas, deve-se a sua representatividade do fenótipo celular, uma vez que as proteínas são as principais moléculas efetoras das células e responsáveis por sua sobrevivência e função (LODISH et al., 2000). Elas desempenham várias tarefas, incluindo a forma e a organização celular, produção, transporte, manutenção, reciclagem de várias moléculas, comunicação intra e extracelular (LODISH et al., 2000). Além disso, os dados genômicos ou transcriptômicos nem sempre se correlacionam com a abundância de proteínas de fato. Atualmente temos 21.306 genes codificadores com capacidade de produzir cerca de 323.824 transcritos com potencial de codificação de proteínas, tornando o proteoma extremamente complexo (PERTEA et al., 2018). Essa complexidade está relacionada a vários fatores, além do *Splicing* alternativo do mRNA. Após a tradução, as proteínas ainda sofrem modificações pós-traducionais através da adição de grupos fosfo, acetílico, ubiquitínico, metílico, entre outros, em sua estrutura (DUAN; WALTHER, 2015). Mais de 450.000 MPTs não-redundantes já foram reportadas no banco de dados *PhosphoSitePlus* (HORNBECK et al., 2018). Ainda, a utilização de quadros de leituras abertos a montante alternativos (uORFs) e alterações no complexo de montagem de proteínas podem conferir alta variabilidade a essas moléculas (HARPER; BENNETT, 2016; MORRIS; GEBALLE, 2000). Associado a esses fatores, a expressão proteica varia para cada tipo de célula, tecido ou órgão. Essa variação é alcançada a fim de conferir identidades celulares e/ou teciduais adequadas e distintas, viabilizando funções específicas e a manutenção da homeostase

tecidual (BUSZCZAK; SIGNER; MORRISON, 2014). Além disso, a abundância e as interações entre proteínas também são afetadas pela alta variabilidade genômica entre os indivíduos que alcança um nível de aproximadamente 10^6 variações (GIBBS et al., 2015). Na figura 7 é possível observar o esquema, adaptado de HARPER & BENNET (2016), com os principais fatores associados à complexidade do proteoma.

No câncer, essa complexidade se torna ainda maior devido ao desbalanço generalizado dos mecanismos de controles, proliferação sustentada, alterações estruturais e/ou em pares de bases únicos, levando a um descontrole do anabolismo e catabolismo proteico (GARRAWAY; LANDER, 2013; LAPLANTE; SABATINI, 2012).

Figura 7 – Visão geral da complexidade do proteoma



Fonte: Adaptado de HARPER & BENNET (2016).

Inúmeros fatores contribuem para a formação de proteomas complexos. Estes incluem (no sentido horário a partir do canto superior esquerdo): *splicing* alternativo; a montagem de complexos de proteínas com composições variadas; a localização subcelular de proteínas; modificações pós-traducionais; o uso de quadros de leitura abertos a montante alternativos (uORFs, roxo) na tradução de mRNA; e a eficiência da tradução de mRNA (HARPER; BENNETT, 2016).

Atualmente as tecnologias proteômicas configuram-se como importantes tanto no entendimento da biologia tumoral do câncer, quanto na pesquisa por biomarcadores. Essa abordagem foi precedida em 1975 com a criação de um método de separação de proteínas

conhecido como Eletroforese Bidimensional em gel de poliacrilamida (2D-PAGE) por O'Farrell & Klose (1975), que impulsionou uma série de estudos em larga escala a partir de várias amostras biológicas (BARBOSA et al., 2012; O'FARRELL, 1975). A 2D-PAGE é capaz de separar aproximadamente 1000 proteínas através do pI e peso molecular (PM), a identificação proteica ocorre, posteriormente, através da combinação com um espectrômetro de massas. Além disso, a técnica fornece a possibilidade de interface com outras metodologias, como *immunoblotting* e é capaz de facilitar a identificação de isoformas e modificações pós-traducionais (CSAKO, 2012; RABILLOUD; LELONG, 2011). Entretanto, a baixa sensibilidade na separação de proteínas de alto peso molecular, associada à baixa reprodutibilidade, impulsionou a criação e utilização de métodos de separação mais robustos e de alto rendimento (RABILLOUD, 2002).

O advento da Espectrometria de massas (EM) revolucionou a pesquisa em larga escala de proteínas. Essa plataforma tem sido extremamente útil na identificação e quantificação de proteínas a partir de misturas complexas e seu impacto vai além da pesquisa básica, alcançando espaço também na prática clínica (JANNETTO; FITZGERALD, 2016). Historicamente, essa técnica tem sido utilizada na confirmação de triagem de drogas, análises de hormônios esteroides, identificação de erros inatos no metabolismo de neonatos, e nas identificações microbianas, acelerando o diagnóstico (FITZGERALD; HEROLD, 1996; HOLLAND et al., 1996; IRVING, 1988; MILLINGTON et al., 1990).

Entretanto, novas abordagens na prática clínica têm sido demonstradas. Em estudo recente, Zhang e colaboradores (2017) desenvolveram um dispositivo portátil de espectrometria de massas capaz de diagnosticar, *in vivo* e *ex vivo*, o câncer em regiões tumorais marginais com composição histológica mista. O *MasPen*, como é chamado o dispositivo, foi proposto como uma tecnologia para a prática clínica, podendo ser utilizado no momento da cirurgia (ZHANG et al., 2017). No estudo, os autores identificaram potenciais biomarcadores preditivos no diagnóstico do câncer com sensibilidade de 96,4%, especificidade de 96,2% e acurácia geral de 96,3% (ZHANG et al., 2017). Por outro lado, a busca de biomarcadores baseados em EM para fins de diagnósticos, prognóstico e definição de terapia, antes da ressecção cirúrgica tem sido abundante. Os estudos atuais baseiam-se, principalmente, em tecnologias *bottom-up* ou de espingarda, aonde as proteínas derivadas das amostras biológicas são tripsinizadas e os peptídeos resultantes são separados através de cromatografia líquida seguida de identificação por espectrometria de massa em tandem (MS/MS) (WU; MACCOSS, 2002). De outro modo, a proteômica *top-down* baseia-se principalmente na análise de proteínas intactas. Enquanto a primeira é mais viável para análises de amostras com alta complexidade, onde estão inclusos

tecidos, plasma ou soro, e outros fluídos biológicos, a segunda é indicada, principalmente, para amostras de proteínas únicas, ou de menor complexidade (RESING; AHN, 2005).

De uma perspectiva geral, a proteômica pode produzir três tipos de resultados ou dados a depender do objetivo. Em primeiro lugar, temos a proteômica de expressão, aonde é determinada a quantidade relativa ou absoluta de proteínas em um determinado sistema (ZHANG et al., 2010). Em segundo, através desta plataforma é possível verificar o estado de modificação proteica. A Espectrometria de massas é capaz de identificar e quantificar os elementos da estrutura primária proteínas maduras e suas modificações pós-traducionais (KEHLET et al., 2016). Em terceiro lugar está o mapeamento das interações proteicas. Que se refere às interações proteína-proteína, mas não se limita apenas a isso (ZHANG et al., 2010). Essa técnica abrange também a identificação de interações proteicas com alguns peptídeos modificados, pequenas moléculas e sequências nucleotídicas (CASANOVAS et al., 2018; GEYER; GEYER; PINGOUD, 2004; MCFEDRIES; SCHWAID; SAGHATELIAN, 2013). Ambas informações, podem ser utilizadas individualmente no estudo de questões biomédicas. Em conjunto, se tornam ferramentas poderosas para definição de diversas estratégias clínicas (COX; MANN, 2011).

2.4.1 Label-Free nanoUPLC-MS^E e Proteômica Quantitativa

O fluxo de trabalho genérico utilizado na descoberta de biomarcadores envolve primariamente a proteômica de expressão, utilizando a proteômica *bottom-up*. A quantificação de proteínas baseada em espectrometria de massas tem sido aprimorada ao longo dos anos com o surgimento de diversas metodologias. No entanto, a fim de reduzir a complexidade da amostra, antes da EM as proteínas devem passar por metodologias de fracionamento (CAMERINI; MAURI, 2015). Como mencionado anteriormente, a SDS PAGE foi pioneira na separação de proteínas a partir de matrizes biológicas e até hoje tem sido usada nesse sentido. Atualmente, técnicas mais robustas envolvem a separação por Cromatografia Líquida (LC), então depois de fracionadas por gel, as proteínas digeridas podem então serem separadas por LC. Algumas metodologias, entretanto, a fim de melhorar a sensibilidade na quantificação de proteínas, avançam diretamente para etapa da separação por Cromatografia Líquida, eliminando vieses que podem surgir na separação por SDS PAGE, como perda de peptídeos durante a extração (SILVA et al., 2006b). No LC, a mistura de peptídeos é então separada em um gradiente de solvente orgânico/aquoso. Em seguida as frações peptídicas são enviadas diretamente para o espectrômetro de massas.

No EM as análises dos peptídeos ionizados previamente são realizadas em fase gasosa. De maneira geral, o espectrômetro de massas é constituído por uma fonte de íons, onde os peptídeos são ionizados com cargas positivas e posteriormente acelerados em velocidades específicas em um campo elétrico (RESING; AHN, 2005). Em seguida, um analisador de massas mede a razão massa/carga (m/z) dos analitos ionizados e um detector registra o número de íons a cada valor m/z . Assim que esses íons chegam no detector, os sinais são registrados no computador, gerando um espectro de massas aonde são mostrados a abundância relativa dos sinais de acordo com a relação m/z (RESING; AHN, 2005).

As fontes de ionização mais comuns envolvem a ESI (Ionização por Eletropulverização) e MALDI (Ionização/dessorção matriz assistida). Na plataforma LC-MS^E, a ionização dos peptídeos ocorre através da eletropulverização. Esse é o método mais utilizado em amostras complexas. O ponto de partida dessa ionização é o bombeamento das amostras líquidas através de um capilar de metal à 3-5 kV, seguida da nebulização na ponta de um capilar para formação de um spray fino composto de gotículas carregadas. Com a aplicação de calor e nitrogênio seco, as gotículas são rapidamente evaporadas e a carga residual nas gotículas é passada para os analitos (FENN et al., 1989; KEBARLE, 2000). No caso das proteínas, a quantidade de resíduos básicos (lisina, arginina, histidina, N-terminal) nos fragmentos pépticos determinam o número máximo de prótons que podem ser adquiridos (KRUSEMARK et al., 2009). Por outro lado, no MALDI as amostras são sublimadas e ionizadas em uma matriz cristalina orgânica através de pulsos de laser. Essa metodologia é geralmente empregada para análise de misturas peptídicas relativamente simples (CRAMER, 2009). Além da identificação de proteínas a partir dos fragmentos peptídicos, nas análises baseadas em EM é possível quantificar de forma relativa e absoluta essas moléculas. Embora a quantificação relativa seja importante na busca de biomarcadores, a quantificação absoluta de proteínas dentro da matriz biológica de interesse é muito valiosa para compreensão dos mecanismos moleculares de respostas ao aumento e diminuição dessas moléculas a nível celular ou sistêmico no câncer (RUBIN; FARBER, 1991).

Várias metodologias para quantificação de proteínas baseada em EM já foram descritas. Elas envolvem a quantificação por rotulagem de peptídeos com isótopos estáveis (*labeling*) ou livre de rotulagem (*Label-free*). As análises proteômicas utilizando a primeira estratégia envolvem a Tag de Afinidade Codificados por Isótopos (ICAT), Tag Isobárica para Rotulagem de Quantificação Relativa e Absoluta (iTRAQTM), Rotulagem Isótopo Estável por Aminoácidos em Cultura de Células (SILAC) e rotulagens com ¹⁸O (GYGI et al., 1999; ONG et al., 2002; ROSS et al., 2004; SHEVCHENKO et al., 1997; YAO et al., 2001).

Embora as variações na análise sejam menores utilizando métodos com rotulagem, a quantificação livre de rótulo oferece maiores vantagens no sentido de permitir a identificação e comparação de um número ilimitado de amostras e análise de peptídeos não tratados (BANTSCHOFF et al., 2012). Além disso, as preparações com isótopos são complexas, demoradas e relativamente caras (SILVA et al., 2006).

A estratégia sem marcação representa um método de alto rendimento nos estudos em proteômica. Baseado nisso, uma quantidade considerável de trabalhos tem usado essa metodologia na busca por biomarcadores (DELIUS et al., 2017; FIRMINO et al., 2018; LOBO et al., 2017; MADDA; LIN; SUN, 2018; ONILE et al., 2017; SUN et al., 2018; WEGDAM et al., 2014a, 2014b). A plataforma LC-MS^E utilizada em nosso estudo apresenta esse tipo de abordagem para quantificação relativa e absoluta das proteínas entre os grupos estudados. Na quantificação relativa, a comparação entre os peptídeos trípticos de cada grupo analisado (controle vs doença) é realizada para determinar de forma precisa as razões relativas das proteínas de interesse (SILVA et al., 2006). A caracterização quantitativa da expressão diferencial das proteínas entre os diferentes estados é obtida através dos valores relacionados à abundância relativa de cada peptídeo para uma determinada proteína. Na maioria das vezes, esses valores estão baseados na medida da intensidade do sinal peptídico para cada proteína em ambos grupos de análise utilizando o cromatograma dos íons extraídos ou na proporção da área do pico cromatográfico dos íons precursores dos peptídeos (MEGGER et al., 2013; WIENER et al., 2004). A acurácia desses dados depende da qualidade da mensuração da área de pico cromatográfico. A fim de melhorar a intensidade dos íons correspondentes aos peptídeos analisados, a LC-MSE lança mão de uma aquisição independente de dados. Isto é realizado por uma alternância na energia de colisão de baixa (MS) para alta energia (MS^E). Deste modo, além do íon precursor, é fornecido o espectro dos produtos dos íons a eles associados. Assim, há um aumento na intensidade do sinal para todos os peptídeos, uma vez que são coletados dados tanto dos íons precursores quanto de seus produtos (GEROMANOS et al., 2009).

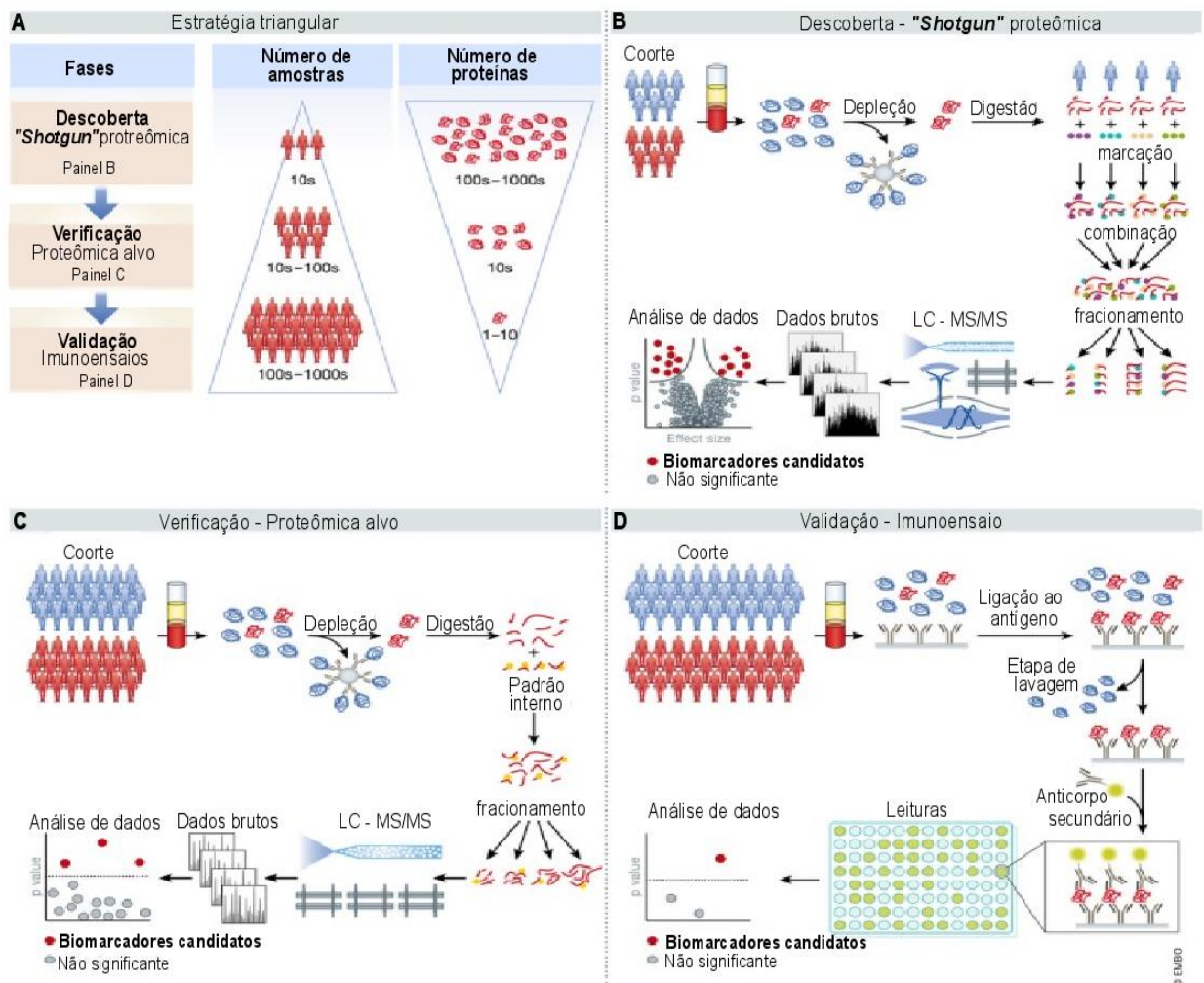
O método de quantificação absoluta para o LC-MS^E desenvolvido por Silva *et al.* (2006) envolve a adição de uma concentração conhecida de uma determinada proteína ou de seus peptídeos correspondentes nas amostras a serem analisadas. Nesse protocolo, a resposta média do sinal de MS para os três peptídeos mais intensos (Hi3) é calculada para cada proteína bem caracterizada na mistura tríptica. Dessa forma, a resposta média do sinal MS da proteína padrão adicionada é usada como fator determinante de resposta do sinal universal (contagens de MS/mol de proteína). Esse padrão é então aplicado às outras proteínas que foram identificadas

nas amostras a fim de determinar sua concentração absoluta correspondente (SILVA et al., 2006).

Além do equipamento e métodos de quantificação, o número de indivíduos ou pacientes incluídos na pesquisa contribui de maneira direta na qualidade e variabilidade das pesquisas. A principal estratégia utilizada pela maioria dos estudos que utilizam a plataforma proteômica para a pesquisa de biomarcadores plasmáticos é conhecida como “*Stepwise*” ou triangular (RIFAI; GILLETTE; CARR, 2006). Neste contexto, são utilizados inicialmente pequenos números de amostras para a identificação livre de hipóteses de proteínas através da proteômica de descoberta, deste modo podem ser identificadas milhares de proteínas, dependendo da amostra utilizada. Em seguida, um pequeno número de proteínas diferencialmente expressas que forem selecionadas na primeira fase (geralmente menor que 10) são direcionadas para a etapa de verificação. Essa etapa ocorre em um coorte maior e independente. Para esse fim, técnicas mais sensíveis que utilizam EM alvo podem ser utilizadas, como o Monitoramento de Reação Múltipla (MRM). Por fim, as proteínas selecionadas são validadas a partir de imunoensaios (KEHLET et al., 2016). Na figura 8, um fluxo de trabalho adaptado de GEYER et al.(2017) demonstra as principais etapas citadas acima envolvidas com a estratégia triangular

.

Figura 8 – Abordagem triangular na pesquisa de biomarcadores plasmáticos



Fonte: Adaptado de GEYER et al. 2017.

(A) Um número relativamente pequeno de casos e controles são analisados por proteômica de descoberta livre de hipóteses em grande profundidade, idealmente levando à quantificação de milhares de proteínas (camada superior no painel). Isso pode produzir dezenas de candidatos com expressão diferencial que são rastreados por métodos proteômicos direcionados em coortes de tamanho moderado (camada intermediária). Finalmente, para um ou alguns dos candidatos restantes, são desenvolvidos imunoensaios, que são então validados em grandes coortes e aplicados na clínica (camada inferior). (B) Fluxo de trabalho para proteômica de descoberta livre de hipóteses. (C) Proteômica direcionada para verificação de candidatos. (D) Desenvolvimento de imunoensaios para validação e aplicação clínica (GEYER et al., 2017)

3 METODOLOGIA

O trabalho experimental foi realizado no Laboratório de Proteômica do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami da Universidade Federal de Pernambuco (LIKA-UFPE) e no Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia, Xérem/Rj (INMETRO). Comitê de Ética aprovado: Registro pela Sociedade Brasileira de Combate ao Câncer, CAAE: 06938812.0.0000.5205

3.1 COLEÇÃO DE PLASMAS

Os plasmas foram obtidos de 10 pacientes com Adenocarcinoma colorretal esporádico de um Hospital Público de Recife, PE que não foram submetidos à terapia neoadjuvante antes da ressecção cirúrgica. O grupo controle foi composto por 10 indivíduos saudáveis sem o histórico familiar de câncer colorretal e não-portadores de doença crônica de base e sem processo inflamatório e ou infeccioso recente. O sangue total de cada participante foi coletado em tubos de EDTA de 5 mL, em seguida foram centrifugados à 1500 rpm por 15 minutos para separação do plasma. Um mix de inibidores de proteases (GE Healthcare) foi adicionado ao plasma obtido numa razão de plasma: inibidor = 1: 100 (p / p). As amostras foram armazenadas à -20° C até uso posterior.

3.1.1 Formação dos Pools Controle e Experimental

Para a formação dos Pools, uma alíquota de 150 µL dos plasmas individuais dos controles saudáveis e dos pacientes, foram agrupados em *Pool* Controle e *Pool* de pacientes com adenocarcinoma colorretal (Pool CCR), respectivamente.

3.1.2 Depleção de Albumina e IgG

Para a depleção das proteínas mais abundantes no plasma, Albumina e IgG, foi utilizado o *Albumin and IgG Depletion Spin Trap* (28948020) da GE Healthcare. Uma alíquota de plasma de cada amostra (50 µL) foi adicionado em duas colunas com resinas à base de Sefarose TM de alto desempenho com afinidade por albumina de soro humano e IgG junto com um tampão de ligação contendo 20 mM de Fosfato de Amônio dibásico e 1 mM de Cloreto de Cálcio, pH 7,4, para facilitar à ligação dessas proteínas a coluna. Os Eluatos foram recuperados após passagem

da amostra pela coluna e armazenados à -20 °C até posterior uso. Uma eletroforese bidimensional foi realizada a fim de verificar a eficiência da depleção.

3.1.3 Quantificação de Proteínas

A análise de proteínas em larga escala requer a quantificação precisa das amostras proteicas para assegurar a quantidade apropriada de proteína a ser utilizada nos procedimentos que a procedem. Em adição, a quantificação precisa facilitar a comparação entre os grupos, permitindo que quantidades idênticas de proteína sejam utilizadas para ambos (GORG, 2004).

Os Eluatos resultantes da depleção de Albumina e IgG foram submetidos à quantificação de proteínas através do 2D *Quanti kit* (código 80-6483-56 - GE Healthcare®). Através desse kit, foi possível precipitar quantitativamente apenas as proteínas presentes nos pools, deixando os outros componentes plasmáticos interferentes em solução. Isso foi feito através da adição de 500 µL do “agente precipitante” e “co-precipitante” em cada tubo contendo 10 µL dos pools controle e CCR. Os eppendorfs foram então centrifugados a 10.000 xg e o sobrenadante descartado. Foi adicionado então 100 µL da solução de cobre e 400 µL de água ultra-pura (Milli-Q®, 18.2 MΩ•cm). Os tubos foram novamente agitados em vórtex e então foi adicionado 1 mL de reagente de cor a cada eppendorf. Após 20 minutos, foi feita a medida das amostras e da curva analítica em 480 nm, em Espectrofotômetro (GE HEALTHCARE, 2010).

Nesse método, o cobre livre é quantificado, portanto os valores das absorbâncias são inversamente proporcionais à concentração de proteínas. A curva analítica padrão foi preparada em uma faixa linear de 0-50 µg de uma solução de Albumina Bovina Sérica (BSA - Albumina Sérica Bovina, GE Healthcare). Todo experimento foi realizado em triplicata.

3.1.4 Precipitação de Proteínas

Para remover o tampão de ligação proveniente da etapa de depleção de albumina e IgG, bem como eliminar outros interferentes, as proteínas foram precipitadas por um método adaptado de Williams & Stone (1997). Para cada 150 µg/mL de proteínas foi adicionado 278 µL de 50 % Ácido Tricloroacético e 139 µL de 0,1 % Triton. As amostras foram incubadas em gelo por 60 minutos e depois submetidas à centrifugação a 10.000 xg por 10 minutos à 4° C. O sobrenadante foi removido e descartado e o *pellet* foi lavado duas vezes com acetona a 90% (WILLIAMS; STONE, 1997). Após a lavagem a acetona foi removida e o *pellet* foi ressolubilizado em Água Milli-Q (Milli-Q®, 18.2 MΩ•cm) e a solução foi submetida a uma nova quantificação de proteínas.

3.1.5 Digestão Tríptica e Preparação de Amostras para LC-MSE

Aproximadamente 50 µg de proteína do grupo experimental e controle foram diluídos em 60 µl de NH_4HCO_3 50 mM. Em seguida, foram adicionados 25 µL de *RapiGest* SF (Waters) a 0,2%, um surfactante utilizado para desnaturar proteínas e melhorar a digestão enzimática, por amostra. A reação ocorreu a 80°C até a completa solubilização das proteínas. Posteriormente, as proteínas foram reduzidas pela adição de 2,5 µl de ditioneitol (100mM) a 60° C por 30 minutos, depois foram resfriadas à temperatura ambiente e alquiladas com 2,5 µL de iodoacetamida (300 mM) por 30 minutos ao abrigo da luz. Para a digestão de proteínas, adicionou-se tripsina*Gold* (Promega) a uma razão de proteína: proteína de 1:100 p/p e as amostras foram incubadas durante 18h a 37 °C. Após a digestão, o *RapiGest* SF foi hidrolisado com a adição de ácido trifluoroacético a 5% durante 90 minutos a 37°C. As amostras foram centrifugadas e o sobrenadante foi transferido para um recipiente *Waters Total Recovering Vial* (Waters). Para a quantificação peptídica absoluta, adicionaram-se 5 pmol de Álcool desidrogenase da *Saccharomyces cerevisiae* (ADH, Uniprot P00330, Waters) a cada amostra como padrão interno. Em seguida, foram adicionados 85 µL de acetonitrila a 3% contendo ácido fórmico a 0,1%, de modo que as concentrações finais de 250ng/µL e 25 µmol/µL para proteína e ADH, respectivamente, foram atingidas. As amostras foram mantidas a 6° C para a análise nanoUPLC-MS^E.

3.1.6 NanoUPLC e aquisição independente de dados (MS^E) livre de marcação (*label-free*) por espectrometria de massas.

Os produtos da digestão tríptica foram separados pelo sistema nanoACQUITY UPLC (Waters) numa coluna de fase reversa HSS T3 C18 (1,8 µm x 100 µm x 100 mm) em conjunto com uma coluna Symmetry C18, 5 µm, usando os seguintes gradientes em uma taxa de fluxo de 450 nL/min: 7 a 40% B em 115 minutos; um gradiente de limpeza de 40 a 85% B em 4 minutos e mantido em 85% de B durante 4 minutos; em seguida, reequilíbrio da coluna para 7% B em 2 minutos. A temperatura da coluna foi mantida a 55° C e as fases móveis A e B consistiram, respectivamente, de água ultrapura e acetonitrila, ambas contendo ácido fórmico a 0,1%. Utilizou-se um espectrômetro de massa Synapt HDMS (Waters) para análise independente de dados (MS^E) dos peptídeos trípticos. O instrumento foi operado no modo resolução e todas as análises foram realizadas no modo “V”, utilizando-se ionização por nano-

eletropulverização no modo íon positivo (nanoESI⁺). Os dados do espectrômetro de massa foram adquiridos usando uma infusão de canal de sonda NanoLockSpray de Glu-Fib (Glu1) derivado de fibrinopeptídeo B humano ($M + 2H$) $2^+ = 785.2486$, e os fragmentos MS/MS Glu-Fib foram usados para calibração final do instrumento. Todas as análises foram realizadas usando um canal de massa Glu-Fib em intervalos de 30 segundos. Os dados exatos de tempo de retenção de massa (EMRT) nanoLC-MSE foram coletados com o padrão alternativo MS (3 eV) e elevada energia de colisão (MSE 15–55 eV) aplicadas à armadilha 'T-wave' CID (colisão-dissociação induzida) com gás argônio, usando um tempo de varredura de 0,8 segundos e interseção automática para cada varredura MS de m/z 50 a 2.000. O *offset* de RF (perfis MS) foi ajustado de tal forma que os dados LC/MS foram efetivamente adquiridos de 350 a 2.000 m/z , o que garantiu que qualquer massa observada nos dados $LC/MS^E < 350$ m/z surgiu de dissociações na célula de colisão.

3.1.7 Processamento de Dados, Identificação de Proteína e Quantificação

Os dados obtidos da análise de nanoLC/MSE foram processados para a identificação de proteínas pelo *software Protein Lynx Global Server v. 2.4 (PLGS)* com o banco de dados *Homo sapiens* UniProtKB (liberado em 09-2018), ao qual a sequência de aminoácidos da proteína padrão interna (ADH, UniprotP00330) foi anexada. Para acessar a taxa de identificação de falso positivo, foi utilizada a sequência reversa do banco de dados *Homo sapiens* UniProtKB. Os parâmetros padrão do PLGS para o processamento de espectros e busca de banco de dados foram: uma perda de clivagem por tripsina, uma modificação fixa de carbamidometil para Cisteína (Cys) e uma modificação variável de oxidação para Metionina (M). Os limiares de busca utilizados foram: fragmentos mínimos por peptídeo (3), peptídeos mínimos por proteína (1), fragmentos mínimos por proteína (7), e taxa de descoberta falsa para identificação de proteínas (2). Os três peptídeos mais abundantes (método de Hi3 livre de marcadores) de todas as proteínas detectadas foram comparados com os três peptídeos mais intensos da proteína de referência cravada (ADH) de concentração conhecida e usados para calcular as quantidades molares carregadas na coluna (quantificação absoluta) para cada proteína.

As proteínas identificadas foram organizadas usando o PLGS em uma lista detalhando a proteína única para cada condição e uma relação logarítmica entre os diferentes grupos. Apenas as proteínas com *scores* de frequência e intervalos de confiança superiores a 98% de acordo com o algoritmo, respectivamente foram consideradas aceitáveis nessas buscas na base

de dados, e quando a mesma proteína foi identificada para diferentes íons do fragmento, aqueles que apresentaram a maior pontuação foram considerados para comparações adicionais e apresentação de dados (CHAMBERY et al., 2009; GEROMANOS et al., 2009; LI et al., 2009).

3.1.8 Anotação Funcional

A análise da Ontologia dos genes relacionados ao Processo Biológico, Função Molecular e Componente Celular foi realizado através do *Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery* (DAVID) v6.8(HUANG; SHERMAN; LEMPICKI, 2009). A classificação das vias de sinalização relacionadas com as proteínas superexpressas e subexpressas foi feito pelo *Reactome* (<https://reactome.org>)(FABREGAT et al., 2018).

Artigo a ser submetido à Revista *Clinical Proteomics*

Fator de Impacto: 3.516



4 PLASMA PROTEINS MODIFICATION IN COLORECTAL ADENOCARCINOMA BY LABEL-FREE PROTEOMICS

Iasmim Lopes de Lima ^a, Camila Rocha da Cruz ^c, Sandra Nara Naressi Scapin^d, José Mauro Granjeiro ^d, José Luiz de Lima Filho ^{a,b}, Roberto Afonso da Silva ^{a,e}

a Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami-LIKA, Universidade Federal de Pernambuco-UFPE, Av. Prof. Moraes Rego, 1235, Cidade Universitária, 50780-901 - Recife, Pernambuco - Brazil.

b Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco – UFPE, Av. Prof. Moraes Rego, 1235, Cidade Universitária, 50670-901 Recife, Pernambuco, Brazil.

c Departamento de Cirurgia, Hospital das Clínicas – HC, Universidade Federal de Pernambuco-UFPE, Av. Prof. Moraes Rego, 1235 Cidade Universitária, 50670-901-Recife, Pernambuco, Brazil.

d Diretoria de Metrologia Aplicada às Ciências da Vida – DIMAV, Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia, Av. Nossa Senhora das Graças, 50 Xerém, 25250020 - Duque de Caxias, Rio de Janeiro, Brazil.

e Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco – UFPE, Campus Vitória. R. Alto do Reservatório, S/n - Bela Vista, 55608-680 - Vitória, Pernambuco, Brazil.

*Author for correspondence: Iasmim Lopes de Lima

minklopes@gmail.com; Tel.: 55 81 9 89234057, fax: 55 81 2126 8485.

Abstract

Background: The worldwide incidence of colorectal cancer (CRC) is 1.8 million new cases. It is the second most deadly cancer type, with 881,000 deaths expected in 2018, behind only lung cancer. Molecular markers are urgently required in response to the increasing incidence of this type of cancer, improving the patient's clinical outcome and increasing the survival time.

Methods: A total of 10 adenocarcinoma colorectal patients and 10 healthy controls plasma samples were analyzed using ultra-performance liquid chromatography followed by electrospray ionization and tandem mass spectrometry (nanoUPLC-ESI-MS^E) followed by label-free quantification.

Results: Were identified 98 human plasma proteins with score ≥ 100 and confidence interval $\geq 98\%$. The analysis of the differential expression of proteins revealed the presence of 78 up-regulated proteins and 11 down-regulated in the plasma. According to functional analysis, the biological process, molecular function and cellular component more overrepresented were: negative regulation of endopeptidase activity (22, $p = 6.7e-29$), serine-type endopeptidase inhibitor activity (15, $p = 9.6e-19$), and extracellular region (64, $p = 5.1e-57$). The most enriched signaling pathways were related to ImmuneSystem (36, $2.00e-07$) and Innate Immune System (34, $p = 1.01e-13$).

Conclusion: Changes in the plasma protein profile and concentration in colorectal adenocarcinoma may provide useful responses in clinical practice ranging from diagnosis to the definition of therapeutic strategies. In this study, we found proteins that may be promising for the composition of a panel of biomarkers in the development of clinical trials for CRC. However, comparative studies using other proteomic platforms are indicated, followed by validation by immunoassay techniques for better definitions.

Keywords: plasma; proteomics; biomarkers; “LC-MSE”; colorectal adenocarcinoma.

Background

The colorectal adenocarcinoma comprises proximally 90% of all types of colorectal cancer (CRC) that involves tumors located in colon, rectosigmoid and rectum [1]. The worldwide incidence of CRC is 1.8 million new cases. Besides, it is the fourth leading cause of cancer deaths in the world with 881,000 deaths per year [2]. In countries located mainly in Latin America and the Caribbean, the death rate tends to double in 2035 [3]. In Brazil, 35.360 new cases are expected for the biennium of 2018-2019. Still, when compared by sex, colorectal cancer reaches the 3rd position in men and the 2nd position in women [4]. In recent years, studies have explored the early detection of colorectal cancer, and this is the best way to decrease the number of deaths and increase the remission change of the disease, once diagnosed early, the 5-year survival reaches 90% [5]. However, the shortcoming of conventional methods for diagnosis presents a significant challenge as the world population grows and ages. Also, there are still few biomarkers used for prognosis and monitoring of CRC. In this context, the development of diagnostic, prognostic and monitoring methods more sensitive and less invasive constitute an essential tool facing all these problems [6].

The blood is the primary biological matrix used in clinical practice to search for biomarkers, and the protein-based markers constitute a large part of them [7,8]. This biomarkers can be explained by the fact that, as are molecules that represent the state cellular phenotypic, changes in expression of plasma or tissues proteins commonly reflect the condition pathologic of the individual and may aid in the diagnosis, prognostic and therapy conduct, as well as bringing insights into the tumor biology [9]. The plasma is the sample more representative of Human Proteome by containing several classes of proteins that may be present in varying concentrations depending on the metabolic and functional state of the individual. In addition to the classic proteins, two more large groups of proteins are present in plasma: proteins leakage by tissues and signal proteins [10]. However, because it is a very complex sample and possesses

a range of very dynamic proteins, the plasma research requires increasingly robust and sensitive platforms this context, the search tools based on proteomics technologies provide a platform useful [11].

Recently, label-free quantitative proteomics has been used in the research of various biomarkers and on different types of biological samples [12,13]. This method offers advantages in the detection of protein changes in complex samples, providing a greater dynamic range of quantitation when compared to other methods which use label [14]. In this study, we performed nanoUPLC-ESI-MS^E label free to assess, qualitatively and quantitatively, the difference of expression of proteins present in the plasma of patients with sporadic colorectal adenocarcinoma compared to healthy individuals.

Methods

Plasma collection

The plasmas were obtained from 10 patients with sporadic colorectal Adenocarcinoma of a public Hospital in Recife, PE that were not submitted to neoadjuvant therapy before surgical resection (Table 1). The control group was composed of 10 healthy individuals without a family history of colorectal cancer and chronic disease. The whole blood of each participant was collected in 5 mL EDTA tubes and then were centrifuged at 1500 rpm for 15 minutes. Protease Inhibitor Mix (GE Healthcare) was added to plasma obtained in a ratio of plasma: inhibitor = 1:100 (w/w). After that, individual plasma samples were pooled in colorectal adenocarcinoma patients pool (Pool CRC) and Pool Control. The samples were stored at -20° C until further use. The Ethics Committee approved, and patients signed TCLE. Registered by Sociedade Brasileira de Combate ao Câncer, CAAE: 06938812.0.0000.5205

Samples preparation

Immunodepletion

For depletion, the most abundant protein in plasma, albumin and IgG, was used o Albumin and IgG Depletion SpinTrap (28948020) GE Healthcare. An aliquot of plasma (50 μ L) was added in columns with Sepharose TM-based resins of high performance with an affinity for human serum albumin and IgG in conjunction with a coupling buffer containing 20 mM $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ + 0,15 M CaCl_2 (pH 7.4) to facilitate the binding of these proteins the column. The eluate was recovered after passing the sample through the column and stored at - 20° C until further use.

Proteins Quantification and Clarification

The eluates resulting from the depletion of Albumin and IgG were submitted to quantification of proteins through the 2-D Quant Kit™ (80-6483-5-GE Healthcare) by following the manufacturer's instructions in triplicate. The calibration curve was made with bovine albumin as standard. Then, the proteins were precipitated by Stone K.L. & Williams K.R, 1997 with some modifications [15]. For each 150 μ g/mL of proteins was added 278 μ L 50 % Trichloroacetic Acid and 139 μ L 0,1 % Triton. The samples were incubated on ice for 60 minutes and then were centrifugated to 16000 g for 10 minutes at 4 °C. The supernatant was removed, discarded and the pellet was washed twice in 90% Acetone. Following, the pellet was resuspended in Ultrapure waters (Milli-Q®, 18.2 M Ω •cm) and was subjected to a new quantification. The protein solution was concentrated in a vacuum centrifuge (Eppendorf) and stored protected from moisture to use later.

Tryptic Digestion and Sample Preparation for LC- MSE

Approximately 50 μ g of protein from control and experimental pools were diluted in 60 μ L of 50-mM NH_4HCO_3 . Then, 25 μ L of 0.2% RapiGest SF (Waters), a surfactant used to

denature proteins and enhance enzymatic digestion, were added per sample. The reaction occurred at 80 °C in the dry bath until complete solubilization of proteins. Afterward, proteins were reduced by adding 2.5 µL of 100-mM dithiothreitol at 60° C for 30 minutes, then were cooled to room temperature and alkylated with 2.5 µL of 300-mM iodoacetamide for 30 minutes in the dark. For protein digestion, Trypsin (Promega) was added at a 1:100 w/w enzyme: protein ratio and the samples were incubated overnight at 37 °C. Following the digestion, the RapiGest SF was hydrolyzed with the addition of 5% TFA for 90 min at 37 °C. The samples were centrifuged, and the supernatant was transferred to a Waters Total Recovering Vial (Waters). For absolute peptide quantification, 5 pmol of yeast alcohol dehydrogenase (ADH, UniProt entry P00330, Waters) was added to each sample as an intern standard. Then, 85 µL of 3% acetonitrile containing 0.1% formic acid was added so those final concentrations of 250 ng/µL and 25 fmol/µL for protein and ADH, respectively, were reached. The samples were kept at 6 °C for the nanoUPLC-MS^E analysis. The products of tryptic digestion were separated by nanoACQUITY UPLC system (Waters) on an HSS T3 C18 reverse-phase column (1.8 µm x 100 µm x 100 mm) in conjunction with a Symmetry C18, 5 µm trap column, using the following gradient at a flow rate of 450 nL/min: 7 to 40% B in 115 min; a cleaning gradient of 40 to 85% B in 4 min and maintained in 85% B for 4 min; then column re-equilibration to 7% B in 2 min. The column oven temperature was kept at 55 °C and mobile phases A and B consisted, respectively, of ultrapure water and acetonitrile, both containing 0.1 % formic acid. A Synapt HDMS mass spectrometer (Waters) was used for data-independent analysis (MS^E) of the tryptic peptides. The instrument was operated in the resolution mode, and all analyses were performed in the “V” mode, using nano-electrospray ionization in the positive-ion mode (nanoESI+). The mass spectrometer data were acquired using a NanoLockSpray probe channel infusion of Glu–Fib (Glu1) derived from fibrinopeptide B human ($M + 2H$)²⁺ = 785.2486, and the MS/MS Glu–Fib fragments were used for final calibration of the instrument. All analyses were performed

using a Glu–Fib mass channel at 30-s intervals. The exact mass retention time (EMRT) nanoLC-MS^E data were collected with alternative standard MS (3 eV) and elevated collision ramp energies (MS^E 15–55 eV) applied to the trap ‘T-wave’ CID (collision-induced dissociation) cell with argon gas, using a scan time of 0.8 s and automatic interscan for each MS scan from m/z 50 to 2,000. The RF offset (MS profiles) was adjusted such that LC/MS data were effectively acquired from m/z 350 to 2,000, which ensured that any mass observed in the LC/MS^E data <m/z 350 arose from dissociations in the collision cell.

Data Processing, Protein identification and Quantification

The data obtained from the analysis of nanoUPLC/MS^E were processed for the identification of proteins by Protein Lynx Global Server v. 2.4 software (PLGS) with the UniProtKB (UniProt release 2018-09) Homo sapiens annotated databases, to which the amino acid sequence from the standard internal protein (ADH, UniProt entry P00330) was appended. To access the false positive identification rate, we used the reverse sequence of the database used. The PLGS default parameters for spectra processing and database search were: one missed trypsin-cleavage, a fixed carbamidomethyl modification for Cysteine and a variable oxidation modification for Methionine. The search thresholds used were: minimum fragment ion matches per peptide (3), minimum fragment ion matches per protein (7), minimum peptides per protein (1), and False discovery rate for protein identification (2). The three most abundant peptides (label-free Hi3 method) of all detected proteins were compared to the three most powerful peptides of the spiked-in reference protein (ADH) of known concentration and used to calculate the molar amounts loaded onto the column (absolute quantification) for each protein.

Proteins identified were organized using PLGS into a list detailing protein unique to each condition and a logarithm ratio between the different groups. Only proteins with

attendance scores and confidence intervals higher than 99% according to the dedicated [16,17] respectively, were considered acceptable in these database searches, and when the same protein was identified for different fragment ions, those presenting the highest score were considered for further comparisons and data presentation [16,18].

Functional Annotation

Gene Ontology analysis (GO) related to Biological Process, Molecular Function and Cellular Component was carried out through the Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery (DAVID) V6.8. The signaling pathways classification was done by the Reactome (<https://reactome.org>).

Results

In the analysis by LC-MSE 98 proteins in the control pool and 95 proteins in the pool of patients with colorectal adenocarcinoma (Pool CRC) were identified, both with score ≥ 100 and FDR rate $\leq 2\%$. Differentially expressed protein analysis (DEPs) by PLGS Expression^E detected 78 up-regulated proteins (Fold-change > 1.5) in the CRC pool when compared to the pool of healthy individuals. The DEPs presented concentration in a range of 18,000 - 34,899 fmol (figure 1). Besides, it was possible to identify the presence of 11 proteins only in the CRC samples and 11 proteins present only in the healthy samples. For both pools, the unique proteins can be interpreted as proteins present in concentrations detectable by LC-MS^E in just a sample or group. Therefore, we consider as up-regulated or down-regulated proteins, respectively (Table 2 and 3). The main up-regulated proteins were: hemoglobin subunit beta, leucine-rich alpha-2-glycoprotein, hemoglobin subunit delta, alpha-1-antichymotrypsin, apolipoprotein A-I, complement component C7, hemoglobin subunit alpha, haptoglobin-related protein, complement component C9, and Alpha-1-acid glycoprotein 2. Down-regulated plasma proteins

from colorectal cancer patients comprise the Immunoglobulins gamma-1 heavy chain and heavy constant gamma 1, Complement component C6, Insulin-like growth factor-binding protein complex acid labile subunit, POTE ankyrin domain family member E and POTE ankyrin domain family member F, Putative uncharacterized protein TSPEAR-AS2, CD5 antigen-like, Ras-related protein Rab-4A and Actin, alpha skeletal muscle.

Functional Analysis of Differentially expressed proteins (DEPs)

According to gene ontology analysis (GO) by DAVID, DEPs have been associated with GO 100 terms in the category of “Biological Process,” 34 in “Molecular Function” category of and 35 in “Cellular Component” (Figure 2 and 3).

With respect to biological process, the up-regulated proteins were grouped primarily in negative regulation of endopeptidase activity (22, $p= 6,7e-29$), platelet degranulation (21, $p= 1,4e-28$), Complement activation, classical pathway (17, $p= 1,5e-21$), Innate immune response (17, $p= 2,3e-11$), receptor-mediated endocytosis (16, $p= 1,3e-15$), Complement activation (13, $p= 1,7e-15$), acute phase response (11, $p= 5,4e-16$), proteolysis (11, $p= 4,5e-5$) regulation of Complement activation (10, $p= 3,4e-15$) and blood coagulation (10, $p= 7,8e-8$). While down-regulated proteins were mainly grouped in Complement activation, classical pathway (2, $p= 0.0405$), Complement activation (2, $p= 0.0357$) and retina homeostasis (2, $p= 0.01655$).

The most enriched GO terms in the category of molecular function in up-regulated proteins were serine-type endopeptidase inhibitor activity (15, $p= 9,6e-19$), serine-type endopeptidase activity (13, $p= 2,6e-10$), endopeptidase inhibitor activity (11, $p= 3,1e-16$), antigen binding (9, $p= 6,3e-9$), receptor binding (10, $p= 8,9e-6$), immunoglobulin receptor binding (7, $p= 6,1e-10$), among others. From down-regulated proteins no one term was statistically significant.

In the GO category of cellular component, the overrepresented terms included extracellular region (64, $p = 5.1e-57$), extracellular exosome (64, $p = 7.7e-42$), blood microparticle (53, $p = 1.2e-95$), extracellular space (53, $p = 4.2e-43$), plasma membrane (24, $p = 4.3e-2$), platelet alpha granule lumen (17, $p = 1.5e-26$), cell surface (11, $p = 5.1e-5$), external side of plasma membrane (9, $p = 1.9e-6$), spherical high-density lipoprotein particle (5, $p = 1.5e-8$), endocytic vesicle lumen (5, $p = 3.9e-7$) and extracellular matrix (5, $p = 3.0e-2$). From down-regulated proteins the mainly terms were extracellular exosome (9, $p = 3.2e-7$) extracellular space (7, $p = 4.0e-6$), blood microparticle (5, $p = 3.2e-7$) and extracellular region (4, $p = 2.7e-2$).

Reactome pathway enrichment analysis revealed the implication of DEPs in 50 pathways. The mainly pathway related to up-regulated proteins were: Immune System (36, $p = 2.00e-07$), Innate Immune System (34, $p = 1.01e-13$), Hemostasis (34, $p = 1.11e-16$), Platelet activation, signaling and aggregation (22, $p = 1.11e-16$), Platelet degranulation (21, $p = 1.11e-16$), Response to elevated platelet cytosolic Ca^{2+} (21, $p = 1.11e-16$), Complement Cascade (19, $p = 1.11e-16$), Regulation of Complement cascade (18, $p = 1.11e-16$), Regulation of Insulin-like Growth Factor (IGF) transport and uptake by Insulin-like Growth Factor Binding Proteins (IGFBPs) (16, $p = 5.55e-16$), Scavenging of heme from plasma (15, $p = 4.44e-16$). From down regulated proteins, the Reactome analysis revealed 3 pathways related to Complement System: Regulation of Complement cascade (2, $p = 0.008$), Complement cascade (2, $p = 0.01$), and Terminal pathway of Complement (1, $p = 0.006$). The other mainly pathways represented were: MET receptor recycling (1, $p = 0.012$), Signalling to p38 via RIT and RIN (1, $p = 0.025$), SOS-mediated signalling (1, $p = 0.025$) and Synthesis of GDP-mannose (1, $p = 0.025$).

Discussion

Protein profile of the differentially expressed plasma proteins

Several studies have noted the importance of plasma-based markers because of the representation of the physiological condition of the individual. In this present study, were evaluated by nanoUPLC-MS^E changing the profile of expression of plasma proteins in patients with colorectal adenocarcinoma. We have observed the up-regulation of a series of positive acute phase proteins in the plasma of patients with colorectal adenocarcinoma and a lower number of up-regulated negative acute phase proteins, which may indicate a sustained inflammatory response. Chronic inflammation is one of the cancer hallmarks, and notably has a dual effect [19]. Tumor response to inflammatory mechanisms ranges from cell death to tumor progression, and this type of response is, in most cancers, tumor stage dependent [20]. Unlike CRC associated with colitis, the development of sporadic colorectal cancer does not come from inflammation. However, it is directly linked to tumor progression with a local inflammatory microenvironment favoring the accumulation of mutations and epigenetic changes [21]. As we have seen, this inflammatory profile is not restricted only to the tumor microenvironment. With the increase in the production of cytokines and growth factors required for tumor progression, it is expected that this reply also extends the systemic level, resulting in the blood [22,23]. In this work, the Immune System and Innate Immune system were the most represent signaling pathways. The Complement System Components and regulators comprise approximately 36% and 38% of all proteins up-regulated involved in both pathways, respectively. The CS plays an essential role in the innate immune system in recognizing and destroying invaders and can be activated through 3 main routes: The classical, lectin, and the alternative pathway [24]. In cancer, the response of complement activation has effects related to both innate and adaptive immunity and can act as an adjuvant of the cytolytic effects in immunotherapy [25]. In tumoral microenvironment, the complement system is related to population regulation and modulation

of cytotoxic T cell response to tumors, by regulating the adaptive immune response [26]. However, the activation of this system can also favor the tumor progression, modulating processes like proliferation, angiogenesis, and migration [25]. The main complement components up-regulated in our work, C7 e C9, are part of the membrane attack complex (MAC) which is composed of 5 proteins (C5b, C6, C7, C8, and C9) and play an essential role in innate immunity and cancer cells death [27]. The increased expression of those components represents good indicators acting as tumor suppressors and delaying the progression of cancer[28,29]. In the other hand, the up-regulation of proteins related to MAC disassembly, vitronectin and clusterin, and other complement-negative regulators, such as C1 inhibitor plasma protease, factor-H and C4b-binding protein alpha chain in plasma of CRC patients, suggest a mechanism of resistance to the possible anti-tumorigenic effects of the complement mentioned above. Besides, it is important to note the decrease in the expression of C6 and Complement C1r subcomponent in the same patients. Associated with this, the positive regulation of C3, factor B, and C5 may contribute to an inflammatory phenotype related to tumor progression and inhibition of the antitumor response, also favoring pro-metastasis mechanisms [30,31]. In colorectal cancer, the expression of complement system proteins has often been suggested as screen markers. In a study of biomarker discovery, MURAKOSHI et al. (2011) demonstrated that increased C9 plasma expression could apply to early CRC detection [32]. In a similar study, clusterin plasma levels also were proposed as pre-diagnostic markers for this cancer [33]. Also, some components of the complement activation lectin pathway may be useful in discriminating colorectal cancer patients from healthy individuals. However, for the application of these proteins in screening tests, it is necessary to combine with other markers [34].

Other up-regulated proteins in our study such as hemoglobin-beta (HB-B), Haptoglobin (HP) and leucine-rich alpha-2-glycoprotein (LGR1) are also involved in the immune system

pathway. In addition to HB-B, two subunits of hemoglobins, hemoglobin alpha (HBA) and Delta (HBD), are among the ten most up-regulated proteins in plasma CRC. In agreement, Choi et al. (2013), demonstrated previously that serum levels of HB-B were increased in patients with colorectal cancer when compared with adenomas [35]. In this same work the increase of HB-B was accompanied by the up-regulation of other proteins also identified in our study as leucine-rich α -2-glycoprotein, and complement factor B [35]. The increased expression of serum hemoglobin (HB-A and HB-B) were also observed in pancreatic adenocarcinoma and ovarian cancer and considered as potential targets for diagnostic and prognosis of these cancers [36,37]. Is not yet well defined what biological function free-HBs play in a tumor, though, when denatured and oxidized, are related to the release of heme iron in the bloodstream. As a result, there is an increase of reactive oxygen species generated by Fenton reaction, with consequent tissue damage and activation of inflammatory cascades [38,39]. Free hemoglobin may also favor the survival of circulating tumor cells in blood circulation. [40]. In our work, the Reactome Analysis revealed the enrichment of the Scavenging of heme from plasma pathway with 15 up-regulated proteins involved, suggesting a mechanism of response to the increase of free-hemoglobin in the plasma of patients with CRC. Among the proteins included in this pathway are haptoglobin (HP), haptoglobin-related protein (HPR), hemopexin (HPX), apolipoprotein-1 (APO-1) and some immunoglobulins. The haptoglobin-related protein and haptoglobin are an extracellular protein involved in the withdrawal of free plasma hemoglobin [41]. However, this paper is not summarised only this function, both HB-B and haptoglobin play a role in the leukocyte degranulation, highlighting its role in inflammation [42]. Chun-San Tai et al. (2017) demonstrated that the expression of this protein is involved in tumor differentiation and survival of patients with hepatocellular carcinoma [43]. In association, a previous study showed HP as a serum marker of hepatic metastasis in patients with CRC [35].

APO-A1 is also involved in the elimination of plasma heme. This protein is the main component of HDL and is notably involved with anti-inflammatory processes associated with cardiovascular protection [44]. In colorectal cancer, a study by Sirnio et al. (2017) it was shown that decreased serum ApoA1 levels were associated with systemic inflammation and adverse survival [45]. In contrast, a more recent study showed that increased gene expression of APOA1 and other apolipoproteins like APOH and APOC3 was related to hepatic metastasis in the CCR [46]. The adverse effect of APO-A1 may be related to the association of the HB-HP-HX complex with HDL, which in inflammatory processes, especially the acute phase, modulates pro-inflammatory properties in this lipoprotein [47]. In our study, in addition to APO-A1 and APOC3, APOD also showed up-regulated. However, more detailed studies are needed to evaluate the possible effect of these proteins in these patients and if it depends on the tumor stage.

Leucine-rich alpha-2-glycoprotein (LRG1), serum glycoprotein produced in hepatocytes, was the second most up-regulated protein in our study. LRG1 has also been reported as a potential marker of prognosis for colorectal cancer stage III and may also be used in CRC pre-diagnosis in women [48,49]. Still, according to Zhang et al. (2018), patients with higher LRG1 expression had shorter survival time compared with patients with lower LRG1 expression [50]. Although the role of LRG1 in cancer is not fully understood, it seems it is directly related to the modulation of TGF- β . Through it, this protein may mediate different effects on carcinogenesis like the promotion of epithelium-mesenchymal transition (EMT), proliferation and inhibition of apoptosis [51]. These data suggest the participation of this protein both in tumor initiation and progression, making it likely targets in the diagnosis and prognosis in the CRC.

In addition to the pathways related to the Immune System, we highlight other 3 main pathways enriched in our study related to the activation and degranulation of platelets: Platelet

activation, signaling and aggregation, Platelet degranulation and Response to elevated platelet cytosolic Ca^{2+} . Besides that, Hemostasis, in which the platelets have essential function, is the third most represented in our work. The effects of platelet activation are not restricted only to the plasma. According to the consensual molecular classification of colorectal cancer, a tumor subtype, CSM4, in addition to displaying strong signature complement system, also presents marked stimulus of platelets *in situ* [52]. Within the tumor microenvironment, these cellular fragments act in the progression of the tumor, promoting the formation of new vessels and contributing to an invasive phenotype [53]. Throughout these processes, the platelets are also capable of stimulating the secretion of clusterin in tumor cells, which can mediate in part the activation of matrix metalloproteinase 9 (MPP-9) [54]. Outside of the tumor environment, platelets also favor the survival of tumor cells in the circulation [55]. The effects at plasma levels of the constant activation of the hemostasis process lead to venous thromboembolism, often occurring as a paraneoplastic phenomenon in several types of cancer, including CRC [56].

Among the up-regulated proteins related to these pathways, it is pertinent to emphasize the presence of alpha-1 antichymotrypsin (SERPINA3), alpha-1 antitrypsin (SERPINA1), alpha-1 acid glycoprotein 1 (ORM1) and acid glycoprotein 2 (ORM2). The Serpin family is part of a group of serine protease inhibitor proteins with highly conserved structures, performing keys functions in the maintenance of cellular homeostasis [57]. These proteins act in the regulation of processes such as coagulation, tissue remodeling, inflammation, apoptosis and metastasis [57,58]. In our study, SERPINA3 and SERPINA1 are among the major up-regulated proteins. Both have a crucial role in inflammation, especially mediating the acute phase response. Previous studies have highlighted the importance of these proteins in colorectal cancer, corroborating with our findings and highlighting the potential diagnosis value and prognosis of these proteins [59,60].

ORM1 and ORM2 also were previously reported as potential markers for colorectal cancer [61–63]. These proteins act on the modulation of immune system activity during the acute phase reaction and may mediate responses to escape the performance of this system [63,64]. The ORM2 promotes the development of CRC and has an active role in inflammatory bowel diseases [63,65].

In addition to the above-mentioned potential markers, we highlight the identification of the Tectonic-2 protein (TCTN-2) in the samples of patients with CRC. As far as we know, this is the first time that the TCTN-2 was identified in the plasma of CRC patients. In recent studies, Cano-Rodriguez (2017) reported for the first time the overexpression of tectonic-2 in colorectal, ovarian and lung tumors tissues. Besides, demonstrated that the silencing of that protein by epigenetic editing increased apoptosis and decreased colony formation and invasive capacity of tumor cells [66]. Tectonic-2 is located at the junction between the basal body and the ciliary axoneme, in a region called the transition zone participating as a barrier to prevent the membrane protein blend [67]. Tectonic family members are also related to reception of signals outside the cell, thus regulating signal transduction [67,68]. The association of these proteins with the Hedgehog and WNT pathways can justify the correlation with tumor transformation, since these pathways are often enabled/disabled on a series of cancers, including colorectal cancer [69]. Later, we will verify the expression of this protein in different CRC cancer stages, evaluating diagnosis value and prognosis.

Additionally, we also highlight the negative regulation of some proteins such as Prostate, Ovary, Testis-Express protein-E (POTE-E), POTE-F and CD5L in the samples of patients with CRC. POTE-E and POTE-F are part of a family multigenic composed of 14 genes located on chromosome 7. Some proteins of this group were overexpressed in several types of cancers, included colon, lung, ovary, and prostate cancer [70]. These proteins have been associated with the plasma membrane, but they are also secreted and can be found in plasma

exosomes and microvesicles of healthy individuals [71]. Although they have no known biological function, increased expression of the proteins was related to the promotion of apoptosis in Hela cell line [72]. However, because a lacking role in CRC reported in the literature, further studies are needed to assess its effects on tumor biology and clinical practice.

CD5 Antigen like (CD5L) is part of a family rich in cysteines and is present mainly in macrophages, lymphocytes and inflammatory tissue [73,74]. In this context, CD5L was related to the recruitment and inhibition of apoptosis in leukocytes and macrophages, modulating the secretion of proinflammatory cytokines, inhibition of the synthesis of tumor necrosis factor (TNF) [74]. In hepatocellular carcinoma tissue levels of this protein are up-regulated and promote inhibition of cell death and tumor proliferation [75]. Therefore, the decrease in expression of this protein can be characterized as beneficial in response to activation of several inflammatory mechanisms in cancer. However, the increase or decrease the role of CD5L expression in colorectal cancer is unclear. Maybe related to Th-17 since, by regulating the lipid metabolism of these cells, CD5L can modulate its pathogenicity. The absence of this antigen in these T cells produces an increase in proinflammatory cytokines such as IL-17 and IL-23, converting non-pathogenic Th-17 cells into pathogenic [76]. In turn, cytokine production in CRC by Th-17 is related to initiation, tumor progression and reduction in disease-free survival [77]. However, due to the double function that this protein may represent, it is essential to evaluate its expression and biological role in colorectal cancer carcinogenesis.

Conclusion

Analysis of the modifications in plasma protein expression profile of patients with sporadic colorectal adenocarcinoma revealed a series of proteins related both to anti-tumor protection and to tumor progression, including positive and negative acute response proteins. Many of them have been described in the literature have also been mediating both effects.

Making it necessary to evaluate the effect of these proteins according to the tumor staging and molecular subclassification of CRC. Although changes in plasma protein expression are common in several pathologies, the clinical and biological profile and repercussions of these changes on a specific set of proteins are different for a number of them, including cancer. However, its effects in CRC should be carefully evaluated, because, for the use of these proteins in clinical practice as predictive markers in diagnosis, prognosis, and therapy, the levels of these proteins must be reproducible in a larger transverse cohort. For this, comparative studies using other proteomic platforms are indicated, followed by validation by immunoassay techniques.

Acknowledgments

We would like to thank the financial support of FACEPE (Fundação de Amparo a Ciência e Tecnologia), LIKA (Laboratório de Imunopatologia KeizoAsami) and UFPE (Universidade Federal de Pernambuco).

Figure Captions

Figure 1- Dynamic range of absolute quantification of the differentially expressed plasma proteins in colorectal cancer patients.

Figure 2- Top GO terms obtained from GO functional and pathways enrichment analysis of up-regulated plasma proteins in colorectal cancer patients by DAVID and Reactome. A: TOP 10 Biological process; B: TOP 10 Molecular functions; C: Top 10 Cellular components; D: Top 10 Pathways.

Figure 3- GO terms obtained from GO functional and pathways enrichment analysis of down-regulated plasma proteins in colorectal cancer patients by DAVID and Reactome. A: Biological process; B: Cellular components; C: Top 10 Pathways.

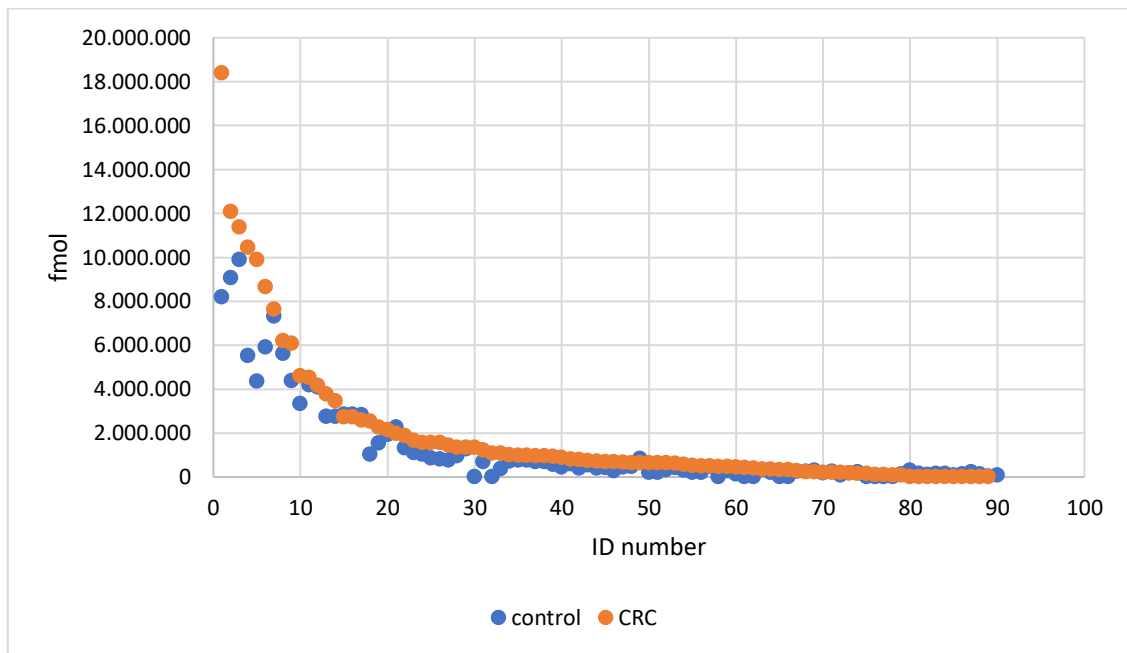
Figure 1

Figure 2

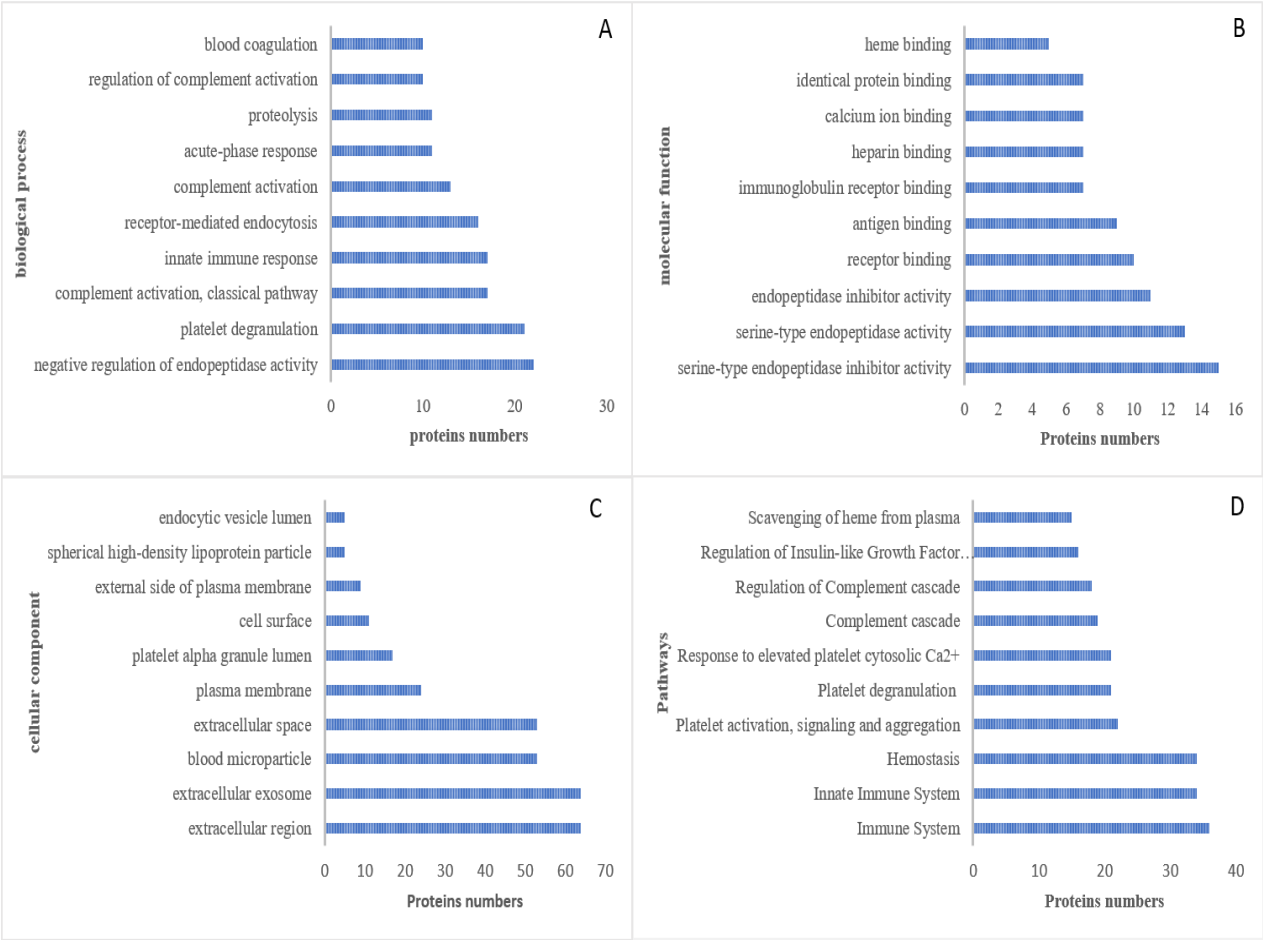


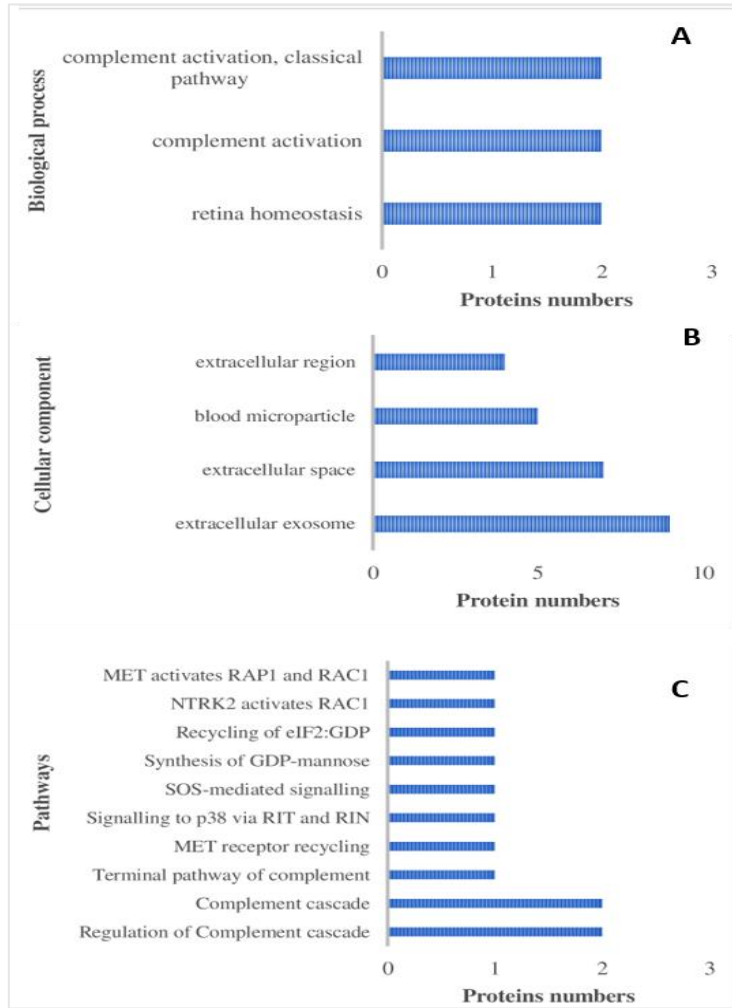
Figure 3

Table 1 – Clinical and histopathological data of patients with colorectal adenocarcinoma.

No	Age	Gender	Tumor location	Histologic grade	pTpNpM
1	69	Male	Rectum	Moderately differentiated	pT4pN2pM0
2	58	Female	Rectum	Moderately differentiated	pT2pN0pM0
3	80	Female	Rectosigmoid	Moderately differentiated	pT3pN0pM0
4	77	Female	Rectum	Moderately differentiated	pT3pN0pM0
5	60	Male	Rectosigmoid	Moderately differentiated	pT3pN0pM0
6	44	Male	Right colon	Moderately differentiated	pT3pN0pMx
7	74	Female	Rectosigmoid	Moderately differentiated	pT3pN1bpMx
8	50	Female	Rectum	Well differentiated	pT3pN1pM0
9	62	Female	Rectum	Moderately differentiated	pT3pN0pM0
10	58	Female	Rectosigmoid	Moderately differentiated	pT4pN0pM0

*pT= primary tumor. pN=regional lymph node involvement, pM0=presence or otherwise of distant metastatic spread, pMx= Presence of metastasis is not checked.

Table 2 – Up-regulated plasma proteins in adenocarcinoma colorectal patients

ID number	ID UniProt	Proteins	Score	1:0_R atio	Ave fmol CRC	SD
43	P68871	Hemoglobin subunit beta	1664,7	5,16	637.630	60.631
56	P02750	Leucine-rich alpha-2-glycoprotein	680,29	5,10	442.730	8.985
44	P02042	Hemoglobin subunit delta	1005,81	5,05	637.630	60.631
17	P01011	Alpha-1-antichymotrypsin	1914,25	4,57	2.537.101	48.778
31	P02647	Apolipoprotein A-I	979,87	4,53	1.071.898	39.063
66	P10643	Complement component C7	152,84	4,53	194.002	18.823
42	P69905	Hemoglobin subunit alpha	314,42	4,22	637.630	60.631
69	P00739	Haptoglobin-relatedprotein	5517,1	4,14	154.459	8.372
55	P02748	Complement component C9	104,89	4,10	485.291	10.263
26	P19652	Alpha-1-acidglycoprotein 2	9602,78	4,06	1.568.392	116.295
68	P00738	Haptoglobin OS=Homo sapiens	18270,1	4,01	18.391.977	8.592.509
4	P02763	Alpha-1-acidglycoprotein 1	17022,08	3,86	9.893.006	265.143
3	P01009	Alpha-1-antitrypsin	6196,16	3,56	10.453.847	272.704
39	P02774	Vitamin D-binding protein	1536,31	3,42	776.872	36.222
25	P05155	Plasma protease C1 inhibitor	1170,06	3,29	1.559.907	19.854
37	Q14624	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H4	479,36	3,22	874.265	19.888
27	P04217	Alpha-1B-glycoprotein	4390,67	3,16	1.441.125	56.418
53	P05546	Heparin cofactor 2	326,41	3,16	467.450	25.698
59	P01031	Complement C5	156,45	3,06	510.277	243.050

49	P25311	Zinc-alpha-2-glycoprotein	1593,18	3,03	642.273	19.261
48	P0C0L4	Complement C4-A	4102,85	2,92	682.256	13.868
51	P02760	Protein AMBP	1701,7	2,92	649.893	27.971
24	P0C0L5	Complement C4-B	4224,96	2,89	1.572.290	11.856
30	P00751	Complement factor B	1577,17	2,89	1.211.329	15.210
47	P02743	Serumamyloid P-component	659,99	2,89	689.959	12.775
35	P04003	C4b-binding protein alpha chain	956,54	2,80	932.330	4.944
38	P08603	Complement factor H	1230,61	2,77	997.850	108.997
45	P04196	Histidine-rich glycoprotein	1045,58	2,77	671.206	22.610
5	P02790	Hemopexin	21692,61	2,75	8.646.776	311.988
40	P00747	Plasminogen	841,82	2,69	739.871	32.084
23	P02749	Beta-2-glycoprotein 1	4484,91	2,66	1.666.469	12.309
46	P02768	Serum albumin	137,21	2,66	557.177	192.744
77	P02753	Retinol-binding protein 4	550,18	2,64	346.209	0
19	P00450	Ceruloplasmin	3386,85	2,59	2.275.851	35.528
8	P01023	Alpha-2-macroglobulin	13783,58	2,53	6.071.202	46.613
28	P01042	Kininogen-1	2332,11	2,53	1.344.374	9.760
32	P00734	Prothrombin	1185,67	2,48	986.179	57.034
33	P10909	Clusterin	949,83	2,46	946.061	36.687
10	P01024	Complement C3	12431,69	2,44	4.606.115	120.105
34	P01008	Antithrombin-III	1161,41	2,41	950.275	11.276
41	P19827	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H1	842,16	2,41	803.135	48.456
52	P08697	Alpha-2-antiplasmin	701,4	2,39	603.735	65.207

70	P20742	Pregnancy zone protein	1232,13	2,36	69.734	7.485
63	Q96PD5	N-acetylmuramoyl-L-alanineamidase	719,53	2,32	199.954	49.587
36	P19823	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H2	754,43	2,29	985.527	47.287
67	P01591	Immunoglobulin J chain	938,2	2,29	168.546	3.299
1	P02787	Serotransferrin	34131,9	2,27	12.070.330	501.565
2	P01876	Immunoglobulin heavy constant alpha	41913,27	2,25	11.373.667	69.502
13	P0CF74	Immunoglobulin lambda constant 6	19394,59	2,25	3.761.834	370.904
18	P0DOY2	Immunoglobulin lambda constant 2	29312	2,25	3.445.078	817.200
12	P0CG04	Immunoglobulin lambda constant 1	27367,38	2,23	2.579.825	1.353.824
14	P0DOX8	Immunoglobulin lambda-1 light chain	27367,38	2,23	1.887.768	1.476.407
65	P01877	Immunoglobulin heavy constant alpha 2	18977,63	2,20	224.799	0
20	P02765	Alpha-2-HS-glycoprotein	6469,54	2,18	2.134.369	58.387
73	P0DOX2	Immunoglobulin alpha-2 heavy chain	18977,63	2,18	353.126	13.594
60	P08185	Corticosteroid-binding globulin	303,21	2,10	229.222	110.916
7	P01834	Immunoglobulin kappa constant	22671,4	2,08	6.205.936	321.458
50	P0DOX7	Immunoglobulin kappa light chain	9077,58	2,03	721.817	65.351
64	P27169	Serum paraoxonase/arylesterase 1	1106,89	1,97	271.462	12.308
6	P02679	Fibrinogen gamma chain	19402,88	1,90	7.622.861	291.626
54	P01019	Angiotensinogen	1512,65	1,88	482.162	19.511
9	P02675	Fibrinogen beta chain	18869,56	1,82	4.536.223	67.225
29	P04004	Vitronectin	2902,44	1,79	1.341.152	44.238
15	P01871	Immunoglobulin heavy constant mu	6876,35	1,72	2.717.750	56.717
16	P0DOX6	Immunoglobulin mu heavy chain	5487,94	1,70	2.717.750	56.717

11	P02671	Fibrinogen alpha chain	6684,11	1,57	4.167.506	85.355
72	P06396	Gelsolin	200,78	1,57	199.478	0
21	P02766	Transthyretin	14798,04	1,45	1.963.128	62.692
	Q8NFY9	Kelch repeat and BTB domain-containing protein 8	210,78	*		720.483
22					1.335.391	
57	P02656	Apolipoprotein C-III	756,72	*	1.083.584	0
58	P05090	Apolipoprotein D	415,05	*	468.953	32.240
61	P02741	C-reactiveprotein	395,39	*	424.690	5.862
62	Q9H9L4	KAT8 regulatory NSL complex subunit 2	212,96	*	397.714	144.934
71	P09871	Complement C1s subcomponent	178,92	*	331.752	0
74	P01767	Immunoglobulin heavy variable 3-53	781,5	*	326.973	0
75	A0A0C4DH42	Immunoglobulin heavy variable 3-66	442,01	*	153.992	0
76	Q6VN20	Ran-bindingprotein 10	231,02	*	110.620	0
78	Q9UMR3	T-box transcription factor TBX20	257,09	*	110.620	0
79	Q96GX1	Tectonic-2	266,76	*	87.367	0

*Unique proteins in colorectal cancer plasma samples.

Table 3 – Down-regulated plasma proteins in adenocarcinoma colorectal patients.

ID Number	ID UniProt	Proteins	Score	Ave fmolcontrol	SD
80	P68133	Actin, alpha skeletal muscle	114,2	300.537,50	54.085
81	O43866	CD5 antigen-like	459,63	152.491,67	10.071
82	P13671	Complement component C6	116,18	100.857,00	0
83	P0DOX5	Immunoglobulin gamma-1 heavy chain	387,36	163.867,00	0
84	P01857	Immunoglobulin heavy constant gamma 1	384,64	163.867,00	0
	P35858	Insulin-like growth factor-binding protein complex	284,23	79.469,00	389
85		acid labile subunit			
86	Q6S8J3	POTE ankyrin domain family member E	382,05	136.222,50	86.588
87	A5A3E0	POTE ankyrin domain family member F	374,41	222.810,00	0
88	P59090	Putative uncharacterized protein TSPEAR-AS2	396,64	135.118,00	0
89	P20338	Ras-related protein Rab-4A	263,51	34.899,00	0
90	P00736	Complement C1r subcomponent	131,66	76.864,50	1.965

REFERENCES

1. Bosman F., Carneiro F, Hruban R., Theise N. WHO Classification of Tumours of the Digestive System. [Internet]. 3th ed. 2010 [cited 2018 Dec 12]. Available from: <http://apps.who.int/bookorders/anglais/detart1.jsp?codlan=1&codcol=70&codcch=4003>
2. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin* [Internet]. American Cancer Society; 2018 [cited 2018 Dec 12];68:394–424. Available from: <http://doi.wiley.com/10.3322/caac.21492>
3. Araghi M, Soerjomataram I, Jenkins M, Brierley J, Morris E, Bray F, et al. Global trends in colorectal cancer mortality: projections to the year 2035. *Int J Cancer* [Internet]. John Wiley & Sons, Ltd; 2018 [cited 2018 Dec 12];ijc.32055. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/ijc.32055>
4. INCA. Estimativa 2018. Incidência de câncer no Brasil. Inst. Nac. Câncer José Alencar Gomes da Silva. 2017.
5. Edwards BK, Ward E, Kohler BA, Ehemann C, Zauber AG, Anderson RN, et al. Annual report to the nation on the status of cancer, 1975-2006, featuring colorectal cancer trends and impact of interventions (risk factors, screening, and treatment) to reduce future rates. *Cancer* [Internet]. 2010 [cited 2018 Dec 13];116:544–73. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19998273>
6. Alvarez-Chaver P, Otero-Estévez O, de la Cadena MP, Rodríguez-Berrocal FJ, Martínez-Zorzano VS. Proteomics for discovery of candidate colorectal cancer biomarkers. *World J Gastroenterol*. 2014;20:3804–24.
7. Fung KYC, Tabor B, Buckley MJ, Priebe IK, Purins L, Pompeia C, et al. Blood-based protein biomarker panel for the detection of colorectal cancer. *PLoS One* [Internet]. Public Library of Science; 2015 [cited 2018 Apr 6];10:e0120425. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25793510>
8. Végvári A, Welinder C, Lindberg H, Fehniger TE, Marko-Varga G. Biobank resources for future patient care: developments, principles and concepts. *J Clin Bioinforma* [Internet]. BioMed Central; 2011 [cited 2018 Dec 15];1:24. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21923917>
9. Group F-NBW. BEST (Biomarkers, EndpointS, and other Tools) Resource [Internet]. BEST (Biomarkers, EndpointS, other Tools) Resour. Food and Drug Administration (US); 2016 [cited 2018 Dec 18]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27010052>

10. Anderson NL, Anderson NG. The Human Plasma Proteome. *Mol Cell Proteomics* [Internet]. 2002 [cited 2019 Jan 9];1:845–67. Available from: <http://www.mcponline.org/lookup/doi/10.1074/mcp.R200007-MCP200>
11. Aebersold R, Mann M. Mass spectrometry-based proteomics. *Nat* 2003 4226928. Nature Publishing Group; 2003;
12. Sun H, Pan L, Jia H, Zhang Z, Gao M, Huang M, et al. Label-Free Quantitative Proteomics Identifies Novel Plasma Biomarkers for Distinguishing Pulmonary Tuberculosis and Latent Infection. *Front Microbiol* [Internet]. Frontiers; 2018 [cited 2018 Dec 16];9:1267. Available from: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2018.01267/full>
13. Firmino M, Weis SN, Souza JMF, Gomes BRB, Mól AR, Mortari MR, et al. Label-free quantitative proteomics of rat hypothalamus under fever induced by LPS and PGE2. *J Proteomics* [Internet]. 2018 [cited 2018 Dec 17];187:182–99. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1874391918302951>
14. Bantscheff M, Lemeer S, Savitski MM, Kuster B. Quantitative mass spectrometry in proteomics: critical review update from 2007 to the present. *Anal Bioanal Chem* [Internet]. 2012 [cited 2019 Jan 13];404:939–65. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22772140>
15. Williams KR, Stone KL. Enzymatic cleavage and HPLC peptide mapping of proteins. *Mol Biotechnol* [Internet]. Humana Press; 1997 [cited 2018 Apr 13];8:155–67. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/BF02752260>
16. Li G-Z, Vissers JPC, Silva JC, Golick D, Gorenstein M V., Geromanos SJ. Database searching and accounting of multiplexed precursor and product ion spectra from the data independent analysis of simple and complex peptide mixtures. *Proteomics* [Internet]. 2009 [cited 2019 Jan 16];9:1696–719. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19294629>
17. Geromanos SJ, Vissers JPC, Silva JC, Dorschel CA, Li G-Z, Gorenstein M V., et al. The detection, correlation, and comparison of peptide precursor and product ions from data independent LC-MS with data dependant LC-MS/MS. *Proteomics* [Internet]. 2009 [cited 2019 Jan 16];9:1683–95. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19294628>
18. Chambery A, Vissers JPC, Langridge JJ, Lonardo E, Minchiotti G, Ruvo M, et al. Qualitative and Quantitative Proteomic Profiling of Cripto^{-/-} Embryonic Stem Cells by Means of Accurate Mass LC–MS Analysis. *J Proteome Res* [Internet]. 2009 [cited 2019 Jan 16];8:1047–58. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19152270>

19. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell*. 2011. p. 646–74.
20. Coussens LM, Werb Z. Inflammation and cancer. *Nature* [Internet]. NIH Public Access; 2002 [cited 2019 Jan 4];420:860–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12490959>
21. Terzić J, Grivennikov S, Karin E, Karin M. Inflammation and Colon Cancer. *Gastroenterology* [Internet]. Elsevier; 2010 [cited 2019 Jan 6];138:2101–2114.e5. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0016508510001769>
22. Witsch E, Sela M, Yarden Y. Roles for growth factors in cancer progression. *Physiology (Bethesda)* [Internet]. NIH Public Access; 2010 [cited 2019 Jan 7];25:85–101. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20430953>
23. Zhang X, Nie D, Chakrabarty S. Growth factors in tumor microenvironment. *Front Biosci (Landmark Ed)* [Internet]. NIH Public Access; 2010 [cited 2019 Jan 7];15:151–65. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20036812>
24. Noris M, Remuzzi G. Overview of complement activation and regulation. *Semin Nephrol* [Internet]. Elsevier; 2013 [cited 2019 Jan 5];33:479–92. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24161035>
25. Markiewski MM, Lambris JD. Is complement good or bad for cancer patients? A new perspective on an old dilemma. *Trends Immunol* [Internet]. NIH Public Access; 2009 [cited 2019 Feb 10];30:286–92. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19428302>
26. Carroll MC, Isenman DE. Regulation of Humoral Immunity by Complement. *Immunity* [Internet]. 2012 [cited 2019 Jan 5];37:199–207. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22921118>
27. Serna M, Giles JL, Morgan BP, Bubeck D. Structural basis of complement membrane attack complex formation. *Nat Commun* [Internet]. Nature Publishing Group; 2016 [cited 2019 Jan 4];7:10587. Available from: <http://www.nature.com/articles/ncomms10587>
28. Ying L, Zhang F, Pan X, Chen K, Zhang N, Jin J, et al. Complement component 7 (C7), a potential tumor suppressor, is correlated with tumor progression and prognosis. *Oncotarget* [Internet]. Impact Journals, LLC; 2016 [cited 2019 Jan 4];7:86536–46. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27852032>
29. Li L, Yang H, Li Y, Li X-D, Zeng T-T, Lin S-X, et al. Hypoxia restrains the expression of complement component 9 in tumor-associated macrophages promoting non-small cell lung cancer progression. *Cell death Discov* [Internet]. Nature Publishing Group; 2018 [cited 2019

Jan 5];4:63. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29900010>

30. Cho MS, Rupaimoole R, Choi H-J, Noh K, Chen J, Hu Q, et al. Complement Component 3 Is Regulated by TWIST1 and Mediates Epithelial–Mesenchymal Transition. *J Immunol* [Internet]. 2016 [cited 2019 Jan 5];196:1412–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26718342>

31. Riihilä P, Nissinen L, Farshchian M, Kallajoki M, Kivisaari A, Meri S, et al. Complement Component C3 and Complement Factor B Promote Growth of Cutaneous Squamous Cell Carcinoma. *Am J Pathol* [Internet]. Elsevier; 2017 [cited 2019 Jan 5];187:1186–97. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28322200>

32. Murakoshi Y, Honda K, Sasazuki S, Ono M, Negishi A, Matsubara J, et al. Plasma biomarker discovery and validation for colorectal cancer by quantitative shotgun mass spectrometry and protein microarray. *Cancer Sci*. 2011;102:630–8.

33. Bertuzzi M, Marelli C, Bagnati R, Colombi A, Fanelli R, Saieva C, et al. Plasma clusterin as a candidate pre-diagnosis marker of colorectal cancer risk in the Florence cohort of the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition : a pilot study. 2015;

34. Storm L, Christensen IJ, Jensenius JC, Nielsen HJ, Thiel S, Danish Study Group on Early Detection of Colorectal Cancer. Evaluation of complement proteins as screening markers for colorectal cancer. *Cancer Immunol Immunother* [Internet]. 2015 [cited 2019 Feb 9];64:41–50. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25261356>

35. Choi JW, Liu H, Shin DH, Yu GI, Hwang JS, Kim ES, et al. Proteomic and cytokine plasma biomarkers for predicting progression from colorectal adenoma to carcinoma in human patients. *Proteomics*. 2013;13:2361–74.

36. Deng R, Lu Z, Chen Y, Zhou L, Lu X. Plasma Proteomic Analysis of Pancreatic Cancer by 2-Dimensional Gel Electrophoresis. *Pancreas* [Internet]. 2007 [cited 2018 Dec 29];34:310–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17414053>

37. Woong-Shick A, Sung-Pil P, Su-Mi B, Joon-Mo L, Sung-Eun N, Gye-Hyun N, et al. Identification of hemoglobin-alpha and -beta subunits as potential serum biomarkers for the diagnosis and prognosis of ovarian cancer. *Cancer Sci* [Internet]. John Wiley & Sons, Ltd (10.1111); 2005 [cited 2018 Dec 23];96:197–201. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1349-7006.2005.00029.x>

38. Schaer DJ, Buehler PW, Alayash AI, Belcher JD, Vercellotti GM. Hemolysis and free hemoglobin revisited: exploring hemoglobin and hemin scavengers as a novel class of therapeutic proteins. *Blood* [Internet]. 2013 [cited 2019 Jan 6];121:1276–84. Available from:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23264591>

39. Quaye IK. Extracellular hemoglobin : the case of a friend turned foe. 2015;6:1–13.
40. Zheng Y, Miyamoto DT, Wittner BS, Sullivan JP, Aceto N, Jordan NV, et al. Expression of β -globin by cancer cells promotes cell survival during blood-borne dissemination. *Nat Commun* [Internet]. Nature Publishing Group; 2017 [cited 2018 Jan 19];8:14344. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28181495>
41. BUTTARI B, PROFUMO E, PETRONE L, PIETRAFORTE D, SIRACUSANO A, MARGUTTI P, et al. Free Hemoglobin: A Dangerous Signal for the Immune System in Patients with Carotid Atherosclerosis? *Ann N Y Acad Sci* [Internet]. 2007 [cited 2019 Jan 6];1107:42–50. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17804531>
42. Tabassum U, Reddy O, Mukherjee G. Elevated serum haptoglobin is associated with clinical outcome in triple-negative breast cancer patients. *Asian Pac J Cancer Prev* [Internet]. 2012 [cited 2019 Jan 6];13:4541–4. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23167376>
43. Tai C-S, Lin Y-R, Teng T-H, Lin P-Y, Tu S-J, Chou C-H, et al. Haptoglobin expression correlates with tumor differentiation and five-year overall survival rate in hepatocellular carcinoma. *PLoS One* [Internet]. Public Library of Science; 2017 [cited 2018 Dec 30];12:e0171269. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28158312>
44. Besler C, Lüscher TF, Landmesser U. Molecular mechanisms of vascular effects of High-density lipoprotein: alterations in cardiovascular disease. *EMBO Mol Med* [Internet]. Wiley-Blackwell; 2012 [cited 2019 Jan 3];4:251–68. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22431312>
45. Sirniö P, Väyrynen JP, Klintrup K, Mäkelä J, Mäkinen MJ, Karttunen TJ, et al. Decreased serum apolipoprotein A1 levels are associated with poor survival and systemic inflammatory response in colorectal cancer. *Sci Rep* [Internet]. Nature Publishing Group; 2017 [cited 2019 Jan 3];7:5374. Available from: <http://www.nature.com/articles/s41598-017-05415-9>
46. Zhang T, Guo J, Gu J, Wang Z, Wang G, Li H, et al. Identifying the key genes and microRNAs in colorectal cancer liver metastasis by bioinformatics analysis and in vitro experiments. *Oncol Rep* [Internet]. Spandidos Publications; 2019 [cited 2019 Jan 4];41:279–91. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30542696>
47. Planck M. Where is science going? [Internet]. First Edition. New York: W. W. NORTON & COMPANY, INC; 1932 [cited 2019 Feb 7]. Available from: https://archive.org/stream/whereissciencego00plan_0/whereissciencego00plan_0_djvu.txt

48. Sun D-C, Shi Y, Wang L-X, Lv Y, Han Q-L, Wang Z-K, et al. Leucine-rich alpha-2-glycoprotein-1, relevant with microvessel density, is an independent survival prognostic factor for stage III colorectal cancer patients: a retrospective analysis. *Oncotarget* [Internet]. 2017 [cited 2018 Dec 31];8:66550–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29029535>
49. Ladd JJ, Busald T, Johnson MM, Zhang Q, Pitteri SJ, Wang H, et al. Increased Plasma Levels of the APC-Interacting Protein MAPRE1, LRG1, and IGFBP2 Preceding a Diagnosis of Colorectal Cancer in Women. *Cancer Prev Res* [Internet]. 2012 [cited 2019 Jan 18];5:655–64. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22277732>
50. Zhang Q, Huang R, Tang Q, Yu Y, Huang Q, Chen Y, et al. Leucine-rich alpha-2-glycoprotein-1 is up-regulated in colorectal cancer and is a tumor promoter. *Onco Targets Ther* [Internet]. Dove Press; 2018 [cited 2018 Dec 31];11:2745–52. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29785123>
51. Wang X, Abraham S, McKenzie JAG, Jeffs N, Swire M, Tripathi VB, et al. LRG1 promotes angiogenesis by modulating endothelial TGF- β signalling. *Nature* [Internet]. Nature Publishing Group; 2013 [cited 2018 Dec 31];499:306–11. Available from: <http://www.nature.com/articles/nature12345>
52. Lam M, Roszik J, Kanikarla-Marie P, Davis JS, Morris J, Kopetz S, et al. The potential role of platelets in the consensus molecular subtypes of colorectal cancer. *Cancer Metastasis Rev* [Internet]. 2017 [cited 2019 Feb 9];36:273–88. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28681242>
53. BAMBACE NM, HOLMES CE. The platelet contribution to cancer progression. *J Thromb Haemost* [Internet]. 2011 [cited 2019 Feb 9];9:237–49. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21040448>
54. Radziwon-Balicka A, Santos-Martinez MJ, Corbalan JJ, O'Sullivan S, Treumann A, Gilmer JF, et al. Mechanisms of platelet-stimulated colon cancer invasion: role of clusterin and thrombospondin 1 in regulation of the P38MAPK-MMP-9 pathway. *Carcinogenesis* [Internet]. Oxford University Press; 2014 [cited 2019 Feb 9];35:324–32. Available from: <https://academic.oup.com/carcin/article-lookup/doi/10.1093/carcin/bgt332>
55. Gupta GP, Massagué J. Platelets and metastasis revisited: a novel fatty link. *J Clin Invest* [Internet]. 2004 [cited 2019 Feb 9];114:1691–3. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15599391>
56. Franchini M, Montagnana M, Favaloro E, Lippi G. The Bidirectional Relationship of

- Cancer and Hemostasis and the Potential Role of Anticoagulant Therapy in Moderating Thrombosis and Cancer Spread. *Semin Thromb Hemost* [Internet]. 2009 [cited 2019 Feb 9];35:644–53. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20013531>
57. Law RHP, Zhang Q, McGowan S, Buckle AM, Silverman GA, Wong W, et al. An overview of the serpin superfamily. *Genome Biol* [Internet]. BioMed Central; 2006 [cited 2019 Feb 9];7:216. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16737556>
58. Silverman GA, Bird PI, Carrell RW, Church FC, Coughlin PB, Gettins PG, et al. The serpins are an expanding superfamily of structurally similar but functionally diverse proteins. Evolution, mechanism of inhibition, novel functions, and a revised nomenclature. *J Biol Chem* [Internet]. American Society for Biochemistry and Molecular Biology; 2001 [cited 2019 Feb 9];276:33293–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11435447>
59. Peltier J, Roperch J-P, Audebert S, Borg J-P, Camoin L. Quantitative proteomic analysis exploring progression of colorectal cancer: Modulation of the serpin family. *J Proteomics* [Internet]. 2016 [cited 2019 Jan 28];148:139–48. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27492143>
60. Surinova S, Choi M, Tao S, Schüffler PJ, Chang C, Clough T, et al. Prediction of colorectal cancer diagnosis based on circulating plasma proteins. 2015;7:1166–78.
61. Brock R, Xiong B, Li L, Vanbogelen RA, Christman L. A multiplex serum protein assay for determining the probability of colorectal cancer. *Am J Cancer Res* [Internet]. e-Century Publishing Corporation; 2012 [cited 2019 Jan 28];2:598–605. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22957311>
62. Gao F, Zhang X, Whang S, Zheng C. Prognostic impact of plasma ORM2 levels in patients with stage II colorectal cancer. *Ann Clin Lab Sci* [Internet]. 2014 [cited 2019 Feb 9];44:388–93. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25361921>
63. Zhang X, Xiao Z, Liu X, Du L, Wang L, Wang S, et al. The Potential Role of ORM2 in the Development of Colorectal Cancer. Lo AWI, editor. *PLoS One* [Internet]. Public Library of Science; 2012 [cited 2019 Feb 9];7:e31868. Available from: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0031868>
64. Dente L, Pizza MG, Metspalu A, Cortese R. Structure and expression of the genes coding for human alpha 1-acid glycoprotein. *EMBO J* [Internet]. 1987 [cited 2019 Feb 10];6:2289–96. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2822385>
65. Kjeldsen J, Lauritsen K, De Muckadell OB. Serum concentrations of orosomucoid: improved decision-making for tapering prednisolone therapy in patients with active

- inflammatory bowel disease? *Scand J Gastroenterol* [Internet]. 1997 [cited 2019 Feb 10];32:933–41. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9299674>
66. Cano-Rodriguez D, Campagnoli S, Grandi A, Parri M, Camilli E De, Song C, et al. TCTN2: a novel tumor marker with oncogenic properties. *Oncotarget* [Internet]. Impact Journals, LLC; 2017 [cited 2018 Dec 26];8:95256–69. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29221125>
67. Rohatgi R, Snell WJ. The ciliary membrane. *Curr Opin Cell Biol* [Internet]. NIH Public Access; 2010 [cited 2018 Dec 26];22:541–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20399632>
68. Garcia-Gonzalo FR, Corbit KC, Sirerol-Piquer MS, Ramaswami G, Otto EA, Noriega TR, et al. A transition zone complex regulates mammalian ciliogenesis and ciliary membrane composition. *Nat Genet* [Internet]. NIH Public Access; 2011 [cited 2018 Dec 26];43:776–84. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21725307>
69. Bienz M, Clevers H. Linking Colorectal Cancer to Wnt Signaling. *Cell* [Internet]. 2000 [cited 2018 Dec 26];103:311–20. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0092867400001227>
70. Bera TK, Saint Fleur A, Lee Y, Kydd A, Hahn Y, Popescu NC, et al. POTE paralogs are induced and differentially expressed in many cancers. *Cancer Res* [Internet]. American Association for Cancer Research; 2006 [cited 2018 Dec 27];66:52–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16397215>
71. Bastos-Amador P, Royo F, Gonzalez E, Conde-Vancells J, Palomo-Diez L, Borrás FE, et al. Proteomic analysis of microvesicles from plasma of healthy donors reveals high individual variability. *J Proteomics* [Internet]. Elsevier; 2012 [cited 2018 Dec 27];75:3574–84. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1874391912002059?via%3Dihub>
72. Liu XF, Bera TK, Liu LJ, Pastan I. A primate-specific POTE-actin fusion protein plays a role in apoptosis. *Apoptosis* [Internet]. 2009 [cited 2018 Dec 23];14:1237–44. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19669888>
73. Sanjurjo L, Amézaga N, Aran G, Naranjo-Gómez M, Arias L, Armengol C, et al. The human CD5L/AIM-CD36 axis: A novel autophagy inducer in macrophages that modulates inflammatory responses. *Autophagy* [Internet]. Taylor & Francis; 2015 [cited 2019 Jan 8];11:487–502. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25713983>
74. Sanjurjo L, Aran G, Roher N, Valledor AF, Sarrias M-R. AIM/CD5L: a key protein in the control of immune homeostasis and inflammatory disease. *J Leukoc Biol* [Internet]. John Wiley

& Sons, Ltd; 2015 [cited 2019 Jan 8];98:173–84. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1189/jlb.3RU0215-074R>

75. Aran G, Sanjurjo L, Bárcena C, Simon-Coma M, Téllez É, Vázquez-Vitali M, et al. CD5L is upregulated in hepatocellular carcinoma and promotes liver cancer cell proliferation and antiapoptotic responses by binding to HSPA5 (GRP78). *FASEB J*. 2018;32:3878–91.

76. Wang C, Yosef N, Gaublomme J, Wu C, Lee Y, Clish CB, et al. CD5L/AIM Regulates Lipid Biosynthesis and Restrains Th17 Cell Pathogenicity. *Cell* [Internet]. 2015 [cited 2019 Jan 8];163:1413–27. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0092867415014245>

77. Tosolini M, Kirilovsky A, Mlecnik B, Fredriksen T, Mauger S, Bindea G, et al. Clinical Impact of Different Classes of Infiltrating T Cytotoxic and Helper Cells (Th1, Th2, Treg, Th17) in Patients with Colorectal Cancer. *Cancer Res* [Internet]. 2011 [cited 2019 Jan 8];71:1263–71. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21303976>

5 CONCLUSÃO

A análise das alterações no perfil de expressão das proteínas plasmáticas de pacientes com adenocarcinoma colorretal esporádico revelou uma série de proteínas relacionadas tanto com a supressão, quanto à progressão tumoral e incluiu grande parte das proteínas clássicas do plasma. Em adição as proteínas previamente identificadas no plasma de pacientes com câncer colorretal como HB-B, C7, C9, HP, APO A1, LRG1, SERPINA 3, SERPIN A1, destacamos a identificação de TCTN-2, pela primeira vez no plasma desses pacientes. A anotação funcional exibiu uma assinatura imunológica bem enriquecida, com forte influência de componentes do complemento e de outras proteínas de fase aguda positiva. A expressão diferencial revelou fortes candidatos proteicos para composição de painéis no desenvolvimento de ensaios clínicos para o câncer colorretal. Portanto, torna-se necessário avaliar as implicações clínicas e biológicas dessa resposta sistêmica plasmática em pacientes com CRC. Além disso, é importante analisar essa resposta frente a expressão de outros marcadores já utilizados na clínica a fim de obter uma reação integrada à presença do tumor e prover melhorias nas estratégias diagnósticas, prognósticas e terapêuticas.

6 PERSPECTIVAS

A reprodutibilidade da expressão dessas proteínas será avaliada em um coorte transversal maior, utilizando outras plataformas proteômicas para composição de uma assinatura proteica, seguida de validação por técnicas de imunoensaio. Além disso, os efeitos clínicos serão analisados frente ao estadiamento tumoral e classificação molecular, ferramentas já utilizadas na prática clínica. Na sequência, será proposta uma análise independente do resultado histopatológico a fim de avaliar os efeitos sistêmicos de diferentes subtipos moleculares do câncer colorretal.

REFERÊNCIAS

- ABDEL-RAHMAN, W. M.; PELTOMÄKI, P. Lynch syndrome and related familial colorectal cancers. **Critical reviews in oncogenesis**, v. 14, n. 1, p. 1- 22; discussion 23-31, 2008.
- AEBERSOLD, R.; MANN, M. Mass spectrometry-based proteomics. **Nature**, v. 422, n. 6928, p. 198–207, 13 Mar. 2003a.
- ANDERSON, N. L. The clinical plasma proteome: a survey of clinical assays for proteins in plasma and serum. **Clinical chemistry**, v. 56, n. 2, p. 177–85, 1 Feb. 2010.
- ARAGHI, M. et al. Global trends in colorectal cancer mortality: projections to the year 2035. **International Journal of Cancer**, p. ijc.32055, 10 Dec. 2018.
- ARNOLD, M. et al. Global patterns and trends in colorectal cancer incidence and mortality. **Gut**, v. 66, n. 4, p. 683–691, Apr. 2017.
- BANTSCHEFF, M. et al. Quantitative mass spectrometry in proteomics: critical review update from 2007 to the present. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 404, n. 4, p. 939–965, 8 Sep. 2012.
- BARBOSA, E. B. et al. Proteômica: metodologias e aplicações no estudo de doenças humanas. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 58, n. 3, p. 366–375, May 2012.
- BEHRENS, J. et al. Functional interaction of β -catenin with the transcription factor LEF-1. **Nature**, v. 382, n. 6592, p. 638–642, 15 Aug. 1996.
- BEN-ZE'EV, A.; GEIGER, B. Differential molecular interactions of β -catenin and plakoglobin in adhesion, signaling and cancer. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 10, n. 5, p. 629–639, 1 Oct. 1998.
- BERGER, F. G.; BERGER, S. H. Cancer Biology & Therapy Thymidylate synthase as a chemotherapeutic drug target: Where are we after fifty years? **Cancer Biology & Therapy**, v. 5, p. 1238–1241, 2006.
- BHARDWAJ, M. et al. Blood-Based Protein Signatures for Early Detection of Colorectal Cancer: A Systematic Review. **Clinical and Translational Gastroenterology**, v. 8, n. 11, p. e128, 2017a.
- BIOMARKERS DEFINITIONS WORKING GROUP. Biomarkers and surrogate endpoints: Preferred definitions and conceptual framework. **Clinical Pharmacology & Therapeutics**, v. 69, n. 3, p. 89–95, Mar. 2001.
- BIRD, A. P. CpG-rich islands and the function of DNA methylation. **Nature Review**, v. 321, n. 15, p. 209–213, 1986.
- BLANCO, A. et al. Proteins. In: **Medical Biochemistry**. [s.l.] Academic Press, 2017. p. 21–71.
- BRAY, F. et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and

mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 68, n. 6, p. 394–424, 1 Nov. 2018.

BUSZCZAK, M.; SIGNER, R. A. J.; MORRISON, S. J. Cellular differences in protein synthesis regulate tissue homeostasis. **Cell**, v. 159, n. 2, p. 242–51, 9 Oct. 2014.

CAMERINI, S.; MAURI, P. The role of protein and peptide separation before mass spectrometry analysis in clinical proteomics. **Journal of Chromatography A**, v. 1381, p. 1–12, 13 Feb. 2015.

CASANOVAS, A. et al. TCellXTalk facilitates the detection of co-modified peptides for the study of protein post-translational modification cross-talk in T cells. **Bioinformatics**, 13 Sep. 2018.

CASTAGNINO, J. M. Biomarcadores en proteómica clínica. v. 45, n. 2, p. 253–255, 2011.

CHAMBERY, A. et al. Qualitative and Quantitative Proteomic Profiling of Cripto^{-/-} Embryonic Stem Cells by Means of Accurate Mass LC–MS Analysis. **Journal of Proteome Research**, v. 8, n. 2, p. 1047–1058, 6 Feb. 2009.

CHEN, G. The Role of the Gut Microbiome in Colorectal Cancer. **Clinics in Colon and Rectal Surgery**, v. 31, n. 03, p. 192–198, 1 May 2018.

CHUNG, L. et al. Novel serum protein biomarker panel revealed by mass spectrometry and its prognostic value in breast cancer. **Breast Cancer Research**, v. 16, n. 3, p. R63, 16 Jun. 2014.

CHURCH, T. R. et al. Prospective evaluation of methylated SEPT9 in plasma for detection of asymptomatic colorectal cancer. **Gut**, v. 63, n. 2, p. 317–25, 1 Feb. 2014.

COLUSSI, D. et al. Molecular pathways involved in colorectal cancer: implications for disease behavior and prevention. **International journal of molecular sciences**, v. 14, n. 8, p. 16365–85, 7 Jan. 2013.

COMPTON, C. C. Colorectal Carcinoma: Diagnostic, Prognostic, and Molecular Features. **Modern Pathology**, v. 16, n. 4, p. 376–388, Apr. 2003.

COX, J.; MANN, M. Quantitative, High-Resolution Proteomics for Data-Driven Systems Biology. **Annual Review of Biochemistry**, v. 80, n. 1, p. 273–299, 7 Jul. 2011.

CRAMER, R. MALDI MS. In: **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**. [s.l.: s.n.]. v. 564p. 85–103.

CSAKO, G. Immunofixation Electrophoresis for Identification of Proteins and Specific Antibodies. In: **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**. [s.l.: s.n.]. v. 869p. 147–171.

DELIUS, J. et al. Label-free quantitative proteome analysis of the surface-bound salivary pellicle. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 152, p. 68–76, 1 Apr. 2017.

DEUTSCH, E. W. et al. Human Plasma PeptideAtlas. **PROTEOMICS**, v. 5, n. 13, p. 3497–3500, Aug. 2005.

DHALIWAL, A. et al. Fecal DNA testing for colorectal cancer screening: Molecular targets and perspectives. **World Journal of Gastrointestinal Oncology**, v. 7, n. 10, p. 178, 15 Oct. 2015.

DIENSTMANN, R. et al. Consensus molecular subtypes and the evolution of precision medicine in colorectal cancer. **Nature Reviews Cancer**, v. 17, n. 2, p. 79–92, 4 Feb. 2017.

DUAN, G.; WALTHER, D. The roles of post-translational modifications in the context of protein interaction networks. **PLoS computational biology**, v. 11, n. 2, p. e1004049, Feb. 2015.

ELLIS, L. M. et al. Vascular endothelial growth factor in human colon cancer: biology and therapeutic implications. **The oncologist**, v. 5 Suppl 1, p. 11–5, 2000.

FABREGAT, A. et al. The Reactome Pathway Knowledgebase. **Nucleic Acids Research**, v. 46, n. D1, p. D649–D655, 4 Jan. 2018.

FENN, J. et al. Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. **Science**, v. 246, n. 4926, p. 64–71, 6 Oct. 1989.

FERLAY, J. et al. Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. **International Journal of Cancer**, v. 136, n. 5, p. E359–E386, 2015.

FERTE, C.; ANDRE, F.; SORIA, J.-C. Molecular circuits of solid tumors: prognostic and predictive tools for bedside use. **Nat Rev Clin Oncol**, v. 7, n. 7, p. 367–380, Jul. 2010.

FIRMINO, M. et al. Label-free quantitative proteomics of rat hypothalamus under fever induced by LPS and PGE2. **Journal of Proteomics**, v. 187, p. 182–199, Sep. 2018.

FITZGERALD, R. L.; HEROLD, D. A. Serum total testosterone: immunoassay compared with negative chemical ionization gas chromatography-mass spectrometry. **Clinical Chemistry**, v. 42, n. 5, 1996.

FLEISHER, A. S. et al. Microsatellite instability in inflammatory bowel disease-associated neoplastic lesions is associated with hypermethylation and diminished expression of the DNA mismatch repair gene, hMLH1. **Cancer research**, v. 60, n. 17, p. 4864–8, 1 Sep. 2000.

FOUAD, Y. A.; AANEI, C. Revisiting the hallmarks of cancer. **American journal of cancer research**, v. 7, n. 5, p. 1016–1036, 2017.

FRANCIS, N. et al. Metilação de DNA e Câncer. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 56, n. 4, p. 493–499, 2010.

FUNG, K. Y. C. et al. Blood-Based Protein Biomarker Panel for the Detection of Colorectal Cancer. **PLOS ONE**, v. 10, n. 3, p. e0120425, 20 Mar. 2015.

GAGNIÈRE, J. et al. Gut microbiota imbalance and colorectal cancer. **World journal of gastroenterology**, v. 22, n. 2, p. 501–18, 14 Jan. 2016.

GAJJAR, K. K. et al. Deciphering the potential value of 5-fluorouracil metabolic enzymes in predicting prognosis and treatment response of colorectal cancer patients. **The International**

Journal of Biological Markers, v. 33, n. 2, p. 180–188, 25 May 2018.

GARRAWAY, L. A.; LANDER, E. S. Lessons from the Cancer Genome. **Cell**, v. 153, n. 1, p. 17–37, 28 Mar. 2013.

GARRELS, J. I. Proteome. **Encyclopedia of Genetics**, p. 1575–1578, 1 Jan. 2001.

GE HEALTHCARE. **2-D Electrophoresis: Principles and Methods** Uppsala GE Healthcare Bio-Sciences AB, , 2010. Disponível em:
<<https://cdn.gelifesciences.com/dmm3bwsv3/AssetStream.aspx?mediaformatid=10061&destinationid=10016&assetid=13891>>

GEROMANOS, S. J. et al. The detection, correlation, and comparison of peptide precursor and product ions from data independent LC-MS with data dependant LC-MS/MS. **PROTEOMICS**, v. 9, n. 6, p. 1683–1695, Mar. 2009.

GEYER, H.; GEYER, R.; PINGOUD, V. A novel strategy for the identification of protein-DNA contacts by photocrosslinking and mass spectrometry. **Nucleic acids research**, v. 32, n. 16, p. e132, 21 Sep. 2004.

GEYER, P. E. et al. Revisiting biomarker discovery by plasma proteomics. **Molecular systems biology**, v. 13, n. 9, p. 942, 2017.

GIBBS, R. A. et al. A global reference for human genetic variation. **Nature**, v. 526, n. 7571, p. 68–74, 1 Oct. 2015.

GOLD, P.; FREEDMAN, S. O. Demonstration of Tumor-Specific Antigens in Human Colonic Carcinomata By Immunological Tolerance and Absorption Techniques. **The Journal of experimental medicine**, v. 121, p. 439–62, 1965.

GONZALEZ-PONS, M.; CRUZ-CORREA, M. Colorectal Cancer Biomarkers : Where Are We Now ? **BioMed Research International**, v. 2015, n. Article ID 149014, p. 1–14, 2015.

GORG, A. 2-D Electrophoresis. Principles and Methods. **Handbook**, p. 163, 2004.

GRADY, W. M.; PRITCHARD, C. C. Molecular alterations and biomarkers in colorectal cancer. **Toxicologic pathology**, v. 42, n. 1, p. 124–39, 2014.

GUINNEY, J. et al. The consensus molecular subtypes of colorectal cancer. **Nature medicine**, v. 21, n. 11, p. 1350–6, Nov. 2015.

GYGI, S. P. et al. Quantitative analysis of complex protein mixtures using isotope-coded affinity tags. **Nature Biotechnology**, v. 17, n. 10, p. 994–999, 1 Oct. 1999.

HADJIPETROU, A. et al. Colorectal cancer, screening and primary care: A mini literature review. **World Journal of Gastroenterology**, v. 23, n. 33, p. 6049–6058, 7 Sep. 2017.

HAHN, W. C.; WEINBERG, R. A. Rules for Making Human Tumor Cells. **New England Journal of Medicine**, v. 347, n. 20, p. 1593–1603, 14 Nov. 2002.

HANAHAHAN, D.; WEINBERG, R. A. **Hallmarks of cancer: The next generation** Cell, 2011.

HANDLEY, S. A.; DEVKOTA, S. Going Viral: a Novel Role for Bacteriophage in Colorectal Cancer. **mBio**, v. 10, n. 1, 22 Jan. 2019.

HANNIGAN, G. D. et al. Diagnostic Potential and Interactive Dynamics of the Colorectal Cancer Virome. **mBio**, v. 9, n. 6, p. e02248-18, 21 Dec. 2018.

HARPER, J. W.; BENNETT, E. J. Proteome complexity and the forces that drive proteome imbalance. **Nature**, v. 537, n. 7620, p. 328–338, 15 Sep. 2016.

HAUPTMAN, N.; GLAVAČ, D. Colorectal Cancer Blood-Based Biomarkers. **Gastroenterology Research and Practice**, v. 2017, p. 1–11, 25 Sep. 2017.

HOLLAND, R. D. et al. Rapid identification of intact whole bacteria based on spectral patterns using matrix-assisted laser desorption/ionization with time-of-flight mass spectrometry. **Rapid communications in mass spectrometry : RCM**, v. 10, n. 10, p. 1227–32, 31 Jul. 1996.

HOPIRTEAN, C.; NAGY, V. Optimizing the use of anti VEGF targeted therapies in patients with metastatic colorectal cancer: review of literature. **Clujul medical (1957)**, v. 91, n. 1, p. 12–17, 2018.

HORNBECK, P. V et al. 5 years of PhosphoSitePlus ® : integrating post-translationally modified sites, disease variants and isoforms. **Nucleic Acids Research**, v. 47, p. 433–441, 2018.

HORTIN, G. L.; CARR, S. A.; ANDERSON, N. L. Introduction: Advances in protein analysis for the clinical laboratory. **Clinical chemistry**, v. 56, n. 2, p. 149–51, Feb. 2010.

HUANG, D. W.; SHERMAN, B. T.; LEMPICKI, R. A. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. **Nature Protocols**, v. 4, n. 1, p. 44–57, 1 Jan. 2009.

HUGHES, L. A. E. et al. The CpG island methylator phenotype in colorectal cancer: Progress and problems. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer**, v. 1825, n. 1, p. 77–85, Jan. 2012.

IMPERIALE, T. F. et al. Multitarget Stool DNA Testing for Colorectal-Cancer Screening. **New England Journal of Medicine**, v. 370, n. 14, p. 1287–1297, 3 Apr. 2014.

INCA. **ABC do Câncer: Abordagens Básicas para o Controle do Câncer**. Rio de Janeiro: [s.n.].

INCA. **INCA - Instituto Nacional de Câncer - Estimativa 2016**. [s.l: s.n.].

INCA. **Estimativa 2018. Incidência de câncer no Brasil**. [s.l: s.n.].

IRVING, J. Drug testing in the military--technical and legal problems. **Clinical Chemistry**, v. 34, n. 3, 1988.

JANNETTO, P. J.; FITZGERALD, R. L. Effective Use of Mass Spectrometry in the Clinical Laboratory. **Clinical Chemistry**, v. 62, n. 1, p. 92–98, 1 Jan. 2016.

JASPERSON, K. W. et al. Hereditary and familial colon cancer. **Gastroenterology**, v. 138, n. 6, p. 2044–58, Jun. 2010.

JASS, J. R. Classification of colorectal cancer based on correlation of clinical, morphological and molecular features. **Histopathology**, v. 50, n. 1, p. 113–130, Jan. 2007.

JOHNSON, C. M. et al. Meta-analyses of colorectal cancer risk factors. **Cancer causes & control : CCC**, v. 24, n. 6, p. 1207–22, Jun. 2013.

KAWAKAMI, H.; ZAANAN, A.; SINICROPE, F. A. Microsatellite instability testing and its role in the management of colorectal cancer. **Current treatment options in oncology**, v. 16, n. 7, p. 30, Jul. 2015.

KEBARLE, P. A brief overview of the present status of the mechanisms involved in electrospray mass spectrometry. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 35, n. 7, p. 804–817, Jul. 2000.

KEHLET, S. N. et al. Excessive collagen turnover products are released during colorectal cancer progression and elevated in serum from metastatic colorectal cancer patients. **Scientific reports**, v. 6, p. 30599, 2016.

KESHISHIAN, H. et al. Multiplexed, Quantitative Workflow for Sensitive Biomarker Discovery in Plasma Yields Novel Candidates for Early Myocardial Injury. **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 14, n. 9, p. 2375–2393, Sep. 2015.

KHEIRELSEID, E. A H.; MILLER, N.; KERIN, M. J. Molecular biology of colorectal cancer : Review of the literature. v. 2013, n. April, p. 72–80, 2013.

KIM, K. et al. Differences Regarding the Molecular Features and Gut Microbiota Between Right and Left Colon Cancer. **Annals of Coloproctology**, v. 34, n. 6, p. 280–285, 31 Dec. 2018.

KIM, N. H. et al. Serum CEA and CA 19-9 Levels are Associated with the Presence and Severity of Colorectal Neoplasia. **Yonsei Medical Journal**, v. 58, n. 5, p. 918, Sep. 2017.

KRUSEMARK, C. J. et al. Modifying the charge state distribution of proteins in electrospray ionization mass spectrometry by chemical derivatization. **Journal of the American Society for Mass Spectrometry**, v. 20, n. 9, p. 1617–25, Sep. 2009.

KULASINGAM, V.; DIAMANDIS, E. P. Strategies for discovering novel cancer biomarkers through utilization of emerging technologies. **Nature clinical practice. Oncology**, v. 5, n. 10, p. 588–99, 2008.

LAPLANTE, M.; SABATINI, D. M. mTOR signaling in growth control and disease. **Cell**, v. 149, n. 2, p. 274–93, 13 Apr. 2012.

LI, D.; CHAN, D. W. Proteomic cancer biomarkers from discovery to approval: it's worth the effort. **Expert review of proteomics**, v. 11, n. 2, p. 135–6, Apr. 2014.

LI, G.-M. Mechanisms and functions of DNA mismatch repair. **Cell Res**, v. 18, n. 1, p. 85–98, Jan. 2008.

LI, G.-Z. et al. Database searching and accounting of multiplexed precursor and product ion spectra from the data independent analysis of simple and complex peptide mixtures. **PROTEOMICS**, v. 9, n. 6, p. 1696–1719, Mar. 2009.

LI, Y. et al. MYC through miR-17-92 Suppresses Specific Target Genes to Maintain Survival, Autonomous Proliferation, and a Neoplastic State. **Cancer Cell**, v. 26, n. 2, p. 262–272, 11 Aug. 2014.

LINDOR, N. M. et al. Immunohistochemistry Versus Microsatellite Instability Testing in Phenotyping Colorectal Tumors. **Journal of Clinical Oncology**, v. 20, n. 4, p. 1043–1048, 15 Feb. 2002.

LLOSA, N. J. et al. The vigorous immune microenvironment of microsatellite instable colon cancer is balanced by multiple counter-inhibitory checkpoints. **Cancer discovery**, v. 5, n. 1, p. 43–51, Jan. 2015.

LOBO, M. D. P. et al. Label-Free Proteome Analysis of Plasma from Patients with Breast Cancer: Stage-Specific Protein Expression. **Frontiers in oncology**, v. 7, p. 14, 2017.

LOCKER, G. Y. et al. ASCO 2006 Update of Recommendations for the Use of Tumor Markers in Gastrointestinal Cancer. **Journal of Clinical Oncology**, v. 24, n. 33, p. 5313–5327, 20 Nov. 2006.

LODISH, H. et al. The Molecules of Life. In: **Molecular Cell Biology**. 4th. ed. New York: W. H. Freeman, 2000.

MADDA, R.; LIN, S.; SUN, W. Plasma proteomic analysis of systemic lupus erythematosus patients using liquid chromatography / tandem mass spectrometry with label-free quantification. **PeerJ**, v. 6, n. 4730, p. 22, 2018.

MAIDA, M. et al. Screening of colorectal cancer: present and future. **Expert Review of Anticancer Therapy**, v. 17, n. 12, p. 1131–1146, 2 Dec. 2017.

MARKOWITZ, S. D.; BERTAGNOLLI, M. M. Molecular Basis of Colorectal Cancer. **New England Journal of Medicine**, v. 361, n. 25, p. 2449–2460, 17 Dec. 2009.

MCFEDRIES, A.; SCHWAID, A.; SAGHATELIAN, A. Methods for the Elucidation of Protein-Small Molecule Interactions. **Chemistry & Biology**, v. 20, n. 5, p. 667–673, 23 May 2013.

MEGGER, D. A. et al. Proteomic Differences Between Hepatocellular Carcinoma and Nontumorous Liver Tissue Investigated by a Combined Gel-based and Label-free Quantitative Proteomics Study. **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 12, n. 7, p. 2006–2020, Jul. 2013.

MILLINGTON, D. S. et al. Tandem mass spectrometry: a new method for acylcarnitine profiling with potential for neonatal screening for inborn errors of metabolism. **Journal of inherited metabolic disease**, v. 13, n. 3, p. 321–4, 1990.

MILLIONI, R. et al. High abundance proteins depletion vs low abundance proteins enrichment: comparison of methods to reduce the plasma proteome complexity. **PloS one**, v. 6, n. 5, p. e19603, 4 May 2011.

MOJARAD, E. N. et al. The CpG island methylator phenotype (CIMP) in colorectal cancer. **Gastroenterology and Hepatology from Bed to Bench**, v. 6, n. 3, p. 120–128, 2013.

MORENO, C. C. et al. Colorectal Cancer Initial Diagnosis: Screening Colonoscopy, Diagnostic Colonoscopy, or Emergent Surgery, and Tumor Stage and Size at Initial Presentation. **Clinical Colorectal Cancer**, v. 15, n. 1, p. 67–73, 2016.

MORRIS, D. R.; GEBALLE, A. P. Upstream open reading frames as regulators of mRNA translation. **Molecular and cellular biology**, v. 20, n. 23, p. 8635–42, 1 Dec. 2000.

NAGPAL, M. et al. Tumor markers: A diagnostic tool. **National journal of maxillofacial surgery**, v. 7, n. 1, p. 17–20, 2016.

O'FARRELL, P. H. High resolution two dimensional electrophoresis of proteins. **Journal of Biological Chemistry**, v. 250, n. 10, p. 4007–4021, 1975.

ONG, S.-E. et al. Stable isotope labeling by amino acids in cell culture, SILAC, as a simple and accurate approach to expression proteomics. **Molecular & cellular proteomics : MCP**, v. 1, n. 5, p. 376–86, 1 May 2002.

ONILE, O. S. et al. Quantitative label-free proteomic analysis of human urine to identify novel candidate protein biomarkers for schistosomiasis. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 11, p. e0006045, 8 Nov. 2017.

PAPAMICHAEL, D. The use of thymidylate synthase inhibitors in the treatment of advanced colorectal cancer: current status. **The oncologist**, v. 4, n. 6, p. 478–87, 1 Dec. 1999.

PARK, S.-M. et al. The miR-200 family determines the epithelial phenotype of cancer cells by targeting the E-cadherin repressors ZEB1 and ZEB2. **Genes & development**, v. 22, n. 7, p. 894–907, 1 Apr. 2008.

PEDERSEN, S. K. et al. A Two-Gene Blood Test for Methylated DNA Sensitive for Colorectal Cancer. **PLOS ONE**, v. 10, n. 4, p. e0125041, 30 Apr. 2015.

PERTEA, M. et al. Thousands of large-scale RNA sequencing experiments yield a comprehensive new human gene list and reveal extensive transcriptional noise. **bioRxiv**, p. 332825, 29 May 2018.

PINO, M. S.; CHUNG, D. C. The Chromosomal Instability Pathway in Colon Cancer. **Gastroenterology**, v. 138, n. 6, p. 2059–2072, 2010.

PLANCK, M. **Where is science going?** First Edition ed. New York: W. W. NORTON & COMPANY, INC, 1932.

QIAN, W.-J. et al. Enhanced Detection of Low Abundance Human Plasma Proteins Using a Tandem IgY12-SuperMix Immunoaffinity Separation Strategy. **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 7, n. 10, p. 1963–1973, Oct. 2008.

RABILLOUD, T. Two-dimensional gel electrophoresis in proteomics: Old, old fashioned, but it still climbs up the mountains. **PROTEOMICS**, v. 2, n. 1, p. 3–10, 10 Jan. 2002.

RABILLOUD, T.; LELONG, C. Two-dimensional gel electrophoresis in proteomics: A

tutorial. **Journal of Proteomics**, v. 74, n. 10, p. 1829–1841, 6 Sep. 2011.

RAVIPATY, S. et al. Clinical Validation of a Serum Protein Panel (FLNA, FLNB and KRT19) for Diagnosis of Prostate Cancer. **Journal of Molecular Biomarkers & Diagnosis**, v. 08, n. 02, p. 1–8, 8 Feb. 2017.

RESING, K. A.; AHN, N. G. Proteomics strategies for protein identification. **FEBS Letters**, v. 579, n. 4, p. 885–889, 7 Feb. 2005.

REX, D. K. et al. Colorectal Cancer Screening: Recommendations for Physicians and Patients From the U.S. Multi-Society Task Force on Colorectal Cancer. **Gastroenterology**, v. 153, n. 1, p. 307–323, 1 Jul. 2017.

RIFAI, N.; GILLETTE, M. A.; CARR, S. A. Protein biomarker discovery and validation: the long and uncertain path to clinical utility. **Nature Biotechnology**, v. 24, n. 8, p. 971–983, 1 Aug. 2006.

ROSS, P. L. et al. Multiplexed protein quantitation in *Saccharomyces cerevisiae* using amine-reactive isobaric tagging reagents. **Molecular & cellular proteomics : MCP**, v. 3, n. 12, p. 1154–69, 1 Dec. 2004.

RUBIN, H.; FARBER, E. Cellular Adaptation in the Origin and Development of Cancer. **Cancer Research**, v. 51, p. 2751–2761, 1991.

SAGAERT, X.; VANSTAPEL, A.; VERBEEK, S. Tumor Heterogeneity in Colorectal Cancer: What Do We Know So Far? **Pathobiology**, v. 85, n. 1–2, p. 72–84, 2018.

SCHIRRIPA, M.; LENZ, H.-J. Biomarker in Colorectal Cancer. **Cancer journal (Sudbury, Mass.)**, v. 22, n. 3, p. 156–64, 2016.

SCHWENK, J. M. et al. The Human Plasma Proteome Draft of 2017: Building on the Human Plasma PeptideAtlas from Mass Spectrometry and Complementary Assays. **Journal of Proteome Research**, v. 16, n. 12, p. 4299–4310, 10 Dec. 2017.

SEPULVEDA, A. R. et al. Molecular Biomarkers for the Evaluation of Colorectal Cancer: Guideline From the American Society for Clinical Pathology, College of American Pathologists, Association for Molecular Pathology, and the American Society of Clinical Oncology. **Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology**, v. 35, n. 13, p. 1453–1486, 1 May 2017.

SHARMA, S. Tumor markers in clinical practice: General principles and guidelines. **Indian journal of medical and paediatric oncology : official journal of Indian Society of Medical & Paediatric Oncology**, v. 30, n. 1, p. 1–8, 2009.

SHEVCHENKO, A. et al. Rapid ‘de novo’ peptide sequencing by a combination of nanoelectrospray, isotopic labeling and a quadrupole/time-of-flight mass spectrometer. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 11, n. 9, p. 1015–1024, 15 Jun. 1997.

SIEGEL, R. L. et al. Colorectal cancer statistics, 2017. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 67, n. 3, p. 177–193, 6 May 2017.

SILVA, J. C. et al. Absolute quantification of proteins by LCMSE: a virtue of parallel MS

acquisition. **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 5, n. 1, p. 144–156, Jan. 2006a.

SILVA, J. C. et al. Absolute quantification of proteins by LCMSE: a virtue of parallel MS acquisition. **Molecular & cellular proteomics : MCP**, v. 5, n. 1, p. 144–56, 1 Jan. 2006b.

SISIK, A. et al. CEA and CA 19-9 are still valuable markers for the prognosis of colorectal and gastric cancer patients. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 14, n. 7, p. 4289–4294, 2013.

SOUZA, D. L. B. et al. Colorectal Cancer Mortality in Brazil. **Diseases of the Colon & Rectum**, v. 57, n. 9, p. 1082–1089, Sep. 2014.

STAIB, L.; LINK, H. K.; BEGER, G. H. Follow-up in colorectal cancer: cost-effectiveness analysis of established and novel concepts. **Langenbeck's Archives of Surgery**, v. 385, n. 6, p. 412–420, 2000.

STATES, D. J. et al. Challenges in deriving high-confidence protein identifications from data gathered by a HUPO plasma proteome collaborative study. **Nature Biotechnology**, v. 24, n. 3, p. 333–338, 1 Mar. 2006.

STIKSMA, J.; GROOTENDORST, D. C.; VAN DER LINDEN, P. W. G. CA 19-9 As a Marker in Addition to CEA to Monitor Colorectal Cancer. **Clinical Colorectal Cancer**, v. 13, n. 4, p. 239–244, Dec. 2014.

SUN, H. et al. Label-Free Quantitative Proteomics Identifies Novel Plasma Biomarkers for Distinguishing Pulmonary Tuberculosis and Latent Infection. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, p. 1267, 13 Jun. 2018.

SWANTON, C. Intratumor heterogeneity: evolution through space and time. **Cancer research**, v. 72, n. 19, p. 4875–82, 1 Oct. 2012.

SZULMAN, A. E. Chemistry, distribution, and function of blood group substances. **Annual review of medicine**, v. 17, p. 307–322, 1966.

TAYLOR, J. M. G.; ANKERST, D. P.; ANDRIDGE, R. R. Validation of biomarker-based risk prediction models. **Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research**, v. 14, n. 19, p. 5977–83, 1 Oct. 2008.

THULASIRAMAN, V. et al. Reduction of the concentration difference of proteins in biological liquids using a library of combinatorial ligands. **ELECTROPHORESIS**, v. 26, n. 18, p. 3561–3571, Sep. 2005.

TOIYAMA, Y.; OKUGAWA, Y.; GOEL, A. DNA methylation and miRNA biomarkers for noninvasive detection of gastric and colorectal cancer. **Biochem Biophys Res Commun**, n. 455, p. 43–57, 2015.

TRIANTAFILLIDIS, J. K.; NASIOULAS, G.; KOSMIDIS, P. A. Colorectal cancer and inflammatory bowel disease: epidemiology, risk factors, mechanisms of carcinogenesis and prevention strategies. **Anticancer research**, v. 29, n. 7, p. 2727–37, 1 Jul. 2009.

VACANTE, M. et al. Biomarkers in colorectal cancer: Current clinical utility and future perspectives. **World journal of clinical cases**, v. 6, n. 15, p. 869–881, 6 Dec. 2018.

VAN ROSSUM, L. G. et al. Random Comparison of Guaiac and Immunochemical Fecal Occult Blood Tests for Colorectal Cancer in a Screening Population. **Gastroenterology**, v. 135, n. 1, p. 82–90, Jul. 2008.

VILAR, E.; TABERNERO, J. Molecular Dissection of Microsatellite Instable Colorectal Cancer. **Cancer Discovery**, v. 3, n. 5, p. 502–511, May 2013.

W.W., P. et al. Can the acute-phase reactant proteins be used as cancer biomarkers? **International Journal of Biological Markers**, v. 25, n. 1, p. 1–11, 2010.

WEGDAM, W. et al. Label-Free LC-MSe in Tissue and Serum Reveals Protein Networks Underlying Differences between Benign and Malignant Serous Ovarian Tumors. **PLoS ONE**, v. 9, n. 9, p. e108046, 29 Sep. 2014a.

WEGDAM, W. et al. Label-Free LC-MSe in Tissue and Serum Reveals Protein Networks Underlying Differences between Benign and Malignant Serous Ovarian Tumors. **PLoS ONE**, v. 9, n. 9, p. e108046, 29 Sep. 2014b.

WEINBERG, B. A.; MARSHALL, J. L.; SALEM, M. E. The Growing Challenge of Young Adults With Colorectal Cancer. **Oncology (Williston Park, N.Y.)**, v. 31, n. 5, p. 381–9, 2017.

WIENER, M. C. et al. Differential Mass Spectrometry: A Label-Free LC–MS Method for Finding Significant Differences in Complex Peptide and Protein Mixtures. **Analytical Chemistry**, v. 76, n. 20, p. 6085–6096, 15 Oct. 2004.

WILLIAMS, K. R.; STONE, K. L. Enzymatic cleavage and HPLC peptide mapping of proteins. **Molecular Biotechnology**, v. 8, n. 2, p. 155–167, Oct. 1997.

WINAWER, S. J. et al. Prevention of Colorectal Cancer by Colonoscopic Polypectomy. **New England Journal of Medicine**, v. 329, n. 27, p. 1977–1981, 30 Dec. 1993.

WIŚNIEWSKI, J. R. et al. A “Proteomic Ruler” for Protein Copy Number and Concentration Estimation without Spike-in Standards. **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 13, n. 12, p. 3497–3506, Dec. 2014.

WOLF, A. M. D. et al. Colorectal cancer screening for average-risk adults: 2018 guideline update from the American Cancer Society. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 68, n. 4, p. 250–281, 1 Jul. 2018.

WU, C. C.; MACCOSS, M. J. Shotgun proteomics: tools for the analysis of complex biological systems. **Current opinion in molecular therapeutics**, v. 4, n. 3, p. 242–50, Jun. 2002.

YAMAGISHI, H. et al. Molecular pathogenesis of sporadic colorectal cancers. **Chinese Journal of Cancer**, v. 35, n. 1, p. 4, 2016.

YAN, W.; GUO, M. Epigenetics of colorectal cancer. In: **Cancer Epigenetics: Risk Assessment, Diagnosis, Treatment, and Prognosis**. [s.l.: s.n.].

YAO, X. et al. Proteolytic 18O labeling for comparative proteomics: model studies with two serotypes of adenovirus. **Analytical chemistry**, v. 73, n. 13, p. 2836–42, 1 Jul. 2001.

YING, H. et al. Oncogenic Kras maintains pancreatic tumors through regulation of anabolic glucose metabolism. **Cell**, v. 149, n. 3, p. 656–70, 27 Apr. 2012.

YÖRÜKER, E. E.; HOLDENRIEDER, S.; GEZER, U. Blood-based biomarkers for diagnosis, prognosis and treatment of colorectal cancer. **Clinica Chimica Acta**, 2016.

YU, L. C.-H. Microbiota dysbiosis and barrier dysfunction in inflammatory bowel disease and colorectal cancers: exploring a common ground hypothesis. **Journal of Biomedical Science**, v. 25, n. 1, p. 79, 9 Dec. 2018.

ZARKAVELIS, G. et al. Current and future biomarkers in colorectal cancer. **Annals of gastroenterology**, v. 30, n. 6, p. 613–621, 2017.

ZHANG, G. et al. Protein quantitation using mass spectrometry. **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**, v. 673, p. 211–22, 2010.

ZHANG, J. et al. Nondestructive tissue analysis for ex vivo and in vivo cancer diagnosis using a handheld mass spectrometry system. **Science translational medicine**, v. 9, n. 406, 6 Sep. 2017.

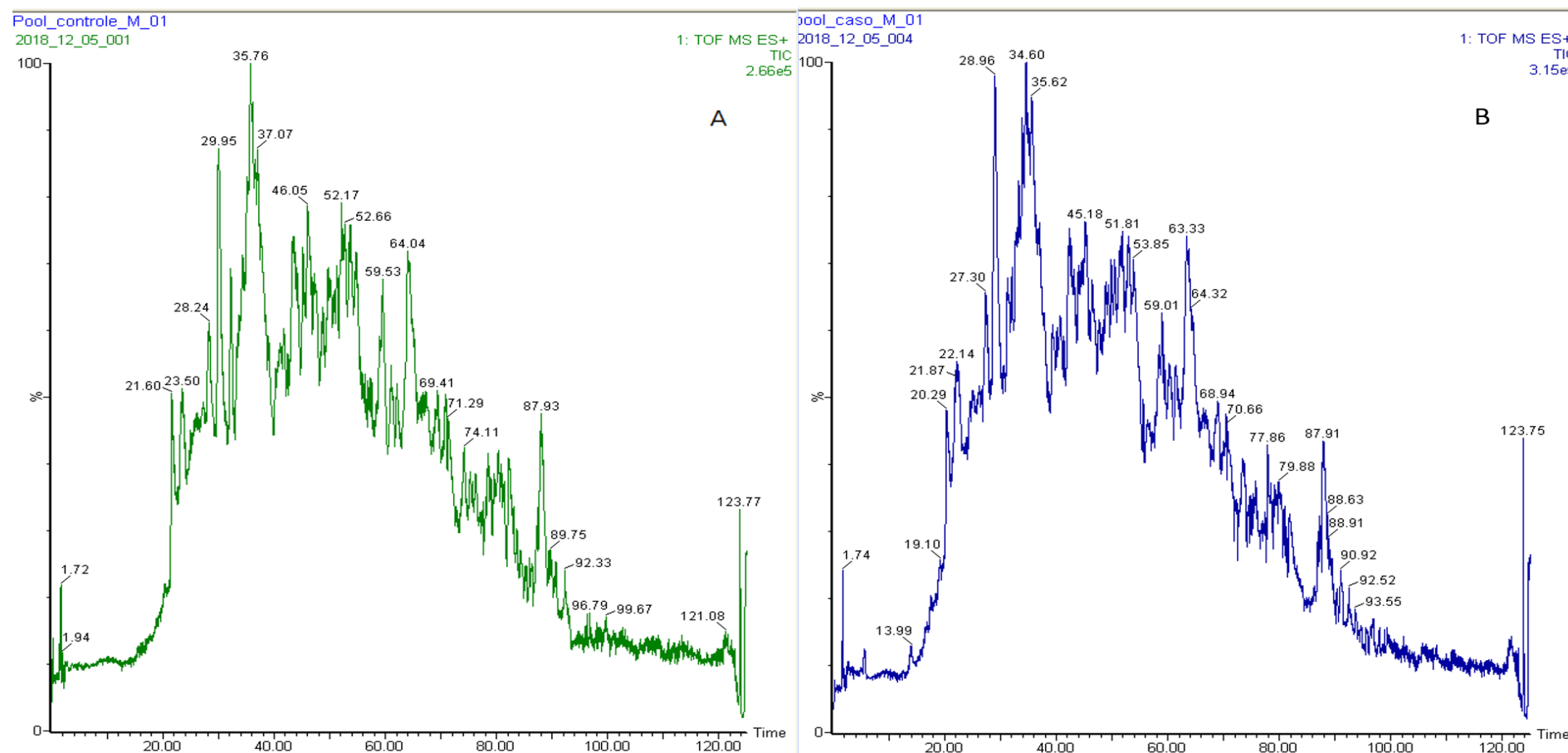
ZHANG, X. et al. CBD: a biomarker database for colorectal cancer. **Database**, v. 2018, 1 Jan. 2018.

ZHANG, Z. et al. Three Biomarkers Identified from Serum Proteomic Analysis for the Detection of Early Stage Ovarian Cancer. **Cancer Research**, v. 64, n. 16, p. 5882–5890, 15 Aug. 2004.

ZHANG, Z.; CHAN, D. W. The road from discovery to clinical diagnostics: lessons learned from the first FDA-cleared in vitro diagnostic multivariate index assay of proteomic biomarkers. **Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology**, v. 19, n. 12, p. 2995–9, Dec. 2010.

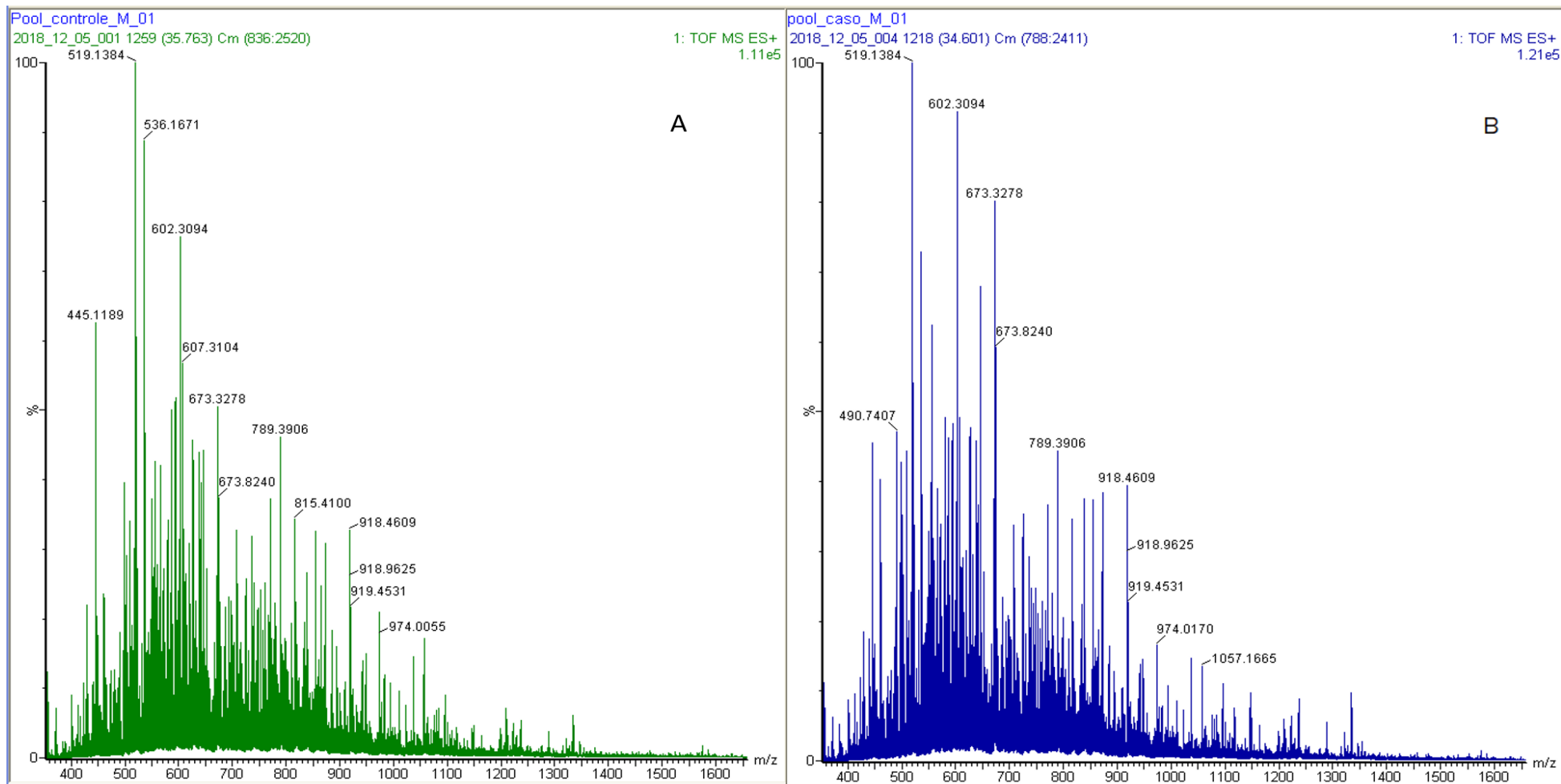
ANEXO A - CROMATOGRAMAS E ESPECTROS DE MASSAS

Cromatografia de fase reversa em sistema nanoAQUITY UPLC dos peptídeos trípticos do pool controle e pool CRC.



A: Cromatografia dos peptídeos trípticos do pool controle B: Cromatografia dos peptídeos trípticos do pool controle. B.

Espectro de Massas dos pools controles e dos pacientes com câncer colorretal obtidos através do nanoUPLC-MSE.



A: Espectro de massas do pool controle. B: Espectro de massas do pool de pacientes com câncer colorretal

ANEXO B - TERMO DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA

Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Serres Humanos		UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE / UFPE-	
--	---	---	---

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Utilização de ferramentas proteômicas para identificação de potenciais biomarcadores determinantes do risco familiar do câncer colorretal.

Pesquisador: KILMA COELHO PAZ

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 34744714.8.0000.5208

Instituição Proponente: LABORATÓRIO DE IMUNOPATOLOGIA KEISO ASAMI

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 853.913

Data da Relatoria: 08/11/2014

Apresentação do Projeto:

Indicado na relatoria inicial.

Objetivo da Pesquisa:

Indicado na relatoria inicial.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Indicado na relatoria inicial.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Indicado na relatoria inicial.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Indicado na relatoria inicial.

Recomendações:

s/recomendação;

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

aprovado.

Situação do Parecer:

Aprovado

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do CCS	
Bairro: Cidade Universitária	CEP: 50.740-600
UF: PE	Município: RECIFE
Telefone: (81)2126-8588	E-mail: cepccs@ufpe.br