



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA TERRA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**ANÁLISE PROTEÔMICA E EPIGENÉTICA DE
PACIENTES COM CÂNCER COLORRETAL DO ESTADO
DO AMAZONAS**

FABIANA GREYCE OLIVEIRA ALMEIDA

MANAUS

2017

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA TERRA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

FABIANA GREYCE OLIVEIRA ALMEIDA

**ANÁLISE PROTEÔMICA E EPIGENÉTICA DE
PACIENTES COM CÂNCER COLORRETAL DO ESTADO
DO AMAZONAS**

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Química do Instituto de Ciências Exatas da Universidade Federal do Amazonas, como requisito parcial para a obtenção do título de doutor em Ciências (Química), área de concentração Química Orgânica.

Orientador: Dr. Afonso Duarte Leão de Souza

Co-orientadora: Dra. Juliana de Saldanha da Gama Fischer

*Bolsista CNPQ

MANAUS

2017

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

A447a Almeida, Fabiana Greyce Oliveira
Análise proteômica e epigenética de pacientes com câncer colorretal do Estado do Amazonas / Fabiana Greyce Oliveira Almeida. 2017
150 f.: il. color; 31 cm.

Orientador: Afonso Duarte Leão de Souza
Coorientadora: Juliana de Saldanha da Gama Fischer
Tese (Química - Bacharelado) - Universidade Federal do Amazonas.

1. câncer colorretal. 2. epigenética. 3. proteômica . 4. Amazonas.
5. iTRAQ . I. Souza, Afonso Duarte Leão de II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

**“ANÁLISE PROTEÔMICA E EPIGENÉTICA DE
PACIENTES COM CÂNCER COLORRETAL DO ESTADO
DO AMAZONAS”**

Fabiana Greyce Oliveira Almeida

Tese de Doutorado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Química, do Instituto de Ciências Exatas da Universidade Federal do Amazonas como requisito parcial para a obtenção do Grau de Doutor em Química.

Aprovado, em 17 de fevereiro de 2017.

COMISSÃO EXAMINADORA



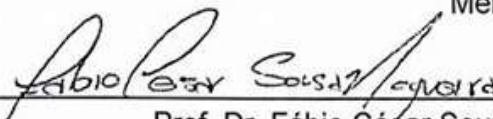
Prof. Dr. Afonso Duarte Leão de Souza
Universidade Federal do Amazonas
Orientador



Prof.ª Dr.ª Maria Lúcia Belém Pinheiro
Membro UFAM



Prof. Dr. Spartaco Astolfi Filho
Membro UFAM



Prof. Dr. Fábio César Souza Nogueira
Membro Externo



Prof.ª Dr.ª Kátia Luz Torres Silva
Membro Externo

Universidade Federal do Amazonas
Manaus, 17 de fevereiro de 2017.

“Dedico essa tese em especial à minha mãe, aos meus pais Milton e Filho, à Edinaide, uma amiga querida, à toda família Pinto de Oliveira e Michiles de Almeida e a todos os pacientes com câncer que foram uma grande motivação para mim”

AGRADECIMENTOS

Na minha opinião essa parte é a mais bela de todas, porque todo o êxito depende de um cenário de pessoas e situações. Por isso, minha gratidão primeiramente a **Deus**, por ter-me concedido muita sabedoria e por permitir que eu estudasse desde meu primeiro ano escolar em uma escola pública, concluir minha graduação, mestrado e doutorado em universidades federais.

Minha gratidão à minha maior incentivadora, grande educadora e patrocinadora, minha mãe **Cremilda**, que me ensinou a escrever meu nome e sempre me fez entender que a educação é a única forma de mudar de vida! Obrigada pelo amor, por compreender minhas escolhas, por sofrer e se alegrar comigo em cada minuto desse trajeto. Você foi excepcional, mãe!

Obrigada aos meus dois pais, **Milton e Filho**, pelo carinho, pela torcida pelo meu sucesso e por estarem sempre ao meu lado. Eu sou muito privilegiada em ter vocês na minha vida!

Às minhas irmãs **Tainá**, pela ajuda nas coletas das amostras, **Flávia**, **Joyce** e **Beatriz** por estarem sempre na torcida por mim, minhas futuras médicas!!

À toda minha família, minha falecida vó **Diquinha**, meus tios **Paulo**, **Laurino**, **Nilson**, **José Valder**, minhas tias **Waldira**, **Dinha**, **Cristina**, **Marcola**, **Gracinha**, **Dulce**, por acreditar no meu potencial e me incentivar sempre, em especial às minhas tias **Anete** e **Leila**, pela motivação, pelas instruções de vida quando cheguei para morar em Manaus e até hoje.

À **Herici**, por cuidar da minha mãe e da minha família enquanto estive longe.

Aos meus primos **Kalissa**, **Jores**, **Joyce**, **Andreza**, **Simoni**, **Wender**, **Weber**, **Wemerson**, **Werbet**, **Karem**, **Junior**, **Kayser**, que sempre foram como irmãos para mim.

Obrigada a esse homem simples e do interior que nem eu, meu orientador, prof. Dr. **Afonso Duarte**, por acreditar no meu sonho, abrir portas e criar pontes para que eu executasse meu projeto. Pelas parcerias de sucesso com os pesquisadores Dr. Paulo Carvalho, que contribuiu significativamente na

parte proteômica, Dra. **Glória Carvalho**, pelos ensinamentos de epigenética e à Dra. **Juliana Fisher**. Minha profunda gratidão por abraçarem nossas ideias e contribuírem de forma tão eficiente no desenvolvimento deste projeto.

À **Priscila Aquino**, por sua orientação nos experimentos de proteômica, por toda paciência em repassar seus conhecimentos e parceria de anos que perduram desde a graduação em química.

À professora **Antonia de Souza**, por sua ajuda na pesquisa e conhecimento transmitido ao longo da minha formação.

Ao **Gabriel**, pela ajuda nas corridas no espectrômetro de massas.

À **Thaís** por sua ajuda nas análises epigenéticas.

Ao Dr. **Sidney Chalub** pela colaboração com as amostras de câncer e orientação na escrita do projeto no Comitê Científico do FCECON.

À **Sonia**, por sua amizade e presteza em colaborar com o projeto nas difíceis coletas das amostras de câncer, onde passávamos mais de 6 horas esperando o cirurgião liberar as amostras do estudo.

Ao meu amigo e irmão do coração, **Márcio**, por ser ombro amigo nas horas certas e incertas e por me emprestar a sua família em Manaus.

Aos meus amigos do curso de química **Paulo Renan** (Paulinho “best”), **Mayane** (May), **Adriana** (Drica), **Aimee** (Mea), **Rita** (Ritinha), **Andrea** (Dederos), **Bruna Caroline** (Bruninha), **Orlando**, pela amizade desde o período da faculdade que se estendeu ao mestrado e doutorado. Valeu o incentivo moral!!

Aos meus amigos do tempo de escola de Maués, ao qual se perpetua até hoje uma grande amizade, **Monara**, **Ingride**, **Fabiana Afonso**, **Markley**, **Walax**, obrigada pela amizade e incentivo em todo o tempo.

Às amigas do mestrado, minhas mineiras queridas, **Fernanda**, **Graziele**, **Walessa**, **Karen**, **Daniela** e a paulista **Aline**, pelas conversas longas pelo telefone e trocas de conhecimento.

Aos amigos que fiz durante as disciplinas do doutorado, **Renan, Elzalina, Bruna Ribeiro, Richardson, Samirimi e Sidney**. Pelas gargalhadas e momentos de descontração durante os estudos de listas, provas e seminários. Vocês são demais!!! Nunca vou esquecer dos nossos amigos-ocultos, cantorias e risadas!!

Àqueles que chegaram por último, mas não menos importantes, meus amigos da Fucapi, **Eneida e Tito**, pela oportunidade dada e, em especial ao meu grupo de amigos, composto pela **Isabel** (Bebel), **Priscila Ribas** (Pri), **Edieliton** (Edi), **Sergio** (Serjão), **Felipe** (Felipinho), **Marcela** (a chefe), **Tatiane** (Taty), **Cibele** (Cib), pelos momentos de descontração e carinho. Vocês deixam a vida mais animada e feliz!

Ao **CNPQ** pela bolsa e taxa de bancada!

Enfim, a todos que foram pontes para que esse grande sonho fosse construído! Muito obrigada!

“Quisera eu poder desfrutar das maravilhas do mundo sem enfrentar desafios”
Fabiana Almeida

RESUMO

O câncer colorretal (CCR) é o terceiro tipo de câncer mais comum no mundo, com uma baixa taxa de sobrevivência e eficiência terapêutica. Um dos tratamentos é a retirada do tumor, que implica na remoção de um tecido aparentemente não tumoral ao redor do tumor (margem de ressecção). Nesse sentido, a margem de ressecção é uma região muito interessante para investigar as características moleculares do processo tumorigênico. Dessa forma, o objetivo desse trabalho foi realizar um estudo comparativo de amostras de tecidos tumorais e margem de ressecção através de análises epigenéticas e proteômicas de pacientes com câncer colorretal do estado do Amazonas (Brasil). Para o perfil epigenético, treze amostras, nas quais seis eram tumorais e sete eram margem de ressecção foram analisadas pela reação em cadeia de polimerase (PCR) específica para metilação (MSP). Na análise proteômica, quatro amostras de CCR e suas respectivas margens de ressecção foram digeridas com tripsina, marcadas com iTRAQ 8-plex e submetidas a cromatografia de troca catiônica forte. Cada fração foi analisada por cromatografia de fase reversa acoplada a um espectrômetro de massa Orbitrap Velos e, por fim, os dados foram analisados no programa *PatternLab for Proteomics*. A análise da metilação dos genes *CDH1*, *CDKN2A*, *DAPK* e *TIMP2* foi 30,8% (4/13), 30,8% (4/13), 84,6% (11/13) e 11/13 (84,6%), respectivamente. A análise proteômica identificou 1090 proteínas, das quais 56 foram apontadas como diferencialmente abundantes. Estas proteínas estão envolvidas principalmente no metabolismo energético (e.g. proteína S100A11 de ligação de cálcio), migração de células (e.g. transgelina), formação do citoesqueleto (e.g. profilina 1) e participam de importantes processos biológicos (e.g. anidrase carbônica 2). A análise de *Gene Ontology* feita para todas as proteínas identificadas revelou a relação dessas com processos de adesão, invasão, metástase e morte celular. Os resultados mostram padrões de metilação distintos para cada paciente que, por sua vez, podem contribuir no desenvolvimento de tratamentos individualizados e também proteínas diferencialmente abundantes relacionadas à tumorigênese, enfatizando a importância do estudo de painéis de marcadores para o CCR no contexto das diferentes populações.

Palavras-Chave: câncer colorretal, epigenética, proteômica, Amazonas, iTRAQ

ABSTRACT

Colorectal cancer (CRC) is the third most common cancer in the world, with a low survival rate and therapeutic efficacy. One of the treatments is tumor removal, which involves removal of apparently non-tumorous tissue around the tumor (resection margin). In this sense, the margin of resection is a very interesting region to investigate the molecular characteristics of the tumorigenic process. Thus, the objective of this study was to perform a comparative study of tumor tissue samples and margin of resection through epigenetic and proteomic analyzes of patients with colorectal cancer in the state of Amazonas (Brazil). For the epigenetic profile thirteen samples, in which six were tumoral and seven were resection margins were analyzed by polymerase chain reaction (PCR) specific for methylation (MSP). In the proteomic analysis, four CRC samples and their respective resection margins were digested with trypsin, labeled with iTRAQ 8-plex and subjected to strong cation exchange chromatography. Each fraction was analyzed by reverse phase chromatography coupled to an Orbitrap Velos mass spectrometer and, finally, the data were analyzed in the PatternLab for Proteomics program. Analysis of *CDH1*, *CDKN2A*, *DAPK* and *TIMP2* genes was 4/14 (30.8%), 5/14 (30.8%), 11/14 (84.6%) and 12/14 (84.6%), respectively. Proteomic analysis identified 1090 proteins, of which 56 were identified as differentially abundant. These proteins are mainly involved in energy metabolism (e.g., S100 calcium binding protein A11), cell migration (e.g. transgelin), cytoskeleton formation (e.g., profilin 1) and extracellular matrix degradation (e.g., carbonic anhydrase 2). Gene Ontology analysis revealed several proteins related to adhesion, invasion, metastasis and cell death. The results show distinct methylation patterns for each patient, which in turn may contribute to the development of individualized treatments and also differentially abundant proteins related to tumorigenesis, emphasizing the importance of the study of marker panels for CRC in the context of different Populations.

Key words: colorectal cancer, epigenetics, proteomics, Amazonas, iTRAQ

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1-** Visualização das diferentes partes do cólon e do reto. O cólon é dividido em cólon ascendente, transverso, descendente e sigmoide..... 23
- Figura 2-** Os dez tipos de câncer com maiores taxas de incidências (A) e mortalidade (B), em ambos os sexos, mundialmente em 2012..... 23
- Figura 3 -** Estimativa para os próximos 5 anos de casos de câncer no Brasil na população adulta (Total: 1.079.277)..... 24
- Figura 4 -** Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes no Brasil estimados para o biênio 2016-2017 por sexo, exceto pele não melanoma* 25
- Figura 5 -** Taxas brutas de incidência estimadas para o biênio 2016-2017 por sexo, segundo Estado e capital (Amazonas). 25
- Figura 6 -** Sequência adenoma-carcinoma. As primeiras etapas requerem mutações no gene adenomatous polyposis coli (APC). 29
- Figura 7-** Metilação da citosina. A adição de metila na posição 5' da citosina é catalisada pela enzima De novo Metiltransferase (DNMT), usando S-adenosilmetionina (SAM) como grupo doador. 31
- Figura 8 -** Diferentes estágios para o desenvolvimento do CCR. 35
- Figura 9 -** Ilustração do instrumento híbrido LTQ -Orbitrap Velos da Thermo Scientific, usado nas análises proteômicas dessa tese..... 37
- Figura 10 -** Estrutura química do iTRAQ(*isobaric tags for relative and absolute quantitation*)..... 39
- Figura 11 -** Exemplo da região de baixa massa de um espectro de MS2 obtido, enfatizando a presença dos íons marcadores característicos do iTRAQ-8 plex. FONTE: Retirado de <<http://sciex.com>> Acessado em 14.10.2016 40
- Figura 12 -** Esquema de um experimento utilizando amarração por iTRAQ (isobaric tag for relative and absolute quantitation).41
- Figura 13.** Fluxograma geral das análises realizadas nas amostras coletadas neste trabalho..... 44

Figura 14 - Segmento de reto sigmóide obtido a partir do ato cirúrgico. Nesta, o tecido foi dividido em tumor, margem proximal (2 cm) e margem distal (5 cm).	46
Figura 15 - Fluxograma das etapas empregadas para análise dos dados obtidos.....	59
Figura 16. Visualização do gel de agarose 1% de alguns DNA extraídos de tecidos colorretais..	65
Figura 17. Imagem representativa do gel de eletroforese para reação específica para metilação (MSP) dos genes <i>CDH1</i> , <i>DAPK</i> , <i>CDKN2A</i> , e <i>TIMP2</i> em algumas amostras estudadas.....	67
Figura 18. Cromatograma e espectro referente à fração de 250 mM.....	74
Figura 19 - Normalização realizada utilizando a marcação por isóbaros (iTRAQ) no módulo de quantificação do PatternLab Isobaric Analyzer.	75
Figura 20. Gráfico do tipo “Volcano” comparando os peptídeos (os pontos) identificadas para o tumor em relação à margem de ressecção a 5 cm. .	76
Figura 21 - Rede de interações das proteínas diferencialmente abundantes em tecido tumoral colorretal de acordo com os critérios utilizados no Isobaric Analyzer.	85
Figura 22 - Rede interatoma de proteínas abundantes nas amostras da margem de ressecção. CHGA significa cromogranina, VIM é vimentina, CLCA1 é acessório do canal de cloreto 1, CA2 é anidrase carbônica II, ALB é a albumina, ITLN1 é intelectina 1, SERPINA1 é alfa-1-antitripsina, SELENBP1 é proteína ligante a selenium 1, TF é serotransferrina.	86
Figura 23 - Análise de proteínas através do <i>Gene Ontology</i> nas amostras tumorais e a respectiva margem de ressecção 5 cm de acordo com: A) Componente Celular; B) Processos Biológicos; C) Função Molecular.....	88

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Definições dos estágios tumor-nódulo-metástase (TNM).	27
Tabela 2 - Iniciadores utilizados na reação em cadeia pela polimerase específica para metilação.....	51
Tabela 3 - Reagentes utilizados no gel de poliacrilamida 10%.....	52
Tabela 4 - Desenho experimental usado para marcação de cada amostra empregada nessa parte do estudo.....	55
Tabela 5 - Dados clínicos dos pacientes incluídos no estudo.....	64
Tabela 6 - Resultado da quantificação de DNA utilizando Nanodrop 2000. ...	66
Tabela 7 - Perfil de metilação dos genes <i>CDH1</i> , <i>CDKN2A</i> , <i>DAPK</i> e <i>TIMP2</i> nas amostras estudadas.	68
Tabela 8 - Quantificação das proteínas realizadas pelo método do Qubit® 2.0 Fluorometer.....	71
Tabela 9 - Quantificação dos peptídeos utilizando o método de Qubit® 2.0 Fluorometer.....	72
Tabela 10 - Lista de 56 proteínas diferencialmente abundantes quando comparados tumor versus margem de ressecção.....	77

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIações

14-3-3 ζ - 14-3-3 zeta/delta

AJCC - *American Joint Committee on Cancer*

APC - *Adenomatous polyposis coli*

ATP - Adenosina trifosfato

CA2- *Anidrase carbônica*

CALD1 - *Caldesmona*

CCR - Câncer colorretal

CDH1 – *Caderina-1*

CgA -Cromogranina A

DAPK - *Death-Associated Protein kinase*

DCC - *Deleted in Colon Cancer*

DDA - *Data dependent acquisition*

DNMNT- *De novo Metiltransferase*

ESI - *Electrospray ionization*

e.g. - por exemplo (do latim, *exempli gratia*)

FAP - *Familial adenomatous polyposis*

FCECON - Fundação Centro de Controle de Oncologia do Estado do Amazonas

FDR - *False discovery rate*

FLNA - Filamina A

GPI - *Glucose-6-phosphate isomerase*

HCD- *Higher-energy collisional dissociation*

HE - Hematoxilina-Miosina

HNPCC - *Hereditary nonpolyposis colorectal cancer*

HS- *washing solution*

HSP - *Heat shock protein (HSPs)*

iTRAQ - *Isobaric tags for relative and absolute quantitation*

i.e. - isto é

K-ras - *Kirsten-ras*

LDHA- *Lactate dehydrogenase A*

MAPK - *Mitogen Activated Protein Kinase*

MD – Margem distal

MDH2- *malate dehydrogenase 2*
MGMT - *O⁶-alkylguanine DNA alkyltransferase*
MLH1 - *MutL homóloga 1*
MP – Margem proximal
MS - *Mass Spectrometry*
WS – Solução de lavagem
MSP-PCR - *Methylation Specific Polymerase chain reaction*
MudPIT - *Multidimensional Protein Identification Technology*
MYH9- *Miosina-9*
NHS - *N-hidroxissuccinimida*
p16^{CDKN2A} - *Inibidor de cinase dependente de ciclina*
PFN1- *Profilina 1*
PL 4.0 - *Patternlab for Proteomics 4.0*
PSM - *Peptide Sequence Match*
RP - *Reverse Phase*
RPLP2 – *Proteína Ribossomal grande*
RPS3 - *Proteína Ribossomal S3*
SAM - *S-adenosilmetionina*
SCX - *Strong Cation Exchange Chromatography*
SERPINA1 - *alfa-1-antitripsina*
SFRP - *Secreted frizzled-related protein 1*
SRM - *Selection Reaction Monitor*
T- Tumor
TAGLN - *Transgelina*
TBS – *Solução de ligação*
TCEP - *Tris (2-carboxietil) fosfina (do inglês tris (2-carboxietil)fosfina)*
TCLE - *Termo de Consentimento Livre e Esclarecido*
TEAB - *Bicarbonato de trietilamônio (do inglês Tetraethylammonium bicarbonate)*
TE – *tampão de eluição*
TFA- *Ácido trifluoracético (do inglês Trifluoroacetic acid)*
TGF- β - *Fator de transformação do crescimento beta ig-h3*
TIMP2 - *Inibidor de tecidos de metaloproteinases*

TLN1- Talina-1

TLS –Solução de lise

TNM - Tumor-nódulo-metástase

TPM2 - *Tropomiosina-2*

XIC–Cromatograma de íon extraído (do inglês, *Extracted Ion Chromatogram*)

SUMÁRIO

RESUMO	X
ABSTRACT	XI
LISTA DE FIGURAS	XII
LISTA DE TABELAS	XIV
LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIações	XV
1. INTRODUÇÃO	20
2. REVISÃO DE LITERATURA	22
2.1. CÂNCER.....	22
2.1.1. Câncer Colorretal.....	22
2.1.2. A Carcinogênese Colorretal.....	28
2.2. PROTEÔMICA E CÂNCER.....	33
2.2.1. Proteômica quantitativa.....	38
3. OBJETIVOS	43
3.1. OBJETIVO GERAL.....	43
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	43
4. MATERIAIS E MÉTODOS	44
4.1. SELEÇÃO DE PACIENTES.....	45
4.2. CRITÉRIOS.....	46
4.3. ANÁLISE ANATOMOPATOLÓGICA.....	47
4.3.1. Fixação dos tecidos.....	47
4.3.2. Desidratação, Inclusão e Microtomia (corte em fatias finas).....	47
4.3.3. Coloração com Hematoxilina-Miosina (HE).....	48
4.3.4. Montagem de lâminas.....	49
4.4. PARTE 1: EPIGENÉTICA.....	49
4.4.1. Extração de DNA.....	49
4.4.2. Tratamento com Bissulfito.....	50
4.4.3. PCR específica para metilação (MSP).....	50
4.4.4. Gel de poliacrilamida 10% revelado por nitrato de prata.....	52
4.5. PARTE 2: ESTUDO PROTEÔMICO UTILIZANDO QUANTIFICAÇÃO RELATIVA E ABSOLUTA POR MARCAÇÃO COM ISÓBAROS (iTRAQ)....	53
4.5.1. Pulverização do tecido, extração e dosagem de proteínas.....	53
4.5.2. Digestão triptica.....	53
4.5.3. Dessalinização.....	54
4.5.4. Dosagem de peptídeos para a marcação com iTRAQ.....	55

4.5.5. Marcação dos peptídeos com iTRAQ 8 plex.	55
4.5.6. Cromatografia de troca iônica (SCX)	56
4.5.7. Análise por nano-cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa (nLC-MS / MS)	57
4.5.8. Análise de dados	58
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	63
Tabela 5 - Dados clínicos dos pacientes incluídos no estudo.....	64
Legenda: M: masculino F: feminino.	64
5.1. EPIGENÉTICA	65
5.2. PROTEÔMICA	71
5.2.1. Análise dos dados obtidos com a tecnologia multidimensional de identificação de proteínas (MudPIT) <i>off-line</i>	73
6. CONCLUSÃO.....	90
7. REFERÊNCIAS	92
8. ADENDOS.....	102
8.1. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)	102
8.2. Questionário.....	105
8.3. Lista de proteínas identificadas a partir da análise de peptídeos únicos. 106	
9. ANEXOS.....	115
9.1. Termo de aprovação do Conselho de Ética	115
9.2. Artigo publicado a revista <i>Biological Research</i> - Impact Factor: 1.328) – B5 (Química).....	119
Colorectal cancer DNA methylation patterns from patients in Manaus, Brazil	119
9.3. Artigo publicado na revista <i>Journal of Proteomics</i> - Impact Factor: 3.867) – A1 (Química).....	129

1. INTRODUÇÃO

O câncer é uma das principais causas de morte no mundo e, de acordo com a última estimativa registrada pela Organização Mundial de Saúde, foi responsável por 8,2 milhões de mortes no ano de 2012 (WHO, 2012). Entre os diversos tipos de cânceres, no Brasil, o câncer colorretal (CCR) é o quarto em mortalidade (WCRF, 2012). Em particular, no Amazonas, a incidência no ano 2016 foi de 100 casos a cada 100.000 habitantes (INCA, 2016).

Outro aspecto interessante no processo carcinogênico envolve as alterações epigenéticas e genéticas que desencadeiam o processo neoplásico. Quando as alterações genéticas ocorrem em genes especiais chamados proto-oncogenes, estes transformam-se em oncogenes, que são os causadores da malignização das células normais (Martinez et al., 2006). Além dos proto-oncogenes, o silenciamento de genes supressores de tumores (Croce, 2008; Knudson, 1971) também é responsável pelo desenvolvimento do câncer e pode ocorrer devido a alterações epigenéticas, tal como a metilação do DNA (Feinberg & Vogelstein, 1983; Kulis & Esteller, 2010). A importância de uma melhor compreensão da relação dos padrões de metilação e o câncer entre as diferentes populações pode ajudar a desenvolver tratamentos mais individualizados (Egger et al., 2004; Tsang et al., 2014). Em adição a isso, atualmente, é limitado o número de técnicas que estão disponíveis para a avaliação de tumores colorretais e que sejam suficientemente sensíveis para auxiliar no diagnóstico preventivo.

Um grande desafio no estudo de neoplasias é a reincidência da doença, a qual pode estar correlacionada a margem de ressecção, visto que estudos têm mostrado que essa região pode apresentar possíveis mudanças moleculares,

Introdução

que indicam que esta área não é tão “saudável” quanto se espera (Aquino et al., 2012; Oppenheimer et al., 2010). De maneira que, tais trabalhos motivam a compreensão dos processos moleculares que possam estar ocorrendo nessas regiões.

Uma outra abordagem que pode auxiliar nesse contexto é a espectrometria de massas, uma ferramenta indispensável para os estudos proteômicos, no que se refere a detecção, a identificação e a caracterização de proteínas nos diferentes tipos de células, tecidos e órgãos. Mais recentemente, a introdução de métodos de marcação química como por exemplo, o iTRAQ (*Isobaric Tags for Relative and Absolute Quantification*), possibilitou a aquisição de dados de quantificação relativa e absoluta em estudos proteômicos em larga escala, assim como o desenvolvimento de ferramentas de proteômica computacional têm permitido um refinamento dos resultados obtidos nesse tipo de abordagem.

Dessa forma, este trabalho visa contribuir com o painel de genes supressores tumorais através de uma abordagem epigenética e também objetiva identificar proteínas diferencialmente abundantes em tecidos colorretais e respectiva margem de ressecção, empregando técnicas de *shotgun proteomics* quantitativo.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. CÂNCER

O câncer é uma doença de origem multifatorial caracterizada por um incontrolável crescimento e proliferação celular (INCA, 2016). Para o desenvolvimento cancerígeno, as células adquirem uma série de mutações que levam ao crescimento e divisão desregulados, inibição da diferenciação celular, bem como a morte de tais células (Balmain, 2001). À medida que os tumores vão crescendo, eles são estimulados a adquirirem uma nova fonte de vasos sanguíneos para servirem como fonte de nutrientes e oxigênio, fenômeno este conhecido por angiogênese. Eventualmente, as células do tumor invadem o tecido ao redor e se espalham para outras partes do corpo, num processo denominado metástase (INCA, 2016).

Alterações em dois tipos específicos de genes podem levar ao surgimento do câncer: os genes supressores de tumor e os proto-oncogenes. O primeiro tipo atua na inibição do ciclo de divisão celular, regulando negativamente os sinais de crescimento celular e permitindo o reparo do DNA (Knudson, 1971). Além disso, tais genes podem agir no controle e na interrupção do ciclo celular, ativando a apoptose. Já os proto-oncogenes podem sofrer mutações tornando-se os oncogenes; estes, por sua vez, quando ativos podem acelerar e amplificar o crescimento de células que se propagam rapidamente e sem controle (Thomas et al., 2007).

2.1.1. Câncer Colorretal

O câncer colorretal (CCR) abrange tumores que acometem um segmento do intestino grosso (o cólon) e o reto (Figura 1). O cólon forma a extremidade

final do aparelho digestivo e tem a função de absorver a água e eliminar excretos (resíduos alimentares, toxinas, etc). O reto é a parte terminal do cólon.

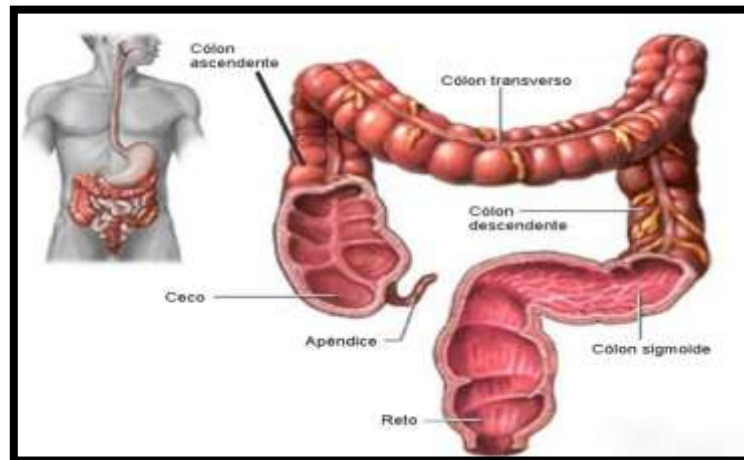


Figura 1- Visualização das diferentes partes do cólon e do reto. O cólon é dividido em cólon ascendente, transverso, descendente e sigmoide.
FONTE: <<http://www.supera.med.br>> Acessado em 17.12.2016.

De acordo com a mais recente estimativa da Agência Internacional em Pesquisa com Câncer (*International Agency for Research on Cancer*), o CCR encontra-se em terceiro lugar entre os cânceres mais incidentes mundialmente e o quarto em mortalidade (Figura 2) é uma doença tratável e frequentemente curável quando localizada no intestino (sem extensão para outros órgãos)(INCA, 2016).

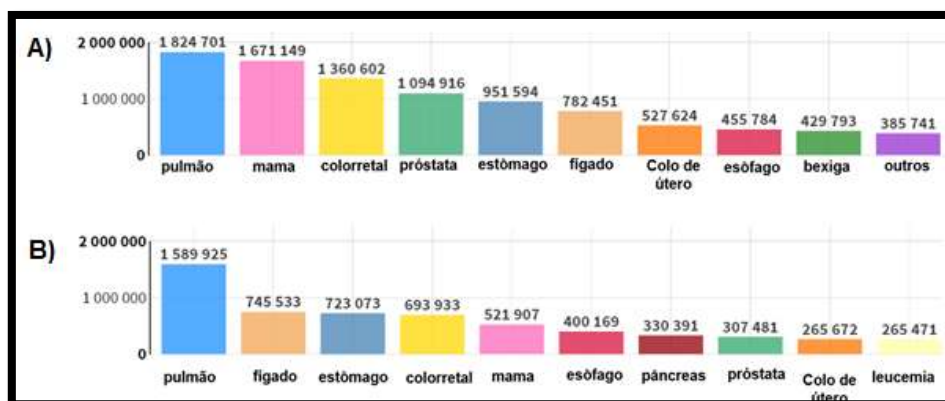


Figura 2- Os dez tipos de câncer com maiores taxas de incidências (A) e mortalidade (B), em ambos os sexos, mundialmente em 2012.
FONTE: <<http://gco.iarc.fr>> Acessado em 15.12.2016

De acordo com o a estimativa mais recente do GLOBOCAN (2012), o CCR é quarto tipo de câncer mais incidente no Brasil (Figura 3).

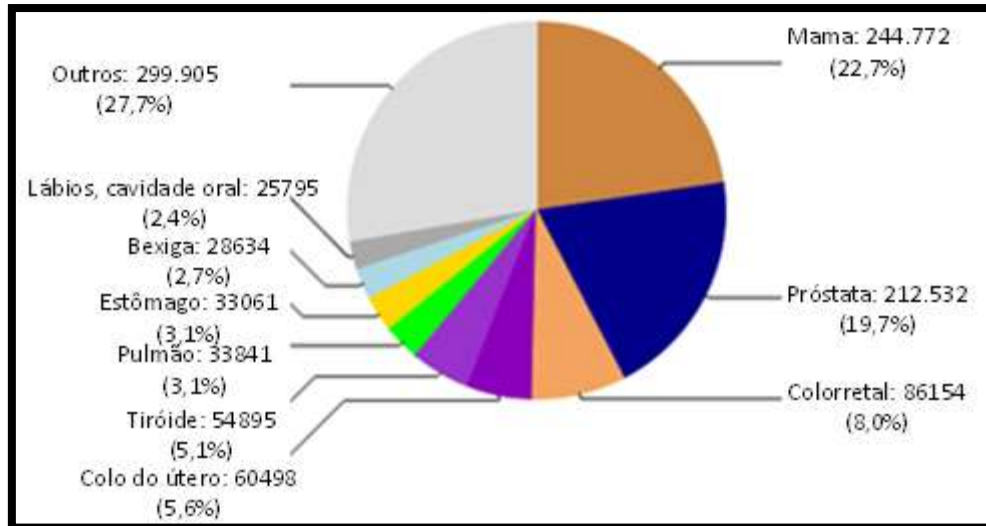


Figura 3 - Estimativa para os próximos 5 anos de casos de câncer no Brasil na população adulta (Total: 1.079.277).
FONTE: GLOBOCAN, 2012. Acessado em 14.01.2016

A incidência de casos de câncer colorretal no Brasil para o ano de 2016 foi de 34.280, sendo 16.660 em homens e 17.620 novos casos em mulheres (INCA, 2016) (Figura 4). No estado do Amazonas (Brasil), calculou-se uma taxa de aproximadamente 5,60 casos em homens e 6,98 em mulheres a cada 100 mil habitantes (INCA, 2016). Quando se trata de Manaus, capital do Amazonas, essa taxa dobra sendo 9,17 e 10,73 para homens e mulheres, respectivamente (Figura 5).

Localização primária					Localização primária		
	casos novos	%				casos novos	%
Próstata	61.200	28,6%	Homens	Mulheres	Mama Feminina	57.960	28,1%
Traqueia, Brônquio e Pulmão	17.330	8,1%			Cólon e Reto	17.620	8,6%
Cólon e Reto	16.660	7,8%			Colo do Útero	16.340	7,9%
Estômago	12.920	6,0%			Traqueia, Brônquio e Pulmão	10.890	5,3%
Cavidade Oral	11.140	5,2%			Estômago	7.600	3,7%
Esôfago	7.950	3,7%			Corpo do Útero	6.950	3,4%
Bexiga	7.200	3,4%			Ovário	6.150	3,0%
Laringe	6.360	3,0%			Glândula Tireoide	5.870	2,9%
Leucemias	5.540	2,6%			Linfoma não Hodgkin	5.030	2,4%
Sistema Nervoso Central	5.440	2,5%			Sistema Nervoso Central	4.830	2,3%

Figura 4-Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes no Brasil estimados para o biênio 2016-2017 por sexo, exceto pele não melanoma*. FONTE: INCA, 2016

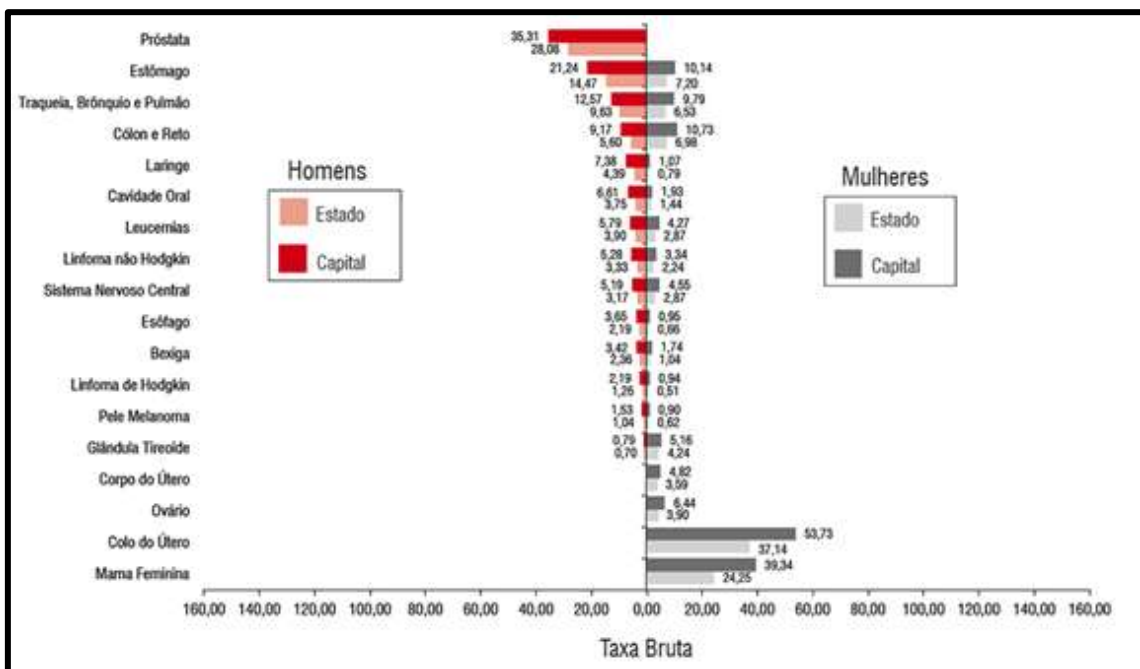


Figura 5- Taxas brutas de incidência estimadas para o biênio 2016-2017 por sexo, segundo Estado e capital(Amazonas). Fonte: INCA, 2016

Dentre os fatores de risco para o CCR destacam-se; o consumo de carne vermelha, carnes processadas (como mortadelas, presuntos, salsichas, linguiças), alcoolismo, tabagismo, gordura corporal e abdominal. Já o consumo de fibras e grãos reduzem o risco de CCR. Outros fatores de risco são o histórico familiar de CCR e/ou pólipos colorretais; fatores hereditários como Síndrome de Lynch, conhecida como câncer colorretal hereditário sem polipose, do inglês *hereditary nonpolyposis colorectal cancer* (HNPCC), e

polipose adenomatosa familiar, do inglês, *familial adenomatous polyposis* (FAP); e também uma história pessoal de doença crônica inflamatória do intestino (por exemplo, colite ulcerosa ou doença de Crohn) (Nelson et al., 2001). Além disso, a idade também deve ser considerada como um fator de risco, uma vez que tanto a incidência quanto a mortalidade aumentam com o aumento da mesma (Day et al., 2011).

Apesar disso, cerca de 75% dos CCR ocorre de forma esporádica, surgindo de mutações somáticas e da evolução do clone celular tumoral. O tipo histopatológico mais comum é o adenocarcinoma que pode ser categorizado em três graus de diferenciação, dependendo da arquitetura glandular, pleomorfismo celular e padrão de secreção de muco. Assim, estes são: adenocarcinoma diferenciado (grau I), moderadamente diferenciado (grau II) e mal diferenciado (grau III) (Hamilton, 2000).

A evolução da doença é altamente dependente da fase em que a doença é detectada. Pacientes com doença localizada (fase I) têm um excelente resultado com taxas de sobrevivência em 5 anos até 90%; enquanto a mesma taxa para os pacientes com a doença na fase de metástase (fase IV) é abaixo de 8%. Infelizmente, os sintomas clínicos surgem principalmente na fase tardia, ou seja, quando a doença já se espalhou para fora do cólon (de Wit et al., 2013).

A principal forma de tratamento quando a intenção é curativa, ainda é a cirurgia, principalmente nos estágios iniciais. Porém, para estágios mais tardios a chance de cura apenas com a cirurgia diminui devido ao aumento em termos de profundidade e envolvimento de gânglios linfáticos. Para tumores de cólon, indica-se realizar a ressecção radical através da retirada do segmento

acometido com a margem proximal e distal mínima de 5 cm. Para o reto, a margem distal mínima considerada ideal é de 2 cm, podendo considerar até 1 cm quando há tratamento neoadjuvante, com excisão total do mesorreto (Nelson et al., 2001).

O estadiamento do tumor é definido de acordo com a classificação clínica utilizando o sistema TNM (tumor-nódulo-metástase) descrito pela *American Society of Clinical Oncology* (Nelson et al., 2001). Os requisitos desse sistema estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1- Definições dos estágios tumor-nódulo-metástase (TNM).

Estágio	Definição
Tumor Primário (T)	
T0	Não há evidência de tumor primário
T1	Tumor invade submucosa
T2	Tumor invade mucosa
T3	Tumor que invade além da muscular própria, alcançando a subserosa ou os tecidos pericólicos ou peri-retais, não peritonizados
T4	Tumor perfura peritônio visceral ou invade diretamente outros órgãos ou estruturas
Os linfonodos regionais (N)†	
NX	Os linfonodos regionais não podem ser avaliados
N0	Ausência de metástases em linfonodos regionais
N1	Metástases em 1 a 3 linfonodos regionais
N2	Metástases em 4 ou mais linfonodos regionais
Metástases à distância (M)	
MX	Metástases à distância não pode ser avaliada
M0	Ausência de metástases à distância
M1	Metástases à distância
Extensão da ressecção (R)	
RX	A presença de tumor residual não pode ser avaliada
R0	Sem tumor residual

FONTE: Nelson et al., 2001

2.1.2. A Carcinogênese Colorretal

A patogênese do CCR é muito complexa e ocorre pelo menos em três diferentes vias, incluindo a via de instabilidade cromossômica (CIN), a via de instabilidade de microssatélites (MSI) e a via de fenótipo metilador da ilha CpG (CIMP) (IJspeert et al., 2015). A principal via de instabilidade cromossômica é a via adenoma- carcinoma, descrita desde 1990 por Fearon e Vogelstein (Fearon & Vogelstein, 1990), que é caracterizada por um acúmulo de várias mutações que resultam na ativação de oncogenes (*KRAS*) e inativação de genes supressores tumorais (*DCC*, *APC*, *SMAD4* e *TP53*). Esta é uma via bem estudada dentro da carcinogênese colorretal, que corresponde à 70% dos casos de CCR e está relacionada com Polipose Adenomatosa Familiar (FAP) e tumores esporádicos, sendo originadas de lesões como os adenomas (Smith et al., 2002). Nesta via, inicialmente, ocorre a mutação do gene *APC* (*adenomatous polyposis coli*), encontrada em 75% dos casos de câncer esporádico, enquanto as mutações germinativas nesse gene podem causar *Familiar Polipose Adenomatosa Coli* (FAP) (Jasperson & Burt, 1993; Reyes Moreno et al., 2007). A mutação no gene *APC* leva a displasia, isto é, anormalidades nas células adultas, ou resulta na formação de pólipos (formações benignas em crescimento na superfície da membrana). É importante frisar que as mutações no gene *APC* também alteram a adesão celular. A outra mutação ocorre no gene *Kirsten-ras* (*K-ras*), no qual o pólipo cresce a uma velocidade mais rápida transformando-se em um tumor maior, conhecido como adenoma intermediário (Vogelstein & Kinzler, 2004). A mutação ocorrida proto-oncogenes *K-ras* é responsável pelo crescimento celular devido a ativação da via EGFR-RAS-RAF-ERK-JUN /FOS que inibe a apoptose (Smith et

al., 1987). Posteriormente, ocorre a inativação de outros genes supressores tumorais, incluindo a perda de *p53* (região cromossômica 17p13) e a perda de heteroziguidade ao longo do cromossomo 18 (18q LOH) (IJspeert et al., 2015). Recentemente foram descritas mutações envolvendo outros genes, tais como o *TGFBR* e o *PIK3CA*, que são necessários para o modelo de sequência adenoma-carcinoma (Armaghany et al., 2012).

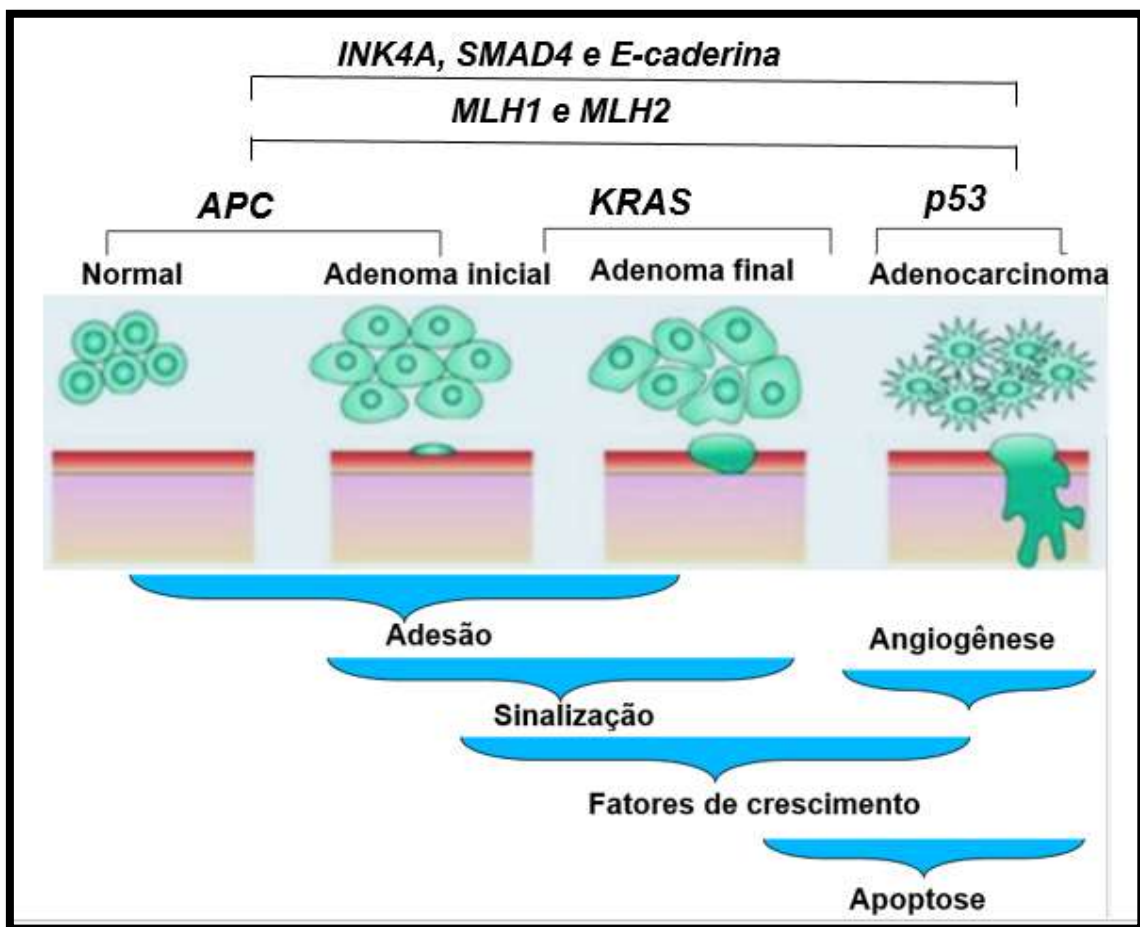


Figura 6 - Sequência adenoma-carcinoma. As primeiras etapas requerem mutações no gene *adenomatous polyposis coli* (APC). Em seguida, ocorrem instabilidade genética e mutações sequenciais nos genes *K-ras*, *Smad4*, e *p53*.
FONTE: Armaghany et al. (2012)

De acordo com a literatura, outros caminhos, incluindo mecanismos epigenéticos (Colussi et al., 2013; Tsang et al., 2014), foram relatados. Nesse sentido, a epigenética refere-se a modificação covalente no DNA, proteína, ou

RNA, resultando em alterações na função e/ ou regulação destas moléculas, mas sem alterar as sequências primárias(Jaenisch & Bird, 2003). Alterações epigenéticas como, a hipo/hipermetilação do promotor, podem causar a desregulação da expressão de muitos genes importantes no câncer colorretal (Lahtz & Pfeifer, 2011). O interesse no estudo de alterações epigenéticas tem aumentado e há relatos da descrição de alterações epigenéticas em mucosa de tumor colorretal histologicamente normal(Kawakami et al., 2006; Petko et al., 2005); despertando assim, o interesse da utilização de marcadores epigenéticos para pacientes do grupo de risco(Kawakami et al., 2006; Wong et al., 2007). Dentre as alterações epigenéticas, umas das mais comuns é a metilação do DNA que está relacionada com o silenciamento gênico, o qual é importante para a regulação e desenvolvimento do processo de tumorigênese. A metilação do DNA é encontrada predominantemente em sítios CpG de genomas de mamíferos, que ficam agrupados em regiões que se repetem extensivamente, como repetições centrômeras ou terminação 5' de genes, chamados por ilhas CpGs do inglês "*CpGs Islands*" – CpGIs(Bernstein et al., 2007). A metilação consiste da adição de grupos -CH₃ na posição 5' da citosina promotora, formando a 5-metilcitosina (Tsang et al., 2014; Zakhari, 2013) (Figura 7). Genes reguladores da transformação neoplásica podem ser "silenciados" por metilação e, conseqüentemente, terem sua expressão gênica suprimida. Alguns exemplos de genes supressores de tumor são: *Cadherin-1 (CDH1)* (Tsanou et al., 2008), *Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A (p16^{CDKN2A})* (Sanz-Casla et al., 2005), *Tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP2)* (Nagase et al., 2006) e *Death-Associated Protein kinase (DAPK)* (Benderska and Schneider-Stock, 2014). Adicionalmente, estudos

têm demonstrado que alterações epigenéticas influenciadas alterações genéticas, em alguns casos antecedendo as mutações (Molinari et al., 2013). A ocorrência de mutação *BRAF V600E* está associada com a metilação do promotor e instabilidade de microsatélites em CCR (Weisenberger et al., 2006). No CCR esporádico, a instabilidade de microsatélites também está associada à metilação do promotor *MLH1* com perda da expressão da proteína *MLH1* (Deng et al., 2002).

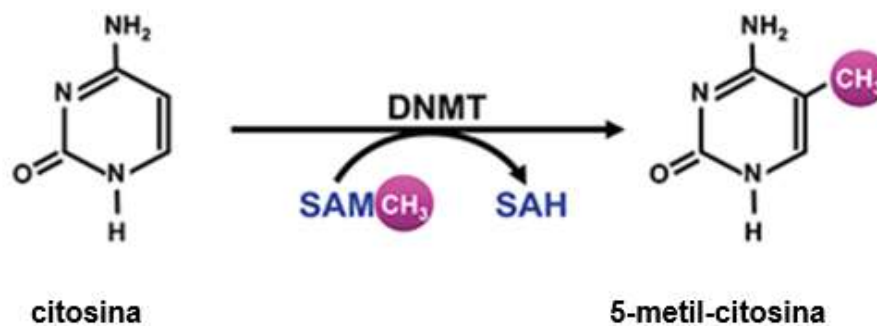


Figura 7- Metilação da citosina. A adição de metila na posição 5' da citosina é catalisada pela enzima De novo Metiltransferase (DNMT), usando S-adenosilmetionina (SAM) como grupo doador.

FONTE: Zakiari et al., 2013

O gene *CDH1* (Shiozaki et al., 1996), o qual está localizado no cromossomo 16q22 (Shiozaki et al., 1996; Tsanou et al., 2008) codifica a proteína E-caderina, que é uma proteína transmembranar que fica entre as células epiteliais e corresponde a uma das principais proteínas envolvidas na adesão celular. A perda da adesão mediada por E-caderina parece ser fundamental em processos neoplásicos, pois permite que as células deixem de ter um crescimento normal e controlado de sinalização, resultando na perda da diferenciação e aumento da proliferação celular associada ao comportamento invasivo (Tsanou et al., 2008). No câncer colorretal, a ausência ou a diminuição

da proteína E-caderina tem sido associada a tumores com estágios mais avançados e à maior incidência de metástases linfonodais e hepáticas(Kimura et al., 2000; Kitagawa et al., 1999).

Outro gene relacionado com o câncer é *CDKN2*, localizado no cromossomo 9p21 que codifica a proteína p16. Esta inibe a cinase dependente de ciclina D4 (CDK) e a proteína cinase CDK6, as quais são reguladores-chaves da progressão de células eucarióticas da fase G1 do ciclo celular(Benderska &Schneider-Stock, 2014).A inativação dessa proteína p16pode causar células anormais e um crescimento celular descontrolado (Serrano et al., 1993)

O gene *DAPK* codifica uma proteína quinase associada à morte celular que participa de vários processos na célula, dentre as quais pode-se citar, a reorganização do citoesqueleto sob estímulos de citocinas e a indução de apoptose(Benderska &Schneider-Stock, 2014), e é um gene candidato a supressor tumoral.

O gene *TIMP2* codifica o inibidor de tecido de metaloproteinases-2 (TIMP2), conhecido por antagonizar a atividade de metaloproteinases da matriz e por suprimir o crescimento de tumores, angiogênese, invasão e metástase (De Clerck et al., 1992). O gene *TIMP2* é conhecido por ser expresso em tecidos humanos normais, enquanto a sua expressão é regulada negativamente em glioblastomas e os tumores metastáticos do pulmão (Parashar &Capalash, 2012).

De acordo com a literatura, os padrões de metilação anormais desses genes são indicativos de câncer(Hussain et al., 2013). Estudos relatam tais alterações, por exemplo, na mucosa do tumor colorretal, servindo como

motivação para a investigação de maiores informações sobre o padrão de metilação de pacientes com o câncer (Kawakami et al., 2006; Wong et al., 2007). Em um estudo realizado por Kawakami et al. (2006), verificou-se que os níveis de metilação para *CDKN2A* e *DAPK* foram relativamente baixos na mucosa de cólon adjacente ao tumor de pacientes com CCR, quando comparado com outros genes. Nesse mesmo trabalho, os autores ainda correlacionaram pacientes com altos níveis de metilação do *INK4A* e *DAPK* com idade avançada ($p < 0,1$) a um maior risco para essa patologia (Kawakami et al., 2006). Por fim, um painel de marcadores compreendendo a metilação de *CDKN2A*, *MGMT* (*O⁶-alkylguanine DNA alkyltransferase*), *MLH1* (*MutL homolog 1*), e *SFRP* (*Secreted frizzled-related protein 1*) no diagnóstico de câncer colorretal foi descrito (Kawakami et al., 2006).

Embora cada vez mais tenha aumentado o interesse em marcadores epigenéticos no rastreamento de amostras de neoplasia colorretal (Gu et al., 2014; Molinari et al., 2013), novas investigações, especialmente em diferentes populações, são fundamentais para a devida compreensão da aplicabilidade destes marcadores na prática clínica (Balch & Nephew, 2013). Nesse contexto, o presente trabalho é o primeiro estudo realizado, explorando painéis de genes de pacientes com câncer colorretal em Manaus.

2.2. PROTEÔMICA E CÂNCER

O proteoma é definido como um conjunto de proteínas expressas por um sistema biológico - células, tecidos, órgãos, ou fluídos biológicos (sangue, plasma, soro) - em um determinado momento ou estado fisiológico (Wilkins et al., 1996). Já a proteômica é definida como o conjunto de técnicas desenvolvidas para se estudar o proteoma. O objetivo da proteômica é

Revisão de Literatura

descrever a identidade, quantidade, estrutura tri-dimensional, interações proteicas, modificações pós-traducionais e as funções de todas as proteínas expressas em um sistema durante um período ou momento.

Com o surgimento das técnicas de ionização suave, MALDI (*Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization*) (Tanaka et al., 1988) e ESI (*electrospray ionization*) (Fenn et al., 1989), tornou-se possível a ionização de biomoléculas termicamente instáveis e, assim, a utilização da espectrometria de massas pôde auxiliar na caracterização de proteínas e peptídeos (Lössl et al., 2016; Zaluzec et al., 1995). Além disso, o desenvolvimento de analisadores de massas híbridos e métodos de fracionamentos multidimensionais em misturas complexas possibilitaram um progresso na proteômica. A proteômica associada a espectrometria de massas (*Mass Spectrometry - MS*) têm se tornado uma ferramenta fundamental para a identificação de proteínas, permitindo a descoberta de candidatos a biomarcadores e drogas alvos (Fan et al., 2012).

A utilização de biomarcadores tem auxiliado os pacientes com câncer em procedimentos para a detecção inicial, diagnóstico, monitorização da doença e orientação no tipo de terapia mais adequada. Contudo, os marcadores empregados na clínica ainda não se demonstraram eficientes no rastreamento populacional de indivíduos portadores de neoplasias colorretais, especialmente os assintomáticos (Fernandes & Matos, 2002). A sensibilidade para diagnóstico dos marcadores atuais tem-se revelado inferior a 50%, inviabilizando tais métodos para finalidades diagnósticas. Por isso faz-se necessário a busca de biomarcadores que englobem os diferentes estágios que o CCR possui, conforme apresentado na Figura 8.

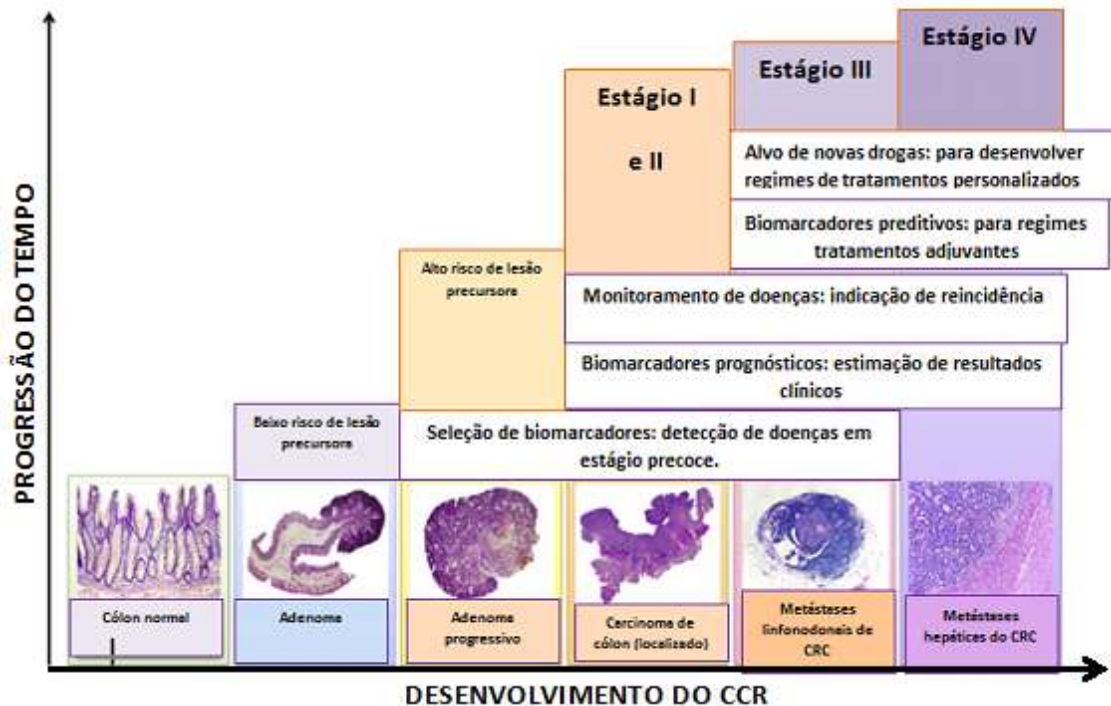


Figura 8 - Diferentes estágios para o desenvolvimento do CCR. No eixo x, é mostrado o desenvolvimento conforme o passar do tempo; enquanto no eixo y é exemplificado pelas barras de diferentes cores, as fases desse tipo de câncer.
 FONTE: Modificado de De Wit et al., 2012.

Neste contexto, o uso de ferramentas proteômicas para investigar padrões de expressão de proteínas que possam distinguir entre estados com e sem determinada patologia, pode permitir uma melhor compreensão dos eventos moleculares associados com o desenvolvimento e progressão da doença (Alvarez-Chaver et al., 2007, 2014).

A análise de proteínas inicia com a preparação da amostra, na qual proteínas podem ser digeridas enzimaticamente para obtenção de peptídeos (análise *Bottom-up*) (Chait, 2006; McDonald & Yates, 2003) ou podem ser analisadas intactas (análise *Top-down*) (Breuker et al., 2008; Reid & McLuckey, 2002). Dentro da abordagem *Bottom-up*, utiliza-se a “proteômica *shotgun*” que se refere à análise direta de uma mistura complexa de proteínas para gerar rapidamente um perfil global das proteínas dentro da mistura (Wu & MacCoss, 2002). Esta abordagem foi facilitada pelo uso da tecnologia multidimensional de

identificação de proteínas (MudPIT)(Washburn et al., 2001), que incorpora cromatografia líquida de alta pressão multidimensional (LC / LC), espectrometria de massa em tandem (MS / MS) e algoritmos de busca de banco de dados.

O MudPIT é um método que utiliza cromatografia líquida de troca catiônica forte(*Strong Cation Exchange Chromatography -SCX*) associada a cromatografia líquida de fase reversa (*Reverse Phase- RP*) diretamente acoplada a espectrometria de massas em *tandem*(Washburn et al., 2001). Nesta, os peptídeos são separados primeiramente pela cromatografia de troca catiônica, onde os diferentes peptídeos eluem de acordo com um gradiente crescente de sal. Em seguida, cada fração é carregada diretamente (*online*) ou não (*off-line*) em uma coluna de fase reversa. A cromatografia de fase reversa (RP) possui uma fase estacionária apolar, que é composta por hidrocarbonetos apolares, como C₁₈, e uma fase móvel que é formada por solventes polares (H₂O) e orgânicos (e.g. acetonitrila, butanol, metanol, etc.). Uma vez iniciado o gradiente de RP, os peptídeos mais polares eluirão primeiro enquanto que os mais apolares ficarão retidos na fase estacionária. À medida que a concentração do solvente orgânico é aumentada, os peptídeos perdem afinidade pela coluna e são eluídos para detecção no espectrômetro de massas.

Nessa tese, o espectrômetro de massas utilizado foi utilizado o LTQ Orbitrap Velos (Figura 9a). Este equipamento é composto por uma fonte de ionização nano eletrospray (ESI), dois tipos de analisadores (*Ion Trap* Linear e Orbitrap) e detectores (Figura 9b).

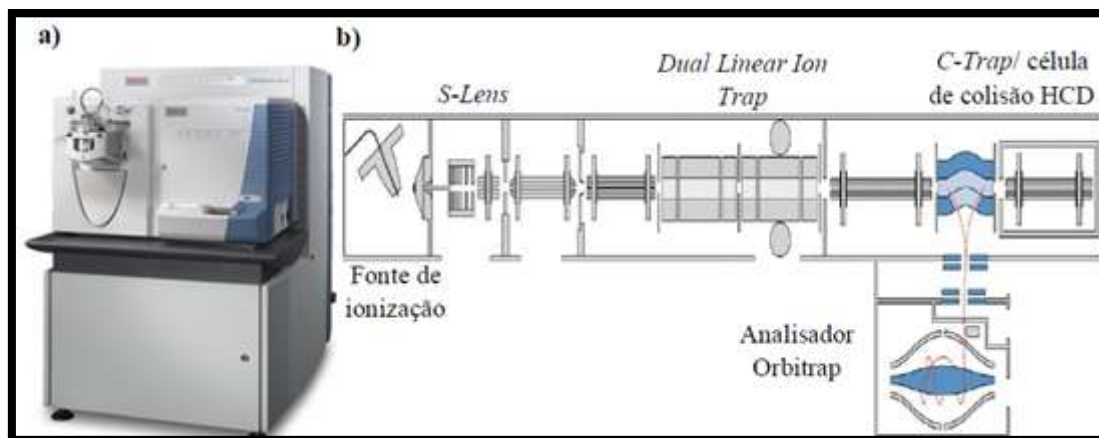


Figura 9 - Ilustração do instrumento híbridoLTQ-Orbitrap Velos da *Thermo Scientific*, usado nas análises proteômicas dessa tese. **a)** Imagem ilustrativa do espectrômetro de massas **b)** Esquema interno do LTQ-Orbitrap Velos que possui como fonte de ionização um *nanoelectron spray (nano-ESI)*

FONTE: Modificado de <<http://www.thermofisher.com>.> Acessado em 03.11.2015

Para a interpretação dos espectros obtidos do espectrômetro de massas, empregam-se algoritmos que fazem a comparação do espectro experimental com o espectro teórico, tais como SEQUEST (Eng et al., 2013), X-Tandem (Craig & Beavis, 2004), Mascot (Perkins et al., 1999), ProLuCID (Xu et al., 2006), entre outros.

Um ambiente computacional interessante e gratuito desenvolvido para analisar dados da proteômica é o *PatternLab for Proteomics 4.0* (PL 4.0) (Carvalho et al., 2016), disponível na página <http://www.patternlabforproteomics.org/>. Essa plataforma integra vários módulos que cobrem os principais aspectos da análise proteômica, incluindo a extração de informações quantitativas de dados com e sem marcação química, realização das estatísticas diferenciais para proteômica, exibição dos resultados em uma variedade de formatos gráficos e ainda ajuda na compreensão do significado biológico dos dados à luz da análise do Gene Ontology (Carvalho et al., 2016).

2.2.1. Proteômica quantitativa

A proteômica quantitativa pode ser realizada utilizando a quantificação relativa. Esta pode ser empregada mediante métodos livres de marcação (*label free*) ou com marcação, a qual pode ser química, enzimática ou metabólica. Os métodos *label free* realizam a quantificação por comparação da intensidade dos íons precursoros entre uma corrida e outra, no espectrômetro de massas, isto é, integra a área do pico do cromatograma (*XIC*); ou ainda pode ser realizado através da contagem de espectros (*spectral counts*), no qual se utiliza um número de espectros de MS2 adquiridos e mapeados para uma proteína como indicador da respectiva quantidade desta na amostra (Aquino et al., 2016; Carvalho, 2010).

Por outro lado, alguns métodos de marcação permitem analisar múltiplas amostras em diferentes condições simultaneamente (Herbrich et al., 2013). Um exemplo é o iTRAQ (*Isobaric tags for relative and absolute quantitation*) (Ross et al., 2004). Este reagente é formado por um grupo N-metilpiperazina (grupo repórter), que possui massa variável de 114 a 117 Da (iTRAQ 4-*Plex*) ou 113 a 121 Da (iTRAQ 8-*Plex*), um grupo carbonil (grupo de equilíbrio de massa) e um grupo N-hidroxissuccinimida (NHS) (Figura 10).

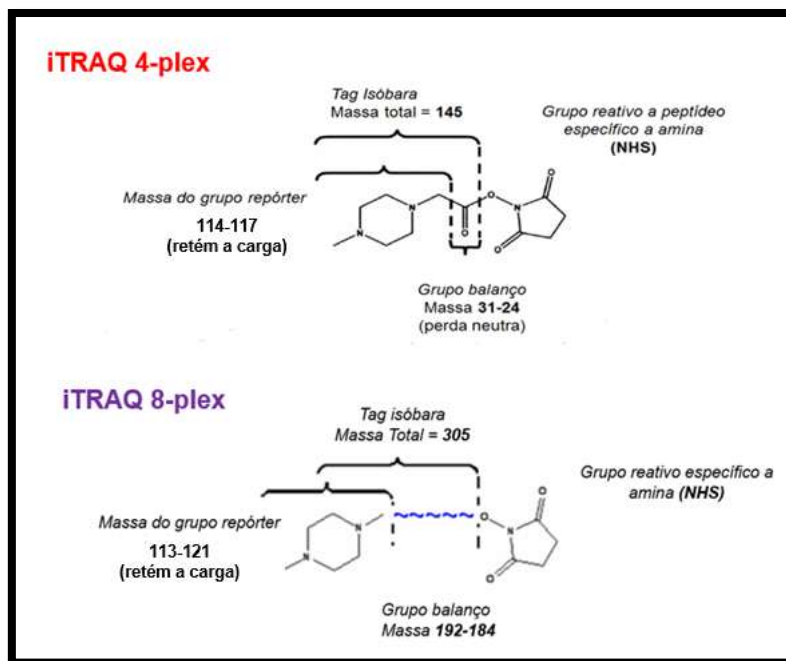


Figura 10 - Estrutura química do iTRAQ (*isobaric tags for relative and absolute quantitation*). Este é formado por um grupo repórter (Massa variável de 114-117 Da para iTRAQ 4-plex; 113-121 Da para iTRAQ 8-plex), um grupo balanço e um grupo reativo a amina, no qual reage especificamente com grupos amino terminal dos peptídeos e cadeia lateral de grupos ϵ -aminos de lisina.

FONTE: Modificado de Ross et al., 2004

De maneira geral, o grupo éster da NHS reage com os grupos N-terminal das aminas dos peptídeos e grupos ϵ -amina de resíduos de lisina para fixar as tags nos peptídeos, formando uma ligação amida. Assim, mesmo após a marcação, a massa molecular dos peptídeos marcados com diferentes marcadores isóbaros permanece a mesma e aparece como um único pico na varredura inicial do espectro MS1 (Mirza, 2012). Porém, com a fragmentação do íon precursor ocorre a perda neutra da porção balanço (grupo carbonil) e a carga é mantida no fragmento do grupo repórter, resultando no aparecimento dos picos referentes aos íons repórteres no espectro de MS2 (Figura 11). Logo, as intensidades relativas desses íons fornecem leituras diretas da contribuição relativa dos peptídeos presentes em cada uma das amostras na mistura (Herbrich et al., 2013; Ross et al., 2004).

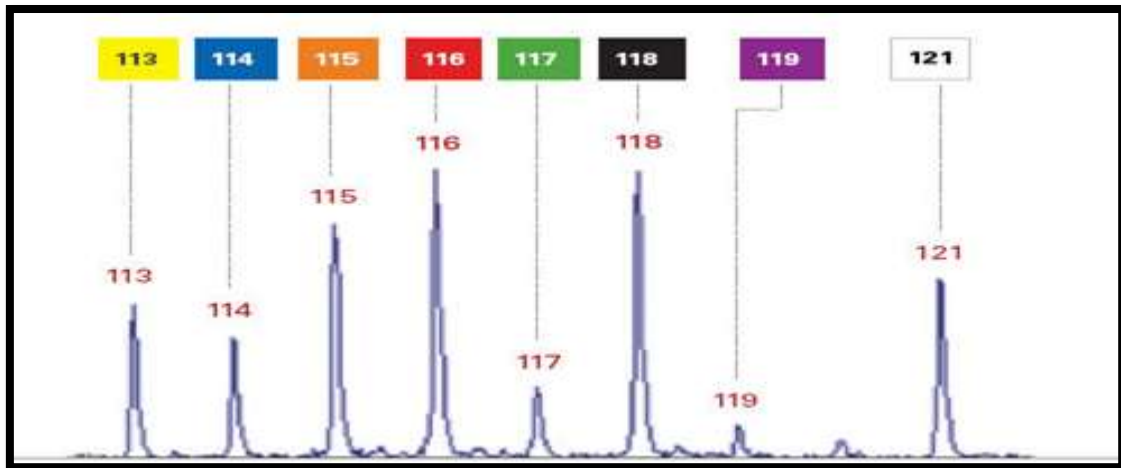


Figura 11- Exemplo da região de baixa massa de um espectro de MS2 obtido, enfatizando a presença dos íons marcadores característicos do iTRAQ-8 *plex*. FONTE: Retirado de <<http://sciex.com>> Acessado em 14.10.2016

A quantificação por iTRAQ® é um método eficiente empregado na proteômica quantitativa e tem como vantagens: a identificação de proteínas com baixa abundância em amostras complexas e a quantificação de múltiplas amostras em paralelo, o que diminui as variáveis experimentais e aumenta a reprodutibilidade (Gan et al., 2007; Garbis et al., 2008; Ross et al., 2004). Um esquema de um experimento empregando a marcação com iTRAQ encontra-se na Figura 12.

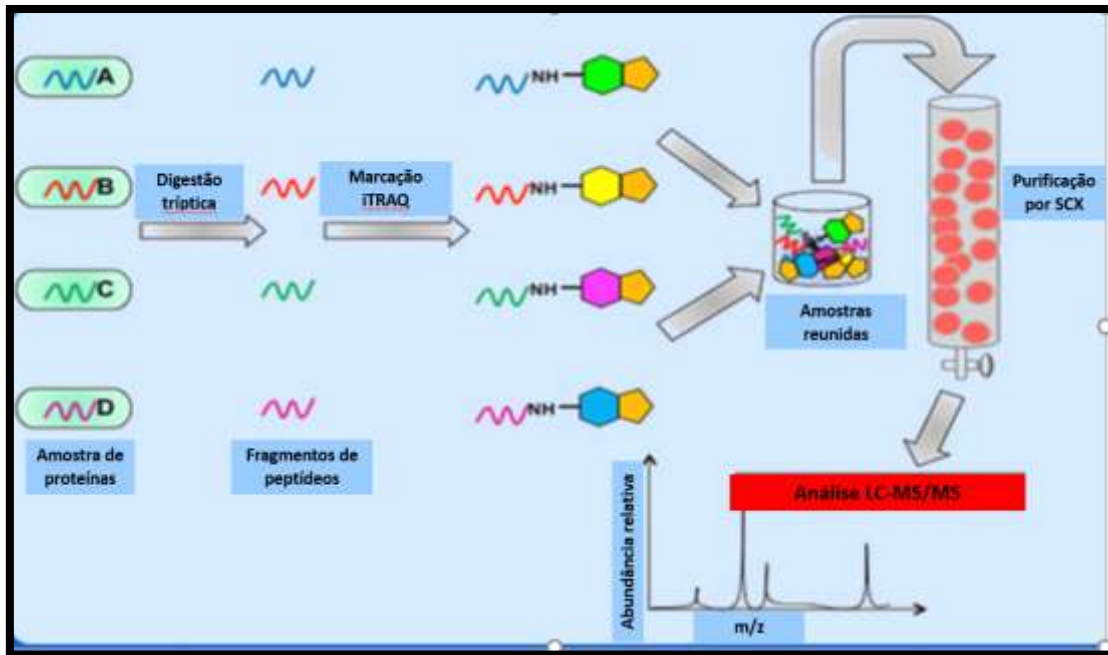


Figura 12 - Esquema de um experimento utilizando amarcção por iTRAQ (*isobaric tag for relative and absolute quantitation*). Neste, os peptídeos são obtidos da mistura proteica após a clivagem enzimática e, em seguida, os peptídeos de cada condição são marcados com marcadores isobáros no N-terminal ou em cadeias laterais da lisina. Posteriormente, esses são misturados e separados por cromatografia de troca catiônica forte (SCX) seguida de cromatografia líquida de fase reversa acoplada diretamente ao espectrômetro de massas. No espectro MS/MS, observa-se os íons repórteres na região de baixa massa, sendo que a razão desses picos representa uma proporção relativa de cada peptídeo na amostra.
 FONTE: modificado de <<http://www.grc.nia.nih.gov/branches/lci/muproteomics.htm>>
 Acessado em 22.01.2015

Na literatura, alguns trabalhos prévios combinando o câncer colorretal e a quantificação proteica por meio da utilização do iTRAQ têm sido descritos (Fan et al., 2012; Jankova et al., 2011). Em um desses trabalhos, Fan et al. (2012) empregou o iTRAQ 113 e o iTRAQ 114 para analisar amostras com câncer e sem câncer; identificando 802 proteínas, sendo 82 proteínas consideradas potencialmente específicas para CCR, com destaque para a gelsolina.

Em um outro estudo utilizando o iTRAQ para analisar amostras pareadas de pacientes com CCR em estágios iniciais e avançados da doença, Jankova et al. (2011) identificou 1453 proteínas, sendo 118 proteínas diferencialmente abundantes. No mesmo estudo, verificou-se ainda proteínas super-abundantes nos tumores CCR associadas com a glicólise, a ligação de cálcio e a inibição da

Revisão de Literatura

protease; enquanto que as proteínas com níveis reduzidos nesses tumores foram associadas com a perda da produção de adenosina trifosfato(ATP) por meio (i) da redução de β -oxidação de ácidos graxos, (ii) da redução da produção de NADH pelo ciclo de ácido tricarboxílico e (iii) da diminuição da atividade de fosforilação oxidativa (Jankova et al., 2011).

Logo, tais estudos impulsionam na busca por proteínas diferencialmente expressas para essa patologia, empregando metodologias acuradas de quantificação relativa como o iTRAQ, em pacientes diagnosticados no Amazonas. Uma vez que também não há relatos de estudos de proteômica quantitativa de pacientes do Amazonas para esse câncer, necessitando assim de maiores investigações que auxiliem na compreensão dessa doença.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Realizar um estudo comparativo em amostras de tecidos tumorais e margem de ressecção de pacientes com câncer colorretal através de análises epigenéticas e proteômicas.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar um painel de metilação para os genes *CDH1*, *DAPK*, *CDKN2A* e *TIMP-2* em amostras de tecidos de câncer colorretal e da respectiva margem de ressecção dos pacientes estudados;
- Comparar o proteoma de amostras de câncer colorretal e das respectivas margens de ressecção, utilizando a quantificação por marcação com isóbaros – iTRAQ;
- Selecionar proteínas diferencialmente abundantes para o CCR e sua respectiva margem, através de ferramentas de proteômica computacional.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

Essa tese foi desenvolvida conforme as etapas demonstradas na Figura 13.

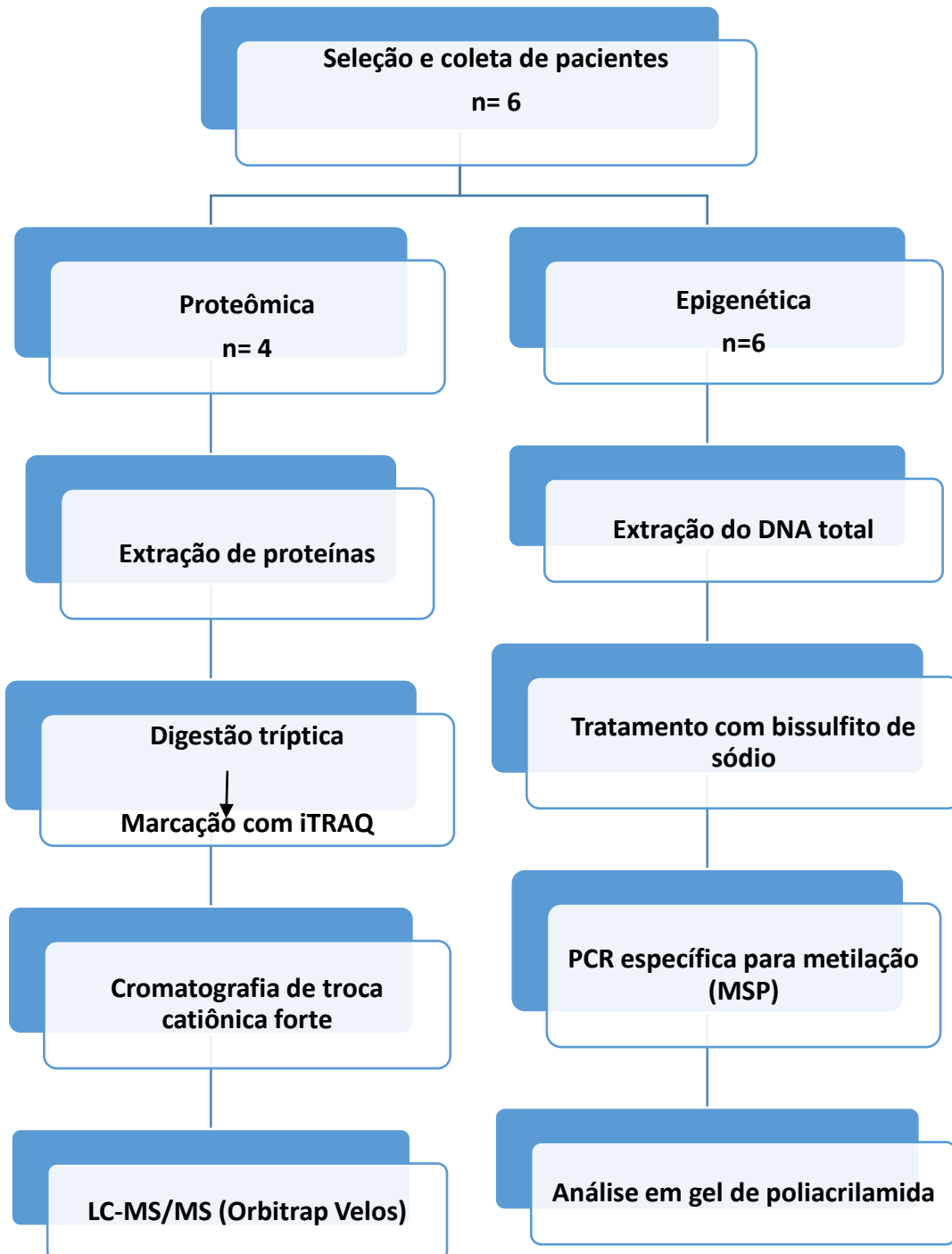


Figura 13. Fluxograma geral das análises realizadas nas amostras coletadas neste trabalho.

4.1. SELEÇÃO DE PACIENTES

Esse estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (Anexo 9.1) com Seres Humanos da Universidade Federal do Amazonas (UFAM: MEMO, No. 27598614.1.0000.5020, CAAE). O consentimento escrito dos voluntários (Termo de Consentimento Livre e Esclarecido) foi obtido em todos os casos (Adendo 8.1). Vale ressaltar que foram seguidas todas as normas do conselho de ética institucional. Oito pacientes que atenderam aos critérios de inclusão e exclusão, e assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido, foram selecionados. Cada paciente respondeu a um questionário (Adendo 8.2), permitindo ao fim da pesquisa correlacionar os dados experimentais com os dados clínicos.

As amostras foram coletadas na Fundação Centro de Controle de Oncologia do Estado do Amazonas (FCECON) pelo cirurgião Dr. Sidney Raimundo Silva Chalub. Após o diagnóstico de câncer colorretal, através de exames histopatológicos, o estadiamento foi determinado de acordo com a classificação tumor, nódulo, metástase (TNM) da *American Joint Committee on Cancer* (AJCC). Durante o ato operatório, foram obtidos três espécimes tumorais de peça cirúrgica. Estes foram classificados da seguinte maneira para o estudo: área do tumor, margem proximal (2cm em relação ao tumor) e margem distal (5cm em relação ao tumor) de acordo com a Figura 14. Cada espécime tumoral e as margens de ressecção foram guardados em microtubos estéreis de 2,0 mL com tampa, os quais foram transportados em gelo seco. Todo o material coletado foi armazenado em freezer – 80 °C do Departamento de Biotecnologia da UFAM até o processamento da amostra.

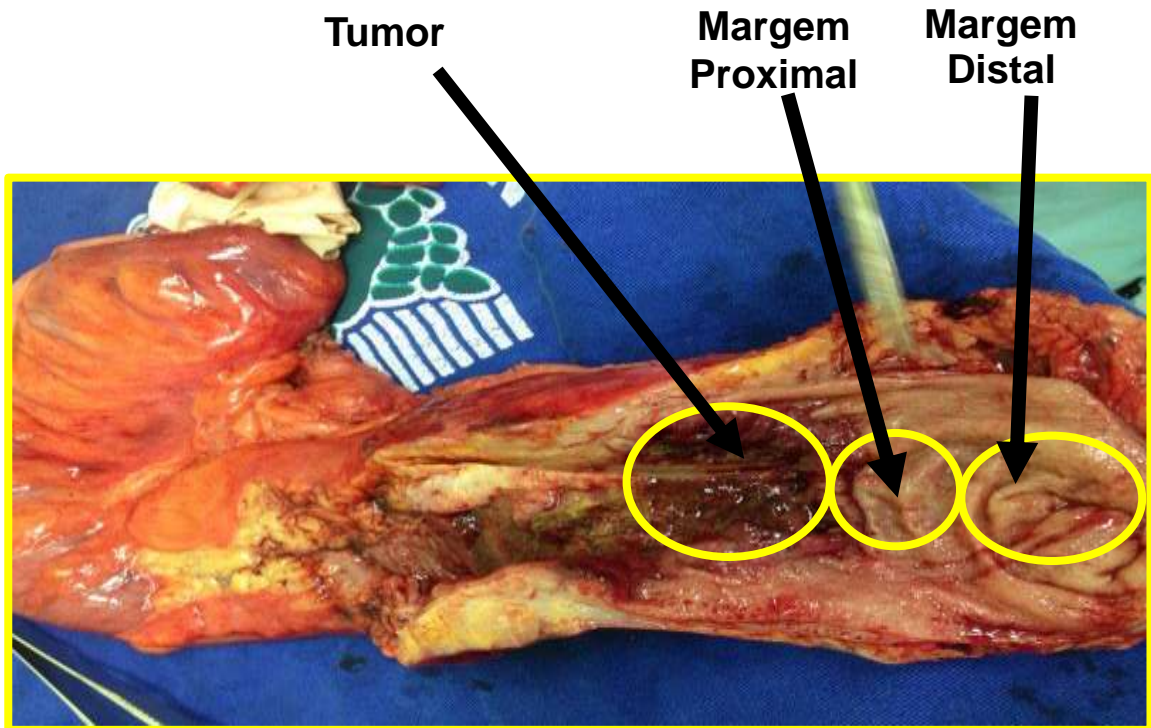


Figura 14 - Segmento de reto sigmóide obtido a partir do ato cirúrgico. Nesta, o tecido foi dividido em tumor, margem proximal (2 cm) e margem distal (5 cm).
FONTE: Próprio autor

4.2. CRITÉRIOS

❖ Critérios de inclusão

- Pacientes com cânceres colorretal, diagnosticados através de biópsia realizada por colonoscopia, tendo como diagnóstico histológico adenocarcinoma; e que tivessem indicação cirúrgica pelo corpo clínico da fundação CECOM.
- Pacientes maiores de idade que concordaram em participar da pesquisa e independente do sexo.
- Pacientes que assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).
- Pacientes que concordaram em responder o questionário clínico.

❖ Critérios de exclusão

- A ocorrência prévia ou atual de doenças, tais como, HIV ou vírus da hepatite B ou C, e outros tipos de carcinomas, que possam interferir nas análises.
- Pacientes menores de idade.
- Pacientes que não concordaram em participar do estudo por motivo pessoal.
- Pacientes que não assinaram o TCLE e nem responderam ao questionário clínico.

4.3. ANÁLISE ANATOMOPATOLÓGICA

A análise anatomopatológica foi realizada na Fundação de Centro de Controle de Oncologia (FCECON) pelos patologistas do próprio hospital.

4.3.1. Fixação dos tecidos

Após a obtenção da peça cirúrgica, pequenos fragmentos da área da lesão e das margens foram fixados e, para isso, foi empregada a solução de formol tamponado 10%. Para o preparo da solução de fixação foram utilizados os seguintes reagentes nas concentrações finais: formaldeído 4% (v/v), fosfato de sódio monobásico monohidratado 0,4% (m/v), fosfato de sódio dibásico anidro 0,6% (m/v) e água. A fixação ocorreu no período de 24 a 48h.

4.3.2. Desidratação, Inclusão e Microtomia (corte em fatias finas)

Após a fixação com a solução aquosa de formalina, os tecidos foram desidratados, uma vez que a água presente nos tecidos não é miscível

Materiais e Métodos

em substâncias apolares como a parafina. A desidratação foi feita através de imersão numa bateria de soluções alcoólicas em concentrações graduais e crescentes, sendo estas 70%, 80%, 90% e 100%. A inclusão em parafina foi precedida pelo uso de substâncias químicas como o xilol. Após a remoção do álcool, o tecido passou por uma infiltração em parafina líquida, esta mantida em estufa a 56°C e, posteriormente, o mesmo foi transferido para o molde contendo parafina líquida. Após alguns minutos a parafina foi endurecida e foi obtido o "bloco" de parafina contendo o fragmento do tecido em seu interior.

Os blocos foram levados para a microtomia e conseqüente obtenção das secções, que foram então coletadas em lâminas de vidro. No caso de inclusão em parafina, após a microtomia, o tecido foi tratado com xilol novamente para remoção da parafina e reidratado, para que fosse submetido à coloração.

4.3.3. Coloração com Hematoxilina-Miosina (HE)

Foi empregada como corante a hematoxilina, que cora geralmente as estruturas em azul, incluindo a heterocromatina, nucléolo, RNA ribossômico, matriz extracelular da cartilagem. Para corar outras estruturas, tais como o citoplasma, filamentos citoplasmáticos e fibras extracelulares foi usado a eosina, que cora as estruturas em vermelho ou rosa.

4.3.4. Montagem de lâminas

Após a coloração as lâminas foram montadas, ou seja, os fragmentos foram protegidos pela cobertura com lamínulas de vidro. Esta foi colada na lâmina através de substâncias selantes como por exemplo o Entellan. Após a secagem, as lâminas foram observadas ao microscópio de luz.

4.4. PARTE 1: EPIGENÉTICA

4.4.1. Extração de DNA

A extração do material genético foi realizada no laboratório de Genômica e Proteômica da Universidade do Estado do Amazonas (UEA). Treze biópsias foram pulverizadas com nitrogênio líquido e os DNAs de cada amostra foram extraídos utilizando o *Kit InnuPrep Forensic* (Biometra, Alemanha), seguindo as recomendações do fabricante. Resumidamente, após a pulverização das amostras, estas foram lisadas com a adição de 400 µL de solução de lise TLS, incubadas a 50 °C por 2:30 h. Após centrifugação a 10.000 x g por 1 min, foi adicionado 400 µL da solução de TBS ao sobrenadante lisado e este foi misturado vigorosamente até a obtenção de uma mistura homogênea. As amostras foram aplicadas em um “*spin filter*” e centrifugadas por 2 min a 10,000 x g. Posteriormente, cada amostra retida na coluna foi lavada com 500 µL de solução HS, centrifugada por 1 min a 10,000 x g e, lavada com a solução MS. Centrifugou-se novamente por 1 min a 10.000 x g. Por último, o DNA foi eluído com 30 µL de tampão de eluição (TE) e estocado a -20 °C até a etapa seguinte.

4.4.2. Tratamento com Bissulfito

Os DNAs foram quantificados utilizando *NanoDrop* 2000 (Thermo, EUA), de acordo com as instruções do fabricante. Dois microgramas (2 µg) de DNA, de cada amostra, foram utilizados para um volume final de 20 µL de reação para o tratamento com bissulfito de sódio, conforme descrito pelo fabricante do kit *EZ DNA Methylation-Lightning* (Sinapse, Alemanha). De maneira simplificada, 130 µL de *Lightning Conversion Reagent* foram adicionados aos 20 µL contendo DNA. Estes foram vortexados e incubados no termociclador (*Mastercycler Gradient, Eppendorf*) com as seguintes condições: 98°C por 8 min, 54°C por 60 min e 4°C por 10 minutos. Após a transferência da amostra para a coluna, adicionou-se 600 µL do *M-Binding Buffer*, misturou-se e centrifugou por 30s a 10.000 x g. Na sequência, o sobrenadante foi descartado e adicionou-se 100 µL de *M-Washing Buffer*. Centrifugou-se novamente por 30s a 10,000 x g e 200 µL de *L-Dessulphonation Buffer* foram adicionados. As amostras foram incubadas a temperatura ambiente por 20 min e centrifugadas por 30s a 10,000 x g. Outra lavagem foi feita com 200 µL de *M-Washing Buffer* e, em seguida, centrifugou-se novamente por 30s a 10,000 x g. Finalmente, em um novo microtubo, o DNA modificado foi eluído da coluna com 13 µL de *M-Elution Buffer*.

4.4.3. PCR específica para metilação (MSP)

Os DNAs modificados foram amplificados pela reação em cadeia pela polimerase (PCR) específica para metilação (MSP), utilizando os *primers* de genes supressores tumorais *DAPK*, *TIMP2*, *DAPK* e *CDKN2A* já descritos anteriormente (Graff et al., 1997; Ivanova et al., 2004; Rosas et

Materiais e Métodos

al., 2001). O tratamento com bissulfito, realizado na etapa anterior - 4.3.2, resulta na conversão de citosinas não metiladas em uracil, deixando as citosinas metiladas intactas. Assim, para detectar essas alterações, iniciadores específicos, listados na Tabela 2, foram usados.

Para as análises por PCR, foram usados 4 µL de DNA modificado com bissulfito, em um volume final de 12,5 µL de reação contendo uma mistura de PCR buffer 1X, MgCl₂ 1,25mM, 0,2mM dNTPs, 0,4 µM de cada iniciador e 0,3U de Taq Polimerase (5U/µL). As reações foram realizadas em um termociclador da *Mastercycler Gradient* (Eppendorff) seguindo os seguintes parâmetros: 96°C por 1 min, seguida do ciclo de 35 vezes a 94°C por 1 min, temperatura de anelamento de 55°C por 1 min para todos os genes, 72°C por 1 min e uma temperatura de extensão de 72°C por 7 min.

Tabela 2 - Iniciadores utilizados na reação em cadeia pela polimerase específica para metilação.

Genes	Iniciadores senso	Iniciadores antisenso	Referência
<i>TIMP2</i> não metilado	5'-TTTGGTGT TTTTGAAGAATGGGTG	5'-CCAACCCCAATCCCCACTACA	Ivanova et al., 2004
<i>TIMP2</i> metilado	5'-TTTGGT GT TTTTGAAGAACGGGCG	5'-CGACCCCGATCCCCGCTACG	Ivanova et al 2004
<i>CDKN2A</i> não metilado	5'-TTATTAGAGGGTGGGGTGGATTGT-3'	5'-CAACCCCAAACCACAACCATAA-3'	Rosas et al., 2001
<i>CDKN2A</i> metilado	5'-TTATTAGAGGGTGGGGCGGATCGC-3'	5'-ACCCCGAACC GCGACCGTAA-3'	Rosas et al., 2001
<i>DAPK</i> não metilado	5'-GGAGGATAGTTGGATTGAGTTAATGTT-3'	5'-CAAATCCCTCCCAAACACCAA-3'	Rosas et al., 2001
<i>DAPK</i> metilado	5'-GGATAGTCGGATCGAGTTAACGTC-3'	5'-CCCTCCCAAACGCCGA-3'	Rosas et al., 2001
<i>CDH1</i> não metilado	5'-GGTAGGTGAATTTT TAGTTAATTAGTGGT-3'	5'-ACCCATAACTAACC AAAAAACACCA-3'	Graff et al., 1997
<i>CDH1</i> metilado	5'-GGTGAATTTT TAGTTAATTAGCGGTAC-3'	5'-CATAACTAACC GAAAAACGCCG-3'	Graff et al., 1997

4.4.4. Gel de poliacrilamida 10% revelado por nitrato de prata

O produto resultante da PCR foi analisado por eletroforese em gel de poliacrilamida 10%, o qual foi corado pela prata (Bassam & Gresshoff, 2007) conforme descrito abaixo. A matriz do gel foi feita de acordo com a Tabela 3.

Tabela 3 - Reagentes utilizados no gel de poliacrilamida 10%.

Reagentes	Quantidades (mL)
Acrilamida/Bisacrilamida 30:0,8	1,66
TBE 5X	1
Água	2,22
Persulfato de amônio 10%	0,12
TEMED	1,33
Volume Final	5mL

TBE = tampão Tris/Borato/EDTA

Resumidamente, cerca de 10 μ L de produto de PCR foi aplicado no gel misturado com 3 μ L de Ficoll (0,25% de azul de bromofenol), onde este foi submetido a 90 V por 90 minutos. Foi utilizado o tampão de corrida TBE 1x. Após o término da corrida, o gel foi corado pela prata, sendo primeiramente colocado na solução 1 (etanol 10%, ácido acético 1%) e incubado por 10 minutos. Posteriormente, o gel foi colocado na solução 2 (0,2% de nitrato de prata) durante aproximadamente 20 segundos. Lavou-se o gel rapidamente com 50 mL de água e incubou-se por 10 minutos. Para a revelação do gel, foi usado 50 mL de solução NaOH 3% contendo 1% de formaldeído. A reação foi parada com a solução 1 (etanol 10%, ácido acético 1%) e o gel foi digitalizado.

4.5. PARTE 2: ESTUDO PROTEÔMICO UTILIZANDO QUANTIFICAÇÃO RELATIVA E ABSOLUTA POR MARCAÇÃO COM ISÓBAROS (iTRAQ)

Os experimentos desenvolvidos nessa parte do estudo foram realizados na Unidade Proteômica, Departamento de Bioquímica do Instituto de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), no laboratório de responsabilidade do Prof. Gilberto Domont e supervisão experimental da Dra. Priscila Aquino. Nesta etapa, foram selecionados quatro pacientes com diagnóstico de câncer colorretal e foram utilizados tecidos de tumor e as respectivas margens de ressecção situadas a 5 cm do tumor.

4.5.1. Pulverização do tecido, extração e dosagem de proteínas

Cada biópsia foi pulverizada com nitrogênio líquido e solubilizada em 200 µL de *RapiGest*® (Waters) a uma concentração final de 0,2% (p/v). Depois, as amostras foram submetidas a um vórtex por vinte segundos e centrifugadas a 4 °C, por 30 min, a 20.800 x g. Retirou-se os sobrenadantes e a quantificação de proteínas foi realizada pela espectroscopia de fluorescência, utilizando o Qubit® (*Invitrogen*), de acordo com as instruções do fabricante.

4.5.2. Digestão trípica

Inicialmente, adicionou-se TEAB (bicarbonato de trietilamônio) a 50 mM para que a concentração final nas amostras ficasse a 0,1%, (v/v), a qual é recomendada para a digestão em solução pelo fabricante. Em seguida, as amostras foram reduzidas com tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP) a uma concentração final de 20 mM. As amostras foram incubadas a 60 °C durante 30 minutos. Na sequência, as amostras foram resfriadas à temperatura ambiente por quinze minutos e estas foram

Materiais e Métodos

alquiladas com iodoacetamida a uma concentração final de 66,7mM, por 30 minutos a temperatura ambiente e protegida da luz. Usando papel de tornassol, o pH das amostras foi verificado, nos quais estes deveriam manter-se entre 7,5 e 8,5 para uma maior eficiência da reação. Caso fosse necessário ajustar o pH, foi adicionado TEAB e, então, foi adicionado tripsina (Promega) na proporção 1/50 (E/S) enzima/substrato. As amostras foram incubadas a 37 °C por 20h. No dia seguinte, para a finalização da reação e remoção do *RapiGest*, foi adicionado ácido trifluoracético (TFA) para uma concentração final de 0,5% e as amostras foram incubadas por 40 minutos à temperatura ambiente. Por fim, os peptídeos foram centrifugados a 5 °C por 30 minutos a 20.800 x g, para a remoção de qualquer partícula insolúvel. O sobrenadante foi retirado para continuar os experimentos e o *pellet* descartado.

4.5.3. Dessalinização

As oito amostras foram dessalinizadas utilizando colunas *Macro Spin* (Capacidade: 70-150 µL). O protocolo para a utilização dessas colunas *Macro Spin (Harvard Apparatus)* foi realizado de acordo com as instruções do fabricante. Resumidamente, a coluna foi hidratada com 300µL de acetonitrila 100% por duas vezes e centrifugou-se a 2.000 x g durante 3 min a 25 °C, onde foi descartado o líquido presente no fundo do tubo. Em seguida, a coluna foi equilibrada com 300 µL de TFA 1% e centrifugou-se a 2000 x g durante 3 min a 25 °C, sendo esse processo repetido três vezes. Posteriormente, adicionaram-se as amostras, que estava em TFA 0,5% nas colunas e estas foram centrifugadas a 2000 x g durante 3 min a 25 °C. As colunas foram lavadas cinco vezes com 60 µL de TFA 0,1%. Os

peptídeos foram eluídos com 80 µL da solução de TFA 0,1% + 70% de acetonitrila. Por fim, as amostras foram secas no *Speed Vacuum* (*Thermo Fisher Scientific*).

4.5.4. Dosagem de peptídeos para a marcação com iTRAQ

Os peptídeos dessalinizados foram ressuspensos em 50µL de TEAB 50mM e quantificados através do método fluorimétrico - *Qubit 2.0*® (*Invitrogen*), de acordo com as instruções do fabricante.

4.5.5. Marcação dos peptídeos com iTRAQ 8 plex.

Os reagentes do iTRAQ 8plex foram preparados de acordo com as recomendações do fabricante. Brevemente, os marcadores isobáros (*tags*) foram colocados à temperatura ambiente por dez minutos e, em seguida, adicionou-se 100µL de isopropanol em cada um dos marcadores, mantendo a concentração orgânica superior a 66% (v/v). Posteriormente, fez-se um vórtex e centrifugou a 15.800 x g por 15 segundos a 25°C. Uma normalização foi feita e vinte microgramas (20 µg) de cada amostra foram marcados, totalizando ao final 160µg. A marcação de cada amostra ocorreu de acordo com a Tabela 4.

Tabela 4 - Desenho experimental usado para marcação de cada amostra empregada nessa parte do estudo.

Número da amostra	Tipo da amostra	Número do paciente	iTRAQ
1	Tumor	1	113
2	Margem de ressecção a 5 cm	1	114
3	Tumor	2	115
4	Margem de ressecção a 5 cm	2	116
5	Tumor	3	117

Materiais e Métodos

6	Margem de ressecção a 5 cm	3	118
7	Tumor	4	119
8	Margem de ressecção a 5 cm	4	121

Após a transferência de cada reagente para a respectiva amostra, centrifugou-se a 15,800x g por 2 min a 25°C, ajustando o pH para aproximadamente 8,0 com TEAB 1M. Incubou-se as amostras a temperatura ambiente por 2 horas e estas foram reunidas em um único tubo. Por último, os peptídeos marcados foram concentrados até um volume aproximado de 26 µL com o auxílio do *Speed Vacuum* (Thermo Fisher).

4.5.6. Cromatografia de troca iônica (SCX)

a) Preparo da coluna Macro Spin

Foram utilizadas colunas *Macro Spin* de SCX (*Harvard Apparatus*) conforme recomendações do fabricante. Resumidamente, as colunas foram hidratadas com 300 µL da solução A (K_2PO_4 10mM em 25% de acetonitrila em H_2O , pH 3) por dez min a temperatura ambiente e centrifugadas a 2300 x g por 3 min a 25 °C. O processo de hidratação e centrifugação foram repetidos por duas vezes.

b) Aplicação da amostra

A amostra foi ressuspensa na solução A e aplicada na SCX *macro spin column* (*Harvard Apparatus*) e centrifugada por três minutos a 2300 x g a 25 °C. Aplicou-se novamente a amostra que passou através da coluna e centrifugou nas mesmas condições usadas anteriormente.

c) Passos salinos de KCl

Os peptídeos foram fracionados com quatro passos salinos de cloreto de potássio, ou seja, 75mM, 150mM, 250mM e 400mM. Cada fração foi coletada individualmente em microtubos previamente identificados e concentrada no *Speed Vacuum*.

d) Dessalinização dos peptídeos

A dessalinização dos peptídeos resultantes da SCX, foi realizada em mini-colunas feitas em um tipo de 200 µL e empacotadas com a resina Poros® R2 (*Applied Biosystems*). Inicialmente, as mini-colunas foram ativadas com 60µL de acetonitrila 100% (3 vezes), e em seguida equilibrada com TFA 1%. Posteriormente, os peptídeos foram aplicados na coluna e esta foi lavada com 60µL de TFA 0,1% (5 vezes). A eluição dos peptídeos ocorreu com 40µL de TFA 0,1% em acetonitrila 70% (2 vezes). As amostras foram concentradas em um *Speed Vacuum*. Os peptídeos resultantes foram ressuspensos em 20 µL de ácido fórmico 0,1% e quantificados pelo método de *Qubit® 2.0 Fluorometer*, de acordo com as instruções do fabricante.

4.5.7. Análise por nano-cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa (nLC-MS / MS)

Cada fração obtida da SCX foi submetida a uma cromatografia de fase reversa independentemente. Nesta, utilizou-se um sistema de nanocromatografia, o *Easy-nLC II (Proxeon)*, e como fase estacionária, empregou-se a resina *Reprosil Pur C18Acqua* com esferas de 5µm (pré-coluna) 3 µm (coluna) de diâmetro e tamanho de poro 120 Å (Dr. Maisch), empacotada em pré-coluna e coluna de 2 e 20 cm de comprimento

Materiais e Métodos

e diâmetro interno de 200 e 75 µm, respectivamente. Para a eluição dos peptídeos, foi usado um gradiente de fase orgânica variando de 5-40% da fase B (95% de acetonitrila em 0,1% de ácido fórmico) durante 107 minutos, seguido de 40-95% da mesma fase móvel por treze minutos com fluxo de 200 nL/min diretamente acoplado ao espectrômetro de massas LTQ Orbitrap Velos (*Thermo Fischer Scientific*). Os espectros foram obtidos no modo *data dependent acquisition* (DDA), alternando automaticamente entre a aquisição *full scan* MS e MS/MS, e com exclusão dinâmica de 60 s. Os dez picos mais intensos com cargas 2+ e 3+ foram selecionados, isolados após a varredura no MS em alta resolução (60000 a m/z 400) e, sequencialmente, fragmentados por dissociação por colisão em alta energia (*Higher-energy collisional dissociation*-HCD), usando uma energia de colisão normalizada de 40. No espectrômetro de massas, foram empregados os parâmetros descritos a seguir: voltagem no *spray* de 1,80 kV, fluxo zero de *sheat* e *auxiliary gas*, uma temperatura de 220 °C no capilar aquecido, a habilitação de *predictive automatic gain control* (AGC) e um nível de 69% de RF na *S-lens*, sendo as funções de *scan* do espectrômetro de massas e os gradientes dos solventes no nLC controlados pelo programa *X-Calibur 2.0* (*Thermo Fischer Scientific*).

4.5.8. Análise de dados

Todas as etapas da análise de dados foram realizadas mediante o uso de ferramentas da plataforma *PatternLab for proteomics 4.0* (Carvalho et al., 2016) e estão ilustradas na Figura 15.

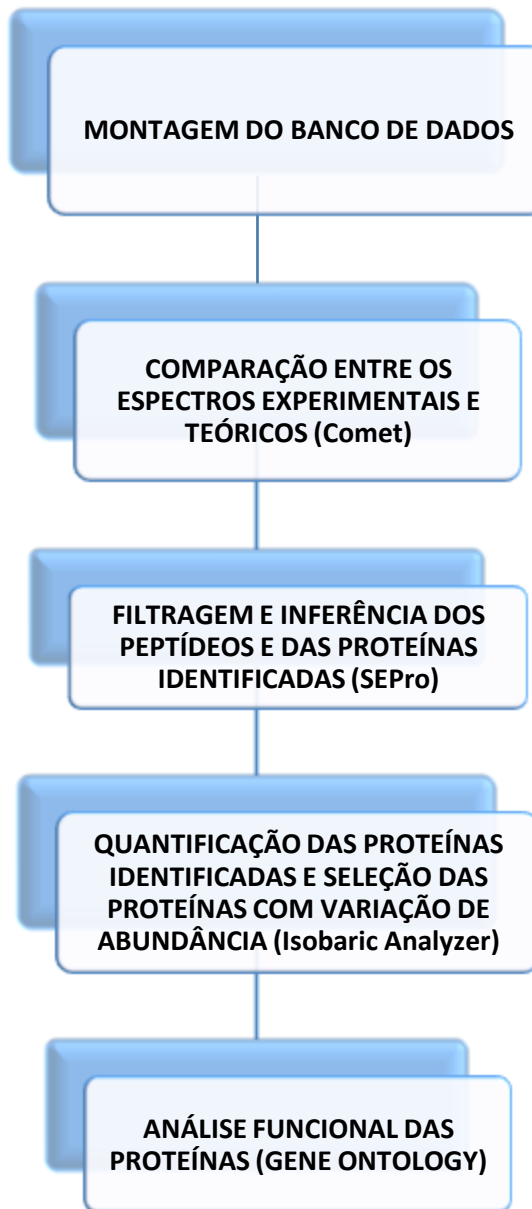


Figura 15 - Fluxograma das etapas empregadas para análise dos dados obtidos.

4.8.8.1. *Peptide Spectrum Match* - PSM.

Para aumentar a confiança da análise, inicialmente foi gerado um banco de dados através da abordagem “*target decoy*” contendo sequências de *Homo sapiens* obtidas do UniProt (<http://www.uniprot.org>) em 2 de abril de 2015 e também sequências de 127 contaminantes comuns a espectrometria de massa (e.g. queratinas).

Materiais e Métodos

A ferramenta de busca, *Comet*, foi utilizada para selecionar os candidatos mais prováveis, através da abordagem PSM (*Peptide Spectrum Match*). Nesta, é feita uma comparação entre os espectros teóricos obtidos a partir do banco de dados gerado anteriormente, e os espectros experimentais oriundos do espectrômetro de massas; aquele que apresentar a maior semelhança, será o PSM.

A busca foi limitada a candidatos de peptídeos semi-trípticos e considerou a carbamidometilação de cisteína e as modificações de iTRAQ no N-terminal e lisina como modificações fixas e a modificação de iTRAQ na tirosina como variável. O mecanismo de busca aceitou até 35 *ppm* da tolerância de massa do precursor, os picos dos espectros de massa em tandem foram armazenados a 0,02 *m/z* eo XCorr foi utilizado como métrica de similaridade.

4.8.8.1.1. Validação de PSMs.

A validação dos PSMs foi realizada pela ferramenta *Search Engine Processor (SEPro)* (Carvalho et al., 2012). Resumidamente, as identificações foram agrupadas em quatro grupos distintos, de acordo com a carga do precursor e o estado tríptico. Para cada grupo, os valores de XCorr, DeltaCN, DeltaPPM e picos correspondentes foram usados para criar um discriminador *Bayesiano*, e as identificações foram relatadas em uma ordem crescente dos valores discriminantes. Este procedimento foi realizado de forma independente em cada subconjunto de dados, estabelecendo um valor de corte (*i.e.* FDR 1%) para que a lista final de identificações tivesse até 1% de *falso positivos*. Além disso, foi considerado apenas sequências com seis ou mais aminoácidos, os resultados foram

pós-processados para aceitar apenas PSMs com menos que 5 ppm e um valor mínimo de XCorr de 1,90 foi fixado na análise. Identificações com XCorr menor que 2,5 foram desprezadas. De maneira que tais filtros levaram a um FDR de 0% nos resultados.

4.8.8.1.2. Quantificação Relativa de Proteínas

Após a obtenção de uma lista de identificações confiáveis, foi feita a desconvolução dos espectros multiplex, utilizando as configurações padrão do YADA (Carvalho et al., 2009). Esse procedimento foi realizado para evitar a quantificação errônea de íons repórteres que se misturam com peptídeos que co-fragmentam dentro da mesma janela de isolamento no MS1, gerando assim íons no espectro de MS2 com intensidade relativa bem próxima. Logo, com a desconvolução, gerou-se um conjunto de arquivos MS2 corrigidos, onde os espectros multiplex foram descartados. Em seguida, foi feita a análise quantitativa utilizando o módulo de quantificação *Isobaric Analyzer* contido no P.L 4.0 (Carvalho et al., 2016). Neste, os dados obtidos dos sinais dos íons marcadores característicos do iTRAQ 8-plex, foram normalizados; isto é, foi feita a soma dos sinais de todos os espectros para cada canal (ou seja, para cada marcador isóbaro) e, posteriormente, o valor normalizado para cada espectro, foi gerado através da divisão do sinal de cada íon marcador pela soma do canal correspondente (Aquino et al., 2016).

Na análise comparativa, foram consideradas apenas proteínas identificadas com dois ou mais peptídeos únicos (ou seja, peptídeos que mapeiam para uma única sequência no banco de dados), um teste *t* pareado com *p*-valor menor ou igual a 0,05; e um *ln fold change* com valor

Materiais e Métodos

absoluto maior que 0,30 (Carvalho et al., 2016). A partir disso, foram apontadas proteínas diferencialmente abundantes para cada condição biológica estudada (*i.e.* tumor e margem de ressecção a 5cm). Para auxiliar na interpretação dos dados, o módulo *Gene Ontology Explorer*, integrado no PL. 4.0, e o *STRING* 10 (<http://string-db.org/>) foram utilizados, a fim de explorar as características diferenciais e as possíveis interações funcionais das proteínas identificadas.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

No presente trabalho, amostras de tecidos de câncer colorretal, com diagnóstico de adenocarcinoma, e suas respectivas margens de ressecção (proximal e distal), foram coletadas. As características clínicas dos pacientes incluídos no estudo estão resumidas na tabela 5 e foram obtidas através das informações contidas no questionário clínico e na análise anatomopatológica de cada paciente. Todos os pacientes apresentaram as margens cirúrgicas livres de neoplasia, de acordo com o exame anatomopatológico. A idade dos pacientes variou entre 40 a 74 anos, com uma mediana de 61,5 anos.

Resultados e Discussão

Tabela 5 - Dados clínicos dos pacientes incluídos no estudo.

PACIENTE	IDADE	SEXO	HISTÓRICO FAMILIAR DE CÂNCER	GRAU DE PARENTESCO/ TIPO CÂNCER	FUMA	BEBE	TIPO DE CÂNCER	SUBTIPO HISTOLÓGICO	ESTADIAMENTO Tumor- Nódulo- Metástase (TMN)
1	61	M	sim	Irmã/útero	não	não	Reto	Adenocarcinoma de alto grau	T3N0M0
4	65	M	sim	Irmã / útero	sim	sim	Reto	Adenocarcinoma mucinoso	T3N0M0
6	60	F	sim	Pai/próstata	não	não	Cólon	Adenocarcinoma moderadamente diferenciado	T2N1M0
7	40	M	sim	Mãe/útero; tio/pulmão e garganta	não	sim	Cólon	Adenocarcinoma moderadamente diferenciado	T3N0M0
8	74	F	sim	Irmã/reto; tia/estomago; prima/útero e mama	não	não	Reto	Adenocarcinoma moderadamente diferenciado	T4N2M0
9	62	M	sim	Mãe/bexiga; avó/estômago;	sim	sim	Reto	Adenocarcinoma moderadamente diferenciado	T3N1M0

Legenda: M: masculino F: feminino.

5.1. EPIGENÉTICA

A primeira etapa do estudo foi avaliar o estado de metilação dos genes supressores de tumor *CDH1*, *DAPK*, *CDKN2A* e *TIMP2* nas amostras selecionadas de seis pacientes. A integridade do DNA total extraído de cada amostra foi confirmada a partir do gel de agarose 1%, mostrado na Figura 16.

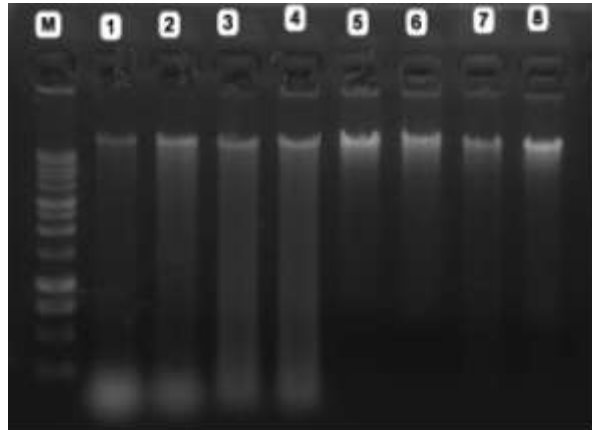


Figura 16. Visualização do gel de agarose 1% de alguns DNA extraídos de tecidos colorretais. **M:** Marcador molecular 1Kb; **1:** Paciente 1 - tumor; **2:** Paciente 1 - Margem distal; **3:** Paciente 4 Tumor; **4:** Paciente 4 - Margem Distal; **5:** Paciente 8 - Tumor; **6:** Paciente 8 - Margem Distal; **7:** Paciente 9 - Tumor; **8:** Paciente 9 Margem Distal.

A quantificação do DNA de cada amostra foi realizada pelo *Nanodrop 2000* (*Thermo Scientific*), com absorvância a 260nm. As amostras que não apresentaram um valor mínimo dentro do limite de detecção do equipamento, foram descartadas. Na Tabela 6, encontra-se as amostras que tiveram uma quantificação superior a 0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, e que foram utilizadas nas etapas subsequentes de reação em cadeia pela polimerase específica para metilação.

Resultados e Discussão

Tabela 6- Resultado da quantificação de DNA utilizando Nanodrop 2000.

NºPaciente/ amostra	Quantidade DNA (µg/µL)
4 T	1,05
4 MP	0,73
4 MD	0,65
7 T	2,5
7 MP	1,13
7 MD	1,06
8 T	1,2
8MD	1,23
1T	1,04
1MD	1,22
9T	1,05
9MD	0,97
6 T	1,28

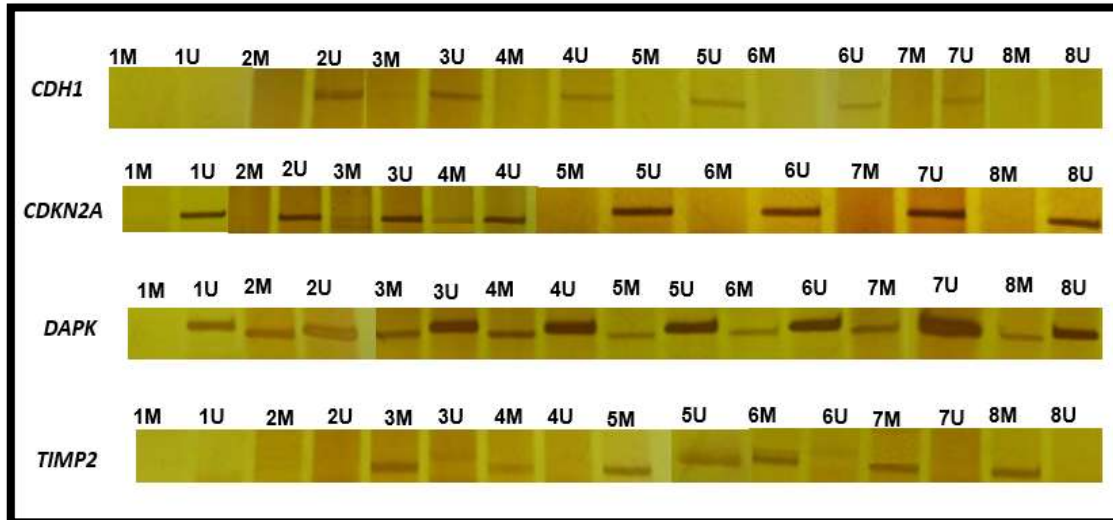
Legenda: T= tumor; MP = margem proximal; MD= margem distal

Na análise sobre o padrão de metilação dos genes estudados, verificou-se que a presença de metilação ocorreu em todos os estágios TMN analisados e, pelo menos, um gene estava metilado por amostra (Tabela 7). Na figura 17, tem-se uma visualização representativa do padrão de metilação observado em algumas amostras através gel de eletroforese. Nesse tipo de PCR específica para metilação, foram feitas duas reações utilizando o DNA modificado por bissulfito de sódio; assim, foram utilizados dois tipos de iniciadores diferentes, sendo um específico para amplificar as regiões de metilação (canaletas descritas como M na Figura 17), e outro específico para regiões não metiladas

Resultados e Discussão

(canaletas descritas como U na Figura 17), sendo este último utilizado também como controle positivo no experimento.

Figura 17. Imagem representativa do gel de eletroforese para reação específica para metilação (MSP) dos genes *CDH1*, *DAPK*, *CDKN2A*, e *TIMP2* em algumas amostras estudadas. M e U



correspondem a reações metiladas e não metiladas (controle), respectivamente. Canal 1: Tumor paciente 1; Canal 2: Controle tumor paciente 1; Canal 3: Margem distal do paciente 1; Canal 4: Controle margem distal do paciente 1; Canal 5: Tumor do paciente 4; Canal 6: Controle tumor do paciente 4; Canal 7: Margem distal paciente 4; Canal 8: Controle Margem distal paciente 4; Canal 9: Tumor paciente 8; Canal 10: Controle tumor paciente 8; Canal 11: Margem distal paciente 8; Canal 12: Controle margem distal paciente 8; Canal 13: Tumor paciente 9; Canal 14: Controle tumor paciente 9; Canal 15: Margem distal do paciente 9; Canal 16: Controle margem distal do paciente 9.

Um resumo dos resultados da metilação dos genes está descrito na tabela 7. De maneira geral, verificou-se que a metilação nos genes *CDH1*, *CDKN2A*, *DAPK* e *TIMP2* foi 4/13 (30,8%), 4/13 (30,8%), 11/13 (84,6%) e 11/13 (84,6%), respectivamente. As amostras 4T e 4MP estavam metiladas para os quatro genes analisados. Todas as margens distais e proximais se apresentaram metiladas para os genes *DAPK* e *TIMP2*, exceto a margem distal da amostra 1 para *TIMP2* que não amplificou. A amplificação do gene *CDH1* nas amostras de 1T, 9MD e 6T não ocorreram e o perfil de metilação não pode ser analisado. O mesmo ocorreu nas amostras 1T e 1MD para o gene *TIMP2*. Mediante tais resultados, observou-se que cada paciente demonstrou um perfil

Resultados e Discussão

de metilação, ressaltando a importância de se estudar as características únicas de cada paciente.

Tabela 7 - Perfil de metilação dos genes *CDH1*, *CDKN2A*, *DAPK* e *TIMP2* nas amostras estudadas.

Nº Paciente/ amostra	Metilação			
	<i>CDH1</i>	<i>CDKN2A</i>	<i>DAPK</i>	<i>TIMP2</i>
4T	M	M	M	M
4 MP	M	M	M	M
4 MD	U	M	M	M
7T	U	U	U	M
7MP	M	U	M	M
7MD	M	U	M	M
8T	U	U	M	M
8MD	U	U	M	M
1T	NA	M	M	NA
1MD	U	U	M	NA
9T	U	U	M	M
9MD	NA	U	M	M
6T	NA	U	U	M

Legenda: NA: não amplificou; U: não metilado; M: metilado; T: tumor; MP: margemproximal (2 cm); MD: margemdistal (5 cm)

Segundo a literatura, a prevalência de hipermetilação nos genes *CDH1*, *CDKN2A*, *DAPK* e *TIMP2* em tumores colorretais foi relatada em diferentes estudos utilizando várias técnicas (Konishi et al., 2011; Li et al., 2011; Petko et al., 2005). Li e colaboradores utilizaram a MSP-PCR para investigar a metilação do promotor do gene *CDH1* e avaliaram a sua relação na expressão de E-caderina para correlacionar com características clínicas e patológicas do

Resultados e Discussão

carcinoma do cólon(Li et al., 2011). Os resultados desse estudo mostraram que 2,4% de tecidos adjacentes e 57,4% do tecido com câncer estavam metilados, enquanto que, por outro lado, não houve metilação nos tecidos normais. A metilação do promotor do gene *CDH1* pode conduzir a expressão aberrante de E-caderina. Nessa tese, 64% (18/28) das margens de ressecção estavam metiladas para os quatro genes e 58% (14/24) do tumor estavam metilados.

A metilação de *CDKN2A*, para pacientes com CCR, é um resultado já descrito anteriormente (Coppedè et al., 2014) e no presente estudo 30,7% (4/13) das amostras estavam metiladas para este gene. Um estudo anterior reportou que 18,3% do gene *CDKN2A* avaliado apresentou metilação (Sanz-Casla et al., 2005). Outro estudo observou que nos tecidos neoplásicos *CDKN2A* é frequentemente hipermetilado, o que efetivamente bloqueia a transcrição do gene e é funcionalmente equivalente a deleção do gene (Sanchez-Cespedes et al., 2000).

Em nossos resultados, o gene *DAPK* apresentou uma porcentagem de metilação de 84,6% (11/13). Este gene relacionado com a apoptose é frequentemente metilado em tumores, incluindo CCR(Hervouet et al., 2013; Kim et al., 2010). De acordo com Hervouet e colaboradores, há uma frequência de metilação de 80% para CCR(Hervouet et al., 2013). Dentre os genes avaliados, foi o que apresentou metilação em todas as margens de ressecção analisadas tanto proximais quanto distais, o que confirma alterações epigenéticas em margens de ressecção histologicamente livre de tumor. Uma vez que *DAPK* esteja metilado, a função anti-metastática pode ser perdida(Gozuacik & Kimchi, 2006). Portanto, pode-se sugerir que a metilação de *DAPK* seja um importante marcador para a invasão, metástase e processos

Resultados e Discussão

apoptóticos nas neoplasias colorretais e pode representar potenciais marcadores de prognóstico.

Similarmente a *DAPK*, a taxa de metilação total para *TIMP2* foi de 84,6% (11/13). As margens de resseção também estavam metiladas (85,7%) para o gene *TIMP2*, o que podemos sugerirum possível comprometimento dessa região, visto que tal gene está relacionado com a função de progressão do câncer, invasão e metástase (Park et al., 2011). Em adição, um estudo realizado por Galm et. al. (2005), detectou-se a presença de 36,7% de metilação desse gene em amostras de câncer colorretal (Galm et al., 2005). No presente estudo foram detectados 66% (4/6) das amostras tumorais estavam metiladas.

Vale ressaltar que um número maior de pacientes é necessário para tirar uma conclusão mais sólida sobre a importância destes marcadores no contexto da população do Amazonas. No entanto, nossos resultados mostram correlação com os trabalhos anteriores e tais resultados são fundamentais para permitir que futuros estudos de meta-análise, principalmente aqueles relacionados a obtenção de painéis de metilação, os quais possam auxiliar no diagnóstico personalizado do paciente (Tsang et al., 2014). Portanto, os resultados obtidos nesse estudo sugerem que a metilação do DNA também ocorre com frequência em regiões de tecido visualmente e histologicamente normais próximas ao tumor colorretal (2cm e 5cm), confirmando que esta alteração epigenética é um evento molecular precoce que pode contribuir para o desenvolvimento desta neoplasia.

5.2. PROTEÔMICA

Em decorrência da análise proteômica requerer um elevado tempo de máquina e apresentar altos custos, esta parte restringiu-se a quatro pacientes (1, 4, 8 e 9) com câncer de reto, sendo analisados, portanto, quatro tecidos de tumor e quatro tecidos da respectiva margem distal (5cm) de ressecção desses pacientes.

As proteínas foram quantificadas utilizando o ensaio fluorimétrico *Qubit®* e a quantidade proteica de cada amostra está descrita na tabela 8.

Tabela 8 - Quantificação das proteínas realizadas pelo método do Qubit® 2.0 Fluorometer.

Amostra	Descrição da amostra	Proteínas (µg/µL)	Volume final (µL)
1	Câncer Colorretal 1	11,1	124,6
2	Margem 1	2,72	78,6
3	Câncer Colorretal 2	3,84	104,8
4	Margem 2	3,60	95,0
5	Câncer Colorretal 3	2,82	180,2
6	Margem 3	4,22	68,8
7	Câncer Colorretal 4	3,58	96,4
8	Margem 4	3,32	69,6

Após a extração, redução e alquilação das proteínas, 100 µg de cada amostra foi digerida com tripsina conforme descrito em materiais e métodos. Na Tabela 9 encontra-se a quantificação dos peptídeos, a qual foi utilizada para a determinação da quantidade de cada amostra que seria usada na marcação com iTRAQ.

Tabela 9 - Quantificação dos peptídeos utilizando o método de Qubit® 2.0 Fluorometer.

Amostra	Descrição da amostra	Leitura (µg/µL)	Quantidade em µg de peptídeo
1	Câncer Colorretal 1	0,789	37,08
2	Margem 1	0,651	30,60
3	Câncer Colorretal 2	1,286	59,16
4	Margem 2	0,480	22,08
5	Câncer Colorretal 3	0,452	21,24
6	Margem 3	0,493	22,68
7	Câncer Colorretal 4	0,901	42,35
8	Margem 4	1,108	52,08

5.2.1. Análise dos dados obtidos com a tecnologia multidimensional de identificação de proteínas (MudPIT) *off-line*

As cinco frações das amostras obtidas da troca catiônica forte seguida de fase reversa apresentaram cromatogramas bem semelhantes ao mostrado na Figura 18. Além disso, foram observados os picos de massas 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 121 no espectro de MS2 confirmando que a marcação com o iTRAQ foi efetiva. A comparação de proteínas presentes em cada região (tumor e respectiva margem distal) foi realizada usando o programa *PatternLab for proteomics* 4.0.

Uma lista de 359 proteínas identificadas (Adendo 8.3.) foi adquirida a partir de análises de peptídeos únicos, isto é, a partir de peptídeos exclusivos para aquela proteína específica.

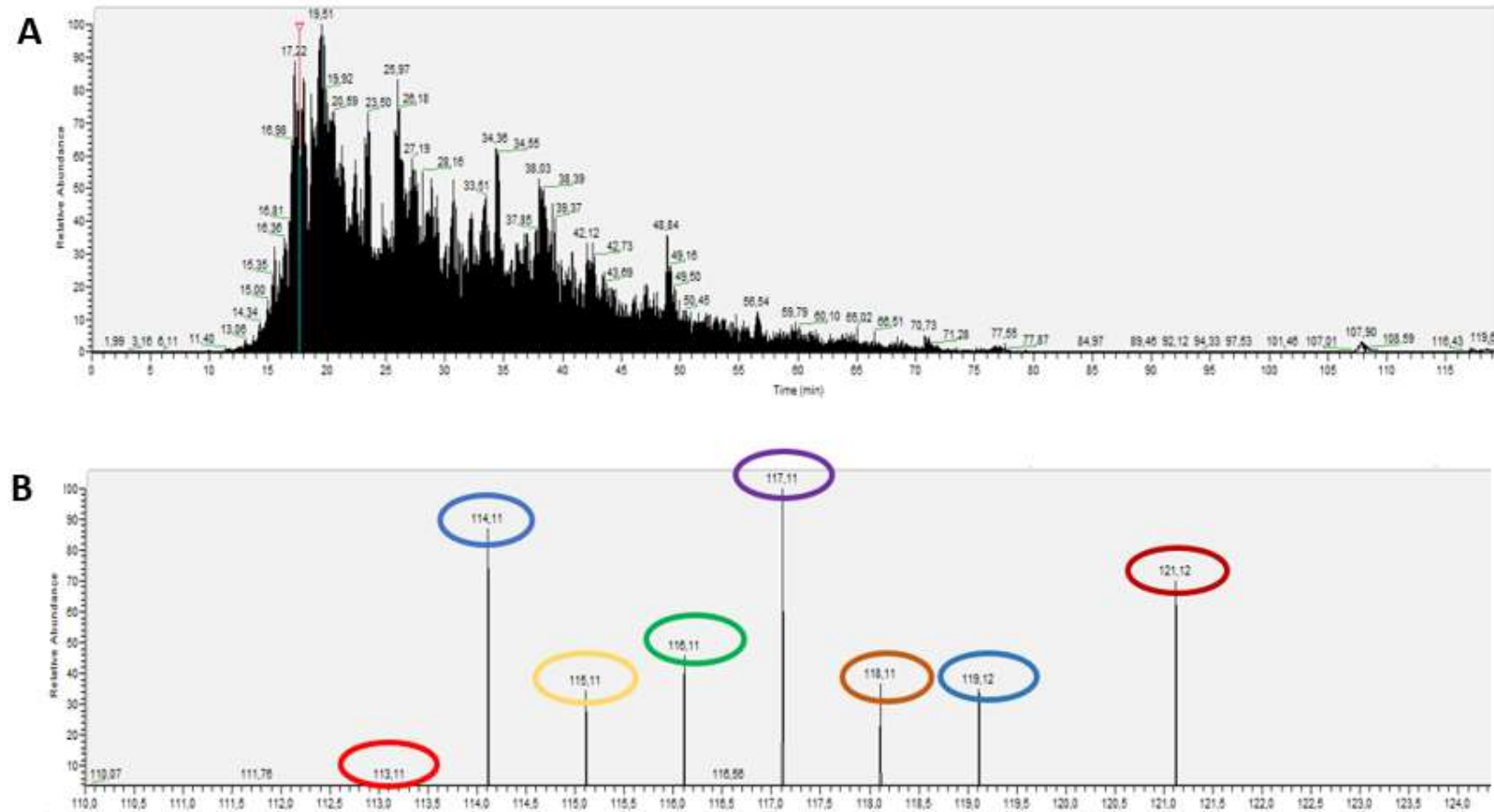
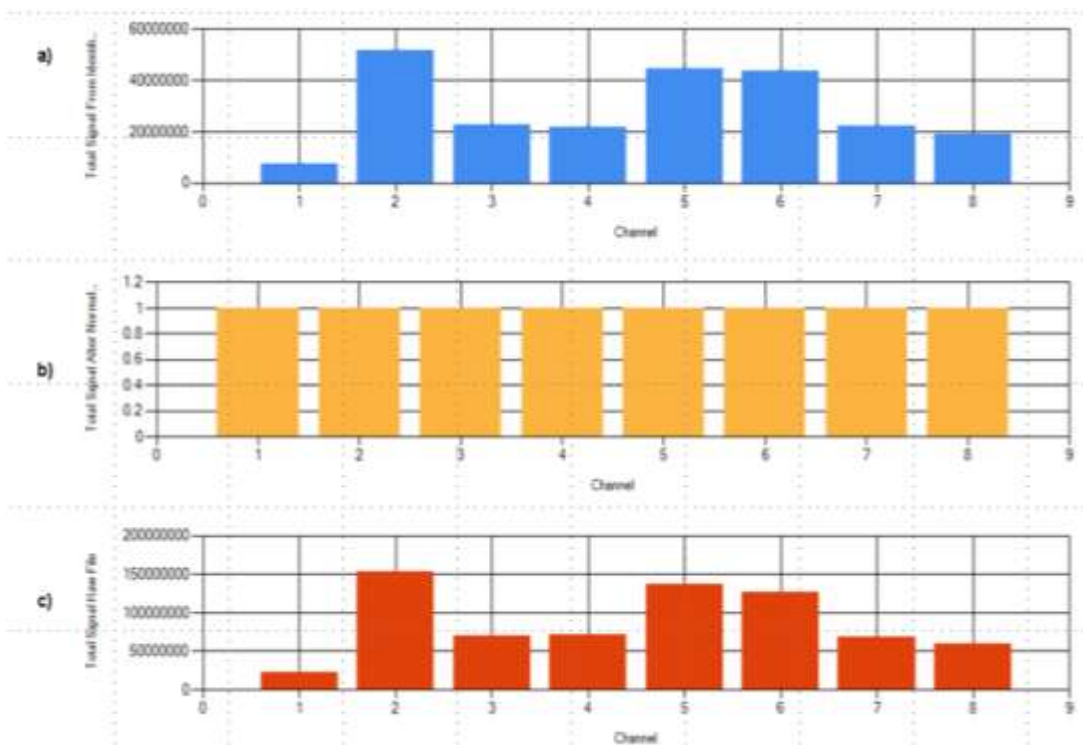


Figura 18. Cromatograma e espectro referente à fração de 250 mM. **A)** Cromatograma de íons totais (TIC) e em **B)** Espectro dos picos referentes a marcação isóbara vistos no MS2.

Resultados e Discussão

De acordo com os exames histopatológicos realizados por patologistas do FCECON, todos os tecidos das margens de ressecção (5 cm) estavam histologicamente saudáveis, isto é, livres de neoplasia. A análise proteômica revelou 1090 proteínas (com redundância) e 539 proteínas (com máxima parcimônia), dos quais 359 proteínas apresentaram um ou mais peptídeos únicos (Adendo 8.3).

Após a retirada dos espectros *multiplex*, realizou-se a normalização de cada íon marcador por amostra utilizando o módulo *Isobaric Analyser* do *PatternLabfor proteomics*. (Figura 19). Conforme descrito anteriormente, essa normalização foi obtida dividindo o sinal do pico espectral de cada marcador pelo somatório do sinal para o marcador correspondente em uma determinada corrida. O gráfico de barras, apresentado na figura 19, mostra o sinal para cada marcador antes (azul – Figura 19a) e após a normalização (laranja – Figura 19b), assim como o somatório dos sinais de todos os espectros para



uma determinada corrida (vermelho – Figura 19c).

Figura 19 - Normalização realizada utilizando a marcação por isóbaros (iTRAQ) no módulo de quantificação do PatternLab Isobaric Analyzer. **a)** Visualização dos sinais totais dos MS2 identificados nos oito canais; **b)** Visualização dos sinais totais depois da normalização nos oito canais; **c)** Visualização dos sinais totais do arquivo RAW.

Resultados e Discussão

Além disso, o módulo *Isobaric Analyser* também foi usado para apontar as proteínas diferenciamente abundantes no câncer colorretal quando comparada à sua respectiva margem de ressecção. Uma vez que, este módulo emprega uma abordagem centrada em *p*-valores, aplicando o *test t* pareado atribuído a cada peptídeo e, em seguida, convergem para um *p*-valor final, no âmbito da proteína, por meio de método do *Stouffer*. De acordo com os filtros de estringência empregados nessa análise e descrito em materiais e métodos, foi possível listar 56 proteínas que apresentaram alterações na sua abundância ao comparar as diferentes condições biológicas estudadas (Tabela 10). Na Figura 20, tem-se uma visualização da distribuição de peptídeos mais abundantes na região tumoral em comparação com a margem, o que está em concordância com o maior número de proteínas identificadas no tumor.

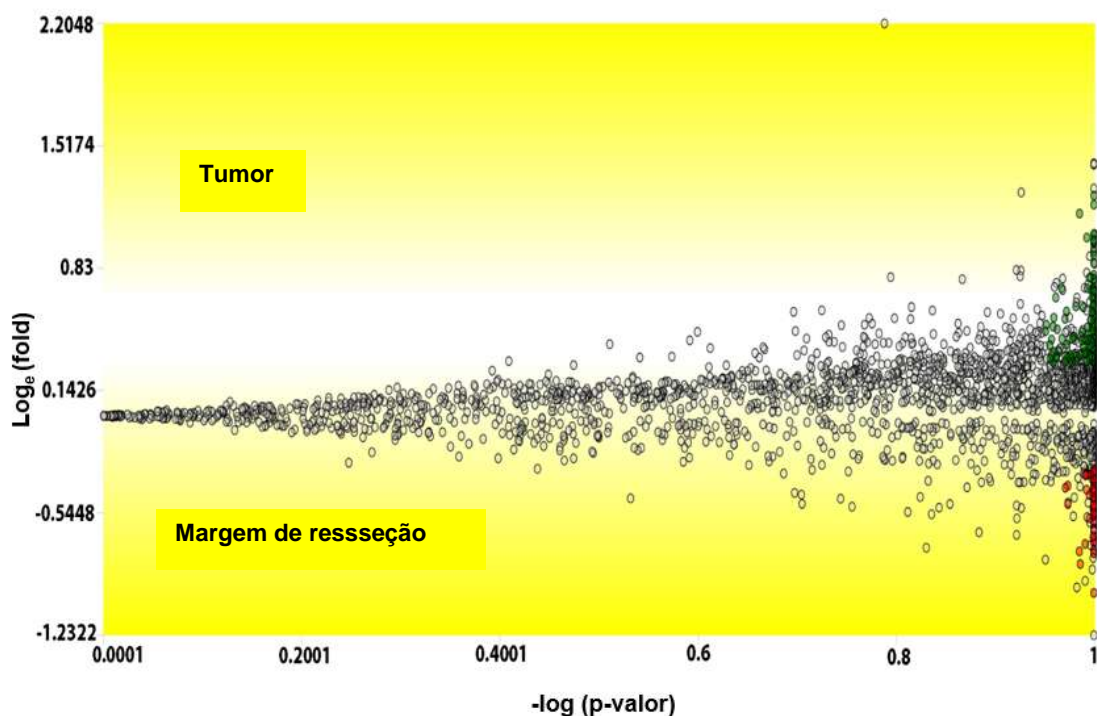


Figura 20. Gráfico do tipo “Volcano” comparando os peptídeos (os pontos) identificados para o tumor em relação à margem de ressecção a 5 cm. O eixo y representa Log_e fold change e o eixo x do -log de p-valor teste t pareado. Os peptídeos (pontos) com um valor y positivo têm uma abundância mais elevada no tumor; da mesma forma, os valores negativos, são peptídeos com maior abundância na margem de ressecção. Pontos verdes e vermelhos representam peptídeos que alcançaram um p-valor menor que 0,05 e um valor de corte para log fold change maior que 0.50.

Resultados e Discussão

Proteínas que apresentam uma abundância diferencial em tecidos de CCR em margem de ressecção podem estar relacionadas com o desenvolvimento do tumor ou comprometimento molecular da margem de ressecção. Foram selecionadas algumas proteínas da Tabela 10 que apresentaram as maiores mudanças em abundância ($p < 0,05$). Dentre as proteínas, destacam-se transgelina, profilina 1, proteína 14-3-3 Zelta/delta, caldesmona e fator de transformação do crescimento beta que estão abundantes no câncer colorretal; anidrase carbônica², intelectina-1, serotransferrina, cromogranina-A, alfa-1-antitripsina e vimentina que estão abundantes na margem de ressecção.

Tabela 10 - Lista de 56 proteínas diferencialmente abundantes quando comparados tumor versus margem de ressecção. Nas colunas estão apresentadas o ID do UniProt, a contagem da sequência peptídeo (SeqCount), a contagem espectral (SpecCount), lista da variação da média de FoldChange dos peptídeos originais pertencentes a essa proteína. Todas as proteínas na tabela têm um valor de $p < 0.05$ de acordo com o teste-t pareado por ser diferencialmente abundante. Um valor de *fold change* positivo indica que a proteína seja mais abundante no cancer colorretal; um valor de *fold change* negativo indica que a proteína está mais abundante na margem de ressecção.

ID	SeqCount	SpectCount	LogFOLD	Descrição
P00918	2	21	-0.686	Anidrase carbônica 2
P10645	5	11	-0.584	Cromogranina-A
A8K714	9	49	-0.539	Regulador do canal 1 de cloreto ativado por cálcio
Q8WWA0	2	13	-0.49	Intelectina-1
Q13228	3	20	-0.47	Proteína de ligação a selenium 1
P01009	2	12	-0.422	Alfa-1-antitripsina
P02787	5	39	-0.391	Serotransferrina
P63104	2	25	0.307	14-3-3 proteína zeta/delta
Q6ZN40	3	8	0.310	Tropomiosina 1 alfa
P23396	2	6	0.316	proteína 40S Ribossomal S3
P40926	3	27	0.324	Malato desidrogenase, mitocondrial
P09211	2	20	0.333	Glutathione S-transferase P
P35579	5	20	0.35	Miosina-9
P12277	2	8	0.351	Creatine kinase B-type
Q07021	2	17	0.353	Componente complemento 1 Q proteína subcomponente ligante, mitocondrial
P27797	2	19	0.353	Calreticulina
P21333	10	62	0.355	Filamina-A
P28838	3	9	0.355	Citosol aminopeptidase
P13639	2	21	0.361	Fator de alongamento 2
P40121	2	6	0.366	Macrophage-capping protein

Resultados e Discussão

Continuação da Tabela 10

ID	SeqCount	SpectCount	LogFOLD	Descrição
Q5TCU3	2	15	0.368	<i>Tropomiosina cadeia beta</i>
P06748	2	9	0.375	<i>Nucleofosmina</i>
P07195	5	49	0.382	<i>L-lactato desidrogenase cadeia B</i>
P06744	4	30	0.384	<i>Glicose-6-fosfato isomerase</i>
P37837	2	18	0.385	<i>Transaldolase</i>
O15144	2	6	0.385	<i>Subunidade 2 do complex 2/3 da proteína relacionada a actina</i>
P07237	5	33	0.386	<i>Proteína Dissulfureto-isomerase</i>
P60174	5	24	0.392	<i>Triosefosfato isomerase</i>
P62937	5	56	0.397	<i>Peptidil-prolil cis-trans isomerase A</i>
P29401	4	23	0.399	<i>Transquetolase</i>
P30044	2	7	0.400	<i>Peroxiredoxina-5, mitocondrial</i>
P00558	6	107	0.407	<i>fosfoglicerato quinase 1</i>
P19338	2	6	0.409	<i>Nucleolina</i>
P05787	7	251	0.412	<i>queratina, tipo II citoesquelital 8</i>
O00299	3	33	0.417	<i>Proteína 1 do canal intracelular de Cloreto</i>
P07900	2	13	0.422	<i>Proteína de choque térmico HSP 90-alfa</i>
P13796	3	17	0.422	<i>Plastina-2</i>
P08238	4	16	0.428	<i>Proteína de choque térmico HSP 90-beta</i>
Q9Y490	2	18	0.430	<i>Talina-1</i>
P04792	2	8	0.462	<i>Proteína de choque térmico beta-1</i>
P14618	14	111	0.473	<i>Piruvate quinase PKM</i>
P06733	13	96	0.49	<i>Alfa-enolase</i>
P10809	5	28	0.491	<i>Proteína de choque térmico 60 kDa, mitocondrial</i>
Q15582	3	10	0.505	<i>Fator de transformação do crescimento beta</i>
P09467	2	4	0.507	<i>Frutose-1,6-bisfosfatase 1</i>
P04406	12	175	0.510	<i>Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase</i>
P07737	4	19	0.518	<i>Profilina-1</i>
P69905	10	188	0.537	<i>Hemoglobina subunidade alfa</i>
P14625	2	7	0.537	<i>Endoplasmina</i>
P31949	3	25	0.608	<i>Protein S100-A11</i>
Q05682	2	17	0.616	<i>Caldesmona</i>
P17661	10	77	0.628	<i>Desmina</i>
P05387	2	9	0.651	<i>Proteína 60S ribossomal acídica P2</i>
P68871	6	82	0.653	<i>Hemoglobina subunidade beta</i>
Q01995	8	90	0.667	<i>Transgelina</i>

5.2.1.1. Proteínas super-abundantes no tumor

Transgelina (TAGLN) estimula a motilidade em células normais e também pode estar envolvida na migração celular. Os níveis elevados de TAGLN podem estar relacionados com um comportamento agressivo das células tumorais, estágio avançado e prognóstico ruim. Um estudo anterior relatou a superexpressão de TAGLN na submucosa invasiva CCR em ratos Fischer-344 induzidos por N-metil-N-nitrosourea (Zhang et al., 2011). No entanto, o papel de TAGLN no câncer permanece obscuro e controverso, uma vez que evidências recentes sugerem que essa proteína também pode atuar como um supressor tumoral (Assinder et al., 2009).

A caldesmona (CALD1) é uma proteína multifuncional que se liga firmemente à actina, calmodulina, tropomiosina e miosina (Kim et al., 2012). Kim e colaboradores revelaram níveis elevados desta proteína em tecidos de câncer colorretal, sugerindo que a desregulação da expressão de Caldesmona pode induzir propriedades metastáticas nas células de câncer (Kim et al., 2012). Esses dados estão de acordo com os resultados dessa tese.

O fator de transformação do crescimento beta (do inglês, *Transforming growth factor-beta-induced protein ig-h3*, TGF- β) é uma das proteínas cinases receptoras de transmembrana serina-treonina. Esta proteína desempenha um papel complexo na carcinogênese, apresentando propriedades oncogênicas e de supressor de tumor (de Caestecker et al., 2000). Em particular, evidências recentes mostraram que a inativação da sinalização de TGF- β em células

epiteliais atua predominantemente para promover o câncer epitelial (Miranda et al., 2015).

A proteína 14-3-3 *zeta/delta*(14-3-3 ζ) pertence a uma família de proteínas ácidas altamente conservadas, que controla processos moleculares como ciclo celular, crescimento celular, diferenciação, sobrevivência, apoptose e migração (Mhawech, 2005). A alta expressão dessa proteína ocorre em vários tipos de câncer tais como o de mama(Zang et al., 2004), pulmão(Fan et al., 2007), pâncreas (Shen et al., 2004), cólon (Lu et al., 2007), esôfago(Sharma et al., 2003), estômago(Jang et al., 2004), cabeça e pescoço(Ralhan et al., 2008). Adicionalmente, essa expressão elevada pode contribuir ainda para inibir a apoptose e ativar as vias de sinalização que promovem o crescimento e/ou sequestro de proteínas supressoras tumorais(Zha et al., 1996).

A profilina 1 (PFN1) é uma proteína de ligação a actina, sendo regulada negativamente em vários tipos de adenocarcinoma incluindo o pancreático (Gronborg et al., 2006)e hepático(Wu et al., 2006). Em especial, para câncer de mama (Janke et al., 2000) e gástrico(Cheng et al., 2015), o silenciamento da expressão de PFN1 pode aumentar a motilidade celular e a progressão do câncer, respectivamente (Zhang et al., 2011). No nosso estudo, a profilina 1 estava super-abundante em amostras tumorais. De forma, essa abundância corrobora com a hipótese da ligação dela na progressão do câncer.

5.2.1.2. Proteínas super-abundantes na margem de ressecção

Neste estudo, foram identificadas proteínas na margem de ressecção que foram anteriormente descritas como super-abundantes em CCRquando comparado com amostras controles(Kim et al., 2012)(Alfonso et al., 2005;

Resultados e Discussão

Bekku et al., 2000), sugerindo que a margem pode estar comprometida, a nível proteico.

Anidrase carbônica 2 (CA2) pertence a uma grande família de metaloenzimas de zinco, que participa numa variedade de processos biológicos, incluindo a respiração, calcificação e balanço ácido-base (Adeva-Andany et al., 2015). A alta expressão de anidrase carbônica 1 (CA1) no câncer do cólon e da anidrase carbônica 2 (CA2) em câncer retal pode estar correlacionada com uma agressividade biológica e metástases de câncer colorretal (Bekku et al., 2000). Em nossas análises esta proteína apresentou maior abundância na margem de ressecção e a super-expressão dessa proteína numa região considerada saudável por análise histopatológica, pode indicarum que a margem de ressecção está comprometida.

A cromogranina A (CgA) é um membro da família graninas de proteínas secretoras neuro-endócrinas (Helman et al., 1988). No câncer, a alta expressãodessa classe de proteína foi detectada no câncer gástrico e colorretal por análises de hibridação de ácido nucléico e imuno-histoquímica (Park et al., 1987). No entanto, no câncer de próstata, a sua função é melhor entendida, uma vez que, como o tumor se desenvolve no tecido endócrino, torna-se a principal fonte de circulação de CgA. A concentração desta é considerada elevada, no que diz respeito à diferenciação neuroendócrina do câncer de próstata (Khan & Ather, 2011). Portanto, a abundância dessa proteína na margem de ressecção de pacientes com CCR pode indicar possíveis processos moleculares associados com o crescimento tumoral.

Alfa-1-antitripsina é um inibidor da protease mais proeminente no soro humano. No presente estudo, essa proteína está abundante na margem

Resultados e Discussão

tumoral. Entretanto, em um estudo recente, foi demonstrado que os níveis séricos da deficiência de alfa-1-antitripsina é significativamente maior em pacientes com câncer colorretal (208 ± 60) do que em controles (Perez-Holanda, 2014).

Intelectina-1, também conhecida como omentin-1, é uma lectina de ligação a galactose, está normalmente expressa no coração, intestino delgado e cólon. A alta expressão da intelectina-1 no câncer gástrico foi correlacionada com características clínicas patológicas por imuno-histoquímica, mostrando que intelectina-1 pode ser um fator prognóstico útil para inferir os diagnósticos de pacientes com câncer gástrico (Zheng et al., 2012). Por outro lado, esta proteína pode ser utilizada como um supressor tumoral que afeta o crescimento, invasão e metástase em neuroblastoma (Li et al., 2015). Em CCR, a intelectina apresentou expressão elevada em tecidos tumorais de pacientes em fase IV de câncer colorretal (Kim et al., 2012). Em contrapartida, no presente estudo, esta proteína está mais abundante na margem a 5 cm do tumor.

A serotransferrina é uma proteína de transporte de ferro que pode se ligar a dois íons Fe^{3+} em associação com a ligação de um ânion. Apesar de Antico Arciuch e colaboradores argumentarem que as serotransferinas desempenham, no câncer, um papel na estimulação da proliferação de células (Antico Arciuch et al., 2012), a expressão dessas proteínas ainda é controversa. De acordo com a literatura, em alguns tipos de cânceres, a serotransferrina apresenta uma baixa expressão em câncer gástrico (Ryu et al., 2003) e alta expressão em câncer pancreático (Nie et al., 2014).

5.2.1.3. Mapeando possíveis interações proteína-proteína com o programa STRING

Para mapear possíveis interações proteína-proteína a partir daquelas diferencialmente abundantes apontadas anteriormente, utilizamos o *softwareString 10* (<http://string-db.org/>). Nossa análise revelou uma rede de proteínas abundantes em CCR (Figura 21). Estas estão envolvidas principalmente na organização do citoesqueleto, que por sua vez, afeta a motilidade celular e é crucial no processo de invasão do câncer e metástase (Honda et al., 2005). Exemplos de proteínas nesta rede são: *miosina-9* (MYH9), *filamina A* (FLNA), *tropomiosina-2* (TPM2), *talina-1* (TLN1), *profilina-1* (PFN1), *transgelina* (TGLN) e *caldesmona* (CALD1).

Identificamos também um grupo de proteínas ligantes a chaperonas (Figura 21), as quais são conhecidas por estarem envolvidas na regulação da proliferação celular e da angiogênese. Neste grupo estão presentes quatro proteínas de choque térmico (*heat shock protein* - HSPs) no tecido tumoral, as quais são: *27kDa heat shock protein 1* (HSPB1), *90kDa heat shock beta-1* (HSP90B1), *90kDa heat shock alpha class A member 1* (HSP90AA1), e *90kDa heat shock alpha class B member 1* (HSP90AB1). Estas proteínas são responsáveis por ajudar as proteínas desnaturadas /danificadas a se redobrar e se recuperar dos danos induzidos pelo estresse (Wang, 2011). A expressão destas proteínas está associada a uma gama de atividades biológicas, tais como, sobrevivência, proliferação e resistência de células cancerosas (Wang, 2011).

Resultados e Discussão

Além disso, a análise pelo STRING mostrou interação entre proteínas ribossomais (Figura 21) em amostras tumorais (por exemplo, *ribosomal protein S3* (RPS3) e *large ribosomal protein*(por exemplo, P2 (RPLP2)). Um trabalho prévio mostrou que proteínas ribossomais são super-expressas em CCR e estão associadas ao crescimento e proliferação de células cancerosas (Chen & Ioannou, 1999). Além disso, verificamos também várias proteínas envolvidas com metabolismo energético, como malato desidrogenase 2 (MDH2), lactato desidrogenase A (LDHA), glicose-6-fosfatoisomerase (GPI), entre outras. Estas proteínas-chave em células cancerosas têm demandas metabólicas diferentes de células normais (Cairns et al., 2011). Alguns indícios, como o estudo de Pate e colaboradores, apontam a glicólise aeróbica do açúcar como uma possível via metabólica predominante em câncer de cólon (Pate et al., 2014). No entanto, até agora, a evidência molecular de como esta reprogramação metabólica ocorre no CCR permanece desconhecida.

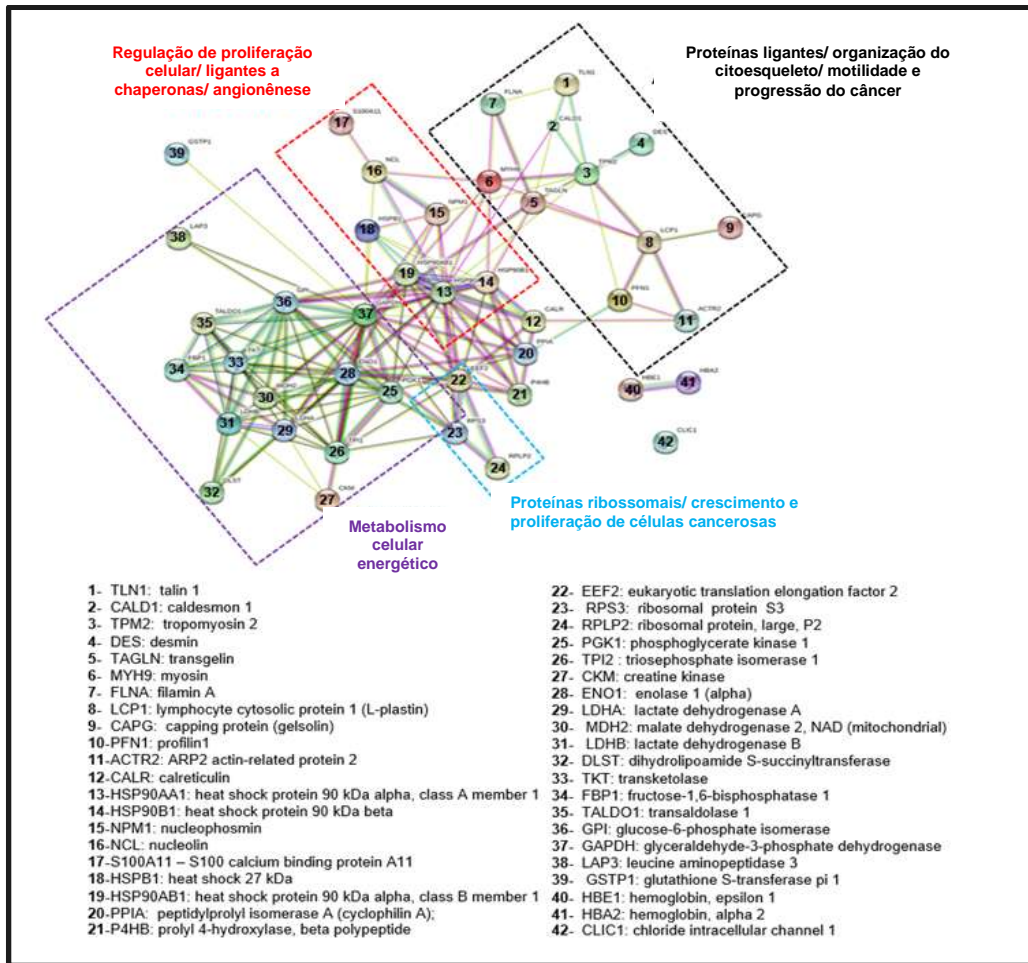


Figura 21 - Rede de interações das proteínas diferencialmente abundantes em tecido tumoral colorretal de acordo com os critérios utilizados no *Isobaric Analyzer*. As proteínas que foram circuladas em vermelho são proteínas de ligação a chaperonas. Em preto são proteínas de ligação a actina que compõem o citoesqueleto. Em lilás estão as proteínas relacionadas ao metabolismo de energia celular e circuladas em azul as proteínas ribossomais. Na rede de interações não estão incluídas na análise as proteínas *complement component 1 Q subcomponent-binding protein, peroxiredoxin-5, keratin type II, pyruvate kinase, 60 kDa heat shock protein* e *transforming growth factor-beta-induced protein*.

O mapa de possíveis interações entre as proteínas reguladas na margem de ressecção (Figura 22) inclui metaloproteínas, principalmente envolvidas no metabolismo do ferro e zinco, como a *serotransferrina* (TF) e anidrase carbônica 2 (CA2), respectivamente. Em nossa análise, a alfa-1-antitripsina (SERPINA1) está conectada à serotransferrina. Segundo Kwon et al. (2014), a SERPINA1 induz a invasão e migração de células cancerígenas

gástricas e sua expressão está associada à progressão do câncer gástrico(Kwon et al., 2014).

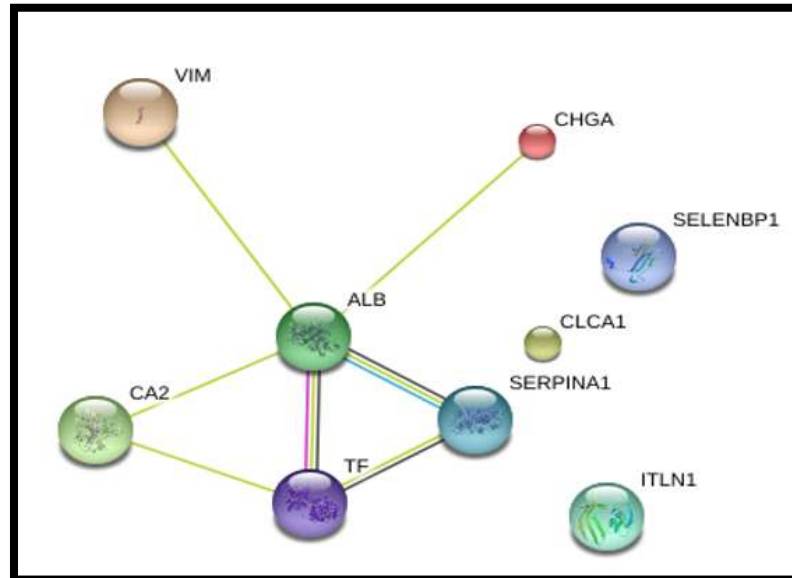


Figura 22 - Rede interativa de proteínas abundantes nas amostras da margem de ressecção. *CHGA* significa cromogranina, *VIM* é vimentina, *CLCA1* é canal de cloreto 1, *CA2* é anidrase carbônica, *ALB* é a albumina, *ITLN1* é intelectina 1, *SERPINA1* é alfa-1-antitripsina, *SELENBP1* é proteína ligante a selenio 1, *TF* é serotransferrina.

5.2.1.3. Análise do *Gene Ontology*

A análise do *Gene Ontology* foi feita para as todas as proteínas identificadas para descrever as funções do produto gênico de acordo com a distribuição hipergeométrica. Nesta, verificou-se que para os processos biológicos, 18,3% das proteínas estavam associadas à processos celulares, seguido pelo processo de organismo simples (15,5%), processo metabólico (13,8%), regulação biológica (12,5%) e organização do componente celular ou biogênese (8,2%) (Figura 23). Para componente celular, 30,1% pertencem à parte celular, 18% à parte organela, 14% à organelas e 13,6% ao complexo macromolecular. Proteínas de ligação constituíram a maior parte das funções moleculares (55%), seguido da atividade catalítica (27,9%) e regulador da função molecular (6,3%).

Resultados e Discussão

Uma análise considerando todas as proteínas enriquecidas com os termos do GO, vinculadas ao desenvolvimento de processos neoplásicos, foi realizada. Nessa, alguns dos termos obtidos foram: regulação da adesão celular, regulação da cascata de sinalização da proteína cinase ativada por mitogénio (*MAPK*) e regulação negativa da sinalização apoptótica.

Os processos de regulação de adesão celular são fundamentais no desenvolvimento neoplásico, devido modularem o grau de ligação célula-célula ou da matriz extracelular e, por conseguinte, desempenham um papel fundamental na disseminação metastática (Bendas & Borsig, 2012). As proteínas identificadas e relacionadas com estes termos foram S100-A11 e caderina-1.

Além disso, a proteína 42 de controle de divisão celular, proteína Rap-1A relacionada com Ras, e a proteína cinase C de ligação delta também foram identificadas e mapeadas para a regulação da via *MAPK*. Esta via está envolvida em processos celulares importantes, incluindo a proliferação, a expressão do gene, a diferenciação, a mitose, a sobrevivência e a apoptose celular (Pearson et al., 2001).

Apesar da enorme variabilidade de câncer, evidências demonstram que a resistência à apoptose é uma das principais características de tumores malignos. Neste trabalho foram identificadas proteínas relacionadas aos processos de regulação negativa da sinalização apoptótica como alfa fibrinogênio, galectina-3, clusterina e peroxiredoxina-2. Uma maior frequência de apoptose ocorre em tumores regredindo e em tumores tratados com agentes citotóxicos anti-câncer (Kerr et al., 1994).

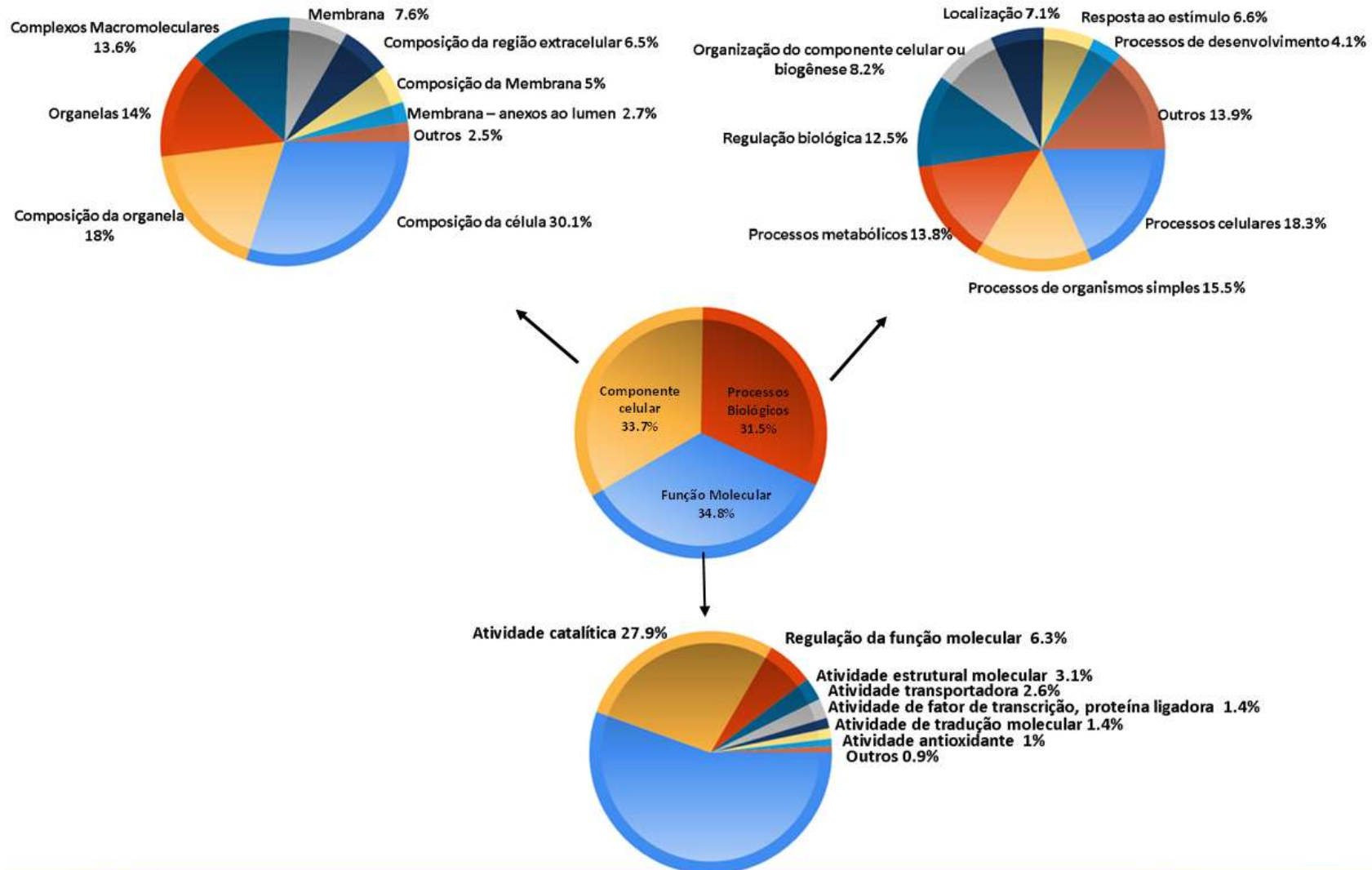


Figura 23 - Análise de proteínas através do *Gene Ontology* nas amostras tumorais e a respectiva margem de ressecção 5 cm de acordo com: **A)** Componente Celular; **B)** Processos Biológicos; **C)** Função Molecular.

Resultados e Discussão

Estudos prévios usando abordagens complementares, tais como, *Selection Reaction Monitory* (SRM) (Ossola et al., 2011), imuno-histoquímica (Kim et al., 2012; Xie et al., 2010; Xu et al., 2016), *western blot* (Kim et al., 2012), por RT-PCR (Ma et al., 2009) e hibridação de ácidos nucleicos (Park et al., 1987), corroboram com muitos dos resultados apresentados nessa tese. Logo, os dados aqui apresentados são fundamentais para um melhor entendimento, no âmbito molecular, do desenvolvimento dessa patologia; acrescentando mais uma peça, de certa forma, a esse grande quebra-cabeça da compreensão do processo de tumorigênese do câncer colorretal.

6. CONCLUSÃO

A avaliação de metilação das margens de ressecção e amostras tumorais de diferentes pacientes realizada no presente estudo foi de 4/13 (30,8%) para *CDH1*, 5/13 (35,7%) para *CDKN2A*, 11/13(84,6%) para *DAPK* e 11/13 (84,6%) para *TIMP2* obtidas nesse estudo sugerem que a metilação do DNA ocorre com frequência em regiões de tecido tumoral assim como em regiões adjacentes a região tumoral.

Em particular, os genes *TIMP2* e *DAPK* apresentaram as maiores porcentagens de metilação nos tecidos estudados. Chama-se atenção também para essas alterações epigenéticas importantes visualizadas nas regiões consideradas “livres de tumor”, pois podem sinalizar possíveis eventos precoces nesses ambientes. De maneira que, os resultados dessa parte epigenéticamostram um perfil distinto de metilação para cada paciente acometido pelo câncer colorretal, enfatizando a importância de estabelecer um painel de genes modificados e que possa ser utilizado para o melhor direcionamento de um tratamento personalizado na população.

Com relação a análise proteômica, foram identificadas 56 proteínas com abundância diferencial entre os tecidos do tumor e as margens de ressecção de CCR de pacientes do Amazonas. Nos tecidos da margem de ressecção, foram identificadas proteínas envolvidas em diversos processos associados ao desenvolvimento de tumores, incluindo a degradação da matriz extracelular, o transporte de oxigênio, a respiração, a síntese de DNA e a composição do citoesqueleto. Assim, essas proteínas reforçam a hipótese desta área não estar molecularmente tão saudável quanto o esperado; sendo que a anidrase

Conclusão

carbônica² é a proteína com maior abundância nessa região. Os tecidos tumorais apresentaram várias proteínas reguladas positivamente à estabilidade do citoesqueleto, como ligantes a actina, transgelina, desmina e caldesmona. Além disso, foram mapeadas, nos dois tipos de tecidos estudados, interações entre proteínas de ligação a chaperonas, ribossomais e também relacionadas ao metabolismo energético das células. Em adição, na análise de enriquecimento das proteínas identificadas pelo *Gene Ontology*, importantes termos ligados a oncogênese como adesão, invasão, metástase, morte, e reconhecimento celular, foram encontrados. Logo, este estudo fornece informações significativas sobre os processos epigenéticos e proteicos que possam estar ocorrendo entre o tumor e a margem de ressecção, em pacientes do Amazonas; auxiliando, portanto, na compreensão da biologia do câncer colorretal.

7. REFERÊNCIAS

Adeva-Andany, M.M., Fernandez-Fernandez, C., Sanchez-Bello, R., Donapetry-Garcia, C., and Martinez-Rodriguez, J. (2015). The role of carbonic anhydrase in the pathogenesis of vascular calcification in humans. *Atherosclerosis* 241, 183–191.

Alfonso, P., Nunez, A., Madoz-Gurpide, J., Lombardia, L., Sanchez, L., and Casal, J.I. (2005). Proteomic expression analysis of colorectal cancer by two-dimensional differential gel electrophoresis. *Proteomics* 5, 2602–2611.

Antico Arciuch, V.G., Elguero, M.E., Poderoso, J.J., and Carreras, M.C. (2012). Mitochondrial regulation of cell cycle and proliferation. *Antioxid Redox Signal* 16, 1150–1180.

Aquino, P.F., Fischer, J.S., Neves-Ferreira, A.G., Perales, J., Domont, G.B., Araujo, G.D., Barbosa, V.C., Viana, J., Chalub, S.R., Lima de Souza, A.Q., et al. (2012). Are gastric cancer resection margin proteomic profiles more similar to those from controls or tumors? *J Proteome Res* 11, 5836–5842.

Aquino et al. (2016). Avaliação Molecular da Margem de Ressecção de Pacientes com Câncer Gástrico por Espectrometria de massas. UFRJ.

Armaghany, T., Wilson, J.D., Chu, Q., and Mills, G. (2012). Genetic Alterations in Colorectal Cancer. *Gastrointest. Cancer Res. GCR* 5, 19–27.

Assinder, S.J., Stanton, J.A., and Prasad, P.D. (2009). Transgelin: an actin-binding protein and tumour suppressor. *Int J Biochem Cell Biol* 41, 482–486.

Balch, C., and Nephew, K.P. (2013). Epigenetic targeting therapies to overcome chemotherapy resistance. *Adv. Exp. Med. Biol.* 754, 285–311.

Balmain, A. (2001). Cancer genetics: from Boveri and Mendel to microarrays. *Nat Rev Cancer* 1, 77–82.

Bekku, S., Mochizuki, H., Yamamoto, T., Ueno, H., Takayama, E., and Tadakuma, T. (2000). Expression of carbonic anhydrase I or II and correlation to clinical aspects of colorectal cancer. *Hepatogastroenterology* 47, 998–1001.

Bendas, G., and Borsig, L. (2012). Cancer cell adhesion and metastasis: selectins, integrins, and the inhibitory potential of heparins. *Int J Cell Biol* 2012, 676731.

Benderska, N., and Schneider-Stock, R. (2014). Transcription control of DAPK. *Apoptosis* 19, 298–305.

Bernstein, B.E., Meissner, A., and Lander, E.S. (2007). The mammalian epigenome. *Cell* 128, 669–681.

Breuker, K., Jin, M., Han, X., Jiang, H., and McLafferty, F.W. (2008). Top-down identification and characterization of biomolecules by mass spectrometry. *J Am Soc Mass Spectrom* 19, 1045–1053.

de Caestecker, M.P., Piek, E., and Roberts, A.B. (2000). Role of transforming growth factor-beta signaling in cancer. *J Natl Cancer Inst* 92, 1388–1402.

Referências

- Cairns, R.A., Harris, I.S., and Mak, T.W. (2011). Regulation of cancer cell metabolism. *Nat Rev Cancer* 11, 85–95.
- Carvalho, P.C. (2010). Um Ambiente Computacional para Proteômica. Universidade Federal do Rio de Janeiro.
- Carvalho, P.C., Xu, T., Han, X., Cociorva, D., Barbosa, V.C., and Yates, J.R. (2009). YADA: a tool for taking the most out of high-resolution spectra. *Bioinforma. Oxf. Engl.* 25, 2734–2736.
- Carvalho, P.C., Fischer, J.S., Xu, T., Cociorva, D., Balbuena, T.S., Valente, R.H., Perales, J., Yates, J.R., 3rd, and Barbosa, V.C. (2012). Search engine processor: Filtering and organizing peptide spectrum matches. *Proteomics* 12, 944–949.
- Carvalho, P.C., Lima, D.B., and Leprevost, F.V. (2016). Integrated analysis of shotgun proteomic data with PatternLab for proteomics 4.0. 11, 102–117.
- Chait, B.T. (2006). Chemistry. Mass spectrometry: bottom-up or top-down? *Science* 314, 65–66.
- Chen, F.W., and Ioannou, Y.A. (1999). Ribosomal proteins in cell proliferation and apoptosis. *Int Rev Immunol* 18, 429–448.
- Cheng, Y.J., Zhu, Z.X., Zhou, J.S., Hu, Z.Q., Zhang, J.P., Cai, Q.P., and Wang, L.H. (2015). Silencing profilin-1 inhibits gastric cancer progression via integrin beta1/focal adhesion kinase pathway modulation. *World J Gastroenterol* 21, 2323–2335.
- Colussi, D., Brandi, G., Bazzoli, F., and Ricciardiello, L. (2013). Molecular Pathways Involved in Colorectal Cancer: Implications for Disease Behavior and Prevention. *Int. J. Mol. Sci.* 14, 16365–16385.
- Coppedè, F., Migheli, F., Lopomo, A., Failli, A., Legitimo, A., Consolini, R., Fontanini, G., Sensi, E., Servadio, A., Seccia, M., et al. (2014). Gene promoter methylation in colorectal cancer and healthy adjacent mucosa specimens. *Epigenetics* 9, 621–633.
- Craig, R., and Beavis, R.C. (2004). TANDEM: matching proteins with tandem mass spectra. *Bioinformatics* 20, 1466–1467.
- Croce, C.M. (2008). Oncogenes and cancer. *N. Engl. J. Med.* 358, 502–511.
- Day, L.W., Walter, L.C., and Velayos, F. (2011). Colorectal cancer screening and surveillance in the elderly patient. *Am. J. Gastroenterol.* 106, 1197–1206;quiz 1207.
- De Clerck, Y., Szpirer, C., Aly, M.S., Cassiman, J.J., Eeckhout, Y., and Rousseau, G. (1992). The gene for tissue inhibitor of metalloproteinases-2 is localized on human chromosome arm 17q25. *Genomics* 14, 782–784.
- Deng, G., Peng, E., Gum, J., Terdiman, J., Sleisenger, M., and Kim, Y.S. (2002). Methylation of hMLH1 promoter correlates with the gene silencing with a region-specific manner in colorectal cancer. *Br. J. Cancer* 86, 574–579.
- Egger, G., Liang, G., Aparicio, A., and Jones, P.A. (2004). Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. *Nature* 429, 457–463.
- Eng, J.K., Jahan, T.A., and Hoopmann, M.R. (2013). Comet: an open-source MS/MS sequence database search tool. *Proteomics* 13, 22–24.

Referências

- Fan, N.J., Gao, C.F., Wang, C.S., Lv, J.J., Zhao, G., Sheng, X.H., Wang, X.L., Li, D.H., Liu, Q.Y., and Yin, J. (2012). Discovery and verification of gelsolin as a potential biomarker of colorectal adenocarcinoma in the Chinese population: Examining differential protein expression using an iTRAQ labelling-based proteomics approach. *Can J Gastroenterol* 26, 41–47.
- Fan, T., Li, R., Todd, N.W., Qiu, Q., Fang, H.B., Wang, H., Shen, J., Zhao, R.Y., Caraway, N.P., Katz, R.L., et al. (2007). Up-regulation of 14-3-3zeta in lung cancer and its implication as prognostic and therapeutic target. *Cancer Res* 67, 7901–7906.
- Fearon, E.R., and Vogelstein, B. (1990). A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 61, 759–767.
- Feinberg, A.P., and Vogelstein, B. (1983). Hypomethylation distinguishes genes of some human cancers from their normal counterparts. *Nature* 301, 89–92.
- Fenn, J.B., Mann, M., Meng, C.K., Wong, S.F., and Whitehouse, C.M. (1989). Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science* 246, 64–71.
- Fernandes, L.C., and Matos, D. (2002). Tumor markers in colorectal cancer. *Rev. Colégio Bras. Cir.* 29, 106–111.
- Galm, O., Suzuki, H., Akiyama, Y., Esteller, M., Brock, M.V., Osieka, R., Baylin, S.B., and Herman, J.G. (2005). Inactivation of the tissue inhibitor of metalloproteinases-2 gene by promoter hypermethylation in lymphoid malignancies. *Oncogene* 24, 4799–4805.
- Gan, C.S., Chong, P.K., Pham, T.K., and Wright, P.C. (2007). Technical, experimental, and biological variations in isobaric tags for relative and absolute quantitation (iTRAQ). *J Proteome Res* 6, 821–827.
- Garbis, S.D., Tyritzis, S.I., Roumeliotis, T., Zerefos, P., Giannopoulou, E.G., Vlahou, A., Kossida, S., Diaz, J., Vourekas, S., Tamvakopoulos, C., et al. (2008). Search for potential markers for prostate cancer diagnosis, prognosis and treatment in clinical tissue specimens using amine-specific isobaric tagging (iTRAQ) with two-dimensional liquid chromatography and tandem mass spectrometry. *J Proteome Res* 7, 3146–3158.
- Gozuacik, D., and Kimchi, A. (2006). DAPk protein family and cancer. *Autophagy* 2, 74–79.
- Graff, J.R., Herman, J.G., Myohanen, S., Baylin, S.B., and Vertino, P.M. (1997). Mapping patterns of CpG island methylation in normal and neoplastic cells implicates both upstream and downstream regions in de novo methylation. *J Biol Chem* 272, 22322–22329.
- Gronborg, M., Kristiansen, T.Z., Iwahori, A., Chang, R., Reddy, R., Sato, N., Molina, H., Jensen, O.N., Hruban, R.H., Goggins, M.G., et al. (2006). Biomarker discovery from pancreatic cancer secretome using a differential proteomic approach. *Mol Cell Proteomics* 5, 157–171.
- Gu, L., Frommel, S.C., Oakes, C.C., Simon, R., Grupp, K., Gerig, C.Y., Bar, D., Robinson, M.D., Baer, C., Weiss, M., et al. (2014). BAZ2A (TIP5) is involved in epigenetic alterations in prostate cancer and its overexpression predicts disease recurrence. *Nat Genet* 8.

Referências

- Hamilton, L.A.A.S.R. (2000). *Pathology and Genetics of Tumours of the Digestive System* (Lyon: IARC).
- Helman, L.J., Ahn, T.G., Levine, M.A., Allison, A., Cohen, P.S., Cooper, M.J., Cohn, D.V., and Israel, M.A. (1988). Molecular cloning and primary structure of human chromogranin A (secretory protein I) cDNA. *J Biol Chem* 263, 11559–11563.
- Herbrich, S.M., Cole, R.N., West, K.P., Jr., Schulze, K., Yager, J.D., Groopman, J.D., Christian, P., Wu, L., O'Meally, R.N., May, D.H., et al. (2013). Statistical inference from multiple iTRAQ experiments without using common reference standards. *J Proteome Res* 12, 594–604.
- Hervouet, E., Cheray, M., Vallette, F.M., and Cartron, P.F. (2013). DNA methylation and apoptosis resistance in cancer cells. *Cells* 2, 545–573.
- Honda, K., Yamada, T., Hayashida, Y., Idogawa, M., Sato, S., Hasegawa, F., Ino, Y., Ono, M., and Hirohashi, S. (2005). Actinin-4 increases cell motility and promotes lymph node metastasis of colorectal cancer. *Gastroenterology* 128, 51–62.
- Hussain, Z., Khan, M.I., Shahid, M., and Almajhdi, F.N. (2013). S-adenosylmethionine, a methyl donor, up regulates tissue inhibitor of metalloproteinase-2 in colorectal cancer. *Genet Mol Res* 12, 1106–1118.
- IJspeert, J.E.G., Medema, J.P., and Dekker, E. (2015). Colorectal neoplasia pathways: state of the art. *Gastrointest. Endosc. Clin. N. Am.* 25, 169–182.
- INCA (2016). Estimativa 2016: Incidência de Câncer no Brasil <http://www.inca.gov.br> (2016). Acessado em 16/10/2016
- Ivanova, T., Vinokurova, S., Petrenko, A., Eshilev, E., Solovyova, N., Kisseljov, F., and Kisseljova, N. (2004). Frequent hypermethylation of 5' flanking region of TIMP-2 gene in cervical cancer. *Int J Cancer* 108, 882–886.
- Jaenisch, R., and Bird, A. (2003). Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nat. Genet.* 33, 245–254.
- Jang, J.S., Cho, H.Y., Lee, Y.J., Ha, W.S., and Kim, H.W. (2004). The differential proteome profile of stomach cancer: identification of the biomarker candidates. *Oncol Res* 14, 491–499.
- Janke, J., Schluter, K., Jandrig, B., Theile, M., Kolble, K., Arnold, W., Grinstein, E., Schwartz, A., Estevez-Schwarz, L., Schlag, P.M., et al. (2000). Suppression of tumorigenicity in breast cancer cells by the microfilament protein profilin 1. *J Exp Med* 191, 1675–1686.
- Jankova, L., Chan, C., Fung, C.L., Song, X., Kwun, S.Y., Cowley, M.J., Kaplan, W., Dent, O.F., Bokey, E.L., Chapuis, P.H., et al. (2011). Proteomic comparison of colorectal tumours and non-neoplastic mucosa from paired patient samples using iTRAQ mass spectrometry. *Mol Biosyst* 7, 2997–3005.
- Jasperson, K.W., and Burt, R.W. (1993). APC-Associated Polyposis Conditions. In *GeneReviews*(®), R.A. Pagon, M.P. Adam, H.H. Ardinger, S.E. Wallace, A. Amemiya, L.J. Bean, T.D. Bird, C.-T. Fong, H.C. Mefford, R.J. Smith, et al., eds. (Seattle (WA): University of Washington, Seattle), p.

Referências

- Kawakami, K., Ruszkiewicz, A., Bennett, G., Moore, J., Grieu, F., Watanabe, G., and Iacopetta, B. (2006). DNA hypermethylation in the normal colonic mucosa of patients with colorectal cancer. *Br J Cancer* *94*, 593–598.
- Kerr, J.F.R., Winterford, C.M., and Harmon, B.V. (1994). APOPTOSIS - ITS SIGNIFICANCE IN CANCER AND CANCER-THERAPY. *Cancer* *73*, 2013–2026.
- Khan, M.O., and Ather, M.H. (2011). Chromogranin A--serum marker for prostate cancer. *J Pak Med Assoc* *61*, 108–111.
- Kim, H.J., Kang, U.B., Lee, H., Jung, J.H., Lee, S.T., Yu, M.H., Kim, H., and Lee, C. (2012). Profiling of differentially expressed proteins in stage IV colorectal cancers with good and poor outcomes. *J Proteomics* *75*, 2983–2997.
- Kim, J.C., Choi, J.S., Roh, S.A., Cho, D.H., Kim, T.W., and Kim, Y.S. (2010). Promoter methylation of specific genes is associated with the phenotype and progression of colorectal adenocarcinomas. *Ann Surg Oncol* *17*, 1767–1776.
- Kimura, T., Tanaka, S., Haruma, K., Sumii, K., Kajiyama, G., Shimamoto, F., and Kohno, N. (2000). Clinical significance of MUC1 and E-cadherin expression, cellular proliferation, and angiogenesis at the deepest invasive portion of colorectal cancer. *Int J Oncol* *16*, 55–64.
- Kitagawa, T., Matsumoto, K., Nagafuchi, A., Tsukita, S., and Suzuki, H. (1999). Co-expression of E-cadherin and alpha-catenin molecules in colorectal cancer. *Surg Today* *29*, 511–518.
- Knudson, A.G., Jr. (1971). Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci U A* *68*, 820–823.
- Konishi, K., Watanabe, Y., Shen, L., Guo, Y., Castoro, R.J., Kondo, K., Chung, W., Ahmed, S., Jelinek, J., Bumber, Y.A., et al. (2011). DNA methylation profiles of primary colorectal carcinoma and matched liver metastasis. *PLoS One* *6*, 21.
- Kulis, M., and Esteller, M. (2010). DNA methylation and cancer. *Adv. Genet.* *70*, 27–56.
- Kwon, C.H., Park, H.J., Lee, J.R., Kim, H.K., Jeon, T.Y., Jo, H.J., Kim, D.H., Kim, G.H., and Park, D.Y. (2014). Serpin peptidase inhibitor clade A member 1 is a biomarker of poor prognosis in gastric cancer. *Br J Cancer* *111*, 1993–2002.
- Lahtz, C., and Pfeifer, G.P. (2011). Epigenetic changes of DNA repair genes in cancer. *J. Mol. Cell Biol.* *3*, 51–58.
- Li, C., Dong, J., Chen, M.Q., Li, W.L., Ren, J.Y., Chen, S.X., Li, Q.T., Geng, J.W., Miao, Y.D., and Yang, J. (2011). [Effects of CDH1 gene promoter methylation on expression of E-cadherin and beta-catenin and its clinicopathological significance in colon carcinoma]. *Zhonghua Wei Chang Wai Ke Za Zhi* *14*, 538–541.
- Li, D., Mei, H., Pu, J., Xiang, X., Zhao, X., Qu, H., Huang, K., Zheng, L., and Tong, Q. (2015). Intelectin 1 suppresses the growth, invasion and metastasis of neuroblastoma cells through up-regulation of N-myc downstream regulated gene 2. *Mol Cancer* *14*, 47.
- Lössl, P., Waterbeemd, M. van de, and Heck, A.J. (2016). The diverse and expanding role of mass spectrometry in structural and molecular biology. *EMBO J.* e201694818.

Referências

- Lu, B., Xu, J., Zhu, Y., Zhang, H., and Lai, M. (2007). Systemic analysis of the differential gene expression profile in a colonic adenoma-normal SSH library. *Clin Chim Acta* 378, 42–47.
- Ma, Y., Peng, J., Liu, W., Zhang, P., Huang, L., Gao, B., Shen, T., Zhou, Y., Chen, H., Chu, Z., et al. (2009). Proteomics identification of desmin as a potential oncofetal diagnostic and prognostic biomarker in colorectal cancer. *Mol. Cell. Proteomics MCP* 8, 1878–1890.
- Martinez, M.A.R., Francisco, G., Cabral, L.S., Ruiz, I.R.G., and Festa Neto, C. (2006). Genética molecular aplicada ao câncer cutâneo não melanoma. *An. Bras. Dermatol.* 81, 405–419.
- McDonald, W.H., and Yates, J.R., 3rd (2003). Shotgun proteomics: integrating technologies to answer biological questions. *Curr Opin Mol Ther* 5, 302–309.
- Mhawech, P. (2005). 14-3-3 proteins--an update. *Cell Res* 15, 228–236.
- de Miranda, N.F., van Dinther, M., van den Akker, B.E., van Wezel, T., ten Dijke, P., and Morreau, H. (2015). Transforming Growth Factor beta Signaling in Colorectal Cancer Cells With Microsatellite Instability Despite Biallelic Mutations in TGFBR2. *Gastroenterology* 148, 1427–37.e8.
- Mirza, S.P. (2012). Quantitative mass spectrometry-based approaches in cardiovascular research. *Circ Cardiovasc Genet* 5, 957-753.
- Molinari, C., Casadio, V., Foca, F., Zingaretti, C., Giannini, M., Avanzolini, A., Lucci, E., Saragoni, L., Passardi, A., Amadori, D., et al. (2013). Gene methylation in rectal cancer: predictive marker of response to chemoradiotherapy? *J Cell Physiol* 228, 2343–2349.
- Nagase, H., Visse, R., and Murphy, G. (2006). Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardiovasc Res* 69, 562–573.
- Nelson, H., Petrelli, N., Carlin, A., Couture, J., Fleshman, J., Guillem, J., Miedema, B., Ota, D., and Sargent, D. (2001). Guidelines 2000 for colon and rectal cancer surgery. *J Natl Cancer Inst* 93, 583–596.
- Nie, S., Yin, H., Tan, Z., Anderson, M.A., Ruffin, M.T., Simeone, D.M., and Lubman, D.M. (2014). Quantitative analysis of single amino acid variant peptides associated with pancreatic cancer in serum by an isobaric labeling quantitative method. *J Proteome Res* 13, 6058–6066.
- Oppenheimer, S.R., Mi, D., Sanders, M.E., and Caprioli, R.M. (2010). Molecular analysis of tumor margins by MALDI mass spectrometry in renal carcinoma. *J Proteome Res* 9, 2182–2190.
- Ossola, R., Schiess, R., Picotti, P., Rinner, O., Reiter, L., and Aebersold, R. (2011). Biomarker validation in blood specimens by selected reaction monitoring mass spectrometry of N-glycosites. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* 728, 179–194.
- Parashar, G., and Capalash, N. (2012). Expression of the TIMP2 gene is not regulated by promoter hypermethylation in the Caski cell line. *Oncol Lett* 3, 1079–1082.

Referências

- Park, J.G., Oie, H.K., Sugarbaker, P.H., Henslee, J.G., Chen, T.R., Johnson, B.E., and Gazdar, A. (1987). Characteristics of cell lines established from human colorectal carcinoma. *Cancer Res* 47.
- Pate, K.T., Stringari, C., Sprowl-Tanio, S., Wang, K., TeSlaa, T., Hoverter, N.P., McQuade, M.M., Garner, C., Digman, M.A., Teitell, M.A., et al. (2014). Wnt signaling directs a metabolic program of glycolysis and angiogenesis in colon cancer. *Embo J* 33, 1454–1473.
- Pearson, G., Robinson, F., Beers Gibson, T., Xu, B.E., Karandikar, M., Berman, K., and Cobb, M.H. (2001). Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocr Rev* 22, 153–183.
- Perkins, D.N., Pappin, D.J., Creasy, D.M., and Cottrell, J.S. (1999). Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. *Electrophoresis* 20, 3551–3567.
- Petko, Z., Ghiassi, M., Shuber, A., Gorham, J., Smalley, W., Washington, M.K., Schultenover, S., Gautam, S., Markowitz, S.D., and Grady, W.M. (2005). Aberrantly methylated CDKN2A, MGMT, and MLH1 in colon polyps and in fecal DNA from patients with colorectal polyps. *Clin Cancer Res* 11, 1203–1209.
- Ralhan, R., Desouza, L.V., Matta, A., Chandra Tripathi, S., Ghanny, S., Datta Gupta, S., Bahadur, S., and Siu, K.W. (2008). Discovery and verification of head-and-neck cancer biomarkers by differential protein expression analysis using iTRAQ labeling, multidimensional liquid chromatography, and tandem mass spectrometry. *Mol Cell Proteomics* 7, 1162–1173.
- Reid, G.E., and McLuckey, S.A. (2002). “Top down” protein characterization via tandem mass spectrometry. *J Mass Spectrom* 37, 663–675.
- Reyes Moreno, J., Ginard Vicens, D., Vanrell, M., Mariñó, Z., Garau, I., Llompарт, A., and Obrador Adrover, A. (2007). [Impact of a registry on survival in familial adenomatous polyposis]. *Med. Clin. (Barc.)* 129, 51–52.
- Rosas, S.L., Koch, W., da Costa Carvalho, M.G., Wu, L., Califano, J., Westra, W., Jen, J., and Sidransky, D. (2001). Promoter hypermethylation patterns of p16, O6-methylguanine-DNA-methyltransferase, and death-associated protein kinase in tumors and saliva of head and neck cancer patients. *Cancer Res* 61, 939–942.
- Ross, P.L., Huang, Y.N., Marchese, J.N., Williamson, B., Parker, K., Hattan, S., Khainovski, N., Pillai, S., Dey, S., Daniels, S., et al. (2004). Multiplexed protein quantitation in *Saccharomyces cerevisiae* using amine-reactive isobaric tagging reagents. *Mol Cell Proteomics* 3, 1154–1169.
- Ryu, J.W., Kim, H.J., Lee, Y.S., Myong, N.H., Hwang, C.H., Lee, G.S., and Yom, H.C. (2003). The proteomics approach to find biomarkers in gastric cancer. *J Korean Med Sci* 18, 505–509.
- Sanchez-Cespedes, M., Esteller, M., Wu, L., Nawroz-Danish, H., Yoo, G.H., Koch, W.M., Jen, J., Herman, J.G., and Sidransky, D. (2000). Gene promoter hypermethylation in tumors and serum of head and neck cancer patients. *Cancer Res* 60, 892–895.

Referências

- Sanz-Casla, M.T., Maestro, M.L., Vidaurreta, M., Maestro, C., Arroyo, M., and Cerdan, J. (2005). p16 Gene methylation in colorectal tumors: correlation with clinicopathological features and prognostic value. *Dig Dis* 23, 151–155.
- Serrano, M., Hannon, G.J., and Beach, D. (1993). A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4. *Nature* 366, 704–707.
- Sharma, R., Samantaray, S., Shukla, N.K., and Ralhan, R. (2003). Transcriptional gene expression profile of human esophageal squamous cell carcinoma. *Genomics* 81, 481–488.
- Shen, J., Person, M.D., Zhu, J., Abbruzzese, J.L., and Li, D. (2004). Protein expression profiles in pancreatic adenocarcinoma compared with normal pancreatic tissue and tissue affected by pancreatitis as detected by two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. *Cancer Res* 64, 9018–9026.
- Shiozaki, H., Oka, H., Inoue, M., Tamura, S., and Monden, M. (1996). E-cadherin mediated adhesion system in cancer cells. *Cancer* 77, 1605–1613.
- Smith, C.W., Pritchard, K., and Marston, S.B. (1987). The mechanism of Ca²⁺ regulation of vascular smooth muscle thin filaments by caldesmon and calmodulin. *J Biol Chem* 262.
- Smith, G., Carey, F.A., Beattie, J., Wilkie, M.J.V., Lightfoot, T.J., Coxhead, J., Garner, R.C., Steele, R.J.C., and Wolf, C.R. (2002). Mutations in APC, Kirsten-ras, and p53--alternative genetic pathways to colorectal cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 9433–9438.
- Tanaka, K., Waki, H., Ido, Y., Akita, S., Yoshida, Y., Yoshida, T., and Matsuo, T. (1988). Protein and polymer analyses up to m/z 100 000 by laser ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2, 151–153.
- Thomas, R.K., Baker, A.C., Debiassi, R.M., Winckler, W., Laframboise, T., Lin, W.M., Wang, M., Feng, W., Zander, T., MacConaill, L., et al. (2007). High-throughput oncogene mutation profiling in human cancer. *Nat Genet* 39, 347–351.
- Tsang, J.S., Vencken, S., Sharaf, O., Leen, E., Kay, E.W., McNamara, D.A., Deasy, J., and Mulligan, E.D. (2014). Global DNA methylation is altered by neoadjuvant chemoradiotherapy in rectal cancer and may predict response to treatment - A pilot study. *Eur J Surg Oncol* 40, 1459–1466.
- Tsanou, E., Peschos, D., Batistatou, A., Charalabopoulos, A., and Charalabopoulos, K. (2008). The E-cadherin adhesion molecule and colorectal cancer. A global literature approach. *Anticancer Res* 28, 3815–3826.
- Vogelstein, B., and Kinzler, K.W. (2004). Cancer genes and the pathways they control. *Nat. Med.* 10, 789–799.
- Wang, R.E. (2011). Targeting heat shock proteins 70/90 and proteasome for cancer therapy. *Curr Med Chem* 18, 4250–4264.
- Washburn, M.P., Wolters, D., and Yates, J.R., 3rd (2001). Large-scale analysis of the yeast proteome by multidimensional protein identification technology. *Nat Biotechnol* 19, 242–247.

Referências

- WCRF (2012). World Cancer Research Fund International: Worldwide (2014)<http://www.wcrf.org/int/cancer-facts-figures/worldwide-data> Acessado em 14/08/2016.
- Weisenberger, D.J., Siegmund, K.D., Campan, M., Young, J., Long, T.I., Faasse, M.A., Kang, G.H., Widschwendter, M., Weener, D., Buchanan, D., et al. (2006). CpG island methylator phenotype underlies sporadic microsatellite instability and is tightly associated with BRAF mutation in colorectal cancer. *Nat. Genet.* 38, 787–793.
- WHO, 2012 World Health Organization: WHO. Acessado em 22/10/2016.
- Wilkins, M.R., Pasquali, C., Appel, R.D., Ou, K., Golaz, O., Sanchez, J.C., Yan, J.X., Gooley, A.A., Hughes, G., Humphery-Smith, I., et al. (1996). From proteins to proteomes: large scale protein identification by two-dimensional electrophoresis and amino acid analysis. *Biotechnol. N* 14, 61–65.
- de Wit, M., Fijneman, R.J., Verheul, H.M., Meijer, G.A., and Jimenez, C.R. (2013). Proteomics in colorectal cancer translational research: biomarker discovery for clinical applications. *Clin Biochem* 46, 466–479.
- Wong, J.J., Hawkins, N.J., and Ward, R.L. (2007). Colorectal cancer: a model for epigenetic tumorigenesis. *Gut* 56, 140–148.
- Wu, C.C., and MacCoss, M.J. (2002). Shotgun proteomics: tools for the analysis of complex biological systems. *Curr. Opin. Mol. Ther.* 4, 242–250.
- Wu, N., Zhang, W., Yang, Y., Liang, Y.L., Wang, L.Y., Jin, J.W., Cai, X.M., and Zha, X.L. (2006). Profilin 1 obtained by proteomic analysis in all-trans retinoic acid-treated hepatocarcinoma cell lines is involved in inhibition of cell proliferation and migration. *Proteomics* 6, 6095–6106.
- Xie, L.Q., Zhao, C., Cai, S.J., Xu, Y., Huang, L.Y., Bian, J.S., Shen, C.P., Lu, H.J., and Yang, P.Y. (2010). Novel proteomic strategy reveal combined alpha1 antitrypsin and cathepsin D as biomarkers for colorectal cancer early screening. *J Proteome Res* 9, 4701–4709.
- Xu, L., Gao, Y., Chen, Y., Xiao, Y., He, Q., Qiu, H., and Ge, W. (2016). Quantitative proteomics reveals that distant recurrence-associated protein R-Ras and Transgelin predict post-surgical survival in patients with Stage III colorectal cancer. *Oncotarget*.
- Xu, T., Venable, J.D., Park, S.K., Conciórva, D., Lu, B., Liao, L., Wohlschlegel, J., Hewel, J., Yates, J.R., and Cociórva, D. (2006). ProLuCID, a fast and sensitive tandem mass spectra-based protein identification program.
- Zakhari, S. (2013). Alcohol metabolism and epigenetics changes. *Alcohol Res. Curr. Rev.* 35, 6–16.
- Zaluzec, E.J., Gage, D.A., and Watson, J.T. (1995). Matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry: applications in peptide and protein characterization. *Protein Expr. Purif.* 6, 109–123.
- Zang, L., Palmer Toy, D., Hancock, W.S., Sgroi, D.C., and Karger, B.L. (2004). Proteomic analysis of ductal carcinoma of the breast using laser capture microdissection, LC-MS, and ¹⁶O/¹⁸O isotopic labeling. *J Proteome Res* 3, 604–612.

Referências

Zha, J., Harada, H., Yang, E., Jockel, J., and Korsmeyer, S.J. (1996). Serine phosphorylation of death agonist BAD in response to survival factor results in binding to 14-3-3 not BCL-X(L). *Cell* 87, 619–628.

Zhang, J., Song, M.Q., Zhu, J.S., Zhou, Z., Xu, Z.P., Chen, W.X., and Chen, N.W. (2011). Identification of differentially-expressed proteins between early submucosal non-invasive and invasive colorectal cancer using 2D-DIGE and mass spectrometry. *Int J Immunopathol Pharmacol* 24, 849–859.

Zheng, L., Weng, M., Qi, M., Qi, T., Tong, L., Hou, X., and Tong, Q. (2012). Aberrant expression of intelectin-1 in gastric cancer: its relationship with clinicopathological features and prognosis. *J Cancer Res Clin Oncol* 138, 163–172.

8. ADENDOS

8.1. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Convidamos o (a) Sr (a) para participar de um Projeto de Pesquisa com o título **“Prospecção de Candidatos a Biomarcadores Oncológicos de Câncer Colorretal por Espectrometria de Massas”**. Este projeto será realizado na Universidade Federal do Amazonas (UFAM) em parcerias com outras instituições, visando ajudar no desenvolvimento de metodologias novas para a detecção precoce do câncer, o que aumenta a chance de cura desta doença. Serão feitos estudos com o objetivo de conhecer a distribuição de suas respectivas proteínas, para uma melhor compreensão a nível molecular das possíveis modificações que ocorrem nas células. O(s) pesquisador (es) Fabiana Greyce Oliveira Almeida e Afonso Duarte Leão de Souza, responsáveis pelo projeto, pedem autorização para retirar amostras de tecidos do colorretal para ser utilizado apenas para esta pesquisa. Caso necessário, esta amostra de tecido também poderá ser enviada para Curitiba onde parte da pesquisa será realizada. Neste caso, o transporte da amostra biológica seguirá as normas institucionais previamente estabelecidas. As análises em busca das substâncias referidas acima ocorrerão em aparelhos apropriados para este tipo de pesquisa, os quais são chamados de cromatógrafos e espectrômetros de massas de alta e baixa resolução. Os dados obtidos com esses aparelhos

serão tratados por técnicas de análises estatísticas e de bioinformática para a identificação dos metabólitos e/ou proteínas relacionadas ao câncer.

Se você autorizar esta coleta, seus tecidos serão utilizados nas análises. O que não for usado não será guardado e sim descartado com o cuidado adequado para materiais biológicos humanos. A coleta do tecido será durante o ato operatório, através de punção por agulha fina, não representando nenhuma dor ou qualquer outro sintoma a você.

Se depois de autorizar a coleta, o Sr(a) não quiser que seu tecido seja usado, tem o direito e a liberdade de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, seja antes ou depois da coleta do tecido, independente do motivo e sem prejuízo do atendimento que está recebendo. O (a) Sr (a) não terá nenhuma despesa e também não receberá nenhum pagamento. A sua participação voluntária é importante para o melhor conhecimento desta doença (câncer) e de como pode ser mais bem diagnosticada antes que comprometa a recuperação dos pacientes.

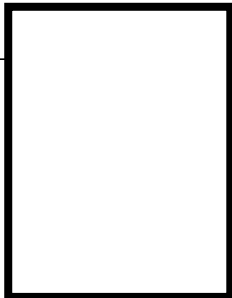
Os resultados da pesquisa serão analisados e publicados, mas sua identidade não será divulgada, sendo guardada em segredo. Para qualquer outra informação, o (a) Sr.(a) poderá entrar em contato com os pesquisadores pelo telefones (92) 9170-0543 e 8110-4245 ou pelos e-mails: fabiana_greyce@hotmail.com esouzadq@ufam.edu.br

Consentimento Pós–Informação

Eu, _____, fui informado(a) sobre o que os pesquisadores querem fazer e porque precisa da minha colaboração, e entendi a explicação. Por isso, eu concordo em participar

do projeto, sabendo que não vou ganhar nada e que posso sair quando quiser.

Estou recebendo uma cópia deste documento, assinada, que vou guardar.

_____	ou		_____
Assinatura do participante			Data
_____			- - -
Pesquisadora Responsável			Data
Impressão do dedo polegar			
Caso não saiba assinar			

8.2. Questionário

NOME:	
IDADE:	SEXO: F () M ()

Histórico de doença na família: SIM () NÃO ()
Caso sim, qual a doença e relação de parentesco?

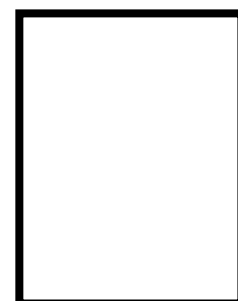
Possui alguma outra doença associada: SIM () NÃO ()
Caso sim, qual?

Está tomando medicamentos? SIM () NÃO ()
Caso sim, qual?

Passou por algum tratamento ou intervenção cirúrgica recentemente? SIM () NÃO ()
Caso sim, qual?

Estágio clínico do câncer:
Estágio cirúrgico do câncer:
Subtipo histológico:

Assinatura do paciente



Manaus, ____ de _____ 2014.

Impressão do dedo polegar
Caso não saiba assinar

8.3. Lista de proteínas identificadas a partir da análise de peptídeos únicos.

Nº	Identificação no Banco de Dados (Uniprot)	Descrição
1	P04406	<i>Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>
2	P14618	<i>Pyruvate kinase PKM</i>
3	P06744	<i>Glucose-6-phosphate isomerase</i>
4	P62937	<i>Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A</i>
5	Q01995	<i>Transgelin</i>
6	P07195	<i>L-lactate dehydrogenase B chain</i>
7	O00299	<i>Chloride intracellular channel protein 1</i>
8	Q00839	<i>Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U</i>
9	P08238	<i>Heat shock protein HSP 90-beta</i>
10	P62258	<i>14-3-3 protein epsilon</i>
11	P78371	<i>T-complex protein 1 subunit beta</i>
12	P02042	<i>Hemoglobin subunit delta</i>
13	Q06323	<i>Proteasome activator complex subunit 1</i>
14	P09622	<i>Dihydrolipoyl dehydrogenase</i>
15	P31939	<i>Bifunctional purine biosynthesis protein PURH</i>
16	P09211	<i>Glutathione S-transferase P</i>
17	P17661	<i>Desmin OS=Homo sapiens</i>
18	O60506	<i>Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein Q</i>
19	P61981	<i>14-3-3 protein gamma</i>
20	Q6ZN40	<i>Tropomyosin 1 (Alpha)</i>
21	P13010	<i>X-ray repair cross-complementing protein 5</i>
22	P07339	<i>Cathepsin D</i>
23	P05455	<i>Lupus La protein</i>
24	Q9P1F3	<i>Costars family protein</i>
25	Q15582	<i>Transforming growth factor-beta-induced protein ig-h3</i>
26	O75083	<i>WD repeat-containing protein 1</i>
27	P31949	<i>Protein S100-A11</i>
28	P35609	<i>Alpha-actinin-2</i>
29	P26038	<i>Moesin</i>
30	Q15102	<i>Platelet-activating factor acetylhydrolase IB subunit gamma</i>
31	P26641	<i>Elongation factor 1-gamma</i>
32	Q15365	<i>Poly(rC)-binding protein 1</i>
33	P13796	<i>Plastin-2 OS=Homo sapiens</i>
34	Q06830	<i>Peroxiredoxin-1</i>
35	Q07021	<i>Complement component 1 Q subcomponent-binding protein</i>
36	P51149	<i>Ras-related protein Rab-7a</i>
37	P07237	<i>Protein disulfide-isomerase</i>
38	P50395	<i>Rab GDP dissociation inhibitor beta</i>
39	O60547	<i>GDP-mannose 4,6 dehydratase</i>

40	P24534	<i>Elongation factor 1-beta</i>
41	P09467	<i>Fructose-1,6-bisphosphatase 1</i>
42	Q14195	<i>Dihydropyrimidinase-related protein 3</i>
43	P48637	<i>Glutathione synthetase</i>
44	O43776	<i>Asparagine--tRNA ligase, cytoplasmic</i>
45	P25398	<i>40S ribosomal protein S12</i>
46	P14174	<i>Macrophage migration inhibitory factor</i>
47	P62851	<i>40S ribosomal protein S25</i>
48	P17858	<i>ATP-dependent 6-phosphofructokinase, liver type</i>
49	P40121	<i>Macrophage-capping protein</i>
50	Q02878	<i>60S ribosomal protein L6</i>
51	P04080	<i>Cystatin-B OS=Homo sapiens</i>
52	P50990	<i>T-complex protein 1 subunit theta</i>
53	P35754	<i>Glutaredoxin-1</i>
54	P60842	<i>Eukaryotic initiation factor 4A-I</i>
55	O15511	<i>Actin-related protein 2/3 complex subunit 5</i>
56	P27824	<i>Calnexin OS=Homo sapiens</i>
57	P04040	<i>Catalase OS=Homo sapiens</i>
58	P62081	<i>40S ribosomal protein S7</i>
59	P04792	<i>Heat shock protein beta-1</i>
60	P36871	<i>Phosphoglucomutase-1</i>
61	P55072	<i>Transitional endoplasmic reticulum ATPase</i>
62	P39023	<i>60S ribosomal protein L3</i>
63	P67936	<i>Tropomyosin alpha-4 chain</i>
64	Q9ULZ3	<i>Apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD</i>
65	P00505	<i>Aspartate aminotransferase, mitochondrial</i>
66	P38646	<i>Stress-70 protein, mitochondrial</i>
67	P52209	<i>6-phosphogluconate dehydrogenase, decarboxylating</i>
68	O75874	<i>Isocitrate dehydrogenase [NADP] cytoplasmic</i>
69	P50991	<i>T-complex protein 1 subunit delta</i>
70	P23284	<i>Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase B</i>
71	O15144	<i>Actin-related protein 2/3 complex subunit 2</i>
72	P62701	<i>40S ribosomal protein S4, X isoform</i>
73	J3QTR3	<i>Ubiquitin (Fragment) OS=Homo sapiens</i>
73	P62269	<i>40S ribosomal protein S18</i>
75	B4DV12	<i>Ubiquitin</i>
76	P0CG48	<i>Polyubiquitin-C (Fragment)</i>
77	F5GYU3	<i>Polyubiquitin-C (Fragment)</i>
78	B8ZZA1	<i>Thymosin alpha-1</i>
79	J3QRK5	<i>Protein UBBP4</i>
80	F5H6Q2	<i>Polyubiquitin-C (Fragment)</i>
81	F5H2Z3	<i>Polyubiquitin-C (Fragment)</i>
82	F5G XK7	<i>Polyubiquitin-C (Fragment)</i>
83	Q96C32	<i>Polyubiquitin-C</i>

84	Q5PY61	<i>Polyubiquitin-C</i>
85	J3QS39	<i>Ubiquitin (Fragment)</i>
86	J3QKN0	<i>Ubiquitin (Fragment)</i>
87	J3QLP7	<i>Protein UBBP4</i>
88	F5H388	<i>Polyubiquitin-C (Fragment)</i>
89	P0CG47	<i>Polyubiquitin-B</i>
90	P62987	<i>Ubiquitin-60S ribosomal protein L40</i>
91	F5H747	<i>Polyubiquitin-C (Fragment)</i>
92	F5H265	<i>Polyubiquitin-C (Fragment)</i>
93	P62979	<i>Ubiquitin-40S ribosomal protein S27a</i>
94	P06454	<i>Prothymosin alpha</i>
95	H7C2N1	<i>Thymosin alpha-1 (Fragment)</i>
96	B5MDF5	<i>GTP-binding nuclear protein Ran</i>
97	P62826	<i>GTP-binding nuclear protein Ran</i>
98	P53999	<i>Activated RNA polymerase II transcriptional coactivator p15</i>
99	P07108	<i>Acyl-CoA-binding protein</i>
100	F5H018	<i>GTP-binding nuclear protein Ran (Fragment)</i>
101	J3KQE5	<i>GTP-binding nuclear protein Ran (Fragment)</i>
102	B8ZZQ6	<i>Uncharacterized protein</i>
103	B8ZZW7	<i>Thymosin alpha-1</i>
104	P31946	<i>14-3-3 protein beta/alpha</i>
105	P07737	<i>Profilin-1</i>
106	A0A087WWU8	<i>Tropomyosin alpha-3 chain</i>
107	Q04917	<i>14-3-3 protein eta</i>
108	P42704	<i>Leucine-rich PPR motif-containing protein, mitochondrial</i>
109	P63104	<i>14-3-3 protein zeta/delta</i>
110	Q5TCU3	<i>Tropomyosin beta chain</i>
111	P60174	<i>Triosephosphate isomerase</i>
112	P23396	<i>40S ribosomal protein S3</i>
113	P27797	<i>Calreticulin OS=Homo sapiens</i>
114	P49368	<i>T-complex protein 1 subunit gamma</i>
115	Q01518	<i>Adenylyl cyclase-associated protein 1</i>
116	P00441	<i>Superoxide dismutase [Cu-Zn]</i>
117	Q12906	<i>Interleukin enhancer-binding factor 3</i>
118	Q15181	<i>Inorganic pyrophosphatase</i>
119	P61019	<i>Ras-related protein Rab-2A</i>
120	P42765	<i>3-ketoacyl-CoA thiolase, mitochondrial</i>
121	P00558	<i>Phosphoglycerate kinase 1</i>
122	P36578	<i>60S ribosomal protein L4</i>
123	P12814	<i>Alpha-actinin-1</i>
124	P13667	<i>Protein disulfide-isomerase A4</i>
125	Q02817	<i>Mucin-2</i>
126	Q14697	<i>Neutral alpha-glucosidase AB</i>
127	P52907	<i>F-actin-capping protein subunit alpha-1</i>

128	P32119	<i>Peroxiredoxin-2</i>
129	P62829	<i>60S ribosomal protein L23</i>
130	P06748	<i>Nucleophosmin</i>
131	O43707	<i>Alpha-actinin-4</i>
132	P13489	<i>Ribonuclease inhibitor</i>
133	P40925	<i>Malate dehydrogenase</i>
134	P08107	<i>Heat shock 70 kDa protein 1A/1B</i>
135	P18206	<i>Vinculin OS=Homo sapiens</i>
136	P30101	<i>Protein disulfide-isomerase A3</i>
137	P00338	<i>L-lactate dehydrogenase A chain</i>
138	P05388	<i>60S acidic ribosomal protein P0</i>
139	P05091	<i>Aldehyde dehydrogenase, mitochondrial</i>
140	O75369	<i>Filamin-B OS=Homo</i>
141	P61978	<i>Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K</i>
142	P30086	<i>Phosphatidylethanolamine-binding protein 1</i>
143	P28838	<i>Cytosol aminopeptidase</i>
144	P13639	<i>Elongation factor 2</i>
145	F5H5D3	<i>Tubulin alpha-1C chain</i>
146	P68363	<i>Tubulin alpha-1B chain</i>
147	Q9BQE3	<i>Tubulin alpha-1C chain</i>
148	Q71U36	<i>Tubulin alpha-1A chain</i>
149	P06733	<i>Alpha-enolase</i>
150	P69905	<i>Hemoglobin subunit alpha</i>
151	P40926	<i>Malate dehydrogenase</i>
152	P40939	<i>Trifunctional enzyme subunit alpha</i>
153	P35579	<i>Myosin-9</i>
154	P10909	<i>Clusterin</i>
155	P08727	<i>Keratin, type I cytoskeletal 19</i>
156	Q9Y490	<i>Talin-1</i>
157	P02675	<i>Fibrinogen beta chain</i>
158	P22314	<i>Ubiquitin-like modifier-activating enzyme 1</i>
159	P05141	<i>ADP/ATP translocase 2</i>
160	P10809	<i>60 kDa heat shock protein, mitochondrial</i>
161	P68871	<i>Hemoglobin subunit beta</i>
162	Q06210	<i>Glutamine--fructose-6-phosphate aminotransferase [isomerizing] 1</i>
163	Q05682	<i>Caldesmon O</i>
164	P30048	<i>Thioredoxin-dependent peroxide reductase</i>
165	P19338	<i>Nucleolin</i>
166	P00326	<i>Alcohol dehydrogenase 1C</i>
167	P12277	<i>Creatine kinase B-type</i>
168	P07900	<i>Heat shock protein HSP 90-alpha</i>
169	P07148	<i>Fatty acid-binding protein, liver</i>
170	P05387	<i>60S acidic ribosomal protein P2</i>

171	P37837	<i>Transaldolase</i>
172	P10599	<i>Thioredoxin</i>
173	P00325	<i>Alcohol dehydrogenase 1B</i>
174	P06576	<i>ATP synthase subunit beta</i>
175	Q15084	<i>Protein disulfide-isomerase A6</i>
176	P02671	<i>Fibrinogen alpha</i>
177	P29401	<i>Transketolase</i>
178	P48735	<i>Isocitrate dehydrogenase [NADP]</i>
179	P21333	<i>Filamin-A</i>
180	P19652	<i>Alpha-1-acid glycoprotein 2</i>
181	P14625	<i>Endoplasmic</i>
182	Q15149	<i>Plectin</i>
183	P01024	<i>Complement C3</i>
184	P56470	<i>Galectin-4</i>
185	P05787	<i>Keratin, type II cytoskeletal 8</i>
186	P62805	<i>Histone H4</i>
187	P10412	<i>Histone H1.4</i>
188	P01859	<i>Ig gamma-2 chain C region</i>
189	Q8WWA0	<i>Intellectin-1</i>
190	P00352	<i>Retinal dehydrogenase 1</i>
191	P02545	<i>Prelamin-A/C</i>
192	P01877	<i>Ig alpha-2 chain C region</i>
193	AOA087WZW8	<i>Protein IGKV3-11</i>
194	P00918	<i>Carbonic anhydrase 2</i>
195	P02790	<i>Hemopexin</i>
196	P01876	<i>Ig alpha-1 chain C region</i>
197	Q6NZI2	<i>Polymerase I and transcript release factor</i>
198	Q13228	<i>Selenium-binding protein 1</i>
199	P10645	<i>Chromogranin-A</i>
200	P01023	<i>Alpha-2-macroglobulin</i>
201	P01009	<i>Alpha-1-antitrypsin</i>
202	P25705	<i>ATP synthase subunit alpha</i>
203	A8K7I4	<i>Calcium-activated chloride channel regulator 1</i>
204	P02787	<i>Serotransferrin</i>
205	P08670	<i>Vimentin</i>
206	P02768	<i>Serum albumin</i>
207	P12532	<i>Creatine kinase U-type</i>
208	P06396	<i>Gelsolin</i>
209	P46940	<i>Ras GTPase-activating-like protein IQGAP1</i>
210	P17655	<i>Calpain-2 catalytic subunit</i>
220	Q9Y5Z4	<i>Heme-binding protein 2</i>
221	P40227	<i>T-complex protein 1 subunit zeta</i>
222	P26447	<i>Protein S100-A4 OS=Homo sapiens</i>
223	P06899	<i>Histone H2B type 1-J</i>

224	Q99877	<i>Histone H2B type 1-N</i>
225	P62807	<i>Histone H2B type 1-C/E/F/G/I</i>
226	Q93079	<i>Histone H2B type 1-H</i>
227	O60814	<i>Histone H2B type 1-K</i>
228	Q5QNW6	<i>Histone H2B type 2-F</i>
229	P23527	<i>Histone H2B type 1-O</i>
230	P58876	<i>Histone H2B type 1-D</i>
231	Q99879	<i>Histone H2B type 1-M</i>
232	P33778	<i>Histone H2B type 1-B</i>
233	Q16778	<i>Histone H2B type 2-E</i>
234	U3KQK0	<i>Histone H2B</i>
235	P05386	<i>60S acidic ribosomal protein P1</i>
236	Q05315	<i>Galectin-10</i>
237	Q01469	<i>Fatty acid-binding protein, epidermal</i>
238	Q8WUM4	<i>Programmed cell death 6-interacting protein</i>
239	P68371	<i>Tubulin beta-4B chain OS=Homo sapiens</i>
240	P00488	<i>Coagulation factor XIII A chain</i>
241	P17987	<i>T-complex protein 1 subunit alpha</i>
242	P27348	<i>14-3-3 protein theta OS=Homo sapiens</i>
243	Q16543	<i>Hsp90 co-chaperone Cdc37</i>
244	Q15029	<i>116 kDa U5 small nuclear ribonucleoprotein component</i>
245	O94760	<i>N(G),N(G)-dimethylarginine dimethylaminohydrolase 1</i>
246	P08311	<i>Cathepsin G OS=Homo sapiens</i>
247	P23381	<i>Tryptophan--tRNA ligase, cytoplasmic</i>
248	Q9HAV7	<i>GrpE protein homolog 1</i>
249	P30050	<i>60S ribosomal protein L12</i>
250	P10606	<i>Cytochrome c oxidase subunit 5B</i>
251	P09382	<i>Galectin-1</i>
252	P07384	<i>Calpain-1 catalytic subunit</i>
253	Q99714	<i>3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase type-2</i>
254	P16401	<i>Histone H1.5</i>
255	P30085	<i>UMP-CMP kinase</i>
256	Q08211	<i>ATP-dependent RNA helicase A</i>
257	P07814	<i>Bifunctional glutamate/proline--tRNA ligase</i>
258	Q96199	<i>Succinyl-CoA ligase [GDP-forming] subunit beta</i>
259	O00151	<i>PDZ and LIM domain protein 1</i>
260	P07305	<i>Histone H1.0</i>
261	A0A087X2C0	<i>Ig mu chain C region</i>
262	Q9H2U2	<i>Inorganic pyrophosphatase 2</i>
263	P20962	<i>Parathyrosin</i>
264	P31937	<i>3-hydroxyisobutyrate dehydrogenase</i>
265	P52597	<i>Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein F</i>
266	P51858	<i>Hepatoma-derived growth factor</i>
267	O15143	<i>Actin-related protein 2/3 complex subunit 1B</i>

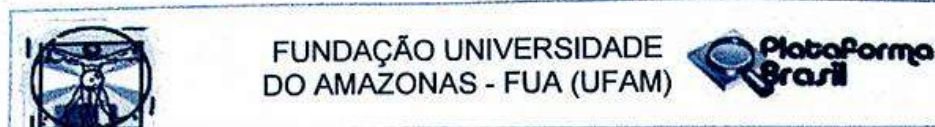
268	P78417	<i>Glutathione S-transferase omega-1</i>
269	P54868	<i>Hydroxymethylglutaryl-CoA synthase, mitochondrial</i>
270	P09960	<i>Leukotriene A-4 hydrolase</i>
271	P11766	<i>Alcohol dehydrogenase class-3</i>
272	P14923	<i>Junction plakoglobin</i>
273	P17931	<i>Galectin-3</i>
274	P14550	<i>Alcohol dehydrogenase [NADP(+)]</i>
275	P13804	<i>Electron transfer flavoprotein subunit alpha</i>
276	P25788	<i>Proteasome subunit alpha type-3</i>
277	P25774	<i>Cathepsin S</i>
278	P60953	<i>Cell division control protein 42 homolog</i>
279	Q15056	<i>Eukaryotic translation initiation factor 4H</i>
280	P49189	<i>4-trimethylaminobutyraldehyde dehydrogenase</i>
281	A0A087WXI2	<i>IgGFC-binding protein</i>
282	Q9Y6R7	<i>IgGFC-binding protein</i>
283	Q96KP4	<i>Cytosolic non-specific dipeptidase</i>
284	O75368	<i>SH3 domain-binding glutamic acid-rich-like protein</i>
285	P39687	<i>Acidic leucine-rich nuclear phosphoprotein 32 family member A</i>
286	P55084	<i>Trifunctional enzyme subunit beta, mitochondrial</i>
287	Q9Y678	<i>Coatomer subunit gamma-1</i>
288	P62316	<i>Small nuclear ribonucleoprotein Sm D2</i>
289	Q16822	<i>Phosphoenolpyruvate carboxykinase [GTP], mitochondrial</i>
290	P23246	<i>Splicing factor, proline- and glutamine-rich</i>
291	P35270	<i>Sepiapterin reductase</i>
292	Q15746	<i>Myosin light chain kinase, smooth muscle</i>
293	Q00610	<i>Clathrin heavy chain 1</i>
294	A0A087WVQ6	<i>Clathrin heavy chain 1</i>
295	Q09666	<i>Neuroblast differentiation-associated protein AHNAK</i>
296	P31146	<i>Coronin-1A</i>
297	P43652	<i>Afamin</i>
298	Q14651	<i>Plastin-</i>
299	P12004	<i>Proliferating cell nuclear antigen</i>
300	Q99832	<i>T-complex protein 1 subunit eta</i>
301	Q86VP6	<i>Cullin-associated NEDD8-dissociated protein 1</i>
302	Q13813	<i>Spectrin alpha chain, non-erythrocytic 1</i>
303	P38117	<i>Electron transfer flavoprotein subunit beta</i>
304	O95994	<i>Anterior gradient protein 2 homolog</i>
305	C9J3E2	<i>Anterior gradient protein 2 homolog (Fragment)</i>
306	B5MC07	<i>Anterior gradient protein 2 homolog</i>
307	P53634	<i>Dipeptidyl peptidase 1</i>
308	H0Y7A7	<i>Calmodulin (Fragment)</i>
309	E7ETZ0	<i>Calmodulin</i>
310	E7EMB3	<i>Calmodulin</i>

311	P62158	<i>Calmodulin</i>
312	O00748	<i>Cocaine esterase</i>
313	P30041	<i>Peroxiredoxin-6</i>
314	P00390	<i>Glutathione reductase, mitochondrial</i>
315	Q13011	<i>Delta(3,5)-Delta(2,4)-dienoyl-CoA isomerase</i>
316	P50570	<i>Dynamin-2 OS=Homo sapiens GN=DNM2 PE=1 SV=2</i>
317	P61026	<i>Ras-related protein Rab-10</i>
318	P0C0L4	<i>Complement C4-A</i>
319	P49411	<i>Elongation factor Tu, mitochondrial</i>
320	P30049	<i>ATP synthase subunit delta, mitochondrial</i>
321	O60701	<i>UDP-glucose 6-dehydrogenase</i>
322	O75367	<i>Core histone macro-H2A.1</i>
323	Q14204	<i>Cytoplasmic dynein 1 heavy chain 1</i>
324	Q9Y696	<i>Chloride intracellular channel protein 4</i>
325	P53618	<i>Coatomer subunit beta</i>
326	Q7L576	<i>Cytoplasmic FMR1-interacting protein 1</i>
327	P49588	<i>Alanine--tRNA ligase, cytoplasmic</i>
328	P53597	<i>Succinyl-CoA ligase [ADP/GDP-forming] subunit alpha</i>
329	P61160	<i>Actin-related protein 2</i>
330	P60981	<i>Dextrin</i>
331	O43488	<i>Aflatoxin B1 aldehyde reductase member 2</i>
332	P01861	<i>Ig gamma-4 chain C region</i>
333	P07954	<i>Fumarate hydratase, mitochondrial</i>
334	F5GXS0	<i>Complement C4-B</i>
335	P0C0L5	<i>Complement C4-B</i>
336	Q02790	<i>Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP4</i>
337	P68366	<i>Tubulin alpha-4A chain</i>
338	P53621	<i>Coatomer subunit alpha</i>
339	Q8WU39	<i>Marginal zone B- and B1-cell-specific protein</i>
340	Q14764	<i>Major vault protein</i>
341	Q9Y6N5	<i>Sulfide:quinone oxidoreductase, mitochondrial</i>
342	Q16401	<i>26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 5</i>
343	Q9NZN4	<i>EH domain-containing protein 2</i>
344	A0A087WXL8	<i>Ig gamma-3 chain C region</i>
345	A0A075B6N8	<i>Ig gamma-3 chain C region (Fragment)</i>
346	A0A087X010	<i>Ig gamma-1 chain C region</i>
347	A0A087WV47	<i>Ig gamma-1 chain C region</i>
348	P01860	<i>Ig gamma-3 chain C region</i>
349	A0A087WYE1	<i>Ig gamma-1 chain C region</i>
350	A0A087WVW2	<i>Ig gamma-3 chain C region</i>
351	P05204	<i>Non-histone chromosomal protein HMG-17</i>
352	P09327	<i>Villin-1</i>
353	Q9NR45	<i>Sialic acid synthase</i>
354	P16104	<i>Histone H2AX</i>

355	P30044	<i>Peroxiredoxin-5</i>
356	Q96CX2	<i>BTB/POZ domain-containing protein KCTD12</i>
357	P11216	<i>Glycogen phosphorylase, brain form</i>
358	P39060	<i>Collagen alpha-1(XVIII) chain</i>
359	A0A087X1C7	<i>Ig gamma-1 chain C region</i>

9. ANEXOS

9.1. Termo de aprovação do Conselho de Ética


PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP
DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: PROSPECÇÃO DE NOVOS CANDIDATOS A BIOMARCADORES ONCOLÓGICOS DE CÂNCER COLORRETAL POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS

Pesquisador: Fabiana Greyce Oliveira Almeida

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 27598614.1.0000.5020

Instituição Proponente: Instituto de Ciências Exatas e Tecnologia

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 562.016

Data da Relatoria: 19/03/2014

Apresentação do Projeto:

Esta é a resposta do projeto, que pertence à Grande Áreas do Conhecimento (CNPq) Grande Área 1. Ciências Exatas e da Terra, ao parecer no. 536.711 do CEP/UFAM. A pesquisadora responsável é a doutoranda Fabiana Greyce Oliveira Almeida, orientada pelo Prof. Dr. Afonso Duarte Leão de Souza, do Instituto de Ciências Exatas da UFAM (ICE/UFAM), no Programa de Pós-graduação em Química da Universidade Federal do Amazonas, conforme projeto completo apensado ao protocolo. A equipe de pesquisa é constituída também pelos pesquisadores: Afonso DL Souza (Orientador), Antonia Queiroz Lima de Souza, Julianade Saldanha da Gama Fischer, Paulo Costa Carvalho, Priscila Ferreira de Aquino e Sidney Raimundo Silva Chalub. Este estudo espera diferenciar biópsias tumorais, respectivas margens de ressecção e tecidos colorretais de indivíduos controle através da análise de seus perfis metabólicos por espectrometria de massas seguida do tratamento estatístico dos dados, e espera-se contribuir de maneira satisfatória para aumentar os dados sobre o câncer colorretal e, conseqüentemente, diminuir a incidência deste câncer na região Norte através de novas ferramentas para a detecção precoce da doença.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Realizar um estudo comparativo de amostras de tecidos tumorais e margem de ressecção de

Endereço: Rua Teresina, 4950
 Bairro: Adrianópolis CEP: 69.057-070
 UF: AM Município: MANAUS
 Telefone: (92)3305-5130 Fax: (92)3305-5130 E-mail: cep@ufam.edu.br



FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE
DO AMAZONAS - FUA (UFAM)



Continuação do Parecer: 562.018

pacientes com câncer colorretal, comparando com amostras colorretais de indivíduos controles (sem a doença - voluntários submetidos à colonoscopia por doenças não oncológicas), através de análises genômicas, proteômicas e metabolômicas.

Objetivo Secundário:

- Analisar a presença de mutações nos genes CRC e KRAS nas amostras de câncer colorretal e nos controles;
- Construir heredogramas para os voluntários deste estudo e avaliar o risco genético;
- Analisar por espectrometria de massas as amostras de câncer colorretal, das respectivas margens de ressecção, e dos controles para a obtenção de perfis proteômicos e metabolômicos;
- Correlacionar os resultados obtidos da técnica de MudPIT com os dados provenientes da análise do MALDI imaging (Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization);
- Analisar alterações no perfil proteômico de biopsias de margem de ressecção a diferentes distâncias do tumor;
- Selecionar através de ferramentas estatísticas candidatos a marcadores proteômicos e metabolômicos específicos para o tipo de câncer em estudo;
- Confrontar os resultados das análises proteômicas, metabolômicas e genômicas com os dados da avaliação clínica dos pacientes envolvidos no estudo e com os heredogramas.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Foi corrigido pela pesquisadora nesta versão:

Riscos:

Para os pacientes tanto com câncer (submetidos à cirurgia) como aqueles pacientes do grupo controle (submetidos a colonoscopia), os riscos oferecidos são inerentes ao procedimento que cada grupo será submetido, tais como desconfortos, incômodos derivados dos procedimentos, ansiedade pela espera dos resultados dos exames pois o material coletado será de peça cirúrgica ou de colonoscopia, rotineiras no CECON. A colonoscopia tem o risco inerente ao procedimento que a concerne tais como anestesia, perfuração e sangramento intestinal. Em relação ao procedimento cirúrgico, pode ainda ocorrer contaminação com material e danificação da peça para exames histopatológico. No entanto, esses riscos serão minimizados em virtude dos cuidados que são tomados durante e após os procedimentos cirúrgicos ou colonoscópicos. Para o pesquisador,

Endereço: Rua Teresina, 4950
 Bairro: Adrianópolis CEP: 69.057-070
 UF: AM Município: MANAUS
 Telefone: (92)3305-5130 Fax: (92)3305-5130 E-mail: cep@ufam.edu.br



FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE
DO AMAZONAS - FUA (UFAM)



Continuação do Parecer. 562.016

os riscos estão relacionados a manipulação de material biológico e solventes químicos. Porém, a utilização de luvas estéreis e roupas cirúrgicas adequadas para manipulação do material biológico, associada à formação em Química e a realização dos trabalhos dentro das normas de segurança adequadas a tais manipulações, os riscos serão minimizados.

Benefícios:

Há a possibilidade de benefício imediato ou pelo menos indireto para a população como um todo, pois este projeto visa identificar proteínas ou grupo de proteínas e metabólitos que permitam avaliar a população de risco com procedimentos de diagnóstico precoce do carcinoma estudado.

COMENTÁRIO: ADEQUADOS.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Nesta versão o orçamento foi detalhado e totaliza o valor de R\$ 9.050,00.

A Metodologia agora esclarece adequadamente a abordagem aos sujeitos: Os pacientes cirúrgicos serão abordados no leito após a internação no dia anterior a realização do procedimento. Os pacientes do grupo controle (colonoscopia) serão abordados no setor de Endoscopia duas horas antes da realização do exame colonoscópico. O Critério de Inclusão: 1. Pacientes com cânceres colorretal esporádico ou familiar, diagnosticados através de biópsia e colonoscopia, tendo como diagnóstico histológico adenocarcinoma; e que tiverem indicação cirúrgica pelo corpo clínico da fundação CECON. 2. Os controles serão os pacientes submetidos a colonoscopia por doenças não oncológicas. 3. Em ambos os casos acima os pacientes serão maiores de idade que concordaram em participar da pesquisa e independente do sexo. Critério de Exclusão: 1. A ocorrência prévia ou atual das seguintes doenças: HIV ou vírus da hepatite B ou C, e o histórico de outros tipos de carcinoma será anotada. No caso de possível interferência nas análises, a amostra correspondente será descartada.

Os links de CV Lattes foram inseridos no Protocolo de Pesquisa no campo Outras Informações, conforme solicitação do parecer anterior para permitir a análise da qualificação da equipe, conforme item III.1.h. da Resolução 466/2013-CNS.

O item Riscos está corrigido e ADEQUADO.

Haverá uso de prontuários e não haverá armazenamento de amostras.

O Cronograma de Execução foi readequado, está detalhado, e discrimina o período da etapa de Coleta e caracterização do material biológico para início em 01/04/2014 e término em 31/12/2014.

Endereço: Rua Teresina, 4950
Bairro: Adrianópolis CEP: 69.057-070
UF: AM Município: MANAUS
Telefone: (92)3305-5130 Fax: (92)3305-5130 E-mail: cep@ufam.edu.br



FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE
DO AMAZONAS - FUA (UFAM)



Continuação do Parecer: 562.016

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Folha de Rosto: Agora ADEQUADA. Assinada pela pesquisadora responsável e, pela Vice-Coordenador do PPG em Química.

Termo de Anuência: Apresentados 3 termos de anuência: a) do Instituto de Ciências Exatas da UFAM, assinado pelo Diretor do ICE/UFAM. ADEQUADO ; b) da Fundação CECON. ADEQUADO, apresentado em papel timbrado e assinada pela Diretora de Ensino e Pesquisa; c) Termo de Anuência do Instituto Carlos Chagas/FIOCRUZ, assinado pela Vice-diretora de Gestão da Inovação, Cooperação e Alianças, Andréa Rodrigues Ávila. ADEQUADO.

TCLE: Corrigido e agora ADEQUADO, tendo sido implementadas todas as solicitações do parecer anterior.

Recomendações:

Recordar na aplicação do TCLE de a incluir rubrica do sujeitos da pesquisa e dos pesquisadores em todas as folhas do TCLE, como preconiza a Res. 466/2012-CNS.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O presente projeto apresenta relevância social e científica, e atendeu todas as pendências do parecer anterior para adequar-se à Res. 466/2012-CNS.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Endereço: Rua Teresina, 4950
Bairro: Adrianópolis CEP: 69.057-070
UF: AM Município: MANAUS
Telefone: (92)3305-5130 Fax: (92)3305-5130 E-mail: cep@ufam.edu.br

9.2. Artigo publicado a revista *Biological Research - Impact Factor: 1.328* – B5 (Química)

[Biol Res](#). 2015; 48(1): 50.

Published online 2015 Sep 12. doi: [10.1186/s40659-015-0042-7](https://doi.org/10.1186/s40659-015-0042-7)

Colorectal cancer DNA methylation patterns from patients in Manaus, Brazil

[Fabiana Greyce Oliveira Almeida](#), [Priscila Ferreira de Aquino](#), [Afonso Duarte Leão de Souza](#), [Antonia Queiroz Lima de Souza](#), [Sonia do Carmo Vinhote](#), [Thaís Messias Mac-Cormick](#), [Marcelo Soares da Mota Silva](#), [Sidney Raimundo Silva Chalub](#), [Juliana de Saldanha da Gama Fischer](#), [Paulo Costa Carvalho](#),[✉] and [Maria da Gloria da Costa Carvalho](#)[✉]

[Author information](#) ► [Article notes](#) ► [Copyright and License information](#) ►

This article has been [cited by](#) other articles in PMC.

Abstract

[Go to:](#)

Background

Colorectal cancer (CRC) comprehends tumors that affect the colon and rectum; it is the third type of cancer with the highest incidence in the world [1]. According to the 2014 estimates for Brazil, about 576,000 new cases of cancer were expected [2] of which 15,070 of those being for CRC in men and 17,530 for women. In particular, for the Amazon state (Brazil), a rate of 4.65 cases per 100,000 inhabitants [2] was estimated. The standard treatment for localized colorectal cancer involves surgical resection by open surgery of the primary tumor and regional lymph nodes. It has been shown that excessive consumption of red meat, alcoholism, body and abdominal fat, smoking, family history of CRC, genetic susceptibility to the development of chronic intestine disease, and age are all positively correlated to CRC [3, 4]. Nevertheless, about 90 % of CRC occurs sporadically and without family history or genetic predisposition; i.e., less than 10 % of the cases are believed to be linked to one's genetics [5].

The study of epigenetics alterations has gained increasing attention; it comprises investigating how external or environmental factors affect the control of gene expression by turning genes “on” or “off” [6]. An example of a key epigenetic event is the methylation that occurs in small regions of DNA called CpG island which are located in the promoter region of genes [7]. Methylation defines the process of adding a methyl (CH₃-) group in the promoter cytosine bases at the 5' position to form 5-methylcytosine (5-MC). DNA methylation is usually linked with the silencing of gene expression for many tumor suppressor genes, such as, *CDHI* [8], *CDKN2A* [9], *TIMP2* [10], and *DAPK* [11]. The *CDHI* gene expresses E-cadherin which is a transmembrane protein contained between epithelial cells and represents one of the main proteins involved in cell adhesion [12]. The loss of adhesion mediated by E-cadherin appears to have a fundamental importance in neoplastic processes. A down regulation of this gene is correlated with a decrease in the efficiency of cellular adhesion and therefore facilitating cellular motility; this in turn facilitates cancer cells for invading surrounding tissues [8]. Another gene strongly correlated to cancer is the *CDKN2A*; one of its products is the p16, a regulatory protein that inhibits the progression of cells through the G1 phase of the cell cycle [11]. Inactivation of p16 can cause abnormal cells and uncontrolled cell growth [13]. The *TIMP2*, for tissue inhibitor of metalloproteinases 2, is known to antagonize the activity of matrix metalloproteinases and suppress tumor growth, angiogenesis, invasion, and metastasis [14]; the mechanism of inhibition of this gene's expression remains unknown. Finally, *DAPK* (for death-associated protein kinase) participates in

several functions in the cell, among them, playing a key role in the reorganization of the cytoskeleton in cytokine stimulation and induction of apoptosis [11]. Understanding *DAPK*'s role in transcriptional regulation may lead to the discovery of novel therapeutics to combat cancer and inflammation associated diseases.

According to literature, abnormal methylation patterns of these genes is an indicative of cancer [15–18]. Studies have reported such alterations, for example, in the mucosa of colorectal tumor and suggested these genes as cancer markers [19, 20]. In another work, the hypermethylation of *DAPK* and *CDKN2A* in the normal colonic mucosa of patients with CRC was evaluated by the methylight assay and the results showed their levels of methylation to be relatively low [mean percentage of a methylated reference (PMR) <1] [20]. In the same work, the authors correlated patients with high levels of methylation of *INK4A* and *DAPK* with advanced age ($p < 0.1$), supporting the hypothesis that age is one of the risk factors for this pathology. Finally, a panel of methylation markers for CRC diagnosis comprising *CDKN2A*, *MGMT*, *MLH1*, and *SFRP* was proposed [21].

Even though epigenetic markers are being increasingly applied in the screening for colorectal neoplasia's samples, further investigations, especially in different populations, is fundamental for a proper understanding of the applicability of these markers to the clinical practice. In the present study, we evaluated the methylation of the *CDH1*, *DAPK*, *CDKN2A*, and *TIMP2* genes in five colorectal cancer patients from Manaus, the capital of the Amazon state in Brazil. Although the Amazon region presents a predominance of Indians, with approximately 342,800 indigenous people [22], this study included only patients recognized as having brown or white skin. This is the first study of this type performed in the population of the Amazon region.

[Go to:](#)

Results

Table 1 shows the clinical characteristics of the five patients included in this study; we note that 20 % (1/5) of the tumors were located in colon and 80 % (4/5) in the rectum. The median age of the patients was 62 years. All the patients had resection margins free of neoplasia according to a histopathological exam. These results were compared to the methylation status obtained here. All of the tumor-node-metastasis (TMN) stages analyzed here had one or more genes methylated. Table 2 shows the gene methylation status for the *CDH1*, *CDKN2A*, *DAPK*, and *TIMP2* genes.

Table 1

Patients' clinical characteristics

Patients no/sample	Cancer type	Gender	Age (years)	Skin color	Stage (TMN)
4	Rectal adenocarcinoma	M	65	Brown	T3N0M0
7	Colon adenocarcinoma	M	40	Brown	T3N0M0
8	Rectal adenocarcinoma	F	74	Brown	T4N2M0
1	Rectal adenocarcinoma	M	61	Brown	T3N0M0
9	Rectal adenocarcinoma	M	62	White	T3N1M0

M male, *F* female, *TMN* tumor-node-metastasis

Table 2

Patients' clinical characteristics. Methylation status of *CDH1*, *CDKN2A*, *DAPK* and *TIMP2* genes.

Patient no/sample	Methylation			
	<i>CDH1</i>	<i>CDKN2A</i>	<i>DAPK</i>	<i>TIMP2</i>
4 T	M	M	M	M
4 PM	M	M	M	M
4 DM	U	M	M	M
7 T	U	U	U	M
7 PM	M	U	M	M
7 DM	M	U	M	M
8 T	U	U	M	M
8 DM	U	U	M	M
1 T	NA	M	M	NA
1 DM	U	U	M	NA
9 T	U	U	M	M
9 DM	NA	U	M	M
Methylation tumor (%)	1/5 (20 %)	2/5 (40 %)	4/5 (80 %)	4/5 (80 %)
Methylation adjacent margin (%)	3/7 (43 %)	2/7 (28 %)	7/7 (100 %)	6/7 (86 %)

NA not amplified, U unmethylated, M methylated, T tumor, PM proximal margin (2 cm), DM distal margin (5 cm)

Tumor biopsies were methylated in 1/5 (20 %), 2/5 (40 %), 4/5 (80 %), and 4/5 (80 %) for the *CDH1*, *CDKN2A*, *DAPK*, and *TIMP2* genes, respectively. The margin biopsies were methylated in 3/7 (43 %), 2/7 (28 %), 7/7 (100 %), and 6/7 (86 %) for the *CDH1*, *CDKN2A*, *DAPK*, and *TIMP2* genes, respectively. In all, 64 % (18/28) of the resection margins and 55 % (11/20) of tumor tissue were methylated for the four genes.

Patient 4 had the tumor biopsy (4T) and margins (4PM and 4DM) methylated for all, *CDH1*, *CDKN2A*, *DAPK*, and *TIMP2*, except for 4DM not being methylated for *CDH1*. The tumor tissue of patient 8 (8T) and the respective adjacent margin (8DM) were not methylated for *CDH1* and *CDKN2A*; yet, *DAPK* and *TIMP2* were both methylated for 8T and 8DM. These results were similar to those from patient 9DM; other sections from this patient, in our hands, were unable to have their genes amplified by PCR. Patient 1 showed 1T to be methylated for *CDKN2A* and *DAPK* and not for *CDH1* and *TIMP2*. *DAPK* showed to be methylated for 1DM. 7T was not methylated for 7DM but was methylated for both *DAPK* and *CDH1* and thus showing a different methylation pattern. Amplification of *CDH1* gene (1T, 6T, and 9DM samples) and *TIMP2* (sample 1DM) were unsuccessful and methylation could not be analyzed.

[Go to:](#)

Discussions

The DNA methylation leads to an altered gene expression resulting in changes in the control of cell proliferation and therefore being recognized as a major epigenetic modification in human genes [19]. There

is increasing evidence that an aberrant methylation pattern is actively involved in early carcinogenesis [7]. In colorectal cancer, both hyper- and hypomethylation have been observed across different stages of progression. Here, we evaluated the prevalence of hypermethylation in the *CDHI*, *CDKN2A*, *DAPK*, and *TIMP2* suppressor tumor genes of colorectal tumor tissue and their non-neoplastic adjacent margin using methylation specific PCR (MSP), which is a highly sensitive and specific technique [23].

Subjects having either brown or white skin were eligible for participating in this study. We note that the brown classification decurrently from the so called *caboclos*, descendants of Indians and Europeans—mostly English, French, and Spanish, that are commonly found in the northern part of Brazil [24]. It is the first time a study addressing the methylation pattern in colorectal cancer patients from the Amazon is performed. Our results show that each individual presented a distinct panel of methylated genes. In general, the methylated tumor tissues had their respective margin methylated. Likewise, genes, not methylated in tumor tissues were not methylated in their adjacent margin. Yet, patient 7 showed an opposing result by not presenting methylation on the tumor for genes *DAPK* and *CDHI*; these genes were methylated only in the respective adjacent margins (7PM and 7DM). We hypothesize that this may have happened considering that methylation is a reversible process [25] and, in this way, the gene could have been previously methylated in the tumor but metabolic factors reversed it. Another probable explanation is that tumor cells have a great heterogeneity [26] and, therefore, the examined area was not methylated.

The literature provides several studies that compare the methylation status of histologically normal mucosa with the neoplastic tissues. While some show no correlation between the methylation with the pathology, many studies, from around the world, were able to correlate methylation of the tumor region and the corresponding adjacent margin [27–30]. Li et al. reported that 2.4 and 57.4 % of the samples were methylated in their tumor and adjacent tissue and that no methylation was detected in all the control tissue. A meta-analysis study revealed the frequency of the *CDHI* promoter methylation in CRC tissues to be higher than those in control tissues (OR = 2.61, 95 % CI = 1:24–5:50, p = 0.012) [31]. When the ethnicity factor was considered, the *CDHI* promoter methylation showed to be closely linked to the pathogenesis of CRC among Asians and Africans, but not among Caucasians. Our results show that the *CDHI* promoter methylation in tumor tissue was lower than in the adjacent margins. *CDHI* gene promoter methylation may lead to aberrant expression of E-cadherin [32]. The loss of adhesion mediated by E-cadherin appears to have a fundamental importance during the neoplastic processes, which allows cells having a controlled stop normal growth signaling, resulting in the loss of differentiation and increase in cell proliferation associated with the invasive behavior [8].

Xing et al. showed that hypermethylation of the *CDKN2A* gene correlated with a poor prognosis for CRC in European and Asian patients [28], but not for patients from other locations. In this regard, Xing et al., highlights the importance of more studies in different geographical locations to determine and clarify whether such suppressor genes serve as a prognostic factor for patients with CRC. In our study, the percentage of methylation for *CDKN2A* was 2/5 (40 %) for tumor tissue and 2/7 (28 %) for adjacent margins. Kuan et al. showed that advanced stage CRC patients presenting *CDKN2A*/p16 methylation were associated with higher risk of CRC recurrence as compared to those with tumor tissues that were not methylated [30].

In the literature, the methylation status of *TIMP2* and *DAPK* is far from a global picture. Here, 80 % (4/5) of tumor samples and 86 % (6/7) of the adjacent margins, respectively, were methylated for *TIMP2*. However, in a histologically exam all margins were diagnosed as being free of tumor. For *DAPK*, 80 % of tumor samples and 100 % of the margins samples were methylated. Since *DAPK* is methylated, its anti-metastatic function is presumed to be lost [33]. Therefore, this work is aligned with the thesis that *DAPK* methylation poses as an important marker for the invasion, metastasis, and apoptotic processes in colorectal neoplasias and thus, ultimately, a potential marker for diagnosis and prognosis.

Even though epigenetic markers are being increasingly applied in the screening for colorectal neoplasia samples, there is still need for further investigations, especially in different populations, such as in Manaus. Although the number of patients in this report is small to draw solid conclusions on the importance of these markers in the context of Manaus population, the *TIMP2* and *DAPK* were methylated on almost all tumors. Furthermore, our results showed a correlation with previous works, thus, supporting our claims.

[Go to:](#)

Conclusion

Taken together, our results disclose methylation patterns for the *CDH1*, *CDKN2A*, *DAPK*, and *TIMP2* genes on tumors and their respective margins. Although this report was limited to five patients, our results can serve as building blocks for future studies comprising meta-analysis of these genes and thus ultimately contributing to generating models with more statistical power. Such large-scale studies should consider establishing panels tailored towards specific population. Our observations pinpointed the heterogeneity of specific molecular abnormalities in each patient; most noticeably, the *TIMP2* and *DAPK* genes were methylated in almost all samples of tumor and their adjacent margins. Yet, adjacent margins were diagnosed as disease-free according to the histopathological assessment. These facts make evident that a better understanding of these methylation patterns are fundamental, in time to come, to aid in developing more effective treatments and premature diagnosis of colorectal cancer.

[Go to:](#)

Methods

Patients

This study was approved by the Ethics Committee of the Federal University of Amazonas (UFAM: MEMO, No. 27598614.1.0000.5020, CAAE). The samples were collected at the Oncology Control Center Foundation of Amazonas State (FCECON). After signing informed consent, five patients diagnosed with adenocarcinoma were evaluated. We obtained biopsies of the tumor (T), distal margin (DM), and proximal margin (PM) from two patients (Fig. 1) and only T and DM from the remaining three. Taken together, there were 12 biopsies. These samples were stored at -80°C . The study includes patients of both genders, all aging between 18 and 80 years and presenting CRC diagnosed by colonoscopy and biopsy.

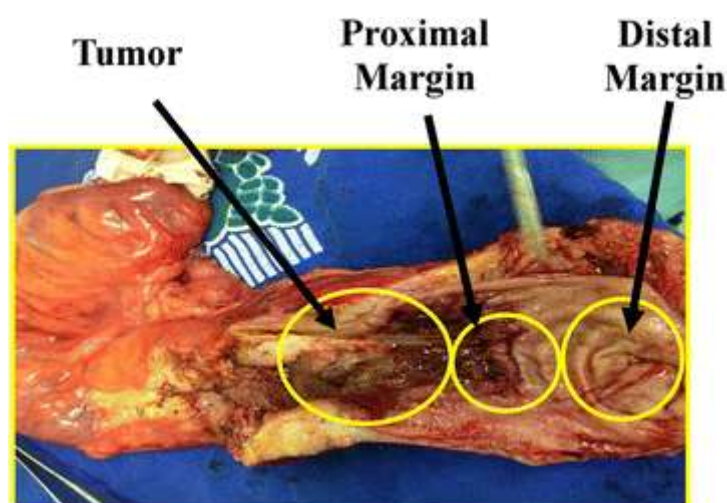


Fig. 1 Colorectal cancer tissue obtained after surgery. The tissue was separated into tumor, proximal margin (2 cm), distal margin (5 cm)

DNA extraction

The tissues were pulverized with liquid nitrogen and the DNAs were extracted from each sample using the kit *InnuPrep Forensic* (Biometra, Germany) according manufacturer's recommendations. The DNAs were quantified using NanoDrop 2000 (Thermo, USA).

Sodium bisulfite modification

Two micrograms of DNA were used to a final volume of 20 μ L in sodium bisulfite modification according the recommendations of the *EZ DNA Methylation-Lightning kit manufacturer* (Synapse, Germany). Briefly, 130 μ L of lightning conversion reagent were added to 20 μ L containing DNA, vortexed and incubated at thermocycler (Mastercycler Gradient, Eppendorff) under the conditions: 98 °C for 8 min, 54 °C for 60 min and 4 °C for 10 min to finish. After transferring the sample to the column, we added 600 μ L of M-binding buffer, mixed and centrifuged for 30 s at 10,000 \times g. The supernatant was discarded, 100 μ L of M-washing buffer were added, centrifuged again at 10,000 \times g for 30 s, and added to 200 μ L of buffer L-desulphonation. The solution was incubated at room temperature for 20 min and then centrifuged at 10,000 \times g for 30 s. Another washing step was performed with 200 μ L of M-washing buffer and then centrifuged at 10,000 \times g for 30 s. The modified DNA was eluted from the column by adding 13 μ L of M-elution buffer.

Methylation-specific PCR (MSP)

DNA from the biopsies was subjected to bisulfite treatment and later was amplified by MSP, using primers specific to distinguish methylated from unmethylated DNA in bisulfite-modified DNA, taking advantage of the sequence differences resulting from bisulfite modification. The treatment with bisulfite results in conversion of unmethylated cytosines to uracil and leaves methylated cytosine intact. To detect these changes, specific primers were used (Table 3), as described previously [34–37].

Table 3

Oligonucleotides used in the MSP

Primer pair	Methylated set (5'-3') upstream/downstream	Unmethylated set (5'-3') upstream/downstream	References
<i>ITMP2</i>	5'-AATAAAAATTGCGGTTTCGGTTTAAAGTTC-3' 5'-CTCTCTCTCTTTAATCTCGAAAACGCG-3'	5'-GTAATAAAAATTGTGGTTTGGTTTAAAGTTT-3' 5'-TTCTCTCTCTCTTTAATCTCAAAAACACA-3'	[38]
<i>CDKN2A</i>	5'-TTATTAGAGGGTGGGGCGGATCGC-3' 5'-GACCCCGAACCCGACCGTAA-3'	5'-TTATTAGAGGGTGGGGTGGATTGT-3' 5'-CAACCCCAAACCAACCCATAA-3'	[17]
<i>DAPK</i>	5'-GGATAGTCGGATCGAGTTAACGTC-3' 5'-CCCTCCCAAACGCCGA-3'	5'-GGAGGATAATTGGATTGAGTTAATGT-3' 5'-CAAATCCCTCCCAAACCAA-3'	[15]
<i>CDH1</i>	5'-GTGAATTTTAAAGTTAATLACGGGTAC-3' 5'-CATAACTAACCGAAAACGCCG-3'	5'-GTAGGTGAATTTTAAAGTTAATTAGTGGTA-3' 5'-ACCCATAACTAACCAAAAACCCA-3'	[39]

Oligonucleotides were used for regions containing frequent cytosines (to distinguish between modified and unmodified DNA) and contained CpG dinucleotides at the 3' end (to provide maximal discrimination between methylated and unmethylated DNA). For each row, the gene names are listed in the primer pair column viz.: *ITMP2* tissue inhibitor of metalloproteinases, *CDKN2A* cyclin dependent kinase 2a/p16, *DAPK* death-associated protein kinase, *CDH1* Cadherin 1

Table 3

Oligonucleotides used in the MSP

For PCR analysis, 1 μ L of bisulfite modified DNA in a final volume of 12.5 μ L of reaction mixture was used containing 1 \times PCR buffer, MgCl₂ 1.25 mM, 0.2 mM dNTPs, 0.4 M of each primer, 0.3U Taq polymerase (5U/ μ L). The reactions methylated and unmethylated were performed in a mastercycler thermocycler (Eppendorff) and the parameters were: 96 °C for 1 min followed by 35 cycles of 94 °C for 1 min, 55 °C for 1 min, 72 °C for 1 min and final extension step of 72 °C for 7 min. The PCR product (10 μ L) was directly loaded onto 10 % polyacrylamide gel stained with silver. Negative controls used in PCR were reaction mixture without DNA.

[Go to:](#)

Authors' contributions

All authors contributed to either the acquisition of data or writing of this manuscript. SV and SC contributed to the collection of samples. Substantial contributions to the acquisition of data together with analysis and interpretation were made by MC, TC, FA and MS. PC, JF, PA, AQS and ADS contributed to the writing of the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgements

The authors thank the medical team of the CECON foundation for assisting with the samples. This work was supported by CAPES, CNPq, Cancer Foundation (Oncobiologia Grant), and FAPEAM.

Compliance with ethical guidelines

Competing interests The authors declare that they have no competing interests.

[Go to:](#)

Contributor Information

Fabiana Greyce Oliveira Almeida, Email: moc.liamtoh@ecyerg_anaibaf.

Priscila Ferreira de Aquino, Email: moc.liamtoh@32oniuqa_alicsirp.

Afonso Duarte Leão de Souza, Email: moc.liamtoh@ldaazuos.

Antonia Queiroz Lima de Souza, Email: rb.moc.oohay@azuoslqainotna.

Sonia do Carmo Vinhote, Email: moc.liamg@ainosetohniv.

Thaís Messias Mac-Cormick, Email: moc.liamg@siaht.kcimroccam.

Marcelo Soares da Mota Silva, Email: moc.liamg@atomadseraosomecram.

Sidney Raimundo Silva Chalub, Email: moc.liamtoh@bulahc.yendis.

Juliana de Saldanha da Gama Fischer, Email: moc.oohay@f_iluj.

Paulo Costa Carvalho, Email: moc.ohlavracp@oluap.

Maria da Gloria da Costa Carvalho, Email: gro.ohlavracg@airolg.

[Go to:](#)

References

1. WCRF. World Cancer Research Fund International: Worldwide. 2012. Accessed 2 Dec 2014.
2. INCA. Instituto Nacional do Câncer/Estimativa 2014: Incidência de Câncer no Brasil. 2014. <http://www.inca.gov.br>. Accessed 20 Aug 2014.
3. Pullar JM, Chisholm A, Jackson C. Dietary information for colorectal cancer survivors: an unmet need. *N Z Med J*. 2012;125(1356):27–37. [[PubMed](#)]

4. Wang Z, McLoone P, Morrison DS. Diet, exercise, obesity, smoking and alcohol consumption in cancer survivors and the general population: a comparative study of 16282 individuals. *Br J Cancer*.2014;27(10):598. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)]
5. Fearon ER. Molecular genetics of colorectal cancer. *Annu Rev Pathol*. 2011;6:479–507. doi: 10.1146/annurev-pathol-011110-130235. [[PubMed](#)] [[Cross Ref](#)]
6. Gu L, Frommel SC, Oakes CC, Simon R, Grupp K, Gerig CY, et al. BAZ2A (TIP5) is involved in epigenetic alterations in prostate cancer and its overexpression predicts disease recurrence. *Nat Genet*.2014;47(1):22–30. doi: 10.1038/ng.3165. [[PubMed](#)] [[Cross Ref](#)]
7. Molinari C, Casadio V, Foca F, Zingaretti C, Giannini M, Avanzolini A, et al. Gene methylation in rectal cancer: predictive marker of response to chemoradiotherapy? *J Cell Physiol*. 2013;228(12):2343–2349. doi: 10.1002/jcp.24405. [[PubMed](#)] [[Cross Ref](#)]
8. Tsanou E, Peschos D, Batistatou A, Charalabopoulos A, Charalabopoulos K. The E-cadherin adhesion molecule and colorectal cancer. A global literature approach. *Anticancer Res*. 2008;28(6A):3815–3826. [[PubMed](#)]
9. Sanz-Casla MT, Maestro ML, Vidaurreta M, Maestro C, Arroyo M, Cerdan J. p16 Gene methylation in colorectal tumors: correlation with clinicopathological features and prognostic value. *Dig Dis*.2005;23(2):151–155. doi: 10.1159/000088597. [[PubMed](#)] [[Cross Ref](#)]
10. Nagase H, Visse R, Murphy G. Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardiovasc Res*. 2006;69(3):562–573. doi: 10.1016/j.cardiores.2005.12.002. [[PubMed](#)] [[Cross Ref](#)]
11. Benderska N, Schneider-Stock R. Transcription control of DAPK. *Apoptosis*. 2014;19(2):298–305. doi: 10.1007/s10495-013-0931-6. [[PubMed](#)] [[Cross Ref](#)]
12. Shiozaki H, Oka H, Inoue M, Tamura S, Monden M. E-cadherin mediated adhesion system in cancer cells. *Cancer*. 1996;77(8 Suppl):1605–1613. doi: 10.1002/(SICI)1097-0142(19960415)77:8<1605::AID-CNCR28>3.0.CO;2-2. [[PubMed](#)] [[Cross Ref](#)]
13. Serrano M, Hannon GJ, Beach D. A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4. *Nature*. 1993;366(6456):704–707. doi: 10.1038/366704a0. [[PubMed](#)][[Cross Ref](#)]
14. De Clerck Y, Szpirer C, Aly MS, Cassiman JJ, Eeckhout Y, Rousseau G. The gene for tissue inhibitor of metalloproteinases-2 is localized on human chromosome arm 17q25. *Genomics*. 1992;14(3):782–784. doi: 10.1016/S0888-7543(05)80186-7. [[PubMed](#)] [[Cross Ref](#)]
15. Trzeciak L, Hennig E, Kolodziejski J, Nowacki M, Ostrowski J. Mutations, methylation and expression of CDKN2a/p16 gene in colorectal cancer and normal colonic mucosa. *Cancer Lett*. 2001;163(1):17–23. doi: 10.1016/S0304-3835(00)00652-2. [[PubMed](#)] [[Cross Ref](#)]
16. Furtado Y, Almeida G, Silveira FA, Silva KS, Maldonado P, do Val IC, et al. TIMP-2 gene methylation in cervical precursor and invasive lesions. *Exp Mol Pathol*. 2015;98(1):119–123. doi: 10.1016/j.yexmp.2015.01.008. [[PubMed](#)] [[Cross Ref](#)]
17. Lu F, Du G, Zheng S, Peng L, Chen J. Detection of CDH1 gene methylation of suspension cells in abdominal lavage fluid from colorectal cancer patients and its clinical significance. *Zhonghua Wei Chang Wai Ke Za Zhi*. 2014;17(11):1133–1136. [[PubMed](#)]
18. Bradly DP, Gattuso P, Pool M, Basu S, Liptay M, Bonomi P, et al. CDKN2A (p16) promoter hypermethylation influences the outcome in young lung cancer patients. *Diagn Mol Pathol Am J Surg Pathol Part B*. 2012;21(4):207–213. doi: 10.1097/PDM.0b013e31825554b2. [[PubMed](#)] [[Cross Ref](#)]

19. Wong JJ, Hawkins NJ, Ward RL. Colorectal cancer: a model for epigenetic tumorigenesis. *Gut*.2007;56(1):140–148. doi: 10.1136/gut.2005.088799. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[Cross Ref](#)]
20. Kawakami K, Ruzkiewicz A, Bennett G, Moore J, Grieu F, Watanabe G, et al. DNA hypermethylation in the normal colonic mucosa of patients with colorectal cancer. *Br J Cancer*. 2006;94(4):593–598. doi: 10.1038/sj.bjc.6602940. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[Cross Ref](#)]
21. Zitt M, Muller HM. DNA methylation in colorectal cancer—impact on screening and therapy monitoring modalities? *Dis Markers*. 2007;23(1–2):51–71. doi: 10.1155/2007/891967. [[PMC free article](#)][[PubMed](#)] [[Cross Ref](#)]
22. IBGE C. <http://censo2010.ibge.gov.br/>. 2010. Accessed 24 Jan 2014.
23. Herman JG, Graff JR, Myöhänen S, Nelkin BD, Baylin SB. Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proc Natl Acad Sci*. 1996;93:9821–9826. doi: 10.1073/pnas.93.18.9821. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[Cross Ref](#)]
24. IBGE. Censo Demográfico 2000. http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/tendencia_demografica.2000. Accessed 19 Aug 2015.
25. Bardhan K, Liu K. Epigenetics and colorectal cancer pathogenesis. *Cancers*. 2013;5(2):676–713. doi: 10.3390/cancers5020676. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[Cross Ref](#)]
26. Wang Q, Jia P, Cheng F, Zhao Z. Heterogeneous DNA methylation contributes to tumorigenesis through inducing the loss of coexpression connectivity in colorectal cancer. *Genes Chromosom Cancer*.2015;54(2):110–121. doi: 10.1002/gcc.22224. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[Cross Ref](#)]
27. Ahuja N, Li Q, Mohan AL, Baylin SB, Issa JP. Aging and DNA methylation in colorectal mucosa and cancer. *Cancer Res*. 1998;58(23):5489–5494. [[PubMed](#)]
28. Xing X, Cai W, Shi H, Wang Y, Li M, Jiao J, et al. The prognostic value of CDKN2A hypermethylation in colorectal cancer: a meta-analysis. *Br J Cancer*. 2013;108(12):2542–2548. doi: 10.1038/bjc.2013.251.[[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[Cross Ref](#)]
29. Ally MS, Al-Ghnam R, Pufulete M. The relationship between gene-specific DNA methylation in leukocytes and normal colorectal mucosa in subjects with and without colorectal tumors. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2009;18(3):922–928. doi: 10.1158/1055-9965.EPI-08-0703. [[PubMed](#)] [[Cross Ref](#)]
30. Kuan JC, Wu CC, Sun CA, Chu CM, Lin FG, Hsu CH, et al. DNA methylation combinations in adjacent normal colon tissue predict cancer recurrence: evidence from a clinical cohort study. *PLoS One*.2015;10(3):e0123396. doi: 10.1371/journal.pone.0123396. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[Cross Ref](#)]
31. Li YX, Lu Y, Li CY, Yuan P, Lin SS. Role of CDH1 promoter methylation in colorectal carcinogenesis: a meta-analysis. *DNA Cell Biol*. 2014;33(7):455–462. doi: 10.1089/dna.2013.2291. [[PubMed](#)] [[Cross Ref](#)]
32. Li C, Dong J, Chen MQ, Li WL, Ren JY, Chen SX, et al. Effects of CDH1 gene promoter methylation on expression of E-cadherin and beta-catenin and its clinicopathological significance in colon carcinoma. *Zhonghua Wei Chang Wai Ke Za Zhi*. 2011;14(7):538–541. [[PubMed](#)]
33. Gozuacik D, Kimchi A. DAPk protein family and cancer. *Autophagy*. 2006;2(2):74–79. doi: 10.4161/auto.2.2.2459. [[PubMed](#)] [[Cross Ref](#)]
34. Ivanova T, Vinokurova S, Petrenko A, Eshilev E, Solovyova N, Kisseljov F, et al. Frequent hypermethylation of 5' flanking region of TIMP-2 gene in cervical cancer. *Int J Cancer*. 2004;108(6):882–886. doi: 10.1002/ijc.11652. [[PubMed](#)] [[Cross Ref](#)]

35. Esteller M, Sanchez-Cespedes M, Rosell R, Sidransky D, Baylin SB, Herman JG. Detection of aberrant promoter hypermethylation of tumor suppressor genes in serum DNA from non-small cell lung cancer patients. *Cancer Res.* 1999;59(1):67–70. [[PubMed](#)]
36. Graff JR, Herman JG, Myohanen S, Baylin SB, Vertino PM. Mapping patterns of CpG island methylation in normal and neoplastic cells implicates both upstream and downstream regions in de novo methylation. *J Biol Chem.* 1997;272(35):22322–22329. doi: 10.1074/jbc.272.35.22322. [[PubMed](#)][[Cross Ref](#)]
37. Herman JG, Graff JR, Myöhänen S, Nelkin BD, Baylin SB. Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proc Natl Acad Sci.* 1996;93:9821–9826. doi: 10.1073/pnas.93.18.9821. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[Cross Ref](#)]
38. Galm O, Suzuki H, Akiyama Y, Esteller M, Brock MV, Osieka R, et al. Inactivation of the tissue inhibitor of metalloproteinases-2 gene by promoter hypermethylation in lymphoid malignancies. *Oncogene.* 2005;24(30):4799–4805. doi: 10.1038/sj.onc.1208599. [[PubMed](#)] [[Cross Ref](#)]

9.3. Artigo publicado na revista *Journal of Proteomics*- Impact Factor: 3.867) – A1 (Química)

Proteomic assessment of colorectal cancers and respective resection margins from patients of the Amazon state of Brazil

Fabiana Greyce Oliveira Almeida^{†&}, Priscila Ferreira de Aquino^{‡&}, Sidney Raimundo S. Chalub[§], Gabriel Duarte T. Araujo[⊥], Gilberto B. Domont[⊥], Afonso Duarte L. de Souza[†], Paulo C. Carvalho^{\$*}, and Juliana de Saldanha da G. Fischer^{||*}.

[†] Chemistry Department, Federal University of Amazon, Amazon, Brazil.

[‡] Leonidas and Maria Deane Institute, Fiocruz Manaus, Amazon, Brazil.

[§] Department of Abdominal Surgery, Oncology Control Foundation Center of the Amazon State, Amazon, Brazil

[⊥] Proteomics Unit, Department of Biochemistry, Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil.

^{||} Laboratory for Proteomics and Protein Engineering, Carlos Chagas Institute, Fiocruz, Paraná, Brazil.

^{\$} Computational Mass Spectrometry & Proteomics Group, Carlos Chagas Institute, Fiocruz, Paraná, Laboratory of Toxinology, Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz, Rio de Janeiro - RJ

*Corresponding authors: paulo@pcarvalho.com and julifr@gmail.com

Address: Rua Professor Algacyr Munhoz Mader, 3775 - Matriz - Cidade Industrial de Curitiba, Curitiba, Paraná, CEP 81350-010.

& Equal contributions

Abstract

Colorectal cancer (CRC) is the third most common type of cancer in the world with a low survival rate and therapeutic efficiency. Tumor surgery implies the removal of an apparently non-tumorous tissue around the tumor in an attempt to reduce recurrence chances; this tissue is referred to as the resection margin. Our analysis employed an 8-plex iTRAQ to label four adenocarcinoma biopsies and their corresponding resection margins at 5 cm; our results disclose fifty-six proteins as being differentially abundant. These proteins are mainly involved in energetic metabolism (e.g. S100 calcium binding protein A11), cell migration (e.g. transgelin), formation of the cytoskeleton (e.g. profilin 1) and degradation of extracellular matrix (e.g. carbonic anhydrase 2). A gene ontology enrichment analysis revealed several proteins related to adhesion, invasion, metastasis, death, and recognition cell. Taken together, our results highlight proteins related to invasion, cell proliferation, and linked to the metastasis of colorectal cancer in tumor tissue. Finally, we argue that the expression patterns revealed in our comparison helps shed light on the development of more effective surgical strategies and add to the comprehension of this disease.

Keywords: colorectal cancer, shotgun proteomics, resection margin, iTRAQ 8-plex

Introduction

Colorectal cancer (CRC) comprises tumors that affect the large intestine segment (colon) and rectum. According to the World Health Organization, CRC is the third most common cancer in men (746,000 cases, 10.0% of the total) and the second in women (614,000 cases, 9.2% of the total) worldwide, corresponding to 8.5% of all cancer deaths [1]. In Brazil, CRC is the fifth most commonly diagnosed cancer and the fourth in cause of death by this disease [2], presenting a five-year survival rate [3]. The main treatment is surgery, and in early stages, the chances of cure are higher. For colon tumors, a radical resection is recommended; this is done by removing the affected segment with proximal and distal margins of at least 5 cm away from the tumor [4]. For rectum tumors, the minimal distal margin is 2 cm, and in some cases only up to 1 cm when performing a neoadjuvant treatment with total mesorectal excision [4]. A major challenge in the treatment of this cancer is in preventing its recurrence disease, this is tightly correlated with its staging; stage 1 has a chance of up to 13% for recurrence, from 11% to 61% for stage 2, and 32% to 88% for stage 3 [5].

In this context, the resection margin (histologically normal tissue near to the tumor) can be an interesting region to investigate the molecular characteristics of tumorigenesis and metastasis process. In a previous study by Aquino et al., the authors compared protein profiles of gastric cancer with its respective resection margin and concluded that even though the resection margin was apparently healthy, according to histological assessment, it was molecularly compromised according to proteomics[6]. In another work with renal carcinoma, Oppenheimer et al. demonstrated that the tissue adjacent to the tumor expressed many tumoral characteristics [7]. Richard Caprioli's group has pioneered several works with MALDI-imaging also corroborating on the resection margin to be molecularly compromised [7, 8].

The development of shotgun proteomics enabled the study of complex peptide mixtures originating from biological fluids, tissues, cell lysates, among others[9]. One application of this approach is the identification and quantification of proteins correlated to a disease such as cancer; thus, providing a better understanding of the molecular signatures or events occurring in different conditions [10][11]. A state-of-the-art strategy for quantitative proteomics relies on labeling peptide with isobaric markers and then performing a relative quantitation by comparing the intensities of their reporter ions on tandem mass spectra. A commercial solution for this is the Isobaric Tags for Relative and Absolute Quantification (iTRAQ) kit [12]; it enables multiplexing up to 12 biological conditions [13]. Previous reports employed iTRAQ for comparing CRC biopsies with control tissues. Fan et al.[14] reported the identification of 802 proteins and 82 as potentially specific to CRC; being gelsolin an example. A study carried out by Jankova et al. included 16 CRC patients; the authors identified 1,453 protein, being 118 differentially abundant [15]. In this work, we argue that our study aggregates an important contribution by exploiting the molecular changes of the paired resection margins; we also highlight the importance of conducting molecular studies on patients of different ethnicities. Our results disclose the proteomic profiles of colorectal cancer from patients from the Amazon, Brazil, together with their respective resection margin. The profiles were generated by labeling the tryptic peptides obtained from biopsies with iTRAQ 8-plex, submitting them to a 4-step offline MudPIT and then analyzed by RP-chromatography online with an Orbitrap-Velos mass spectrometer.

Material and Methods

Materials

Isobaric Tags for Relative and Absolute Quantitation (Cat. nº 4352135) and Self-Pack Poros 20 R2 resin (Cat. nº 1112810) were acquired from Applied Biosystems. Qubit® Protein Assay Kit

(Cat. nº Q33212) and RapiGest SF acid-labile surfactant (Cat. nº 186001861) were purchased from Invitrogen (Carlsbad, CA) and Waters Corp. (Milford, MA), respectively. Sequence grade modified trypsin (V511A) was purchased from Promega. Strong Cation Exchange Macro Spin Column (Cat. nº 744202) was acquired from Harvard Apparatus. All other laboratory reagents were acquired from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO), unless specified otherwise.

Patients

The Ethics Committee of the Federal University of Amazon (CAAE n. 27598614.1.0000.5020) approved this study. After signed informed consent form, four samples from colorectal cancer and their respective resection margins, all being 5 cm apart from the tumor area (Fig. 1), were collected during surgery. Surgeries were performed in the **Oncology Control Foundation Center of the Amazon State**(FCECON) of which we proudly ascribe as being a reference Brazilian oncology institution. Each tissue fragment was subtyped by the pathologists and the clinical stage of disease was determined according to the Tumor, Node, and Metastasis (TNM) classification of the American Joint Committee on Cancer (AJCC).

The inclusion criteria were: patients diagnosed with colorectal adenocarcinoma, above 18 years old, and having signed the informed consent. Patients with previous treatments or having had other types of cancer, besides colorectal adenocarcinoma, were excluded. The clinical details of the four patients included in this study are available in Table 1.

Sample Preparation

All tissues were pulverized with liquid nitrogen. Briefly, this is done by storing the sample in an aluminum foil casing, fully immersing it in liquid nitrogen for one minute, and then, immediately, subjecting it to mechanical stress. This procedure was performed four times. The RapiGest SF surfactant was added to the product of the pulverization from each sample according to the manufacturer's instructions to a final concentration of 0.1% (w/v), at a ratio of 1:2 (v/v for tissue:surfactant). The samples were vortexed for 20 seconds and centrifuged at 4 °C, 20,800 x g for 30 min. The supernatant, containing the solubilized proteins, was transferred to another tube. The proteins in the supernatant were quantified using the Qubit fluorometric quantitation kit (Invitrogen) as described in the manufacturer's instructions. Briefly, we used 1 µL of each sample for protein quantification with 199 µL of Qubit Working Solution. The, samples were vortexed, incubated at room temperature for 15 minutes and quantitated. One hundred micrograms of each protein sample were reduced with 20 mM of Tris (2-carboxyethyl) phosphine (TCEP) at 60 °C for 30 min. The samples were cooled to room temperature and incubated in the dark with 66 mM of

iodoacetamide (IAA) for 30 min. Afterwards, the samples were digested during 20 hours with sequence grade modified trypsin (Promega) at the ratio of 1/50 (w/w) (E/S) at 37 °C. To stop proteolysis and degrade RapiGest, the samples were acidified with 10% (v/v) trifluoroacetic acid (0.5% final concentration). Finally, the samples were centrifuged for 30 min at 20,800 x g at 20 °C to remove insoluble materials.

iTRAQ 8-plex Labeling

The peptide solution was desalted using a reversed-phase column manually packed in a tip with Poros R2 resin (Applied Biosystems) according to manufacturer's instructions. Twenty micrograms of peptides from each sample, quantitated using Qubit 2.0 according to manufacturer's instructions, were individually labeled with iTRAQ 8-plex reagent (Table 2).

. The iTRAQ reagents were prepared according to the manufacturer's recommendations. Briefly, 100 µL of isopropanol were added to each iTRAQ reagent and then added individually to the peptide sample ensuring a final organic concentration of at least 60% (v/v). The samples were incubated with each iTRAQ reagent independently at room temperature for 2 hours. After that, the labeled peptides were combined in one tube and concentrated with a SpeedVac (Thermo Fisher Scientific).

Strong-Cation-Exchange Chromatography (SCX)

The labeled peptides were solubilized in solution A (10 mM KH_2PO_4 in 25% ACN, pH 3.0) and loaded into a strong-cation-exchange macro spin column (Harvard Apparatus), which was equilibrated before with the same solution A. The peptides were eluted from the column in a stepwise manner by applying solution A with increasing KCl concentrations of 75, 150, 250, and 350 mM. Each fraction was desalted once again with Poros R2 resin (Applied Biosystems) according to manufacturer's instructions. The flow-through was also stored for posterior analysis.

Analysis by Nano-liquid Chromatography Mass Spectrometry (nLC-MS/MS)

Each peptide mixture resulting from SCX was subjected three times to the LC-MS/MS analysis as follow. The peptides were separated by reversed phase liquid chromatography in an Easy-nLC II (Proxeon), using a 20 cm analytical column (75 µm inner diameter) that was packed in-house with Reprosil Pur C18 Acqua resin (beads of 3 µm in diameter and 120 Å pore size, Dr. Maisch). The peptides were chromatographically separated with a 120 min gradient as follows: 5-40% of mobile phase B (95% acetonitrile in 0.1% formic acid) for 107 min, then 40-95% of the

same mobile phase for 13 minutes with a flow rate of 200 nL/min. The effluent from nLC was directly electrosprayed into the mass spectrometer.

The LTQ Orbitrap Velos instrument was set to data dependent mode with a dynamic exclusion of 60s. The full MS scan (350 – 2000 m/z) was performed in an Orbitrap system with resolution of 60,000 at 110 m/z. The ten most intense ions with charge states of 2+ or 3+ were sequentially isolated and fragmented in the HCD collision cell using a normalized collision energy of 40. The parameters employed in the mass spectrometer were: 1.80 kV spray voltage, no sheath and auxiliary gas flow, heated capillary temperature of 220 °C, predictive automatic gain control (AGC) enabled, and a S-lens RF level of 69%. Mass spectrometer scan functions and nLC solvent gradients were controlled by the Xcalibur 2.0 system (Thermo Fisher Scientific).

Shotgun Data Analysis

Peptide Spectrum Matching – PSM.

The data analysis was performed with the PatternLab for proteomics 4.0 software[16] that is freely available at <http://www.patternlabforproteomics.org>. The sequences from *Homo sapiens* were downloaded from the UniProt consortium on April 2, 2015. A target-decoy database was generated using PatternLab 4.0 to include a reversed version of each sequence found in the database plus those from 127 common mass spectrometry contaminants. The Comet [17] search engine (v. 2015.02), integrated in the PatternLab, was used to select the most likely candidates by the comparison between tandem mass spectra obtained experimentally and the theoretical spectra generated *in silico*. The search was limited to fully and semi-tryptic peptides candidates and considered carbamidomethylation of cysteine and the iTRAQ modifications at the N-terminus and lysine as fixed modifications, and the iTRAQ modification at tyrosine as variable. The search engine accepted up to 35 ppm of the precursor mass tolerance, peaks from tandem mass spectra were binned at 0.02 m/z and the XCorr was used as similarity metric.

Validation of PSMs.

The PSMs were validated by the Search Engine Processor (SEPro)[18]. Briefly, the identifications were grouped into four distinct groups according to the precursor charge state and the tryptic status. For each group, the values of XCorr, DeltaCN, DeltaPPM, and Peaks Matched were used to create a Bayesian discriminator and the identifications were reported in an increasing order of the discriminating values. This procedure was independently performed on each data subset, establishing a cutoff score to accept a false-discovery rate (FDR) of 1% at the

peptide level based on the number of labeled decoys. Additionally, minimum sequence length of six amino acid residues was required and the results were post processed to only accept PSMs with less than 5 ppm and 1.90 as minimum value of XCorr. One-hit-wonders with an XCorr of less than 2.5 were discarded. These filters led to a 0% FDR in the search results.

Relative Quantification of Proteins.

It is well known that chimera spectra, generated by two or more co-fragmenting peptides, are common in shotgun proteomics of complex samples. Chimera spectra produce unreliable iTRAQ quantitation signals and therefore should be accounted for. PatternLab provides means to deal with chimera spectra in two ways: being able to handle MultiNotch data [19] or automatically identifying and discarding chimera spectra. As our instrumental setup is not capable of generating MultiNotch data, we proceeded with the later; for this, chimera spectra were identified with YADA [20] and automatically discarded by PatternLab's isobaric analyzer module as specified in PatternLab's protocol [20]. PatternLab's isobaric Analyzer module was then employed to normalize the labeled ions signals, being this procedure independently performed for each LC-MS/MS analysis and iTRAQ marker. Briefly, the sum of signals from each labeled ion was obtained, then for each spectrum, the normalized value was generated by dividing the signal from each marker ion from the value of respective sum, from all spectra, of that marker. Reporter ions were also calibrated by PatternLab according to the software correction factors provided in the iTRAQ kit. Our proteomic comparison considered only proteins identified with two or more unique peptides (i.e., peptides that map to a single sequence in the database), a paired t-test equal or less than 0.05; and an absolute peptide log fold change cutoff greater than 0.30." Our iTRAQ analysis was done as described in PatternLab's bioinformatics protocol [16]. PatternLab's Gene Ontology Explorer module and STRING 10 (<http://string-db.org/>) were used to help interpret the data by exploring the differential characteristics and possible functional interactions of the identified proteins.

Results and Discussion

Colorectal cancer is generally diagnosed by clinical evaluation, imaging, and histopathological assessment of surgical biopsies. Shotgun proteomics analysis allows to investigate different states of a disease, helping in better comprehension of the molecular events associated to the illness. Here, we used iTRAQ-8 to compare CRC with their respective histopathological non-tumoral margin of four patients. Our analysis discloses 1,090 proteins (539

according to maximum parsimony). We used PatternLab's isobaric analyzer module to pinpoint the differentially abundant proteins between the colorectal cancer and its respective resection margin. We note that this module employs a peptide-centric approach to assigned paired t-test p-values to each peptide and then converge to a final p-value, at the protein level, through the Stouffer's method. A peptide's average log fold change was obtained by averaging the log of the quotients, from each of its spectra, of the average normalized reporter ion signals from the cancer versus the margin condition. A protein's log fold change was estimated by averaging the corresponding peptide log folds.

Table 1 lists several traits from the patients, including gender, and if they consume alcohol or tobacco on a regular basis. It is expected that these traits may influence the proteome and even the course of this disease; for example, abundance of L-lactate dehydrogenase A and L-lactate dehydrogenase B have been correlate with alcoholics [21]. Given our experimental approach, iTRAQ-8 limits the analysis to four patients; larger cohorts are necessary to dig down into how these features may impact the course of the disease. Table 3 lists 56 proteins with alterations in abundance when comparing the CRCs with their respective resection margins and Fig. 2 shows a volcano plot of these results. A complete list of proteins together with further details is provided as Supplementary table 1

Proteins presenting differential abundance between the CRC and resection margin could be related to development of the tumor or the molecularly compromised resection margin. We now selected several proteins from Table 3 that presented the greatest changes in abundance ($p < 0.05$). We highlight transgelin, profilin 1, 14-3-3 zelta/delta protein, caldesmon and transforming growth factor-beta induced protein to be upregulated in the colorectal cancer and carbonic anhydrase 2, intelectin-1, serotransferrin, chromogranin-A, and alpha 1-antitrypsin upregulated in the resection margin.

Upregulated proteins in the CRC

Transgelin (TAGLN) stimulates the motility in normal cells and may be involved in cell migration [22]. According to some reports, the elevated levels of TAGLN can be linked with an aggressive tumor cell behavior, advanced stage and poor prognosis [23, 24]. Interestingly, Zhang et al. showed the upregulation of this protein in submucosal invasive CRC in Fischer-344 rats induced by N-methyl-N-nitrosourea [25]. However, the role of TAGLN in cancer remains unclear and controversial, in which recent evidence also suggests that transgelin can act as a tumor suppressor [26].

Caldesmon is a multifunctional protein that binds tightly to actin, calmodulin, tropomyosin, and myosin[27]. Kim et al. demonstrated high levels of this protein in colorectal cancer tissues, suggesting that the dysregulation expression of *caldesmon* may induce metastatic properties in these cancer cells [28]. This is coherent with our results.

Transforming growth factor-beta induced protein (TGF- β) is unique transmembrane receptor serine–threonine kinases which plays a complex role in carcinogenesis, presenting tumor suppressor and oncogenic properties [29]. In particular, recent evidences showed that TGF- β signaling inactivation in epithelial cells predominantly acts to promote the epithelial cancer [30].

14-3-3 zeta/delta protein (14-3-3 ζ) belongs to a highly conserved acidic protein family, controlling molecular processes as cell cycle, cell growth, differentiation, survival, apoptosis, migration and spreading[31]. Its overexpression in multiple cancers as breast [32], lung [33], pancreas [34], colon[35], esophageal[36], stomach[37], head and neck[38], and urothelial[39], to name a few, may contribute to inhibit apoptosis, activate signaling pathways that promote growth and/or sequester tumor suppressor proteins. In addition, Zha et al. postulated that this protein could play a major role in anti-apoptosis by directly binding with Akt-phosphorylated Bad [40].

Profilin 1 (PFN1) is ubiquitously expressed G-actin binding protein, being significantly downregulated in various types of adenocarcinoma including pancreatic [41]and hepatic [42]. In particular, for breast [43] and gastric cancer [44], the silencing of PFN1 expression can increase the cell motility and the cancer progression, respectively [11]. In our study, Profilin 1 was upregulated in tumor samples; an overexpression of the other proteins corroborates to the hypothesis of linkage to cancer progression.

Upregulated proteins in resection margin

In this study, we identified upregulated proteins in the resection margin that were previously reported in CRC as when compared to control samples [27, 45, 46]; we hypothesize this could be somehow linked with a compromised margin at the molecular level.

Carbonic anhydrase 2 (CA2) belongs to a large family of zinc metalloenzymes, participating in a variety of biological processes, including respiration, calcification and acid-base balance[47]. According to Bekku et al., a high expression of carbonic anhydrase (CA1) in colon cancer and carbonic anhydrase II (CA2), in rectal cancer, is correlated with a biological aggressiveness and metastasis of the disease [45]. In our results, CA2 presented a higher abundance in resection margin, drawing attention for the expression of this protein associated with the proliferation of cancer cells in a region without cancer by histopathologic analysis.

Chromogranin A (CgA) is a member of the granin family of neuroendocrine secretory proteins [48]. In cancer, an up-regulation was diagnosed in gastric and colorectal cancers by nucleic acid hybridization and immunohistochemical analyzes, respectively [49]. In prostate cancer, it was shown that as the tumor develops into an endocrine tissue, it becomes the main source of circulating CgA. Its concentration is considered to be elevated with regard to neuroendocrine differentiation of prostate cancer [50]. Therefore, we argue that the higher abundance of this protein in the resection margin of CRC patients may be linked to molecular processes associated to tumor growth.

Intelectin-1, also known as omentin-1, is a novel identified galactose-binding lectin that is usually expressed in heart, small intestine, and colon [51]. Recent studies have revealed the potential roles of this protein in tumorigenesis. Zheng et al. correlated its high expression in gastric cancer with clinical pathological features by immunohistochemistry, showing that intelectin-1 can be a useful prognostic factor for predicting the outcomes of gastric cancer patients [52]. On the other hand, Li et al. reported this protein as a possible tumor suppressor that affects the growth, invasion and metastasis of neuroblastoma through up-regulation of N-myc downstream-regulated gene 2 [53]. In CRC, intelectin showed a higher abundance in tumor tissue of stage IV colorectal cancer patients [27]; in the present study, this protein was more abundant in the resection margin.

Alpha 1-antitrypsin is the most prominent protease inhibitor in human serum. In the present study, this protein was overexpressed in the tumor margin. In a recent study it was shown that serum levels of alpha-1 antitrypsin deficiency is significantly higher in patients with colorectal cancer (208 ± 60) than in controls [54].

Serotransferrin is an iron binding transport protein that can bind two Fe^{3+} ions in association with the binding of an anion. In cancer, serotransferrin plays a role in stimulating cell proliferation [55]. However, its expression pattern seems to be not well established for some types of cancers according to the literatures, being downregulated in gastric [56] and upregulated in pancreatic [57]. A comparative study with fecal immuno occult blood test showed that transferrin dipstick test seems to be a highly sensitive for detecting cancer and other premalignant lesions; thus, providing an additional tool for colorectal cancer screening [58].

Existing works corroborate with many of the results disclosed herein by using complementary approaches *viz.*: SRM [8], immunohistochemistry [27, 59, 60], Western Blot [27], RT-PCR [61], and nucleic acid hybridization [49]. We argue these works (including ours) to provide no imminent impact on development of more effective surgical strategies or in recurrence. Nevertheless, in our view, the data disclosed is fundamental in getting there; for example, if mass

spectrometry is yet to become, one day, a routine side by side to the surgery table, panels of diagnostic markers must be validated. Such will aid, for example, a medical doctor in delineating a resection margin. Converging to these panels demands extensive validation that can only emerge from a herculean joint effort including academia and pharmaceutical companies; it must comprise large-scale meta-analysis of hundreds of thousands of cohort studies on different ethnicity and types of tumors. That being said, in our view, our results, obtained with rigorous quantitative proteomic assessments, certainly adds a piece to this puzzle.

Mapping possible protein-protein interactions with the STRING software

We used the String 10 software to map possible protein-protein interactions networks originating from the differentially abundant proteins. Our analysis revealed a major network of CRC abundant proteins (Fig. 3) to be mostly involved in cytoskeletal organization; this affects the cell motility and is crucial in the process of cancer invasion and metastasis [62]. Examples of proteins in this network are: myosin-9 (MYH9), filamin A (FLNA), tropomyosin-2 (TPM2), talin-1 (TLN1), PFN1, transgelin, and caldesmon (CALD1).

We identified a group of chaperones binding proteins (Fig. 3) that are known to be involved in the regulation of cell proliferation and angiogenesis. In this group, four heat shock proteins (HSPs) were present according to the STRING software in tumor tissue: 27kDa heat shock protein 1(HSPB1), 90kDa heat shock beta-1 (HSP90B1), 90kDa heat shock alpha class A member 1 (HSP90AA1), and 90kDa heat shock alpha class B member 1 (HSP90AB1). These proteins are responsible to help the denatured/damaged proteins to refold and recover from stress-induced damages [63]. The aberrant expression of these proteins is associated with a range of biological activities such cancer cell survival, proliferation, and resistance to therapy [64]. In accordance with the literature, we also found the heat shock protein beta-1 upregulated in CRC tissues [65].

In addition, the STRING analysis showed interaction between ribosomal proteins (Fig. 3) in tumor samples (e.g., ribosomal protein S3 (RPS3) and ribosomal protein large (e.g., P2 (RPLP2)). According to the literature, the ribosomal protein genes are overexpressed in CRC[66]and related to the growth and proliferation of cancer cells [67]. Furthermore, we also verified several proteins involved in the energetic metabolism such as malate dehydrogenase 2 (MDH2), lactate dehydrogenase A, glucose-6-phosphate isomerase (GP1), among others. These proteins key as cancer cells have metabolic demands other than normal cells [68]. However, until now, the molecular evidence for how this metabolic reprogramming takes place in CRC remains unclear,

even though a recent study established aerobic glycolysis as the predominant sugar-metabolic pathway to support colon cancer [69].

The map of possible **interactions between the up-regulated proteins in the resection margin (Fig. 4), includes** metalloproteinases, mainly involved in iron and zinc metabolism, such as serotransferrin (TF) and carbonic anhydrase (CA2), respectively. In our analysis, alpha-1-antitrypsin (SERPINA1) is connected to serotransferrin. Kwon et al [70] observed that SERPINA1 induces the invasion and migration of gastric cancer cells and its expression is associated with the progression of gastric cancer.

Gene Ontology Analysis

PatternLab's Gene Ontology Explore module was employed to statistically pinpoint over-represented gene ontology terms according to the hypergeometric distribution. The completed list of the enriched terms is long, and are available as Supplementary Table 2.

According to Gene Ontology analysis (Fig. 5), for biological processes, 18.3% of the proteins were associated to cellular processes, followed by the single organism process (15.5%), metabolic process (13.8%), biological regulation (12.5%) and cellular component organization or biogenesis (8.2 %). For cellular component, 30.1% belong to cellular part, 18% of organelle part, 14% of organelles and 13.6% of macromolecular complex. Binding proteins stood for 55% of the molecular functions, followed by catalytic activity (27.9%) and molecular function regulator (6.3%).

An enrichment analysis considering all identified proteins revealed GO terms linked with the development of neoplastic processes such: regulation of cell adhesion, regulation of mitogen activated protein kinase (MAPK) cascade and negative regulation of apoptotic signaling. The regulation processes of cell adhesion are fundamental in neoplastic development because it modulates the degree of binding cell-cell or extracellular matrix and therefore plays a key role in the metastatic spread [71]. The identified proteins related to these terms were S100-A11 and cadherin-1. Moreover, cell division control protein 42, Ras-related protein Rap-1A, and protein kinase C delta-binding protein were also identified and mapped for the regulation of MAPK pathway; this pathway is involved in key cellular processes, including proliferation, gene expression, differentiation, mitosis, cell survival, and apoptosis [72]. Furthermore, despite the enormous variability of cancer, evidence shows that resistance to apoptosis is one of the main features for malignant tumors. In our results, we identified proteins related to the negative regulation processes of apoptotic signaling as fibrinogen alpha, galectin-3, clusterin and

peroxiredoxin-2. According to Kerr et al., there is a higher frequency of apoptosis in spontaneously regressing tumors and in tumors treated with cytotoxic anticancer agents [73].

Conclusions

In conclusion, we identified 56 proteins with differential abundance among the tumor tissues and the resection margin tissues from CRC patient from the Amazon (Brazil). In resection margin tissues, we found proteins involved in several processes associated with tumor development, metastasis, and cell invasion. In particular, we highlight carbonic anhydrase 2 as being the most up-regulated protein, this protein has extensively been related to tumoral growth [19, 74]. We believe this corroborate with the hypothesis that resection margins may act as a favorable microenvironment for the tumor [6, 7]. The tumor tissues presented several upregulated proteins such as actin-binding protein, transgelin, desmin and caldesmon that are linked to the cytoskeleton stability. A group of cytoskeletal proteins, chaperone binding proteins, ribosomal proteins and cell energetic metabolism proteins were provided by the STRING and the GO enrichment analyses linking important identifications to adhesion, invasion, metastasis, death, and recognition cell. Therefore, this study is unique in the sense that it explores the resection margin of patients from the Amazon and provides fundamental information on the molecular processes that occurring between the tumor and the margin that may be associated with the tumorigenesis.

Competing financial interests:

The authors declare that they have no competing financial interests.

Supporting Information Available:

The raw mass spectra files, the PatternLab intermediary files, search database, the SEPro identification files, Supplementary Table 1 and Supplementary Table 2, are available for download at <http://proteomics.fiocruz.br/supplementaryfiles/fischer2016crc>. PatternLab for proteomics is freely available for download at <http://patternlabforproteomics.org>.

Acknowledgments

The authors thank the collaboration of Dr. Enio Lucio Coelho Duarte from the Oncology Control Foundation Center of the Amazon State for samples, Dra. Patricia Gioia de Assis, Pathologist University Hospital Clementino Fraga Filho of Federal University of Rio de Janeiro, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pesquisa e Ensino Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação Oswaldo Cruz, and Fundação do Câncer for financial support.

References

- [1] GLOBOCAN, GLOBOCAN 2012: Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx/, 2012 (Accessed 09.03.2016).
- [2] INCA, Estimativa 2016: Incidência de Câncer no Brasil <http://www.inca.gov.br/>, 2016 (Accessed 07.04.2016)
- [3] R.C.R. Fortes, V. L.; Melo, A. L.; Novaes, M. R. C. G., Dietary habits of post-operative colorectal cancer patients, *Rev. Bras. de Cancerologia* 53(3) (2007) 277-289.
- [4] H. Nelson, N. Petrelli, A. Carlin, J. Couture, J. Fleshman, J. Guillem, B. Miedema, D. Ota, D. Sargent, Guidelines 2000 for colon and rectal cancer surgery, *J Natl Cancer Inst* 93(8) (2001) 583-96.
- [5] M.D. Hellinger, C.A. Santiago, Reoperation for recurrent colorectal cancer, *Clinics in colon and rectal surgery* 19(4) (2006) 228-36.
- [6] P.F. Aquino, J.S. Fischer, A.G. Neves-Ferreira, J. Perales, G.B. Domont, G.D. Araujo, V.C. Barbosa, J. Viana, S.R. Chalub, A.Q. Lima de Souza, M.G. Carvalho, A.D. Leao de Souza, P.C. Carvalho, Are gastric cancer resection margin proteomic profiles more similar to those from controls or tumors?, *J Proteome Res* 11(12) (2012) 5836-42.
- [7] S.R. Oppenheimer, D. Mi, M.E. Sanders, R.M. Caprioli, Molecular analysis of tumor margins by MALDI mass spectrometry in renal carcinoma, *J Proteome Res* 9(5) (2010) 2182-90.
- [8] R. Ossola, R. Schiess, P. Picotti, O. Rinner, L. Reiter, R. Aebersold, Biomarker validation in blood specimens by selected reaction monitoring mass spectrometry of N-glycosites, *Methods Mol Biol* 728 (2011) 179-94.
- [9] P. Alvarez-Chaver, O. Otero-Estévez, M. Páez de la Cadena, F.J. Rodríguez-Berrocal, V.S. Martínez-Zorzano, Proteomics for discovery of candidate colorectal cancer biomarkers, *World J Gastroenterol* 20(14) (2014) 3804-24.
- [10] P. Chaurand, J.L. Norris, D.S. Cornett, J.A. Mobley, R.M. Caprioli, New developments in profiling and imaging of proteins from tissue sections by MALDI mass spectrometry, *J Proteome Res* 5(11) (2006) 2889-900.
- [11] Y. Zhang, B.R. Fonslow, B. Shan, M.C. Baek, J.R. Yates, 3rd, Protein analysis by shotgun/bottom-up proteomics, *Chemical reviews* 113(4) (2013) 2343-94.

- [12] S. Wiese, K.A. Reidegeld, H.E. Meyer, B. Warscheid, Protein labeling by iTRAQ: a new tool for quantitative mass spectrometry in proteome research, *Proteomics* 7(3) (2007) 340-50.
- [13] K. Aggarwal, L.H. Choe, K.H. Lee, Quantitative analysis of protein expression using amine-specific isobaric tags in *Escherichia coli* cells expressing *rhsA* elements, *Proteomics* 5(9) (2005) 2297-308.
- [14] N.J. Fan, C.F. Gao, C.S. Wang, J.J. Lv, G. Zhao, X.H. Sheng, X.L. Wang, D.H. Li, Q.Y. Liu, J. Yin, Discovery and verification of gelsolin as a potential biomarker of colorectal adenocarcinoma in the Chinese population: Examining differential protein expression using an iTRAQ labelling-based proteomics approach, *Can J Gastroenterol* 26(1) (2012) 41-7.
- [15] L. Jankova, C. Chan, C.L. Fung, X. Song, S.Y. Kwun, M.J. Cowley, W. Kaplan, O.F. Dent, E.L. Bokey, P.H. Chapuis, M.S. Baker, G.R. Robertson, S.J. Clarke, M.P. Molloy, Proteomic comparison of colorectal tumours and non-neoplastic mucosa from paired patient samples using iTRAQ mass spectrometry, *Mol Biosyst* 7(11) (2011) 2997-3005.
- [16] P.C. Carvalho, D.B. Lima, F.V. Leprevost, Integrated analysis of shotgun proteomic data with PatternLab for proteomics 4.0, 11(1) (2016) 102-17.
- [17] J.K. Eng, T.A. Jahan, M.R. Hoopmann, Comet: an open-source MS/MS sequence database search tool, *Proteomics* 13(1) (2013) 22-4.
- [18] P.C. Carvalho, J.S. Fischer, T. Xu, D. Cociorva, T.S. Balbuena, R.H. Valente, J. Perales, J.R. Yates, 3rd, V.C. Barbosa, Search engine processor: Filtering and organizing peptide spectrum matches, *Proteomics* 12(7) (2012) 944-9.
- [19] B.P. Mahon, M.A. Pinard, R. McKenna, Targeting carbonic anhydrase IX activity and expression, *Molecules* 20(2) (2015) 2323-48.
- [20] P.C. Carvalho, T. Xu, X. Han, D. Cociorva, V.C. Barbosa, J.R. Yates, 3rd, YADA: a tool for taking the most out of high-resolution spectra, *Bioinformatics* 25(20) (2009) 2734-6.
- [21] H. Fernando, J.E. Wiktorowicz, K.V. Soman, B.S. Kaphalia, M.F. Khan, G.A. Shakeel Ansari, Liver proteomics in progressive alcoholic steatosis, *Toxicol Appl Pharmacol* 266(3) (2013) 470-80.
- [22] H.M. Zhou, Y.Y. Fang, P.M. Weinberger, L.L. Ding, J.K. Cowell, F.Z. Hudson, M. Ren, J.R. Lee, Q.K. Chen, H. Su, W.S. Dynan, Y. Lin, Transgelin increases metastatic potential of colorectal cancer cells in vivo and alters expression of genes involved in cell motility, *BMC cancer* 16(1) (2015) 55.
- [23] L. Zhao, H. Wang, Y.J. Deng, S. Wang, C. Liu, H. Jin, Y.Q. Ding, Transgelin as a suppressor is associated with poor prognosis in colorectal carcinoma patients, *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc* 22(6) (2009) 786-96.
- [24] H. Zhou, Y. Zhang, Q. Chen, Y. Lin, AKT and JNK Signaling Pathways Increase the Metastatic Potential of Colorectal Cancer Cells by Altering Transgelin Expression, *Digestive diseases and sciences* (2015).
- [25] J. Zhang, M.Q. Song, J.S. Zhu, Z. Zhou, Z.P. Xu, W.X. Chen, N.W. Chen, Identification of differentially-expressed proteins between early submucosal non-invasive and invasive

colorectal cancer using 2D-DIGE and mass spectrometry, *International journal of immunopathology and pharmacology* 24(4) (2011) 849-59.

[26] S.J. Assinder, J.A. Stanton, P.D. Prasad, Transgelin: an actin-binding protein and tumour suppressor, *Int J Biochem Cell Biol* 41(3) (2009) 482-6.

[27] H.J. Kim, U.B. Kang, H. Lee, J.H. Jung, S.T. Lee, M.H. Yu, H. Kim, C. Lee, Profiling of differentially expressed proteins in stage IV colorectal cancers with good and poor outcomes, *J Proteomics* 75(10) (2012) 2983-97.

[28] K.H. Kim, S.G. Yeo, W.K. Kim, D.Y. Kim, H.Y. Yeo, J.P. Hong, H.J. Chang, J.W. Park, S.Y. Kim, B.C. Kim, B.C. Yoo, Up-regulated expression of I-caldesmon associated with malignancy of colorectal cancer, *BMC cancer* 12 (2012) 601.

[29] M.P. de Caestecker, E. Piek, A.B. Roberts, Role of transforming growth factor-beta signaling in cancer, *J Natl Cancer Inst* 92(17) (2000) 1388-402.

[30] N.F. de Miranda, M. van Dinther, B.E. van den Akker, T. van Wezel, P. ten Dijke, H. Morreau, Transforming Growth Factor beta Signaling in Colorectal Cancer Cells With Microsatellite Instability Despite Biallelic Mutations in TGFBR2, *Gastroenterology* 148(7) (2015) 1427-37.e8.

[31] P. Mhawech, 14-3-3 proteins--an update, *Cell research* 15(4) (2005) 228-36.

[32] L. Zang, D. Palmer Toy, W.S. Hancock, D.C. Sgroi, B.L. Karger, Proteomic analysis of ductal carcinoma of the breast using laser capture microdissection, LC-MS, and 16O/18O isotopic labeling, *J Proteome Res* 3(3) (2004) 604-12.

[33] T. Fan, R. Li, N.W. Todd, Q. Qiu, H.B. Fang, H. Wang, J. Shen, R.Y. Zhao, N.P. Caraway, R.L. Katz, S.A. Stass, F. Jiang, Up-regulation of 14-3-3zeta in lung cancer and its implication as prognostic and therapeutic target, *Cancer Res* 67(16) (2007) 7901-6.

[34] J. Shen, M.D. Person, J. Zhu, J.L. Abbruzzese, D. Li, Protein expression profiles in pancreatic adenocarcinoma compared with normal pancreatic tissue and tissue affected by pancreatitis as detected by two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry, *Cancer Res* 64(24) (2004) 9018-26.

[35] B. Lu, J. Xu, Y. Zhu, H. Zhang, M. Lai, Systemic analysis of the differential gene expression profile in a colonic adenoma-normal SSH library, *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry* 378(1-2) (2007) 42-7.

[36] R. Sharma, S. Samantaray, N.K. Shukla, R. Ralhan, Transcriptional gene expression profile of human esophageal squamous cell carcinoma, *Genomics* 81(5) (2003) 481-8.

[37] J.S. Jang, H.Y. Cho, Y.J. Lee, W.S. Ha, H.W. Kim, The differential proteome profile of stomach cancer: identification of the biomarker candidates, *Oncology research* 14(10) (2004) 491-9.

[38] R. Ralhan, L.V. Desouza, A. Matta, S. Chandra Tripathi, S. Ghanny, S. Datta Gupta, S. Bahadur, K.W. Siu, Discovery and verification of head-and-neck cancer biomarkers by differential protein expression analysis using iTRAQ labeling, multidimensional liquid chromatography, and tandem mass spectrometry, *Mol Cell Proteomics* 7(6) (2008) 1162-73.

[39] M. Heidenblad, D. Lindgren, T. Jonson, F. Liedberg, S. Veerla, G. Chebil, S. Gudjonsson, A. Borg, W. Mansson, M. Hoglund, Tiling resolution array CGH and high

density expression profiling of urothelial carcinomas delineate genomic amplicons and candidate target genes specific for advanced tumors, *BMC medical genomics* 1 (2008) 3.

[40] J. Zha, H. Harada, E. Yang, J. Jockel, S.J. Korsmeyer, Serine phosphorylation of death agonist BAD in response to survival factor results in binding to 14-3-3 not BCL-X(L), *Cell* 87(4) (1996) 619-28.

[41] M. Gronborg, T.Z. Kristiansen, A. Iwahori, R. Chang, R. Reddy, N. Sato, H. Molina, O.N. Jensen, R.H. Hruban, M.G. Goggins, A. Maitra, A. Pandey, Biomarker discovery from pancreatic cancer secretome using a differential proteomic approach, *Mol Cell Proteomics* 5(1) (2006) 157-71.

[42] N. Wu, W. Zhang, Y. Yang, Y.L. Liang, L.Y. Wang, J.W. Jin, X.M. Cai, X.L. Zha, Profilin 1 obtained by proteomic analysis in all-trans retinoic acid-treated hepatocarcinoma cell lines is involved in inhibition of cell proliferation and migration, *Proteomics* 6(22) (2006) 6095-106.

[43] J. Janke, K. Schluter, B. Jandrig, M. Theile, K. Kolble, W. Arnold, E. Grinstein, A. Schwartz, L. Estevez-Schwarz, P.M. Schlag, B.M. Jockusch, S. Scherneck, Suppression of tumorigenicity in breast cancer cells by the microfilament protein profilin 1, *The Journal of experimental medicine* 191(10) (2000) 1675-86.

[44] Y.J. Cheng, Z.X. Zhu, J.S. Zhou, Z.Q. Hu, J.P. Zhang, Q.P. Cai, L.H. Wang, Silencing profilin-1 inhibits gastric cancer progression via integrin beta1/focal adhesion kinase pathway modulation, *World J Gastroenterol* 21(8) (2015) 2323-35.

[45] S. Bekku, H. Mochizuki, T. Yamamoto, H. Ueno, E. Takayama, T. Tadakuma, Expression of carbonic anhydrase I or II and correlation to clinical aspects of colorectal cancer, *Hepato-gastroenterology* 47(34) (2000) 998-1001.

[46] P. Alfonso, A. Nunez, J. Madoz-Gurpide, L. Lombardia, L. Sanchez, J.I. Casal, Proteomic expression analysis of colorectal cancer by two-dimensional differential gel electrophoresis, *Proteomics* 5(10) (2005) 2602-11.

[47] M.M. Adeva-Andany, C. Fernandez-Fernandez, R. Sanchez-Bello, C. Donapetry-Garcia, J. Martinez-Rodriguez, The role of carbonic anhydrase in the pathogenesis of vascular calcification in humans, *Atherosclerosis* 241(1) (2015) 183-91.

[48] L.J. Helman, T.G. Ahn, M.A. Levine, A. Allison, P.S. Cohen, M.J. Cooper, D.V. Cohn, M.A. Israel, Molecular cloning and primary structure of human chromogranin A (secretory protein I) cDNA, *J Biol Chem* 263(23) (1988) 11559-63.

[49] J.G. Park, H.K. Oie, P.H. Sugarbaker, J.G. Henslee, T.R. Chen, B.E. Johnson, A. Gazdar, Characteristics of cell lines established from human colorectal carcinoma, *Cancer Res* 47 (1987).

[50] M.O. Khan, M.H. Ather, Chromogranin A--serum marker for prostate cancer, *J Pak Med Assoc* 61(1) (2011) 108-11.

[51] S. Tsuji, J. Uehori, M. Matsumoto, Y. Suzuki, A. Matsuhisa, K. Toyoshima, T. Seya, Human intelectin is a novel soluble lectin that recognizes galactofuranose in carbohydrate chains of bacterial cell wall, *J Biol Chem* 276(26) (2001) 23456-63.

- [52] L. Zheng, M. Weng, M. Qi, T. Qi, L. Tong, X. Hou, Q. Tong, Aberrant expression of intelectin-1 in gastric cancer: its relationship with clinicopathological features and prognosis, *Journal of cancer research and clinical oncology* 138(1) (2012) 163-72.
- [53] D. Li, H. Mei, J. Pu, X. Xiang, X. Zhao, H. Qu, K. Huang, L. Zheng, Q. Tong, Intelectin 1 suppresses the growth, invasion and metastasis of neuroblastoma cells through up-regulation of N-myc downstream regulated gene 2, *Molecular cancer* 14 (2015) 47.
- [54] S. Perez-Holanda, I. Blanco, M. Menendez, L. Rodrigo, Serum concentration of alpha-1 antitrypsin is significantly higher in colorectal cancer patients than in healthy controls, *BMC cancer* 14 (2014) 355.
- [55] V.G. Antico Arciuch, M.E. Elguero, J.J. Poderoso, M.C. Carreras, Mitochondrial regulation of cell cycle and proliferation, *Antioxidants & redox signaling* 16(10) (2012) 1150-80.
- [56] J.W. Ryu, H.J. Kim, Y.S. Lee, N.H. Myong, C.H. Hwang, G.S. Lee, H.C. Yom, The proteomics approach to find biomarkers in gastric cancer, *Journal of Korean medical science* 18(4) (2003) 505-9.
- [57] S. Nie, H. Yin, Z. Tan, M.A. Anderson, M.T. Ruffin, D.M. Simeone, D.M. Lubman, Quantitative analysis of single amino acid variant peptides associated with pancreatic cancer in serum by an isobaric labeling quantitative method, *J Proteome Res* 13(12) (2014) 6058-66.
- [58] J.Q. Sheng, S.R. Li, Z.T. Wu, C.H. Xia, X. Wu, J. Chen, J. Rao, Transferrin dipstick as a potential novel test for colon cancer screening: a comparative study with immuno fecal occult blood test, *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology* 18(8) (2009) 2182-5.
- [59] L. Xu, Y. Gao, Y. Chen, Y. Xiao, Q. He, H. Qiu, W. Ge, Quantitative proteomics reveals that distant recurrence-associated protein R-Ras and Transgelin predict post-surgical survival in patients with Stage III colorectal cancer, *Oncotarget* 30(10) (2016).
- [60] L.Q. Xie, C. Zhao, S.J. Cai, Y. Xu, L.Y. Huang, J.S. Bian, C.P. Shen, H.J. Lu, P.Y. Yang, Novel proteomic strategy reveal combined alpha1 antitrypsin and cathepsin D as biomarkers for colorectal cancer early screening, *J Proteome Res* 9(9) (2010) 4701-9.
- [61] Y. Ma, J. Peng, W. Liu, P. Zhang, L. Huang, B. Gao, T. Shen, Y. Zhou, H. Chen, Z. Chu, M. Zhang, H. Qin, Proteomics identification of desmin as a potential oncofetal diagnostic and prognostic biomarker in colorectal cancer, *Mol Cell Proteomics* 8(8) (2009) 1878-90.
- [62] K. Honda, T. Yamada, Y. Hayashida, M. Idogawa, S. Sato, F. Hasegawa, Y. Ino, M. Ono, S. Hirohashi, Actinin-4 increases cell motility and promotes lymph node metastasis of colorectal cancer, *Gastroenterology* 128(1) (2005) 51-62.
- [63] R.E. Wang, Targeting heat shock proteins 70/90 and proteasome for cancer therapy, *Current medicinal chemistry* 18(27) (2011) 4250-64.
- [64] M.K. Pandey, S. Prasad, A.K. Tyagi, L. Deb, J. Huang, D.N. Karelia, S.G. Amin, B.B. Aggarwal, Targeting Cell Survival Proteins for Cancer Cell Death, *Pharmaceuticals (Basel, Switzerland)* 9(1) (2016).

- [65] J.J. Wang, Y. Liu, Y. Zheng, F. Lin, G.F. Cai, X.Q. Yao, Comparative proteomics analysis of colorectal cancer, *Asian Pacific journal of cancer prevention* : APJCP 13(4) (2012) 1663-6.
- [66] K. Pogue-Geile, J.R. Geiser, M. Shu, C. Miller, I.G. Wool, A.I. Meisler, J.M. Pipas, Ribosomal protein genes are overexpressed in colorectal cancer: isolation of a cDNA clone encoding the human S3 ribosomal protein, *Molecular and cellular biology* 11(8) (1991) 3842-9.
- [67] F.W. Chen, Y.A. Ioannou, Ribosomal proteins in cell proliferation and apoptosis, *International reviews of immunology* 18(5-6) (1999) 429-48.
- [68] R.A. Cairns, I.S. Harris, T.W. Mak, Regulation of cancer cell metabolism, *Nat Rev Cancer* 11(2) (2011) 85-95.
- [69] K.T. Pate, C. Stringari, S. Sprowl-Tanio, K. Wang, T. TeSlaa, N.P. Hoverter, M.M. McQuade, C. Garner, M.A. Digman, M.A. Teitell, R.A. Edwards, E. Gratton, M.L. Waterman, Wnt signaling directs a metabolic program of glycolysis and angiogenesis in colon cancer, *Embo j* 33(13) (2014) 1454-73.
- [70] C.H. Kwon, H.J. Park, J.R. Lee, H.K. Kim, T.Y. Jeon, H.J. Jo, D.H. Kim, G.H. Kim, D.Y. Park, Serpin peptidase inhibitor clade A member 1 is a biomarker of poor prognosis in gastric cancer, *Br J Cancer* 111(10) (2014) 1993-2002.
- [71] G. Bendas, L. Borsig, Cancer cell adhesion and metastasis: selectins, integrins, and the inhibitory potential of heparins, *International journal of cell biology* 2012 (2012) 676731.
- [72] G. Pearson, F. Robinson, T. Beers Gibson, B.E. Xu, M. Karandikar, K. Berman, M.H. Cobb, Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions, *Endocrine reviews* 22(2) (2001) 153-83.
- [73] J.F.R. Kerr, C.M. Winterford, B.V. Harmon, Apoptosis - Its Significance In Cancer And Cancer-Therapy, *Cancer* 73(8) (1994) 2013-2026.
- [74] P.C. McDonald, J.Y. Winum, C.T. Supuran, S. Dedhar, Recent developments in targeting carbonic anhydrase IX for cancer therapeutics, *Oncotarget* 3(1) (2012) 84-97.

Fig. 1: Rectum segment and sigmoid with ulcerated lesion and infiltration of all sigmoid layers; the mucosa appears brown-yellow and wrinkled (resection margin 5 cm away from the tumor). The lateral margins, is covered by serous smooth that is glossy and transparent. The colorectal tumor and its respective resection margin, 5cm apart, are indicated.

Fig. 2: Volcano plot comparing the peptides (the dots) from tumor versus resection margin 5 cm. The y-axis represents the Log_e fold change and the x-axis the $-\log$ of the paired t-test p-value. Peptides (dots) with a positive y-value had a higher abundance in the tumor; likewise, negative values, are peptides with higher abundance in resection margin. Green and red dots represent peptides that achieved a p-value lower than 0,05 and an absolute peptide log fold change cutoff greater than 0,30.

Fig. 3: Network comprising the differentially expressed protein in colorectal tumor tissue in accordance with the criteria used in Isobaric Analyzer. Proteins circled in red are chaperone binding; in black are actin-binding and compose the cytoskeleton; in purple are related to cellular energy metabolism and circled in blue are ribosomal proteins.

Strings did not include Complement component 1 Q subcomponent-binding protein, peroxiredoxin-5, keratin type II, pyruvate kinase, 60 kDa heat shock protein and transforming growth factor-beta-induced protein in the analysis.

Fig. 4: A network of over-represented proteins found in the resection margin samples. CHGA stands for chromogranin, VIM for vimentin, CLCA1 for chloride channel accessory 1, CA2 for carbonic anhydrase II, ALB for albumin, ITLN1 for intelectin 1, SERPINA1 for alpha-1-antitrypsin, SELENBP1 for selenium binding protein 1 and TF for serotransferrin.

Fig. 5: Gene Ontology analysis of proteins in colorectal tumor and its respective resection margin according to: **A)** Cellular component; **B)** Biological process; **C)** Molecular function.

Table 1: Clinical characteristics of the four patients included in these study.

PATIENT	AGE	GENDER	SMOKING	ALCOHOL	HISTOLOGICAL SUBTYPE	TNM STAGING (Tumor-Node-Metastasis)
1	61	M	No	No	High grade adenocarcinoma	T3N0M0
2	65	M	Yes	Yes	Moderately differentiated adenocarcinoma	T3N0M0
3	74	F	No	No	Moderately differentiated adenocarcinoma	T4N2M0
4	62	M	Yes	Yes	Moderately differentiated adenocarcinoma	T3N1M0

Table 2: Experimental design used to label the samples from the four patients with colorectal cancer and their respective resection margin.

Sample number	Description of the sample	iTRAQ
1	Colorectal cancer 1	113
2	Margin 1	114

3	Colorectal cancer 2	115
4	Margin 2	116
5	Colorectal cancer 3	117
6	Margin 3	118
7	Colorectal cancer 4	119
8	Margin 4	121

Table 3. A list with the 56 differentially abundant proteins obtained when comparing colorectal cancer with its respective resection margin. The column legends are as follows: ID – the identification from the UniProt database; SeqCount – number of peptides that were identified for that protein; SpectCount – number of tandem mass spectra identified for that protein; Log Fold – the value of the logarithm of the average peptide fold changes; Stouffers p-value – the Stouffers p-value decurrent from the meta-analysis of p-values of all peptides belonging to a protein; Protein identification score – Sum of the X-Corr (i.e. the cross-correlation between the experimental peptide theoretical mass spectrum and the experimental one) of all peptide spectrum matches; Description – the UniProt description for a given protein. All proteins that were considered differentially abundant presented a p-value < 0.05 according to the Stouffers method. A positive fold change indicates that the protein is more abundant in the colorectal cancer; likewise, negative, in the resection margin.

ID	Sequence Count	Spectral Count	Log Fold	Stouffers p-value	Protein Identification Score (i.e., XCorr sum)	Description
P00918	2	21	-0.686	0.00761	98.14	Carbonic anhydrase 2
P10645	5	11	-0.584	0.00152	51.27	Chromogranin-A
A8K7I4	9	49	-0.539	0.00002	162.6	Calcium-activated chloride channel regulator 1
Q8WWA0	2	13	-0.49	0.00534	35.53	Intelectin-1
Q13228	3	20	-0.47	0.00324	109.14	Selenium-binding protein 1
P01009	2	12	-0.422	0.00508	275.75	Alpha-1-antitrypsin
P02787	5	39	-0.391	0.00042	416.08	Serotransferrin
P63104	2	25	0.307	0.00528	237.32	14-3-3 protein zeta/delta
Q6ZN40	3	8	0.31	0.00389	619.99	Tropomyosin 1 (Alpha), isoform CRA_f
P23396	2	6	0.316	0.00742	23.29	40S ribosomal protein S3
P40926	3	27	0.324	0.00555	349.47	Malate dehydrogenase, mitochondrial
P09211	2	20	0.333	0.00553	77.36	Glutathione S-transferase P
P35579	5	20	0.35	0.00153	135.77	Myosin-9

P12277	2	8	0.351	0.00508	426.27	Creatine kinase B-type
Q07021	2	17	0.353	0.00554	60.45	Complement component 1 Q subcomponent-binding protein, mitochondrial
P27797	2	19	0.353	0.00852	190.9	Calreticulin
P21333	10	62	0.355	0.00001	954.57	Filamin-A
P28838	3	9	0.355	0.00374	78.05	Cytosol aminopeptidase
P13639	2	21	0.361	0.00563	212.11	Elongation factor 2
P40121	2	6	0,366	0.0081	16.29	Macrophage-capping protein
Q5TCU3	2	15	0,368	0.00739	674.58	Tropomyosin beta chain
P06748	2	9	0.375	0.00563	37.92	Nucleophosmin
P07195	5	49	0.382	0.00074	207.93	L-lactate dehydrogenase B chain
P06744	4	30	0.384	0.00177	164.04	Glucose-6-phosphate isomerase
P37837	2	18	0.385	0.00514	61.31	Transaldolase
O15144	2	6	0.385	0.00678	28.23	Actin-related protein 2/3 complex subunit 2
P07237	5	33	0.386	0.00068	219.84	Protein disulfide-isomerase
P60174	5	24	0.392	0.00078	185.34	Triosephosphate isomerase
P62937	5	56	0.397	0.00054	350.06	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A
P29401	4	23	0.399	0.00263	114.14	Transketolase
P30044	2	7	0.4	0.00518	367.65	Peroxiredoxin-5, mitochondrial
P00558	6	107	0.407	0.00069	409.33	Phosphoglycerate kinase 1
P19338	2	6	0.409	0.00732	59.7	Nucleolin
P05787	7	251	0.412	0.00095	1180.62	Keratin, type II cytoskeletal 8
O00299	3	33	0.417	0.00242	140.17	Chloride intracellular channel protein 1
P07900	2	13	0.422	0.00534	207.34	Heat shock protein HSP 90-alpha
P13796	3	17	0.422	0.00756	128.75	Plastin-2

P08238	4	16	0.428	0.00136	254.84	Heat shock protein HSP 90-beta
Q9Y490	2	18	0.43	0.00728	255.37	Talin-1
P04792	2	8	0.462	0.00632	57.42	Heat shock protein beta-1
P14618	14	111	0.473	0.00001	401.66	Pyruvate kinase PKM
P06733	13	96	0.49	0.00001	332.57	Alpha-enolase
P10809	5	28	0.491	0.00067	374.59	60 kDa heat shock protein, mitochondrial
Q15582	3	10	0.505	0.00662	29.92	Transforming growth factor-beta-induced Protein ig-h3
P09467	2	4	0.507	0.00859	11	Fructose-1,6-bisphosphatase 1
P04406	12	175	0.51	0.00001	861.55	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
P07737	4	19	0.518	0.00097	185.08	Profilin-1
P69905	10	188	0.537	0.00761	1020.67	Hemoglobin subunit alpha
P14625	2	7	0.537	0.00152	351.11	Endoplasmic
P31949	3	25	0.608	0.00002	68.17	Protein S100-A11
Q05682	2	17	0.616	0.00534	86.53	Caldesmon
P17661	10	77	0.628	0.00324	286.03	Desmin
P05387	2	9	0.651	0.00508	38.78	60S acidic ribosomal protein P2
P68871	6	82	0.653	0.00042	3145.38	Hemoglobin subunit beta
Q01995	8	90	0.667	0.00528	271.34	Transgelin
P00338	8	56	0,700	0.00389	217.59	L-lactate dehydrogenase A chain