

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
FACULDADE DE MEDICINA

MARCELO DE MELO ANDRADE COURA

**Estudo comparativo do perfil de N-glicosilação no tecido tumoral, no tecido normal e no soro de pacientes com adenocarcinoma de cólon esporádico. Avaliação por espectrometria de massas**

Brasília

2021

MARCELO DE MELO ANDRADE COURA

**Estudo comparativo do perfil de N-glicosilação no tecido tumoral, no tecido normal e no soro pacientes com adenocarcinoma de cólon esporádico. Avaliação por espectrometria de massas**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília como requisito parcial à obtenção do grau de Doutor.

Área de Concentração: Medicina

Orientador: Prof. Dr. João Batista de Sousa

Brasília

2021

## TERMO DE APROVAÇÃO

MARCELO DE MELO ANDRADE COURA

### **Estudo comparativo do perfil de N-glicosilação no tecido tumoral, no tecido normal e no soro de pacientes com adenocarcinoma de cólon esporádico. Avaliação por espectrometria de massas**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília, como requisito parcial à obtenção do grau de Doutor.

Examinadores:

---

Prof. Dr. João Batista de Sousa-Presidente-Faculdade de Medicina-Universidade de Brasília-UnB

---

Prof. Dr. Norberto Peporine Lopes - membro - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo-USP-Ribeirão Preto

---

Prof. Dr. Carlos Augusto Real Martinez-membro-Faculdade de Ciências Médicas da Universidade de Campinas-Unicamp

---

Prof. Dr. Paulo Gonçalves de Oliveira-membro-Faculdade de Medicina-Universidade de Brasília-UnB

Suplente:

---

Profª. Dra. Juliana Forte Mazzeu de Araújo - Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília -UnB

Conceito:

---

Brasília, 24 de setembro de 2021

## DEDICATÓRIA

Dedico essa tese à minha esposa Michelle, minha melhor parte, companheira da jornada que juntos escolhemos dividir.

À Manu e ao Digo que são o sentido da minha vida. “Que as palavras orientem e o exemplo arraste”.

Ao meu pai, pelo exemplo de homem e de caráter.

À minha mãe, pelo amor além dela mesma.

Ao meu irmão, meu amigo e parceiro de todas as horas.

A todos os três pelos sacrifícios que passamos para que eu pudesse chegar até aqui.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que direta ou indiretamente me ajudaram a realizar esse trabalho, em especial:

Ao Prof. Dr. JOÃO BATISTA DE SOUSA, meu orientador e mestre, cirurgião exemplar e amigo e ao Prof. Dr. CARLOS BLOCH JÚNIOR que juntos vislumbraram a possibilidade de unir a cirurgia à ciência básica, onde estão muitas das respostas aos nossos questionamentos.

Ao Prof. Dr. EDER ALVES BARBOSA, profissional dedicado e competente, que muito pacientemente me ensinou o caminho de transformar o trabalho na bancada em realidade e que enxerga a vida através dos espectros.

Ao Prof. Dr. GUILHERME DOTTO BRAND, pelo apoio, pelos ensinamentos e pela gentileza em deixar as portas abertas do Instituto de Química da Universidade de Brasília para que esta tese fosse possível.

Aos Dra. MAURA VIANNA PRATES, Dra. BEATRIZ BLENDIA PINHEIRO DE SOUZA, Dr. JOSÉ DE LIMA CARDOZO, Dr. ANDRÉ MELRO MURAD e Dr. DANIEL NOGOCEKE SIFUENTES pelo apoio, ensinamentos, companheirismo e orientação no trabalho de bancada, bem como aos demais funcionários do CENARGEN-EMBRAPA que dividiram seu tempo, espaço, os seus materiais e equipamentos, mas mais importante, dividiram a amizade, as esperanças e angústias no árduo caminho de se fazer pesquisa básica em meio à tantas adversidades.

Ao Prof. ROMULO MEDEIROS DE ALMEIDA e demais médicos cirurgiões do serviço de Coloproctologia do Hospital Universitário de Brasília que, muito gentilmente, me permitiram ter acesso aos pacientes cirúrgicos para a coleta de material.

Ao Dr. HEINRICH BENDER KOHNERT SEIDLER pela realização das análises de imunohistoquímica e da pesquisa de mutações somáticas nas peças cirúrgicas.

Ao médico coloproctologista CELSO DE PAIVA MELO que muito me ajudou na coleta dos materiais e no seu transporte, compartilhando alegrias e frustrações dessa empreitada.

À Dra. SILVANA MARQUES E SILVA e às companheiras de trabalho, médicas coloproctologistas ISABEL FERREIRA SAENGER e VALÉRIA CARDOSO PINTO RESENDE, pelo estímulo e apoio nessa longa caminhada.

Aos pacientes que são o grande motivo da nossa busca por mais conhecimento e aprendizagem. Que a ciência, aliada à compaixão, traga alívio ao seu sofrimento.

Aos professores da Pós-Graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília pelos ensinamentos os quais, a despeito de todas as dificuldades, seguem no caminho de transformar as pessoas, a universidade e o Brasil.

Aos colegas da Pós-Graduação pelo estímulo e companheirismo. À Universidade de Brasília por todo o meu aprendizado nesses longos 30 anos.

## EPÍGRAFE

“Esse é o objetivo principal da ciência, dar sentido ao desconhecido. Mas é bom lembrar que, pela sua própria natureza, a construção desse conhecimento sobre o mundo não tem fim. Quando nossa ilha do conhecimento cresce, as praias da nossa ignorância, que demarcam a fronteira do conhecido com o desconhecido, também crescem. Quanto mais sabemos, mais descobrimos o quanto não sabemos”

Marcelo Gleiser- A ilha do conhecimento

## RESUMO

A glicosilação é o fenômeno mais comum na pós-tradução de proteínas, frequentemente alterado em diversos processos biológicos, como no câncer colorretal (CCR). Dessa forma, seu estudo e compreensão podem revelar potenciais marcadores tumorais com finalidade de diagnóstico precoce e prognóstico. **Objetivo:** estudar o perfil de N-glicosilação do soro de pacientes com diagnóstico de câncer de cólon esporádico em relação ao perfil de N-glicosilação do soro de indivíduos saudáveis. Como objetivo secundário realizou-se a comparação do perfil de N-glicosilação presente no tecido tumoral e no tecido colônico normal, e a correlação entre as composições alteradas no soro e no tecido dos pacientes com câncer de cólon. **Método: Soro:** Análise qualitativa e quantitativa por espectrometria de massas (EM) pelos métodos MALDI-TOF-MS e LC-MS/MS de N-glicanos extraídos das glicoproteínas totais presentes em 40 µl do soro de pacientes com câncer de cólon e presentes em 40 µl do soro de indivíduos saudáveis. Os dois grupos foram normalizados em relação aos N-glicanos presentes em 40 µl do conjunto formado por alíquotas iguais do soro de todos os indivíduos saudáveis. **Tecido:** Análise qualitativa e quantitativa por espectrometria de massas (EM) pelos métodos MALDI-TOF-MS e LC-MS/MS de N-glicanos extraídos das glicoproteínas presentes em 60 mg de tecido tumoral e em 60 mg de tecido colônico normal de 13 pacientes com câncer de cólon. **Resultados: Soro:** A análise MALDI-TOF-MS detectou 29 sinais de íon correspondentes a N-glicanos. A composição HexNac5Hex5NeuAc1 [M+Na]<sup>+</sup> foi identificada como relativamente aumentada no soro de pacientes com câncer de cólon ( $\alpha=0,01$ ). A análise LC-MS/MS identificou 53 sinais de íon correspondentes a N-glicanos, dos quais 26 estavam diferentemente expressos no soro de pacientes com câncer ( $p<0,01$ ), em relação ao soro de indivíduos saudáveis. Vinte e três composições estavam diminuídas no soro de pacientes com câncer, das quais 17 eram formas galactosiladas. As composições HexNac2Hex7 [M+2Na]<sup>2+</sup> ( $p=0,0004$ ), HexNac4Hex5Fuc1NeuAc2 [M+3Na]<sup>3+</sup> ( $p=0,0008$ ) e HexNac6Hex7NeuAc3 [M+4Na]<sup>4+</sup> ( $p=0,0014$ ) foram encontradas relativamente aumentadas no soro de pacientes com câncer. A análise do perfil de N-glicosilação identificado no soro, baseada no método de Ward, demonstrou clara diferença na distribuição espacial dos casos, da distribuição espacial dos controles. **Tecido:** A análise MALDI-TOF-MS detectou 12 sinais de íon correspondentes a N-glicanos. Duas composições oligomanosídicas foram identificadas como aumentadas no tecido tumoral ( $p<0,01$ ). A análise LC-MS/MS identificou 24 sinais de íon correspondentes a N-glicanos, dos quais 11 estavam diferentemente expressos no tecido tumoral de pacientes com câncer. Dez composições estavam aumentadas no tecido tumoral, das quais 5 eram formas bi-antênárias incompletas, 4 formas multi-antena e 1 forma rica em manose ( $p<0,005$ ). A composição HexNac2Hex7 [M+2Na]<sup>+2</sup> ( $p<0,01$ ) foi identificada como diminuída no tecido tumoral. Não houve correlação entre as alterações quantitativas das composições alteradas no soro e as composições alteradas no tecido tumoral, dos pacientes com câncer de cólon. **Conclusões:** pacientes com câncer de cólon apresentaram modificações complexas no perfil de N-glicosilação no soro, em relação ao soro de indivíduos saudáveis, com capacidade em separar casos de controles. No tecido tumoral ao contrário, observou-se um aumento na expressão de N-glicanos, em especial formas bi-antênárias incompletas e multi-antênárias, sem correlação com o perfil de N-glicosilação identificado no soro dos pacientes com câncer de cólon.

Descritores: Câncer de cólon. N-glicosilação. Espectrometria de massas. Soro. Tecido tumoral. MALDI-TOF/MS. ESI-LC/MS/MS.

## ABSTRACT

Glycosylation is the most common posttranslational modification in proteins, frequently altered in many biologic processes, as in colorectal cancer (CRC). Thus, in-depth investigation of CRC patients may reveal potential tumor markers suitable for early diagnosis and prognostic. **Objective:** To study the N-glycosylation profile in the serum of patients with sporadic colon cancer, in relation to the N-glycosylation profile in the serum of healthy individuals. Similarly, the comparison of the N-glycosylation profile between tumour tissue and colonic normal tissue, as well as the correlation between altered compositions in serum and in tissue of the same 13 patients with colon cancer was carried out. **Methods: Serum:** Quantitative and qualitative analyses by MALDI-TOF/MS and LC-MS/MS mass spectrometry (MS) technology of N-glycans extracted from glycoproteins in 40  $\mu$ l of the serum of colon cancer patients and 40  $\mu$ l of the serum of healthy individuals. Each analyses of colon cancer patients and healthy individuals was normalized by using N-glycans extracted from 40  $\mu$ l of the pool formed by samples of serum from each healthy individual, as an internal control. **Tissue:** Quantitative and qualitative analyses by MALDI-TOF/MS and LC-MS/MS mass spectrometry (MS) technology of N-glycans extracted from glycoproteins in 60 mg of tumour tissue and 60 mg of colonic normal tissue of the same 13 colon cancer patients. **Results: Serum:** MALDI-TOF/MS analyses detected 29 ion signals of N-glycans, of which one was found differently expressed in serum of colon cancer patients. Ion  $[M+Na]^+$  HexNac5Hex5NeuAc1 were found increased in serum of colon cancer patients ( $\alpha=0.01$ ). LC-MS/MS analyses identified 53 ion signals, of which 26 were found differently expressed in serum of colon cancer patients ( $p<0.01$ ). Twenty-three compositions were decreased in serum of colon cancer patients, of which 17 were galactosylated forms. Compositions  $[M+2Na]^{2+}$  HexNac2Hex7 ( $p=0.0004$ ),  $[M+3Na]^{3+}$  HexNac4Hex5Fuc1NeuAc2 ( $p=0.0008$ ) and  $[M+4Na]^{4+}$  HexNac6Hex7NeuAc3 ( $p=0.0014$ ) were increased in serum of colon cancer patients. Unsupervised non-hierarchical analyses of the global N-glycosylation in serum by Ward's method showed clear distinct spacial distribution between cancer patients and healthy controls. **Tissue:** MALDI-TOF/MS analyses detected 12 ion signals, of which 2 oligomannosidic forms were increased in tumour tissues of colon cancer patients ( $p<0.01$ ). LC-MS/MS analyses identified 24 ion signals of N-glycans, of which 11 were found differently expressed in tumour and normal tissues of cancer patients. Ten compositions were increased in tumour tissues, of which 5 were bi-antennary incomplete forms, 4 multi-antennae forms and 1 mannose-rich form ( $p<0.005$ ). Composition  $[M+2Na]^{+2}$  HexNac2Hex7 ( $p<0.01$ ) was found decreased in tumour tissues. No correlation was found between quantitative alteration in compositions differently expressed in serum and in tumour tissues of colon cancer patients. **Conclusions:** colon cancer patients showed global decrease of N-glycans in serum when compared to healthy individuals, able to separate cases from controls. Conversely, N-glycans were found overexpressed in tumour tissues, especially bi-antennary incomplete and multi-antennae forms, with no correlation to the N-glycosylation profile identified in the serum of colon cancer patients.

Key words: Colon cancer. N-glycosylation. Mass Spectrometry. Serum. Tumour Tissues. MALDI-TOF/MS. ESI-LC/MS/MS.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Representação da síntese e transferência do precursor oligossacarídico dos N-glicanos. A- Síntese na membrana do retículo endoplasmático (RE) do precursor formado por 2 N-acetilhexoses, 9 manoses e 3 glicoses B- Ação da enzima oligossacariltransferase (OST) que transfere em bloco o precursor para a amida do aminoácido asparagina, na proteína recém-sintetizada. Fonte: <http://www.bio.miami.edu>.....28
- Figura 2. Representação esquemática do processo de síntese intracelular de N-glicanos e glicosilação de proteínas. Abaixo- síntese dos N-glicanos, transferência e maturação protéica no retículo endoplasmático (ER). Acima- Transferência da estrutura madura para posterior ação sequencial de manosidases, N-acetiltransferases (GNTs I-V) e fucosiltransferases (FucT) na formação de estruturas híbridas e complexas, no complexo de Golgi. Fonte: *Front. Oncol.*, 25 June 2015 | <https://doi.org/10.3389/fonc.2015.00138>.....29
- Figura 3. A- Estrutura central (core) dos N-glicanos em destaque, com 9 moléculas de manose e decorada com 3 moléculas de glicose antes do processamento no RE. B- À direita, representação das classes de glicanos: ricas em manose, híbridas e complexas que são formadas no complexo de Golgi. Fonte: *Front. Pediatr.*, 11 June 2015 <https://doi.org/10.3389/fped.2015.00054>.....30
- Figura 4. Esquema simplificado do funcionamento de um espectrômetro de massa: fonte de ionização, analisador de massa e detector. Fonte: [ebah.com.br](http://ebah.com.br).....33
- Figura 5. Aspecto macroscópico da peça cirúrgica de um tumor localizado no cólon sigmóide, aberta no sentido longitudinal. Detalhe do tumor primário localizado na sua extremidade distal (seta).....41
- Figura 6. Fragmento de tecido colônico normal de 1 X 1 cm, retirado 10 cm proximais à lesão.....42
- Figura 7. Fragmento de tecido do tumor de 1 X 1 cm, retirado da porção proximal da lesão.....42
- Figura 8. Fragmento de tecido do tumor de 1 X 1 cm, retirado da porção distal da lesão.....43
- Figura 9. Local de ação da enzima polipeptídeo N-glicosidase F (PNGase F) que cliva a ligação dos N-glicanos com a proteína, no resíduo mais interno de N-acetilglicosamina (seta). Fonte: <https://www.sigmaaldrich.com>.....45

- Figura 10. Processo de permetilação de N-glicanos, onde ocorre a substituição dos átomos de hidrogênio das hidroxilas no anel de monossacarídeo, pelo resíduo metil do iodo metano em meio com dimetilsulfóxido (DMSO) e em pH básico. Fonte: Hess, S. & Graham, R.I. 2010.....46
- Figura 11. Detalhe da placa utilizada neste estudo, com os respectivos pontos de leitura ("spots"), sob os quais incide o laser nas aquisições. Na primeira fileira, cada ponto de leitura corresponde a 1 µl da amostra seca de N-glicanos presentes no soro de um paciente com tumor e do "pool" do soro de controles (A1-A13) e a 1 µl da amostra seca de N-glicanos presentes no soro de um indivíduo sadio e no "pool" do soro de controles (A14-A24). Na terceira fileira, cada ponto de leitura corresponde a 1 µl da amostra seca de N-glicanos presentes no tumor e no tecido normal de cada paciente com câncer (C1-C15).....50
- Figura 12. Representação esquemática do funcionamento do modo refletor de leitura, no analisador de massa TOF (time-of-flight) de estruturas ionizadas por matriz a laser (MALDI-TOF). Fonte: NIH / NIGMS Biomedical Mass Spectrometry Resources Washington.US.....50
- Figura 13. Espectrômetro de massa MALDI-TOF/TOF-MS (time-of-flight) utilizado para as aquisições desta tese. Fonte: Embrapa-Cenargem, Laboratório de Espectrometria de massas.....51
- Figura 14. Espectro de intensidades relativas e assinalamento de íons correspondentes a N-glicanos presentes no tecido tumoral e no tecido colônico normal de um paciente com adenocarcinoma de cólon transversal, pT3N0. MALDI-TOF-MS, modo refletor,  $m/z$  1.500-5.000. Estruturas moleculares obtidas mediante análise do valor da relação massa/carga da forma derivatizada e ionizada com um íon sódio. Notar a relação entre a intensidade de sinal dos íons das formas permetiladas e deuteradas, marcadas com asterisco. Como exemplo, o sinal mais intenso do glicano permetilado  $[M+Na]^+=2792,4$  Da em relação ao seu isótopo pesado  $[M+Na]^+=2910,1$  Da .....53
- Figura 15. Cromatógrafo RPLC Eksigent UltraLC 110-XL (AB Sciex) acoplado a um espectrômetro de massa TripleTof 5600+ (AB Sciex) utilizados para as aquisições desta tese. Fonte: Instituto de Química, Universidade de Brasília (UnB), Laboratório de Análise e Síntese de Moléculas (LITMO).....55

- Figura 16. A. Corrente iônica total de uma amostra de tecido tumoral e no tecido colônico normal de um paciente com adenocarcinoma de cólon transversal, pT3N0, adquirida na faixa  $m/z$  800-2.000. B. Cromatograma de íon extraído referente à  $m/z$  1407,6859. C. Distribuição isotópica confirmando se tratar do íon  $[M+Na]^{2+}=1407,6859$  Da..... 56
- Figura 17. Representação esquemática da composição bi-antênaria, metilada, HexNac4Hex5Fuc1NeuAc2,  $[M+3Na]^{+3}=1004,1501$  Da.....57
- Figura 18. Representação esquemática do fluxograma do estudo para amostras de tecido .....58
- Figura 19. Representação esquemática do fluxograma do estudo para amostras de soro.. .....59
- Figura 20. Aspecto imunohistoquímico normal da expressão tecidual dos heterodímeros correspondentes às enzimas de reparo do DNA MLH1/PMS2 e MSH2/MSH6 no epitélio tumoral, comparada com o tecido estromal adjacente normal. Paciente 1.....64
- Figura 21. Espectro de intensidade e assinalamento de N-glicanos presentes no soro de um paciente com adenocarcinoma de cólon transversal, pT3N0, *KRAS* mutado e no soro do “pool” de controles. Notar a diferença de intensidade relativa da forma metilada  $[M+Na]^+= 2792,4$  e deuterada  $[M+Na]^+= 2910,1$  (asterisco) do íon nº 54- HexNac4Hex5NeuAc2, MALDI-TOF/TOF-MS, modo refletor,  $m/z$  1.500-5.000.....66
- Figura 22. Análise LC-MS da amostra do soro de um paciente com adenocarcinoma de cólon, localizado em cólon transversal. Acima, extração do cromatograma do íon anotado nº 54- HexNac2Hex5NeuAc2 na forma permetilada  $[M+2Na]^{+2}=1407,6869$  Da. Abaixo em detalhe, a distribuição monoisotópica da respectiva forma metilada (-CH3).....68
- Figura 23. Análise LC-MS de uma amostra composta pelo conjunto (“pool”) do soro de controles sadios. Acima, extração do cromatograma do íon anotado nº 54- HexNac2Hex5NeuAc2 na forma deuterada  $[M+2Na]^{+2}=1466,5521$  Da. Abaixo em detalhe, a distribuição isotópica da respectiva forma deuterada (-CD3).....69
- Figura 24. Espectro MS/MS do N-glicano permetilado nº 17-HexNac2Hex7 (massa do precursor  $[M+2Na]^{2+}= 1005,4862$  Da) identificado no soro e um paciente com

	câncer obtido pelo método LC-MS/MS. Interpretação gerada pelo software GRITS.....	70
Figura 25.	Espectro MS/MS do N-glicano permetilado n° 60-HexNAc4Hex5Fuc1NeuAc2 (massa do precursor $[M+3Na]^{3+} = 1004,1560$ Da) identificado no soro de um paciente com câncer, obtido pelo método LC-MS/MS. Interpretação gerada pelo software GRITS.....	71
Figura 26.	Dendograma representativo da distribuição espacial por semelhança do conjunto dos valores normalizados $CH_3/CD_3$ dos 89 N-glicanos quantificados no soro de pacientes (●P) e controles sadios (●C), obtidos pela análise LC-MS/MS e submetidos ao algoritmo de aglutinação hierárquica não supervisionada pelo método de Ward.....	81
Figura 27.	Espectro de intensidade e assinalamento de N-glicanos presentes no tecido tumoral e no tecido normal de um paciente com adenocarcinoma de cólon transversal, pT3N0, <i>KRAS</i> mutado. Notar a diferença de intensidade relativa da forma metilada $[M+Na]^+ = 2792,4$ Da (tumor) e deuterada $[M+Na]^+ = 2910,1$ Da (normal, asterisco) do íon n° 54- HexNAc4Hex5NeuAc2, MALDI-TOF-MS, modo refletor, $m/z$ 1.500-5.000.....	82
Figura 28.	A. Análise LC-MS/MS mostrando a corrente iônica total (TIC) de uma amostra de tecido tumoral, de um paciente com adenocarcinoma de cólon localizado em cólon transversal, pT3N0, <i>KRAS</i> mutado, adquirida na faixa $m/z$ 800-2.000. B. Cromatograma de íon extraído referente ao íon $[M+2Na]^{2+} = 1407,6859$ Da C. Distribuição isotópica confirmando se tratar do íon $[M+Na]^{2+} = 1407,6859$ Da.....	84
Figura 29.	Distribuição em “blox-plot” dos valores das razões de área $CH_3/CD_3$ dos 11 sinais de íon diferentemente expressos no tecido tumoral em relação ao tecido normal. Método LC-MS/MS. Teste de Wilcoxon, $\alpha=0,01$ .....	89

## LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1. Mediana e valores intervalares da área CH<sub>3</sub>/CD<sub>3</sub> da composição n° 51-HexNac5Hex5NeuAc1 alterada no soro dos pacientes com tumor (n=13) em relação aos controles sadios (n=11) pelo método MALDI-TOF-MS.....75
- Gráfico 2. Mediana e valores intervalares das razões iônicas das 26 composições significativamente alteradas no soro dos pacientes com tumor (vermelho) em relação aos controles sadios (azul) pelo método LC-MS/MS ( $\alpha=0,01$ , Teste U de Mann-Withney).....79
- Gráfico 3. Mediana e valores intervalares da área CH<sub>3</sub>/CD<sub>3</sub> das duas composições alteradas no tecido tumoral em relação ao tecido normal dos pacientes com tumor (n=13), pelo método MALDI-TOF-MS.....86

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1. Descrição da casuística de pacientes com adenocarcinoma de cólon.....63
- Tabela 2. Características dos indivíduos sadios, participantes do grupo controle.....65
- Tabela 3. Relação das composições deuteradas usadas como referência para os respectivos sinais de íon das 6 composições permetiladas, detectadas nas amostras de soro pelo método MALDI-TOF-MS. ....72
- Tabela 4. Conjunto das razões iônicas dos 29 íons correspondentes a N-glicanos detectados no soro de um paciente com adenocarcinoma de cólon localizado em cólon transversal, estadiamento II (pT3N0) e com mutação no oncogene *KRAS*.....73
- Tabela 5. Conjunto das razões iônicas dos 29 íons correspondentes a N-glicanos detectados no soro de um controle sadio de 67 anos e do sexo feminino.....74
- Tabela 6. Conjunto dos valores das razões dos 53 íons correspondentes a N-glicanos identificados no soro de um paciente com adenocarcinoma de cólon localizado em cólon transversal, estadiamento II (pT3N0) e com mutação no oncogene *KRAS*.....76
- Tabela 7. Conjunto dos valores das razões dos 53 íons correspondentes a N-glicanos identificados no soro de um controle sadio de 67 anos e do sexo feminino.....77
- Tabela 8. Quantificação dos 26 sinais de íon de N-glicanos alterados no soro de pacientes com câncer de cólon em relação ao soro de indivíduos sadios.....78
- Tabela 9. Distribuição dos 12 sinais de íon utilizados para análise quantitativa no tecido pelo método MALDI-TOF-MS.....83
- Tabela 10. Conjunto dos valores da relação das áreas dos 12 íons utilizados para quantificação por MALDI-TOF-MS no tecido tumoral de um paciente com adenocarcinoma de cólon localizado em cólon transversal, estadiamento II (pT3N0) e com mutação no oncogene *KRAS*.....85
- Tabela 11. Conjunto dos valores das áreas CH<sub>3</sub>/CD<sub>3</sub> dos 24 sinais de íon utilizados para análise quantitativa, identificados no tecido tumoral e no tecido normal de um

paciente com adenocarcinoma de cólon localizado em cólon transverso, estadiamento II (pT3N0) e com mutação no oncogene *KRAS*. Método LC-MS/MS.....87

Tabela 12. Relação quantitativa das áreas CH<sub>3</sub>/CD<sub>3</sub> dos 11 sinais de íon consistentemente alterados no tecido dos pacientes com câncer de cólon, LC-MS/MS.....88

Tabela 13. Correlação entre as relações das áreas CH<sub>3</sub>/CD<sub>3</sub> dos 8 sinais de íon identificados alterados no soro e no tecido tumoral dos pacientes com câncer de cólon (n=13).....90

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABNT: Associação Brasileira de Normas Técnicas

ADCC: citotoxicidade celular dependente de anticorpos

AJCC: Comitê Americano para Estadiamento do Câncer Colorretal

Anti-PDL-1: anti-ligante de morte celular programada 1 ("programmed cellular death ligand-1")

*APC*: gene da polipose adenomatosa do cólon "adenomatous poliposis coli"

*ATM*: gene da ataxia teleangectasia mutado

$\beta$ -TGF: fator de crescimento transformante beta

B3GnT8: beta1,3 N-acetilglicosaminiltransferase 8

*BRAF/RAS*: gene "rat sarcoma virus" B

C1GalT-1: core 1 galactosiltransferase 1

C3GnT-1: core 3 N-acetilglicosaminiltransferase 1

C6GnT-1: core 6 N-acetilglicosaminiltransferase 1

CCR: Câncer colorretal

CEA: antígeno carcinoembrionário

CENARGEN: Centro Nacional de Recursos Genéticos e Biotecnologia

CIMP: fenótipo metilador de ilhas de CpG

CL: cromatografia líquida

cm: centímetros

CMS: subtipo molecular de câncer colorretal ("Colorectal Molecular Subtype")

CONEP: Comissão Nacional de Ética e Pesquisa

CTI: contagem total de íons

CpG: citosina ligada pelo fosfato à guanina

Da: Daltons

DHB: ácido 2,3- dihidroxibenzoico

DMSO: dimetilsulfóxido

DNA: ácido desoxirribonucleico

DTT: ditioneitol

dp: desvio-padrão

EGFR: receptor do fator de crescimento epidérmico

ELISA: ensaio de imunoabsorção enzimática

EM: espectrometria de massas

EMBRAPA: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

EMT: transição epitelial mesenquimal

EPCAM: Molécula de Adesão de Célula Epitelial

ESI-RPLC/MS: ionização por eletrospray-cromatografia líquida em fase reversa acoplada à espectrometria de massas ("electrospray ionization-liquid chromatography coupled to mass spectrometry")

Fuc: fucose

GnT-III: N-acetilglicosaminiltransferase III

GnT-V: N-acetilglicosaminiltransferase V

°C: grau Celsius

Hex: hexose (manose, glicose ou galactose)

HexNac: N-acetil hexose (N-acetilglicosamina ou N-acetilgalactosamina)

HNPCC: câncer colorretal hereditário não polipóide

HUB: Hospital Universitário de Brasília

IAA: iodoacetoamida

IBGE: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

IC: instabilidade cromossômica

ICD3: iodometano perdeuterado

ICH3: iodometano

IgG: imunoglobulina G

IgM: imunoglobulina M

INCA: Instituto Nacional do Câncer

IQ: Instituto de Química

kDa: kiloDalton

*KRAS*: oncogene Kirsten sarcoma viral em ratos ("Kirsten rat sarcoma viral")

LC-PGC: cromatografia líquida em colunas de carbono grafite poroso

LITMO: Laboratório de Isolamento e Transformação de Moléculas Orgânicas

M:molar

mM: milimolar

MALDI-TOF: ionização por dessorção a laser assistida por matriz, tempo de voo ("time-of-flight"), espectrometria de massas

MGAT 1: manosil (alfa-1,3)-glicoproteína beta-1,2-N-acetilglicosaminil-transferase 1

MGAT 3: manosil (alfa-1,4)-glicoproteína beta-1,4-N-acetilglicosaminiltransferase 3

MGAT 5: manosil (alfa-1,6)-glicoproteína beta-1,6-N-acetilglicosaminiltransferase 5

$\mu\text{g}$ : microgramas  
 $\mu\text{l}$ : microlitros  
mg: miligramas  
ml: mililitros  
*m/z*: relação massa/carga  
MLH1: MutL Homólogo 1  
MSH2: MutS Homólogo 2  
MSH6: MutS Homólogo 6  
MSI-H: alta instabilidade microsatélite  
MSS: estabilidade de microsatélites  
MSK1/STK4: proteína quinase STE 20 de mamíferos/Serina-treonina quinase 4  
MUC-1: mucina-1  
N<sub>2</sub>: nitrogênio  
NAcGal: N-acetil galactosamina  
NAcGlic: N-acetil glicosamina  
NeuAc: ácido neuramínico ou ácido siálico  
Nras: oncogene Neuroblastoma viral em ratos ("Neuroblastoma rat sarcoma viral")  
OST: oligossacariltransferase  
PCR: reação em cadeia da polimerase ("polymerase chain reaction")  
PMS2: Segregação Pós-Meiose 2  
PNGase-F: peptídeo N-glicosidase F  
*POLD*: gene da polimerase delta  
*POLE*: gene da polimerase épsilon  
ppNAcGalT: polipeptídeo N-acetilgalactosaminiltransferase  
PSA: antígeno prostático específico  
RE: retículo endoplasmático  
RCUI: retocolite ulcerativa idiopática  
RNA: ácido ribonucléico  
rpm: rotações por minuto  
S100A9: S100 proteína ligante de cálcio A9  
SDS: sulfato dodecil de sódio  
sLeA: antígeno Lewis A sializado  
sLeX: antígeno Lewis X sializado  
sT: antígeno Thomsen-Friedenreich sializado

sTn: antígeno Tn sializado

ST3GalNacT: N-acetilgalactosaminilsialiltransferase-3

ST6GalNacT: N-acetilgalactosaminilsialiltransferase-6

TCLE: termo de consentimento livre e esclarecido

TGFR-beta: receptor do fator de crescimento transformante beta

TIMP1: inibidor de metaloproteinase 1

TNF: fator de necrose tumoral

TNM: Tumor Node Metastasis

TNT: Terapia Neoadjuvante Total ("Total Neoadjuvant Therapy")

UDP-NAcGal: uridina difosfato N-acetilgalactosamina

UDP-NAcGlic: uridina difosfato N-acetilglicosamina

VEGFR: receptor do fator de crescimento do endotélio vascular

VUS: variantes de significado incerto ("variants of unknown significance")

## SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO</b> .....	22
<b>1. OBJETIVO</b>	
1.1 OBJETIVOS SECUNDÁRIOS.....	37
<b>2. MÉTODO</b>	
2.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS	
2.2 CASUÍSTICA	
<b>2.2.1 Pacientes com câncer de cólon-Casos</b>	
2.2.1.1 Critérios de inclusão.....	38
2.2.1.2 Critérios de não inclusão.....	39
<b>2.2.2 Indivíduos sadios-Controles</b>	
2.2.2.1 Critérios de inclusão	
2.2.2.2 Critérios de não inclusão.....	40
2.3 PROCEDIMENTOS	
<b>2.3.1 Coleta das amostras</b>	
2.3.1.1 Tecido.....	41
2.3.1.2 Soro-pacientes com tumor de cólon	
2.3.1.3 Soro-indivíduos sadios.....	43
<b>2.3.2 Preparo das amostras</b>	
2.3.2.1 Tecido colônico normal e tumoral	
2.3.2.2 Soro-pacientes e controles	
2.3.2.3 Soro-conjunto do grupo de controles.....	44
<b>2.3.3 Extração, purificação e derivatização dos N-glicanos</b> .....	45
<b>2.3.4 Derivatização diferenciada dos N-glicanos do tecido tumoral e do tecido normal</b> .....	47
<b>2.3.5 Derivatização diferenciada dos N-glicanos do soro de pacientes com tumor e de indivíduos sadios e do "pool" de controles</b> .....	48
<b>2.3.6 Preparo, aquisição e quantificação dos N-glicanos derivatizados</b>	
2.3.6.1 Espectrômetro de massa MALDI-TOF - Tecido	
2.3.6.2 Espectrômetro de massa MALDI-TOF – Soro.....	49
2.3.6.3 Detecção e quantificação dos N-glicanos MALDI-TOF-MS.....	52
2.3.6.4 Cromatografia líquida acoplada ao espectrômetro de massa (LC-MS).....	53
2.3.6.5 Detecção, identificação e quantificação dos N-glicanos ESI-LC-MS/MS.....	55
2.3.6.6 Simbologia e representação gráfica das composições de N-glicanos.....	57
<b>3. ANÁLISE ESTATÍSTICA</b>	
3.1 ANÁLISE DAS AMOSTRAS DE SORO.....	60
3.2 ANÁLISE DA ACURÁCIA DO N-GLICOMA DO SORO EM DISCRIMINAR PACIENTES COM TUMOR DE INDIVÍDUOS SADIOS .....	61
3.3 ANÁLISE DAS AMOSTRAS DE TECIDO.....	62
<b>4. RESULTADOS</b>	
4.1 CARACTERÍSTICA DOS PARTICIPANTES.....	63
4.2 AVALIAÇÃO DA DISTRIBUIÇÃO DOS N-GLICANOS IDENTIFICADOS NO SORO DE PACIENTES COM CÂNCER DE CÓLON E INDIVÍDUOS SADIOS	
<b>4.2.1 Análise MALDI-TOF-MS</b> .....	66
<b>4.2.2 Análise LC-MS</b> .....	67
<b>4.2.3 Análise LC-MS/MS</b> .....	70
4.3 AVALIAÇÃO QUANTITATIVA DOS N-GLICANOS IDENTIFICADOS NO SORO DE PACIENTES COM CÂNCER DE CÓLON E INDIVÍDUOS SADIOS	
<b>4.3.1 Análise MALDI-TOF-MS</b> .....	71

<b>4.3.2 Análise LC-MS/MS</b> .....	75
4.4 ANÁLISE HIERÁRQUICA NÃO SUPERVISIONADA DOS PERFIS DE N-GLICOSILAÇÃO NO SORO DE PACIENTES COM CÂNCER DE CÓLON E INDIVÍDUOS SADIOS.....	80
4.5 AVALIAÇÃO DA DISTRIBUIÇÃO DOS N-GLICANOS IDENTIFICADOS NO TECIDO TUMORAL E NORMAL DOS PACIENTES COM CÂNCER DE CÓLON	
<b>4.5.1 Análise MALDI-TOF-MS</b> .....	82
<b>4.5.2 Análise LC-MS/MS</b> .....	84
4.6 AVALIAÇÃO QUANTITATIVA DOS N-GLICANOS IDENTIFICADOS NO TECIDO TUMORAL E NORMAL DOS PACIENTES COM CÂNCER DE CÓLON	
<b>4.6.1 Análise MALDI-TOF-MS</b> .....	85
<b>4.6.2 Análise LC-MS/MS</b> .....	86
4.7 CORRELAÇÃO ENTRE O PERFIL DE N-GLICOSILAÇÃO NO SORO E NO TECIDO DOS PACIENTES COM CÂNCER DE CÓLON.....	89
<b>5. DISCUSSÃO</b> .....	91
<b>6. CONCLUSÃO</b> .....	129
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	130
<b>APÊNDICES</b> .....	154
<b>ANEXOS</b> .....	205

## INTRODUÇÃO

O câncer colorretal (CCR) é o terceiro câncer mais frequente em novos casos diagnosticados e a segunda causa mundial de mortalidade, com cerca de 940.000 mortes decorrentes de tumores em 2020 (SUNG ET AL, 2021).

O CCR apresenta ampla variação em incidência e mortalidade em diferentes países. Como exemplo, as estimativas anuais dos Estados Unidos têm demonstrado uma redução tanto na incidência quanto na mortalidade relacionada diretamente ao câncer.

No Brasil, ao contrário, um crescente aumento no número de casos e na mortalidade relacionada a esse tumor têm sido observados nos últimos anos (Instituto Nacional do Câncer-INCA, 2020; KEUM & GIOVANNUCCI, 2019; SIEGEL ET AL, 2021).

O Instituto Nacional do Câncer (INCA) estima que cerca de 41 mil casos novos serão diagnosticados a cada ano para o triênio 2020-2022, e que cerca de metade desses pacientes irão morrer em decorrência direta da doença (Instituto Nacional do Câncer-INCA, 2020).

Cerca de 25% dos pacientes são diagnosticados em estádios avançados, isto é, com a presença de metástases à distância, e mais 15-20% dos casos sem metástases no momento do diagnóstico desenvolverão doença metastática, cuja sobrevida em cinco anos não é superior a 10 % (SCHMOLL ET AL, 2012; SIEGEL ET AL, 2020).

O tratamento e o prognóstico do câncer colorretal são baseados no estadiamento clínico, por exames de imagem e no estadiamento patológico, com o objetivo de determinar a extensão local do tumor, a presença de linfonodos acometidos pela doença e de metástases à distância, definidos pela sigla TNM derivada do inglês, "Tumor, Nodes and Metastases" (EDGE ET AL, 2010). A utilização dessa classificação permite definir o tratamento apropriado e estimar o prognóstico em cada paciente, cujo objetivo último é a cura da doença.

Entretanto, apenas o estadiamento TNM tem se revelado insuficiente nesse propósito. Não raro, pacientes em um mesmo estadiamento e, portanto, submetidos à igual tratamento, têm evolução e sobrevida diferentes (SALEM ET AL, 2020).

Nos últimos anos, o uso de técnicas operatórias minimamente invasivas para o tratamento do câncer do cólon tem obtido uma melhor recuperação pós-operatória sem prejuízo dos resultados oncológicos, entretanto sem comprovado benefício na sobrevida (BERTELSEN ET AL, 2019; BUUNEM ET AL, 2009; HOHENBERGER ET AL, 2009).

Nos tumores do reto, o emprego de novos esquemas associados à neoadjuvância como a terapia total neoadjuvante (do inglês, “Total Neoadjuvant Therapy, TNT”) têm permitido um aumento na resposta patológica completa dos tumores, ou seja, a ausência de tecido tumoral na peça cirúrgica e ainda resultados iniciais promissores no impacto na sobrevida global (HOSPERS ET AL, 2021; CONROY ET AL, 2020; SAUER ET AL, 2004; SEBAG-MONTEFIORE ET AL, 2009)

De modo similar, o advento de novos quimioterápicos, como p. ex. os anticorpos anti-receptores dos fatores de crescimento derivados do epitélio (do inglês, EGFR) e antiligante de morte celular programada 1 (do inglês, PDL-1) tem resultado em melhora na sobrevida global, na doença metastática (BRAY ET AL, 2018; LE ET AL, 2015; SALEM ET AL, 2020).

Entretanto, todos esses recentes avanços na terapêutica ainda não reduziram significativamente a mortalidade global do CCR não metastático, que ainda se mantém em torno de 50% (Instituto Nacional do Câncer-INCA, 2020; KEUM & GIOVANNUCCI, 2019).

Assim, o estudo da carcinogênese envolvida no surgimento e na evolução dos tumores colorretais tem sido o principal objeto de pesquisa nos últimos anos, com o interesse em permitir a descoberta de marcadores biológicos relevantes no diagnóstico precoce, na resposta terapêutica e no prognóstico, com possível impacto na redução na incidência e melhora na sobrevida dos pacientes (SANZ-PAMPLONA ET AL, 2012).

Até o momento, três vias da carcinogênese no CCR são conhecidas (FEARON & VOLGESTEIN, 1990; TOYOTA ET AL, 1999; UMAR ET AL, 2004).

Há 30 anos, FEARON E VOLGESTEIN (1990) descreveram pela primeira vez a sequência de mutações genéticas responsáveis pelo surgimento do câncer colorretal, iniciada pela mutação do gene *APC* e caracterizada por aneuploidia, translocação, inserções e deleções em oncogenes e em genes supressores de tumor.

Essa via é conhecida como sequência adenoma-carcinoma ou, mais modernamente, padrão hipomutado ou de instabilidade cromossômica (IC), presente em cerca de 80-84% dos tumores colorretais (FEARON & VOLGESTEIN, 1990).

Por sua vez, LYNCH ET AL (1966) estudaram famílias com alta incidência de tumores colorretais e extra-colônicos, de surgimento precoce e que acometiam mais de uma geração de doentes. Critérios clínicos foram criados para definir as famílias como pertencentes à essa forma especial de câncer colorretal familiar, conhecida inicialmente como câncer colorretal hereditário não polipóide (HNPCC) (LYNCH ET AL, 1966; UMAR ET AL, 2004).

Com o conhecimento das mutações genéticas herdadas e envolvidas na sua origem, atualmente denomina-se como Síndrome de Lynch, apenas os casos decorrentes de mutações germinativas dos genes de reparo do DNA, a saber: *MLH1*, *MSH2*, *PMS2*, *MSH6* e do gene *EPCAM* que, quando mutado, leva ao silenciamento de *MSH2*.

Essas mutações germinativas e igualmente as mutações somáticas desses genes, como na hipermetilação do gene promotor da expressão da proteína de reparo do DNA *MLH1*, são responsáveis pela segunda via conhecida da carcinogênese colorretal chamada de instabilidade microssatélite ou padrão hipermutado, presente em cerca de 13-16% dos tumores colorretais (VASEN ET AL, 2013).

Em geral, os tecidos tumorais apresentam hipometilação do DNA. Entretanto, em áreas específicas como p. ex. as sequências de ilhas de citosina ligada pelo fosfato à guanina (CpG), observa-se, ao contrário, um padrão de hipermetilação. Esse fenômeno, caso esteja presente na parte promotora de genes supressores de tumor, acarreta a interrupção da transcrição gênica e por consequência, o seu silenciamento. (TOYOTA ET AL, 1999).

No câncer colorretal, um dos locais mais comuns de hipermetilação ocorre na região promotora do gene *MLH1*, frequentemente associado às mutações no gene *BRAF* da família das tirosina-quinases RAS/RAF.

Os tumores decorrentes desse padrão de hipermetilação são encontrados mais frequentemente em pacientes idosos e do sexo feminino com predileção para surgimento no cólon direito e têm como lesão precursora os adenomas ditos serrilhados, de evolução acelerada para o adenocarcinoma e associados com pior prognóstico. Modernamente, esse padrão de hipermetilação é considerado a terceira via da carcinogênese, denominado CIMP, do inglês, “CpG Island Methylator Phenotype” (BETTINGTON ET AL, 2013).

Baseado no conhecimento atual da carcinogênese, em padrões histológicos e moleculares, recentemente foi proposta uma classificação molecular do câncer colorretal na tentativa de subdividir os tumores de acordo com a via predominantemente envolvida (DIENSTMANN ET AL, 2017; GUINNEY ET AL, 2015).

Essa classificação divide os tumores em 4 grupos distintos, a saber: CMS 1, do inglês “Colorectal Molecular Subtype” 1, ou subtipo imune (14% dos tumores colorretais) que apresenta instabilidade microssatélite e significativa reação imunológica no tecido tumoral associada à mutação do gene *BRAF*; CMS 2 ou subtipo canônico (37% dos tumores colorretais) que é o padrão clássico da sequência adenoma-carcinoma, com alteração no número de cópias

cromossômicas e ativação da via Wnt de proliferação celular; CMS 3 ou subtipo metabólico (13 % dos tumores colorretais) que também apresenta aumento no número de cópias cromossômicas, mas com aumento na expressão de genes envolvidos no metabolismo celular e CMS 4 ou subtipo mesenquimal (23% dos tumores colorretais) que apresenta importante proliferação estromal no tecido tumoral, com expressão de fator de crescimento transformador beta ( $\beta$ -TGF) e expressão de genes envolvidas na transição epitelial-mesenquimal (EMT) no reparo de tecidos (DIENSTMANN ET AL, 2017).

Apesar de empregada em estudos clínicos recentes, essa classificação não foi, até o momento, validada para aplicação clínica rotineira (ALWERS ET AL, 2019).

Depreende-se portanto, que apesar de todo o conhecimento acumulado até o momento, muitos dos mecanismos moleculares que envolvem o surgimento, a evolução e determinam ainda o prognóstico do câncer colorretal, são grandemente desconhecidos.

Isso pode ser explicado pelo entendimento que durante a degeneração tecidual maligna, muitas etapas estão envolvidas na penetrância dos genes mutados, desde a transcrição do gene até a manifestação fenotípica final. Vários fatores não só genéticos propriamente ditos, mas também epigenéticos e pós-traducionais interagem determinando o fenótipo da mutação patológica (DUNNE ET AL, 2016).

Além disso, o surgimento e o crescimento tumorais se iniciam após mutações em mais de um oncogene ou em mais de um gene supressor de tumor, ditos condutores (“driver genes”), presentes em células-tronco (“stem-cells”), os quais seriam os responsáveis por capacitar as células com vantagens proliferativas em relação ao tecido normal.

Associadas às mutações nos genes condutores, outras mutações em genes ditos permissivos (“passengers genes”) levam em última análise à expansão clonal, através da facilitação na expressão dos genes condutores, apesar de não conferirem vantagem proliferativa *per si* (HANAHAN ET AL, 2011; MEACHAM ET AL, 2013).

Eventos muito precoces que ocorrem com frequência no microambiente tumoral e no estroma, como p. ex. hipóxia, inflamação ou diminuição de nutrientes, exercem pressão seletiva sobre os diversos clones mutados e promove a seleção de linhagens com maior vantagem adaptativa, que por sua vez ocupam progressivamente o tecido original. Por esse modelo, os tumores sólidos apresentariam não apenas uma, mas diversas linhagens celulares com distintos padrões mutacionais (DUNNE ET AL, 2016; MEACHAM ET AL, 2013; RUSSO ET AL, 2017).

Estudos recentes têm procurado explorar não apenas as mutações genéticas no tecido tumoral, mas também as modificações epigenéticas e, igualmente, as alterações nos processos celulares envolvidos na síntese de proteínas, ou seja, na transcrição, tradução e pós-tradução, conhecidos no seu conjunto como transcriptômica e proteômica (IMIELINSKI ET AL, 2012; ZHANG ET AL, 2014).

Em especial, o estudo das modificações das proteínas após sua síntese, ditos pós-traducionais, tem surgido como uma nova fronteira do conhecimento em biologia tumoral. As modificações pós-traducionais são essenciais para a atividade proteica e por conseguinte, para muitos processos celulares, de modo que as alterações nesse processamento normal têm sido descritas em diversas doenças, inclusive no câncer (PINHO & REIS, 2015; VENKITACHALAM ET AL, 2016).

Tais alterações presentes no tecido tumoral e no sangue dos pacientes com câncer, se configuram como um objeto ideal para estudo, uma vez que refletem a etapa final da expressão gênica, isto é, das estruturas proteicas maduras e prontas para exercer suas atividades celulares seja na membrana plasmática, no citossol ou no meio extracelular (ADAMCZYK ET AL, 2012; KYSELOVA ET AL, 2008; REIS ET AL, 2010; RUHAAK ET AL, 2013; ZHAO ET AL, 2012).

A modificação pós-traducional mais comum das proteínas é a glicosilação, isto é, a adição de um ou mais monossacarídeos às proteínas e peptídeos (HOLST ET AL, 2015; MOREMEM ET AL, 2012).

Esse evento é altamente conservado em vertebrados, e acredita-se que mais de 60 % de todas as proteínas presentes nos organismos vivos são glicosiladas (MOREMEN ET AL, 2012; VASCONCELOS-DOS-SANTOS ET AL, 2015).

Esse fenômeno está envolvido na regulação de várias funções celulares, como p. ex. interação célula-célula, interação célula-meio extracelular, motilidade, migração, diferenciação, reconhecimento "self/non-self" e resposta imunológica, todos esses eventos necessários para o surgimento do câncer (DE FREITAS JUNIOR & MORGADO-DIAZ ET AL, 2016; HANAHAN ET AL, 2011; PINHO ET AL, 2013; PINHO & REIS, 2015; THIERY ET AL, 2006).

A glicosilação proteica é um processo complexo, mediado pela ação coordenada e sequencial de glicosidases e glicosiltransferases, que atuam simultaneamente à síntese proteica no retículo endoplasmático (RE) e no complexo de Golgi. Esses processos são estritamente regulados por influência genética, embora a glicosilação seja sensível também às modificações

ambientais, como flutuações na quantidade de nutrientes e na oxigenação nos tecidos (HOLST ET AL, 2013; MOREMEN ET AL, 2012; VARKI ET AL, 2017).

Em humanos, os monossacarídeos mais frequentemente utilizados na glicosilação são as hexoses (Hex): manose, glicose e galactose, a deoxi-hexose (Fuc): fucose, as hexosaminas (HexNac): N-acetilglicosamina, N-acetilgalactosamina e o ácido neuramínico (NeuAc), também chamado ácido siálico.

A forma de glicosilação mais comum e melhor compreendida é a N-glicosilação. Esse fenômeno é assim chamado devido ao tipo de ligação covalente do açúcar à proteína, que é feita com o nitrogênio (N) do resíduo amida da cadeia lateral do aminoácido asparagina (Asn) (MOREMEN ET AL, 2012; VARKI ET AL, 2017).

A N-glicosilação se inicia com a síntese de um precursor oligossacarídico ligado a um resíduo dolicol que é transferido em bloco pela enzima oligossacariltransferase (OST) para a asparagina da proteína recém-sintetizada, na sequência asparagina-X-serina/treonina (Asn-X-Ser/Thr), onde X é qualquer aminoácido que não a prolina (SCHACHTER ET AL, 2000; SPIRO ET AL, 2002). Figura 1.

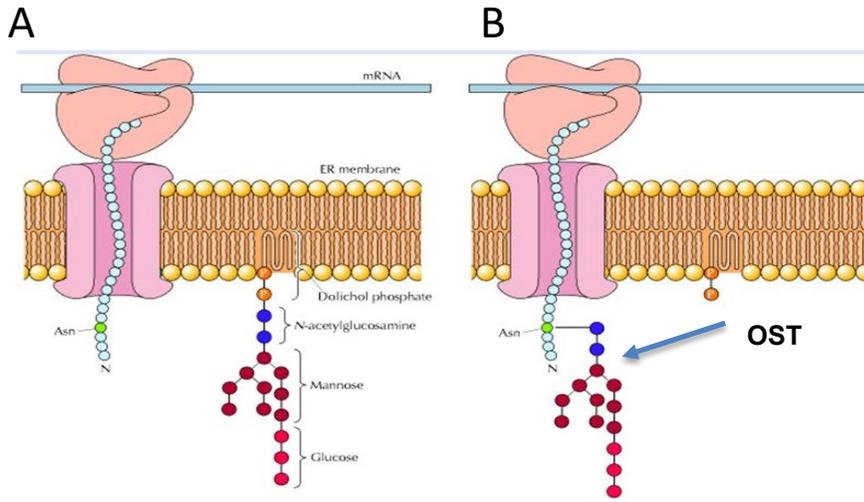


Figura 1. Representação da síntese e transferência do precursor oligossacarídico dos N-glicanos. A- Síntese na membrana do retículo endoplasmático (RE) do precursor formado por 2 N-acetilhexoses, 9 manoses e 3 glicoses B- Ação da enzima oligossacariltransferase (OST) que transfere em bloco o precursor para a amida do aminoácido asparagina, na proteína recém-sintetizada. Fonte: <http://www.bio.miami.edu>.

As três moléculas de glicose são sequencialmente removidas enquanto se processa a maturação das proteínas. No caso de maturação inadequada, o processo de N-glicosilação se modifica até que a proteína adquira sua estrutura terciária definitiva ou, na persistência de maturação incompleta, sejam degradadas nos lisossomos.

As proteínas adequadamente formadas nessa etapa inicial são transportadas para o Complexo de Golgi onde o processo de N-glicosilação continua até a completa maturação proteica e transporte para sua função biológica definitiva (MOREMEN ET AL, 2012; XIE ET AL, 2009). Portanto, esse fenômeno capacita e determina à proteína nascente sua forma e onde exercer sua ação adequada, seja em localização intracelular, extracelular ou como receptor na membrana plasmática. Figura 2.

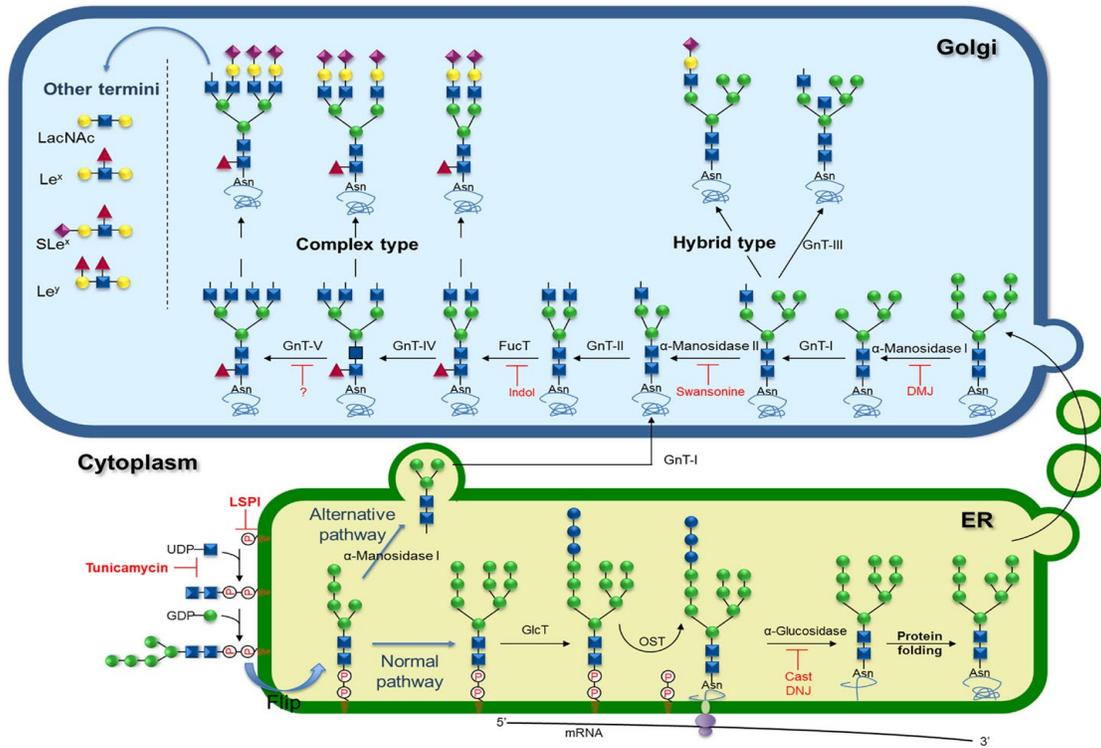


Figura 2. Representação esquemática do processo de síntese intracelular de N-glicanos e glicosilação de proteínas. Abaixo: síntese dos N-glicanos, transferência e maturação protéica no retículo endoplasmático (RE). Acima: transferência da estrutura madura para posterior ação sequencial de manosidases, N-acetiltransferases (GNTs I-V) e fucosiltransferases (FucT) na formação de estruturas híbridas e complexas, no complexo de Golgi. Fonte: Front. Oncol., 25 June 2015 | <https://doi.org/10.3389/fonc.2015.00138>

Os N-glicanos possuem uma estrutura central (do inglês, “core”), formada por duas N-acetilglicosaminas (HexNAc) e 3 manoses, a partir da qual ocorre o enlogamento do núcleo comum, pela adição e remoção de monossacarídeos, formando as estruturas maduras, divididas em três grupos distintos, a saber: 1- ricos em manose: com predomínio de manoses, sintetizado ainda no RE; 2- complexos: formados pela adição de N-acetilglicosamina, fucose (Fuc), galactose (Hex), N-acetilgalactosamina (HexNAc) e ácido N-acetilneuramínico (NeuAc), criando complexos bi, tri e multi-antena e 3- híbridos: com padrões combinados dos dois primeiros grupos. Esses dois últimos grupos são sintetizados no complexo de Golgi (MOREMEN ET AL, 2012). Figura 3.

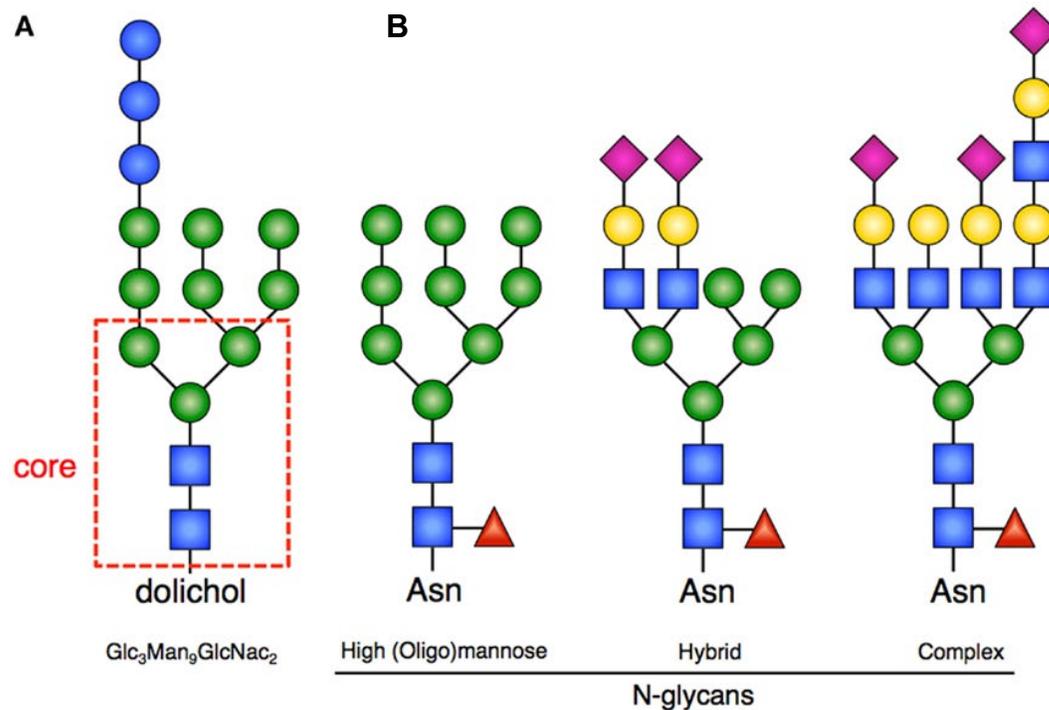


Figura 3. A- Estrutura central (core) dos N-glicanos em destaque, com 9 moléculas de manose e decorada com 3 moléculas de glicose antes do processamento no RE. B- À direita, representação das classes de glicanos: ricas em manose, híbridas e complexas que são formadas no complexo de Golgi. Fonte: Front. Pediatr., 11 June 2015 | <https://doi.org/10.3389/fped.2015.00054>

É frequente a disrupção da glicosilação protéica em tumores, na qual a expressão ou inibição das glicosidases e glicosiltransferases, a modificação na localização intracelular dessas enzimas e alterações na disponibilidade de nucleotídeos doadores de açúcares atuam em conjunto na subversão da N-glicosilação (CHANDRASEKARAM ET AL, 2006; KUDO ET AL, 1998; PARK & LEE, 2013).

Especula-se que a modificação do metabolismo celular da glicose, frequentemente presente em tumores, que privilegia a glicólise aeróbia ao invés da fosforilação oxidativa, conhecido como “efeito Warburg”, teria como uma de suas funções servir como fonte contínua de glicose para a construção de glicoconjugados específicos, durante os processos de glicosilação proteica (WARBURG, 1956).

Os efeitos biológicos decorrentes da glicosilação anômala das proteínas nos tumores não são completamente entendidos e há dúvidas se essas alterações são causa ou consequência do processo de transformação tumoral. Entretanto, a modificação da N-glicosilação é atualmente

reconhecida como um dos fenótipos marcantes e necessários para o surgimento e evolução do câncer (HANAHAM & WEINBERG, 2011; HOLST ET AL, 2015; VENKITACHALAM ET AL, 2016).

São conhecidas ao menos três modificações na função das proteínas com reflexos diretos na carcinogênese, quais sejam: a perda ou ganho na atividade da proteína, alterando sua atividade como enzima ou como fator de transcrição (HANAHAM & WEINBERG, 2011; MUINELO-ROMAY ET AL, 2008); a estabilização e ativação sustentada dos receptores de membrana, muitos deles reguladores dos processos de proliferação e diferenciação celulares como p. ex. EGFR e E-caderina (HUNG ET AL, 2014; PATSOS ET AL, 2009; SWINDALL & BELLIS, 2011) e o aumento da ligação desses glicoconjugados com proteínas (lectinas) do meio extracelular ou do endotélio vascular que reconhecem e se ligam à galactoses (galectinas) ou que reconhecem e se ligam aos ácidos siálicos (siglectinas) (MAZUREK ET AL, 2012; TANIDA ET AL, 2013; ZHUO ET AL, 2008).

Todas essas modificações proteicas estão de modo direto ou indireto envolvidas nos processos de proliferação celular contínua, perda da coesão tecidual, adesão ao meio extracelular e migração, que podem explicar em grande parte, o mecanismo do surgimento dos tumores, da sua capacidade de metastatização, de evasão do sistema imunológico e da resistência à terapêutica.

No processo de metastatização p. ex., a célula deve ser capaz de se destacar do epitélio, adquirir motilidade, migrar através do meio extracelular, aderir ao endotélio vascular e finalmente se implantar em um novo tecido, iniciando o processo de neovascularização e multiplicação celulares. Em todas essas etapas, várias alterações na N-glicosilação das proteínas têm sido descritas (GU ET AL, 2008; GUO ET AL, 2003; NI ET AL, 2014; PARK ET AL, 2020).

GU ET AL (2008) observaram que atividade da enzima GnT-V, envolvida na síntese de N-glicanos multi-antena, está aumentada em linhagens celulares e em tecidos tumorais metastáticos de pacientes com câncer colorretal. A atividade dessa enzima confere menor estabilidade nas ligações célula-célula mediada pela proteína transmembrana E-caderina. A glicosilação predominante com N-glicanos ramificados impede a ligação adequada entre essas moléculas de adesão e potencializa a capacidade de migração e por consequência de metastatização.

Ao contrário, a atividade da enzima N-acetilglicosaminiltransferase III (GnT-III) que induz a produção de N-glicanos bissectados permite a estabilização da E-caderina e consequentemente das ligações intercelulares, limitando o potencial de transição para o meio extracelular e de metastatização (GU ET AL, 2008; GUO ET AL, 2003).

O sistema imunológico humano é capaz de reconhecer e destruir células neoplásicas que expressam diferentes antígenos de superfície. Muitos epítomos de superfície celulares são proteínas glicosiladas que são reconhecidas pelos linfócitos T durante o processo de apresentação de antígenos e indução da resposta imunológica, de modo que alterações na glicosilação permitiriam que as células tumorais escapassem à essa vigilância na resposta celular (HASLAM ET AL, 2008; RUDD ET AL, 2001).

As células tumorais no câncer colorretal apresentam no glicocálix grandes quantidades das glicoproteínas mucina-1 (MUC-1) e de antígeno carcinoembrionário (CEA). Estudos têm mostrado que essas proteínas glicosiladas de modo anormal são reconhecidas pelas células dendríticas que, ao invés de recrutarem uma resposta de ação citotóxica, o que é habitualmente propriedade dos linfócitos T-helper tipo-1, desencadeiam uma resposta tipo-2, isto é, que envolve a participação de células T-helper tipo-2 não relacionadas com citotoxicidade, promovendo desse modo um microambiente tumoral imunotolerante (SAELAND ET AL, 2012).

Diferentemente do DNA e das proteínas, cuja síntese envolve um modelo prévio que será replicado ou transcrito, os N-glicanos são sintetizados pela adição sequencial e progressiva de resíduos de monossacarídeos, pela ação competitiva de glicosiltransferases. Acredita-se que existam cerca de 900 enzimas codificadas pelo genoma humano envolvidas nos processos de glicosilação, responsáveis pela criação de cerca de 7000 estruturas possíveis (CUMMINGS, 2009; MOREMEN ET AL, 2012).

Dessa forma, a detecção qualitativa e quantitativa dessas moléculas é extremamente difícil e laboriosa, o que requer métodos de análise precisos e que sejam capazes de caracterizar e quantificar simultaneamente, um número muito grande de composições.

Várias tecnologias microanalíticas podem ser utilizadas na caracterização dessas estruturas, como quantificação por afinidade de lectinas, eletroforese capilar, cromatografia líquida (CL) ou espectrometria de massas (EM) (HOLST ET AL, 2015; MECHREF ET AL, 2013).

Na última década, o desenvolvimento crescente de técnicas de ionização de biomoléculas e da sensibilidade dos analisadores e detectores dessas estruturas permitiu que a espectrometria de massas (EM) tenha se tornado um dos métodos mais utilizados na análise e quantificação simultâneas de várias composições, dita de alto-rendimento, por sua sensibilidade, acurácia e excelente reprodutibilidade. Por essa razão, sua aplicação em estudos clínicos envolvendo a glicosilação de proteínas tem crescido exponencialmente na última década (BALOG ET AL, 2012; DOTZ & WHURER, 2019; HARVEY, 2018; HOLM ET AL, 2020; MECHREF ET AL, 2013; RUHAAK ET AL, 2013; SETHI ET AL, 2016; WHURER ET AL, 2013).

Resumidamente, essa técnica utiliza como princípio a ionização das moléculas que, uma vez carregadas, são submetidas a um campo eletromagnético, sofrendo diferentes graus de deflexão relativos à sua massa e carga ( $m/z$ ) enquanto percorrem uma extensão predeterminada de acordo com a conformação do equipamento (HARVEY, 2018; KAILEMIA ET AL, 2014; RUHAAK ET AL, 2018). Essa deflexão é então detectada em momentos diferentes determinando assim sua provável estrutura e quantidade, de acordo com a relação massa/carga e intensidade de sinal identificadas pelo detector. Figura 4.

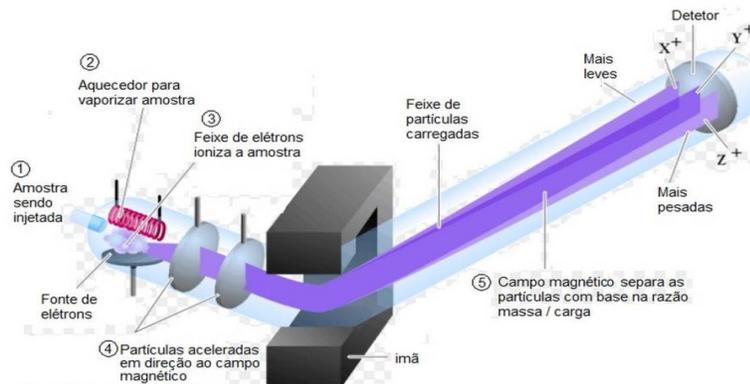


Figura 4. Esquema simplificado do funcionamento de um espectrômetro de massas: fonte de ionização, analisador de massa e detector. Fonte: ebah.com.br.

Com a utilização desse método é possível detectar várias estruturas simultaneamente e, atualmente, equipamentos modernos com diferentes modalidades de ionização e associados a outros métodos micro-analíticos, como p. ex. a cromatografia líquida (CL), possibilitam o aumento na resolução das composições, discriminação de diferentes isômeros, e conseqüentemente, maior capacidade de separação e quantificação das estruturas (HU ET AL, 2013; KAILEMIA ET AL, 2014; VREEKER ET AL, 2017).

O estudo dos glicanos pode ser feito pela análise das estruturas isoladas ou ainda ligadas aos diferentes sítios de glicosilação das glicoproteínas. O método mais utilizado, por sua simplicidade e acurácia, é o da análise das estruturas isoladas, isto é, após a separação dos açúcares da estrutura proteica seja por ação enzimática ou por eliminação redutiva (WADA ET AL, 2007).

É importante salientar que os N-glicanos podem ser analisados e quantificados na sua forma natural ou após modificações, conhecidas como derivatizações, cujo objetivo é estabilizar e facilitar a ionização das composições durante a análise.

Uma vez derivatizados, os N-glicanos são identificados em cada aquisição pelos espectrômetros de massa, de acordo com os valores teóricos de massa exatos, a depender do seu grau de ionização e de acordo com o número de grupos funcionais adicionados à molécula durante o processo de derivatização (CIUCANNU ET AL, 1984; KANG ET AL, 2005).

Portanto, a identificação precisa de cada composição depende da comparação do valor experimental obtido nas aquisições das formas ionizadas e derivatizadas, com os valores teóricos de relação  $m/z$ , catalogados em bancos de dados das estruturas em análise. Essa análise permite a caracterização qualitativa, quantitativa e eventualmente, a descoberta de novas estruturas ainda não descritas (ALDREDGE ET AL, 2012; CERONI ET AL, 2008; GOLDBERG ET AL, 2005; MAXWELL ET AL, 2012; SONG ET AL, 2015).

Nos últimos anos, vários estudos têm utilizado a EM, associada ou não à CL, como ferramenta para comparar o perfil de glicosilação em linhagens celulares, em tecidos normais e tumorais, bem como, na pesquisa de glicanos e glicoconjugados no soro de pacientes com câncer colorretal.

BALOG ET AL (2012) compararam a N-glicosilação de proteínas do tecido tumoral e normal de 13 pacientes, utilizando a espectrometria de massas (ESI-LC-MS e MALDI-TOF/MS). Os autores observaram 245 estruturas de N-glicanos no tecido tumoral, com

aumento das formas ricas em manose, oligomanosídicas com fucosilação central e sulfatadas e diminuição das formas bissectadas no tecido tumoral em relação ao tecido normal.

HOLST ET AL (2015) em revisão abrangente da glicosilação no câncer colorretal observaram modificações características nas composições de N-glicanos como p. ex., aumento de formas beta-1,6 ramificadas, aumento das ramificações de poli-Nacetillactosaminas e de formas truncadas pauci-manosídicas, formas ricas em manose e com fucosilação central, além de diminuição de formas bissectadas em N-glicanos.

Recentemente, ZHANG ET AL (2019) usando tecnologia EM compararam o N-glicoma do tecido normal e de tumores colorretais, onde observaram um aumento de formas ricas em manose e diminuição de formas bissectadas no tecido tumoral.

Igualmente, alguns estudos têm utilizado a CL isoladamente ou a EM na caracterização do N-glicoma do soro de pacientes com CCR comparados com o N-glicoma do soro de indivíduos sadios (DOHERTY ET AL, 2018; DE VROOME ET AL, 2018).

DOHERTY ET AL (2018) avaliaram, através de estudo com CL isolada, o papel prognóstico de grupos de N-glicanos pela comparação das composições presentes no soro de pacientes com CCR e controles normais. Os autores observaram redução em formas bi-antena com fucose no núcleo central do glicano e aumento de formas tri- e tetra-antena sializadas nos pacientes com CCR, cujo perfil estava ausente em pacientes com doença estadio I.

Em estudo semelhante com o uso de tecnologia EM, DE VROOME ET AL (2018) identificaram no soro de pacientes com CCR predomínio de formas multi-antena sializadas e diminuição de formas bi-antena mono-fucosiladas, com valor preditivo prognóstico.

Diante do exposto, o estudo da N-glicosilação nos tecidos de adenocarcinomas colorretais e no soro de pacientes com CCR é uma nova fronteira do conhecimento em biologia tumoral e possível fonte na descoberta de marcadores tumorais, seja para diagnóstico precoce, terapêutica ou prognóstico.

Até o nosso conhecimento, não há estudo que tenha utilizado como método quantitativo a espectrometria de massas na comparação do perfil de N-glicosilação expresso no soro de pacientes com câncer de cólon em relação ao perfil de N-glicosilação do soro de indivíduos sadios, de modo prospectivo e entre o perfil da N-glicosilação dos tecidos de adenocarcinomas de cólon com o tecido colônico não tumoral nos mesmos pacientes com CCR.

Hipotetizamos que o emprego da espectrometria de massas permite revelar de modo mais acurado o perfil dos N-glicanos presentes nas glicoproteínas do soro dos pacientes com tumores

do cólon e dos N-glicanos presentes no tecido tumoral, o que pode indicar o papel de composições específicas de N-glicanos como fonte de marcadores séricos, com capacidade em representar o fenótipo do microambiente tumoral e potencial aplicação clínica.

## **1. OBJETIVO**

Avaliar o papel do perfil qualitativo e quantitativo de N-glicanos presentes nas glicoproteínas do soro como potencial marcador de doença, em diferenciar pacientes com adenocarcinoma esporádico de cólon, microssatélite estáveis (MSS) e estadios II e III, de indivíduos saudáveis.

### **1.1 OBJETIVOS SECUNDÁRIOS**

Avaliar, nos pacientes com adenocarcinoma esporádico de cólon microssatélite estáveis (MSS), o perfil qualitativo e quantitativo de N-glicanos presentes no tecido tumoral e no tecido não tumoral e comparar os perfis de N-glicosilação das glicoproteínas do soro e do tecido tumoral destes pacientes, de modo a identificar no soro, semelhanças e diferenças com a N-glicosilação do microambiente tumoral.

## **2. MÉTODO**

### **2.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS**

O presente estudo foi realizado no Laboratório de Patologia do Hospital Universitário de Brasília (HUB), com a cooperação do Laboratório de Espectrometria de Massa do Departamento de Recursos Genéticos e Biotecnologia (LEM-CENARGEM) da Empresa Brasileira de Pesquisa em Agropecuária (EMBRAPA) e do Laboratório de Isolamento e Transformação de Moléculas Orgânicas (LITMO) do Instituto de Química (IQ) da Universidade de Brasília (UnB).

O projeto de pesquisa foi avaliado e aprovado pelo Comitê de Ética da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília (UnB) sob o número de protocolo UnBDOC 63183716.0.0000.5558/2017. ANEXO A.

Todos os participantes do estudo preencheram um termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) em duas vias. APÊNDICE A.

Para a redação do trabalho, foram utilizadas as normas da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT, NBR 14724:2011 e NBR 6023:2018).

### **2.2 CASUÍSTICA**

#### **2.2.1 Pacientes com câncer de cólon-Casos**

##### **2.2.1.1 Critérios de inclusão**

Foram estudados prospectivamente, 15 voluntários com diagnóstico de adenocarcinoma colônico esporádico não metastático, que concordaram em participar do estudo e que foram operados consecutivamente no período compreendido entre junho de 2017 e abril de 2018, no Hospital Universitário de Brasília e no Hospital Regional de Sobradinho-DF.

História clínica, exame físico completo, colonoscopia, dosagem de CEA e exames de imagem como tomografia de tórax e tomografia de abdome com contraste venoso foram realizados em todos os pacientes, como rotina no estadiamento pré-operatório.

Todos os pacientes tiveram células provenientes da mucosa jugal coletadas por “swab” oral, para extração do DNA e pesquisa de variantes patogênicas germinativas.

Foi utilizado um painel composto por 37 genes, comumente associados a tumores hereditários, através do método da captura de exons Nextera Rapid Capture Mendelics Custom Panel V2, seguida por sequenciamento de nova geração com Alinhamento Illumina HiSeq e identificação de variantes patogênicas utilizando protocolos de bioinformática, tendo como referência a versão GRCh37 do genoma humano. APÊNDICE B.

Todas as amostras dos tumores foram avaliadas pelo método imunohistoquímico para a pesquisa da expressão das proteínas dos genes de reparo do DNA: MLH1, MSH2, MSH6 e PMS2, definida como a coloração nuclear normal das proteínas no tecido tumoral, semelhante à observada no tecido colônico adjacente. As amostras foram ainda analisadas para a pesquisa de mutações somáticas dos genes Kras (locus 12 e 13), Nras (locus 2 e 3) e Braf (substituição valina por ácido glutâmico, V600E) pela técnica de PCR em tempo real. APÊNDICE C.

Todos os tumores ressecados foram avaliados por um patologista independente e estadiados conforme a classificação internacional do Comitê Americano para Estadiamento do Câncer Colorretal, na sua oitava edição (AMIN ET AL, 2018).

#### 2.2.1.2 Critérios de exclusão

- Pacientes com adenocarcinomas de cólon estadio IV.
- Pacientes portadores de adenocarcinomas de reto.
- Pacientes portadores de adenocarcinomas de cólon oriundos de doença inflamatória intestinal.
- Pacientes com diagnóstico fenotípico de polipose adenomatosa familiar clássica (> 100 pólipos) ou com > 20 pólipos adenomatosos cumulativos.

- Pacientes com mutação germinativa patogênica dos genes de reparo do DNA (Síndrome de Lynch): MLH1, MSH2, MSH6, PMS2 ou deleção da extremidade 3' do gene EpCAM.
- Pacientes com diagnóstico de adenocarcinoma de cólon sincrônico ou metacrônico.
- Pacientes cujo tumor demonstrasse a ausência da expressão das enzimas de reparo do DNA.
- Pacientes tabagistas ou com diagnóstico de diabetes tipo I ou tipo II.

## **2.2.2 Indivíduos sadios-Controles**

### 2.2.2.1 Critérios de inclusão

Foram estudados prospectivamente, 15 voluntários assintomáticos, com indicação para realizar colonoscopia com a finalidade de rastreamento do CCR, com idade acima de 50 anos ou por indicação em caso de exame positivo para sangue oculto nas fezes pelo método imunocromatográfico.

Todos os indivíduos com exames classificados como normais ou com diagnóstico de doença diverticular dos cólons foram incluídos nesse estudo. Todos os preparos foram classificados pelo escore de Boston  $> 6$  e todos os indivíduos que possuíam exame de sangue oculto nas fezes positivo tinham endoscopia digestiva alta recente e normal.

### 2.2.2.2 Critérios de exclusão

- Indivíduos tabagistas
- Indivíduos com diagnóstico de diabetes tipo I ou tipo II.
- Indivíduos portadores de doença inflamatória crônica ou doença auto-imune conhecida

## 2.3 PROCEDIMENTOS

### 2.3.1 Coleta das amostras

#### 2.3.1.1 Tecido

Imediatamente após a ressecção do segmento colônico onde estava localizado o tumor primário, foram colhidos 2 fragmentos de 1 cm<sup>2</sup> do tecido colônico normal, localizado a 10 cm da margem macroscópica do tumor e 2 fragmentos do tecido tumoral, assim divididos: 1 fragmento da parte proximal periférica e 1 fragmento da parte distal periférica do tumor, em áreas sem sinais macroscópicos de necrose. Figuras 5, 6, 7 e 8.

Um fragmento de tecido normal foi enviado para análise histológica e os demais fragmentos de tecido normal e de tecido tumoral foram imediatamente congelados a -80°C para análise posterior.



Figura 5. Aspecto macroscópico da peça cirúrgica de um tumor localizado no cólon sigmóide, aberta no sentido longitudinal. Detalhe do tumor primário localizado na sua extremidade distal (seta).



Figura 6- Fragmento de tecido colônico normal de 1 X 1 cm, retirado a 10 cm proximais à lesão.



Figura 7- Fragmento de tecido do tumor de 1 X 1 cm, retirado da porção proximal da lesão.

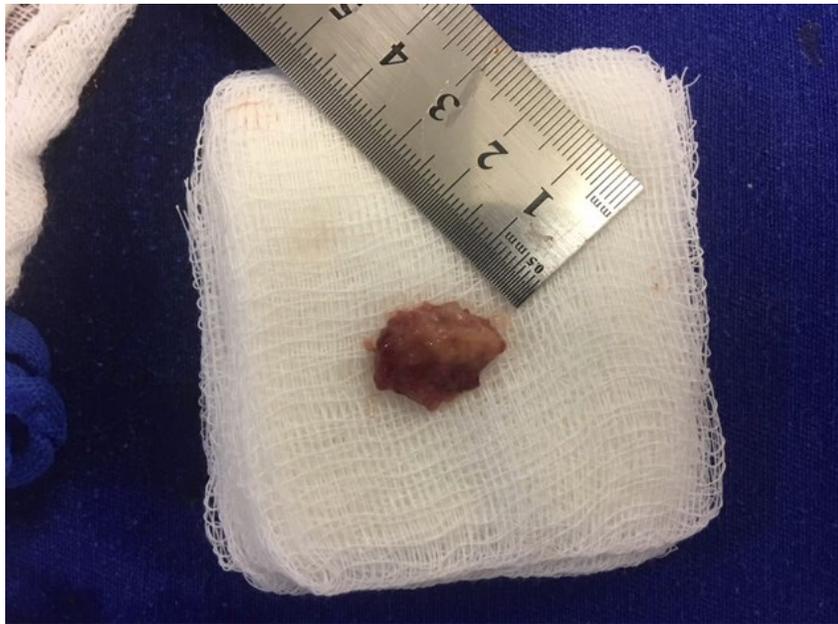


Figura 8- Fragmento de tecido do tumor de 1 X 1 cm, retirado da porção distal da lesão.

#### 2.3.1.2 Soro – Pacientes com tumor de cólon

Foi realizada a coleta de 5 ml de sangue de cada participante, em jejum, na manhã do procedimento cirúrgico.

As amostras foram centrifugadas a 13.400 rpm por 4 minutos para separação do soro, que foi imediatamente congelado a  $-80^{\circ}\text{C}$  para análise posterior.

#### 2.3.1.3 Soro – Indivíduos saudáveis

Foi realizada a coleta de 5 ml de sangue de cada participante, em jejum, imediatamente antes do início da colonoscopia e antes do uso de qualquer medicação utilizada para a sedação.

As amostras foram centrifugadas a 13.400 rpm por 4 minutos para separação do soro, que foi imediatamente congelado a  $-80^{\circ}\text{C}$  para análise posterior.

## 2.3.2 Preparo das amostras

### 2.3.2.1 Tecido colônico normal e tumoral

Os fragmentos de tecido normal e tumoral foram preparados para a extração de proteínas e peptídeos glicosilados, como descrito nas etapas a seguir:

- 1- Pulverização das amostras através de maceração em N<sub>2</sub> líquido a -80°C.
- 2- Homogeneização de 60 mg de tecido pulverizado, pela adição de 500 µl de solução de acetonitrila a 50%.
- 3- Sonicagem em temperatura ambiente por 45 minutos.
- 4- Centrifugação a 13.400 rpm por 45 minutos e extração do sobrenadante.
- 5- Secagem à vácuo da amostra no speedvac.

### 2.3.2.2 Soro – pacientes e controles

As amostras de soro congelado foram deixadas à temperatura ambiente até retorno à fase líquida. Alíquotas de 40 µl de soro foram separadas para análise.

### 2.3.2.3 Soro- Conjunto do grupo de controles

Foi coletado 200 µl do soro de cada indivíduo sadio participante desse estudo, que foram acondicionados juntos, o que deu origem à mistura nomeada como conjunto do grupo de controles ou “pool” de controles, utilizada como controle interno da variação quantitativa dos N-glicanos no soro dos controles, como descrito na seção 2.3.5.

A amostra do “pool” de soro congelado foi deixada à temperatura ambiente até retorno à fase líquida. Alíquotas de 40 µl de soro foram separadas para análise.

### 2.3.3 Extração, concentração e derivatização dos N-glicanos

Para a extração dos oligossacarídeos das proteínas e peptídeos N-glicosilados, foi utilizado o método descrito por MORELLE & MICHALSKI, com algumas modificações (MORELLE & MICHALSKI, 2007).

A lista de reagentes, de soluções e os equipamentos utilizados nesta tese estão detalhados no ANEXO B. As concentrações e dosagens das soluções e descrição dos procedimentos estão detalhados no ANEXO C.

Em resumo, foram adicionados 240  $\mu$ l de solução redutora e alquilante às amostras de tecido tumoral e normal secos e 200  $\mu$ l de solução redutora e alquilante aos 40  $\mu$ l de soro de pacientes, 40  $\mu$ l de soro dos controles e 40  $\mu$ l de soro do “pool” de controles com o objetivo de desfazer as ligações dissulfeto na estrutura tridimensional das proteínas pela ação do ditioneitol 0,5M (DTT) e alquilação por ação da iodoacetoamida 3M (IAA) que impede a reunião dessas ligações e possibilita o acesso da tripsina para a digestão proteica e posterior extração dos glicanos N-ligados.

Posteriormente, procedeu-se à filtragem e separação dos peptídeos menores que 10 kDa das moléculas maiores, as quais foram submetidas à digestão triptica.

Após digestão triptica por 24h a 37 °C, foi adicionada à cada amostra a enzima polipeptídeo N-glicosidase F (PNGase-F) que tem ação específica sobre as ligações glicosídicas dos N-glicanos com os resíduos amida da asparagina (Asn). Figura 9.

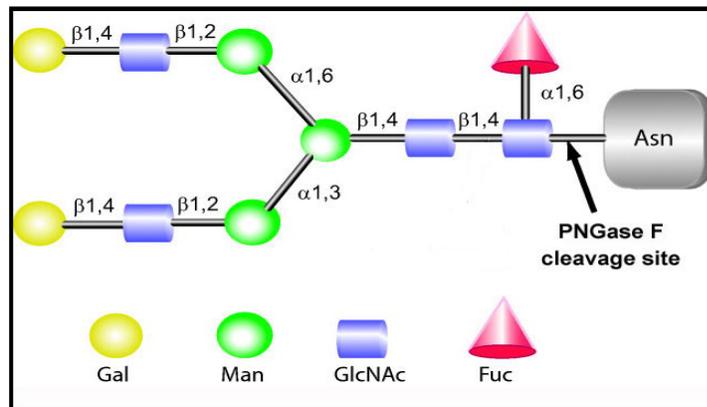


Figura 9. Local de ação da enzima polipeptídeo N-glicosidase F (PNGase F) que cliva a ligação dos N-glicanos com a proteína, no resíduo mais interno de N-acetilglicosamina (seta). Fonte: <https://www.sigmaaldrich.com>.

Dessa forma, as amostras agora constituídas de peptídeos não glicosilados, peptídeos O-glicosilados e N-glicanos livres, foram submetidas ao processo de purificação dos N-glicanos, através da filtração em colunas Sep-Pak C-18, previamente condicionadas com metanol e ácido acético a 5%.

Após secagem, as amostras foram suspensas em ácido acético a 5%, adicionadas às colunas Sep-Pak C-18 e sequencialmente eluídas com ácido acético a 5% e depois com uma solução de ácido acético a 5% e acetonitrila a 80%.

Os N-glicanos são estruturas polares, portanto hidrofílicas, que por essa razão foram coletados primeiro após a passagem pelas colunas condicionadas, ou seja, após eluição com ácido acético a 5%.

Por sua vez, os peptídeos não glicosilados e O-glicosilados são estruturas hidrofóbicas e por essa razão foram coletados depois, ou seja, após eluição com solução de ácido acético a 5% e acetonitrila a 80%.

Os N-glicanos purificados foram então derivatizados, mediante o processo que envolve a substituição do hidrogênio dos grupos hidroxila (-OH) ou amina (-NH) por resíduos metila (-CH<sub>3</sub>), oriundos do iodometano (ICH<sub>3</sub>), em meio básico e em ambiente inerte, criado pela instilação com gás nitrogênio (N<sub>2</sub>). Esse processo é conhecido como permetilação. Figura 10.

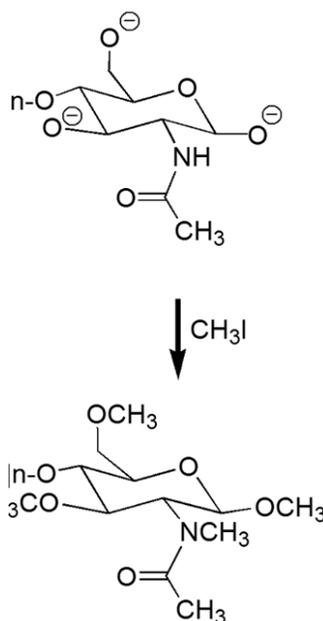


Figura 10. Processo de permetilação de N-glicanos, onde ocorre a substituição dos átomos de hidrogênio das hidroxilas no anel de monossacarídeo, pelo resíduo metil do iodo metano em meio com dimetilsulfóxido (DMSO) e em pH básico. Fonte: Hess, S. & Graham, R.I. 2010

O objetivo da permetilação foi permitir maior estabilidade das composições de N-glicanos, o que possibilitou maior facilidade na separação e na ionização das estruturas antes das aquisições e conseqüente melhor acurácia na identificação dessas moléculas pelo espectrômetro de massa.

#### **2.3.4 Derivatização diferenciada dos N-glicanos do tecido tumoral e do tecido normal**

Com a finalidade em se definir as intensidades relativas e identificar de qual tecido cada estrutura era proveniente, os N-glicanos do tecido tumoral e do tecido normal, foram derivatizados de modo diferente.

Ao contrário dos N-glicanos do tecido tumoral que foram derivatizados com resíduos metila (-CH<sub>3</sub>) doados pelo iodometano (ICH<sub>3</sub>), conforme descrito na seção 2.3.3, os N-glicanos do tecido colônico normal foram derivatizados através da permetilação com o isótopo pesado do iodo metano, o iodo metano perdeuterado (ICD<sub>3</sub>), onde o átomo de hidrogênio possui um próton e um nêutron no seu núcleo, o deutério, com massa de 2 Da.

Essa modificação permitiu que um mesmo N-glicano pudesse ser identificado, e conseqüentemente quantificado, de acordo com o valor da relação  $m/z$  derivatizada.

Assim, uma mesma composição foi identificada em cada aquisição pelo espectrômetro com um valor experimental  $m/z$  correspondente à sua forma metilada, portanto oriundo do tecido tumoral e com um valor experimental  $m/z$  correspondente à sua forma deuterada, portanto oriundo do tecido normal.

Uma vez derivatizados, os N-glicanos dos tecidos colônico normal e tumoral foram novamente purificados por meio de eluição sequencial com água deionizada, solução de acetonitrila a 10% e de acetonitrila a 80%. Ao contrário das estruturas não derivatizadas, os N-glicanos derivatizados se tornam agora estruturas hidrofóbicas, apolares portanto, de modo que foram coletados após eluição nas colunas condicionadas com solução de acetonitrila a 80%, ao final da seqüência de eluentes.

Os N-glicanos derivatizados e purificados foram preparados para análise no espectrômetro de massa, após secagem das amostras no equipamento speedvac.

### 2.3.5 Derivatização diferenciada dos N-glicanos do soro de pacientes com tumor, de indivíduos saudáveis e do “pool” de controles

A variabilidade na glicosilação das proteínas do soro em indivíduos normais é relativamente ampla. Assim, com a finalidade em se determinar um valor de referência para a comparação quantitativa das estruturas analisadas no espectrômetro de massa, foi criado um conjunto formado pela adição de 200 µl de soro de cada indivíduo do grupo controle, conforme descrito na seção 2.3.2.3.

De modo semelhante ao descrito para o tecido tumoral na seção 2.3.4, os N-glicanos oriundos do soro de pacientes com tumor e do soro dos indivíduos saudáveis foram derivatizados com iodometano (ICH<sub>3</sub>).

De modo semelhante ao descrito para o tecido colônico normal na seção 2.3.4, os N-glicanos oriundos do “pool” de controles e utilizados como referência da variação de normalidade, foram derivatizados com iodo metano deuterado (ICD<sub>3</sub>).

Essa modificação permitiu que um mesmo N-glicano pudesse ser identificado, e consequentemente quantificado, de acordo com o valor da sua relação *m/z* derivatizada.

Assim, uma mesma composição foi identificada em cada aquisição com um valor experimental *m/z* correspondente à sua forma metilada, portanto oriundo do soro de um paciente com tumor ou do soro de um indivíduo saudável e com um valor experimental *m/z* correspondente à sua forma deuterada, portanto oriundo do “pool” dos controles saudáveis.

Uma vez derivatizados, os N-glicanos do soro de pacientes com tumor, dos indivíduos saudáveis e do “pool” de controles foram novamente purificados por meio de eluição sequencial com água deionizada, solução de acetonitrila a 10% e de acetonitrila a 80%. Ao contrário das estruturas não derivatizadas, os N-glicanos derivatizados se tornam agora estruturas hidrofóbicas, apolares portanto, de modo que foram coletados após eluição nas colunas condicionadas com solução de acetonitrila a 80%, ao final da sequência de eluentes.

Os N-glicanos derivatizados e purificados foram preparados para análise no espectrômetro de massa, após secagem das amostras no equipamento speedvac.

### 2.3.6 Preparo, aquisição e quantificação dos N-glicanos derivatizados

#### 2.3.6.1 Espectrômetro de massa MALDI-TOF - Tecido

O processo de ionização dessas moléculas foi feito mediante o método de ionização por dessorção a laser assistida por matriz, do inglês, “Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization” (MALDI).

Após eluição com 30 µl de acetonitrila a 100%, os N-glicanos derivatizados presentes no tecido colônico normal e no tecido tumoral de cada paciente foram acondicionados juntos para análise. As amostras foram secas em equipamento speedvac.

Após a ressuspensão das amostras, a matriz de ácido 2,3- dihidroxibenzóico (DHB) e a solução de acetato de sódio 3 % foram adicionadas à cada amostra, na proporção amostra/matriz de 1/3, volume/volume (v/v). Cada 1 µl desse conjunto foi acondicionado nas placas de leitura e submetido à análise no espectrômetro. Figura 11

#### 2.3.6.2 Espectrômetro de massa MALDI-TOF - Soro

Após eluição com 30 µl de acetonitrila a 100%, os N-glicanos derivatizados presentes no soro de cada paciente com tumor e no “pool” de controles foram acondicionados juntos para análise. As amostras foram secas em equipamento speedvac.

De modo similar, após eluição com 30 µl de acetonitrila a 100%, os N-glicanos derivatizados presentes no soro de cada indivíduo sadio e no “pool” de controles foram acondicionados juntos para análise. As amostras foram secas em equipamento speedvac.

Após a ressuspensão das amostras, a matriz de ácido 2,3- dihidroxibenzóico (DHB) e a solução de acetato de sódio 3 % foram adicionadas à cada amostra, na proporção amostra/matriz de 1/3, volume/volume (v/v). Cada 1 µl desse conjunto foi acondicionado nas placas de leitura e submetido à análise no espectrômetro.

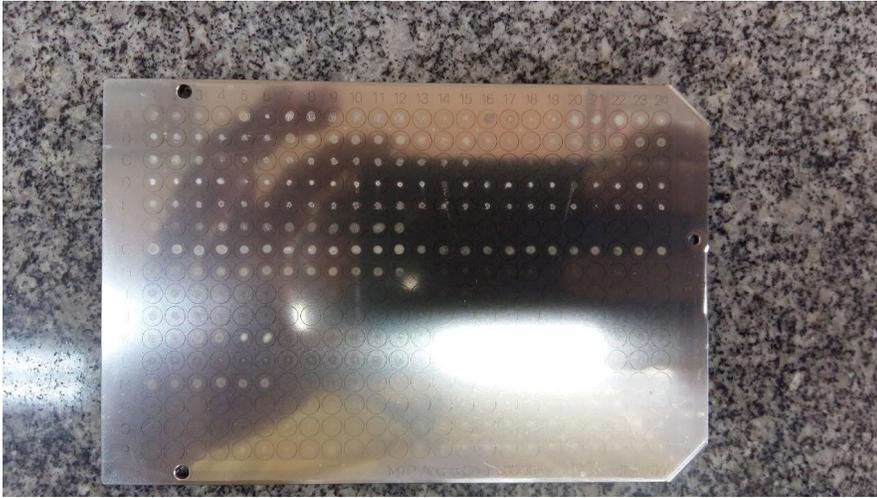


Figura 11. Detalhe da placa utilizada neste estudo, com os respectivos pontos de leitura ("spots"), sob os quais incide o laser nas aquisições. Na primeira fileira, cada ponto de leitura corresponde a 1  $\mu$ l da amostra seca de N-glicanos presentes no soro de um paciente com tumor e do "pool" do soro de controles (A1-A13) e a 1  $\mu$ l da amostra seca de N-glicanos presentes no soro de um indivíduo sadio e no "pool" do soro de controles (A14-A24). Na terceira fileira, cada ponto de leitura corresponde a 1  $\mu$ l da amostra seca de N-glicanos presentes no tumor e no tecido normal de cada paciente com câncer (C1-C15).

Esse processo de ionização adiciona um cátion sódio ( $\text{Na}^+$ ) proveniente da solução de acetato de sódio às estruturas derivatizadas, e a ação do laser sobre as amostras aglutinadas à matriz na superfície da placa de leitura permite a mobilização dessas moléculas ionizadas que, sob a influência do campo magnético gerado no aparelho, irão percorrer a extensão do espectrômetro até seu registro no detector.

As detecções representam a relação  $m/z$  de cada estrutura, e esta é determinada de acordo com a deflexão que a estrutura sofre e o tempo necessário para percorrer essa distância, chamado de tempo de voo, do inglês "time-of-flight" (MALDI-TOF). Figura 12.

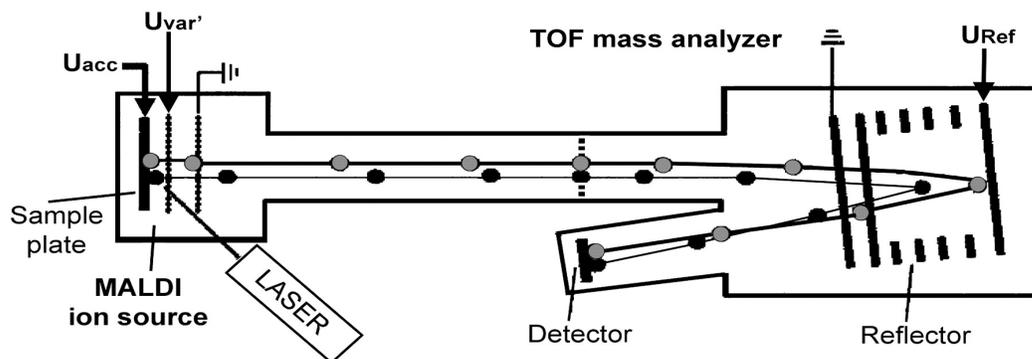


Figura 12. Representação esquemática do funcionamento do modo refletor de leitura, no analisador de massa TOF (time-of-flight) de estruturas ionizadas por matriz a laser (MALDI-TOF). Fonte: NIH / NIGMS Biomedical Mass Spectrometry Resources - Washington.US.

As aquisições foram feitas no modo iônico positivo refletor (RP) e cada aquisição foi obtida no intervalo  $m/z$  de 1.500-5.000.

Antes de cada aquisição o espectrômetro de massa foi calibrado com a solução de calibração padrão II de peptídeos (Bruker Daltonics). Os espectros foram então recalibrados usando os íons com relações  $m/z$  1835,9, 2040,0, 2431,2, 2792,4, 2910,2, 3602,8, 4413,2 e 4597,3 como controles internos.

O equipamento utilizado para análise das estruturas de N-glicanos foi o espectrômetro de massa MALDI-TOF/TOF, modelo Ultraflex III, Modo refletor (Bruker Daltonics, Billerica, NJ). A análise dos espectros e quantificação da área de cada sinal de íon foi realizada pelo software FlexAnalysis 3.4 e assinalamento das estruturas dos glicanos com o auxílio do programa GlycoWorkBench (<https://code.google.com/p/glycoworkbench/>). Os valores gerados foram exportados para posterior análise estatística.



Figura 13. Espectrômetro de massa MALDI-TOF/TOF-MS (time-of-flight) utilizado para as aquisições desta tese. Fonte: Embrapa-Cenargem, Laboratório de Espectrometria de massas.

### 2.3.6.3 Detecção e quantificação dos N-glicanos MALDI-TOF-MS

Cada espectro de aquisição foi analisado e os sinais de íon detectados foram anotados separadamente.

Todos os sinais de íon detectados foram ionizados como adutos de sódio  $[M+Na]^+$ .

Todos os sinais de íon detectados tiveram seu valor experimental  $m/z$  monoisotópica comparados manualmente com um registro de valores teóricos exatos de massa/carga  $m/z$  de composições de N-glicanos permetiladas e deuteradas e ionizadas com um cátion sódio ( $Na^+$ ), originários de bancos de dados, das composições presentes no soro humano e nos tecidos colorretal normal e tumoral, composto por cerca de 250 estruturas conhecidas (ALDREDGE ET AL, 2012; BALOG ET AL, 2012; CERONI ET AL, 2008; SONG ET AL., 2015).

Cada sinal de íon cujo valor experimental  $m/z$  correspondia à massa nominal do valor teórico descrito no banco de estruturas, foi anotado como sendo uma composição de N-glicano e atribuída sua estrutura composicional teórica.

Dessa forma, cada estrutura de N-glicano detectado teve dois valores experimentais de massa/carga exata, um valor menor correspondente à sua estrutura derivatizada com iodometano, portanto oriundo do tecido tumoral, do soro de pacientes com tumor ou do soro de controles, e outro valor maior, correspondente à sua estrutura derivatizada com iodometano deuterado, portanto oriundo do tecido colônico normal ou do “pool” de controles, a depender da amostra em análise.

A intensidade de cada forma metilada detectada foi usada para comparação com a intensidade da forma deuterada correspondente, usada como referência. Figura 14.

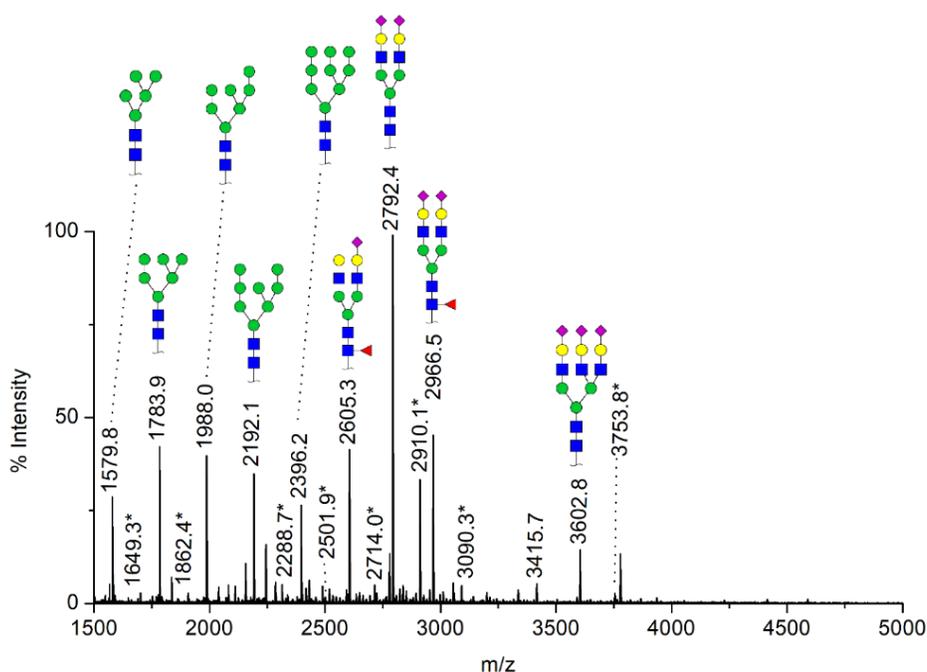


Figura 14. Espectro de intensidades relativas e assinalamento de íons correspondentes a N-glicanos presentes no tecido tumoral e no tecido colônico normal de um paciente com adenocarcinoma de cólon transverso, pT3N0. MALDI-TOF-MS, modo refletor,  $m/z$  1.500-5.000. Estruturas moleculares obtidas mediante análise do valor da relação massa/carga da forma derivatizada e ionizada com um íon sódio. Notar a relação entre a intensidade de sinal dos íons das formas permetiladas e deuteradas, marcadas com asterisco. Como exemplo, o sinal mais intenso do glicano permetilado  $[M+Na]^+=2792,4$  Da em relação ao seu isótopo pesado  $[M+Na]^+=2910,1$  Da.

O software FlexAnalysis 3.4 converteu as intensidades de cada íon em valores equivalentes de área. A área do íon metilado foi chamada de área CH3 e da sua forma deuterada de área CD3. As áreas CH3 e CD3 foram utilizadas para quantificação relativa das estruturas, conforme descrito na seção 3.

#### 2.3.6.4 Cromatografia líquida acoplada ao espectrômetro de massa (LC-MS)

A análise pelo método micro-analítico MALDI-TOF-MS, a despeito de mais simples e rápido na detecção de estruturas em amostras complexas, carece de maior poder na separação, identificação e quantificação de macromoléculas, em especial de glicanos.

Dessa forma, as aquisições MALDI-TOF-MS foram realizadas como um método preliminar para a confirmação do preparo adequado das amostras e como orientação qualitativa na detecção de íons correspondentes a N-glicanos.

Após análise pelo método MALDI-TOF-MS, as amostras foram submetidas à análise por espectrometria de massas LC-MS, com modo de ionização por eletrospray (ESI), acoplada à cromatografia líquida de fase reversa (ESI-RPLC/MS-TRIPLE-TOF).

Esse método dito hifenado, por estar acoplado a um cromatógrafo de alta performance, permite a separação prévia de composições antes da ionização, frequentemente com múltiplas cargas, ou seja, como dois ou mais adutos, menor fragmentação e coalisão iônicas, menor supressão de sinal, de modo a permitir maior acurácia na quantificação e maior separação de isômeros.

As análises foram realizadas em cromatógrafo líquido de fase reversa RPLC Eksigent UltraLC 110-XL (AB Sciex) acoplado a um espectrômetro de massa TripleTof 5600+ (AB Sciex).

Cada amostra foi dissolvida em 40  $\mu$ L de metanol e acrescida de 4  $\mu$ L de acetato de sódio 100 mM. Os solventes utilizados na cromatografia foram água/ácido fórmico 0,1% (v/v) e metanol/ácido fórmico 0,1% (v/v).

As cromatografias foram realizadas a partir da injeção automatizada de 6  $\mu$ L de cada amostra com fluxo de 0,2 mL/min. Após equilibrar a coluna (Kinetex – 50x2,1 mm; 2,6  $\mu$  C18 100 Å) em 5% de metanol/ácido fórmico por cinco minutos, os N-glicanos derivatizados foram cromatografados a partir de um gradiente linear de metanol/ácido fórmico que variou de 30-95% em 10 min.

A seguir, as estruturas foram ionizadas no espectrômetro de massa que operou no modo positivo, com variação de massa/carga 800 a 2.000 e temperatura da fonte igual a 650 °C. Antes do início das aquisições, o espectrômetro foi calibrado utilizando a solução de calibração (AB Sciex) e a cada cinco análises, recalibrado com os íons  $m/z$  702,86381; 838,83862; 974,81343; 1110,78824; 1246,76305; 1382,73786.



Figura 15. Cromatógrafo RPLC Eksigent UltraLC 110-XL (AB Sciex) acoplado a um espectrômetro de massa TripleTof 5600+ (AB Sciex) utilizados para as aquisições desta tese. Fonte: Instituto de Química, Universidade de Brasília (UnB), Laboratório de Análise e Síntese de Moléculas (LITMO).

#### 2.3.6.5 Detecção, identificação e quantificação dos N-glicanos ESI-LC-MS/MS

Os sinais de íons correspondentes a N-glicanos foram extraídos da corrente iônica total (CIT) em cada cromatograma utilizando o software Peakviewer 2.0. Os glicanos nas formas permetilada e perdeuterada foram identificados em cada amostra, através da análise da sua distribuição monoisotópica com uma, duas, três ou quatro cargas de ionização, com tolerância de erro para o valor teórico em Daltons de 5 ppm (cinco partes por milhão). Figura 16.

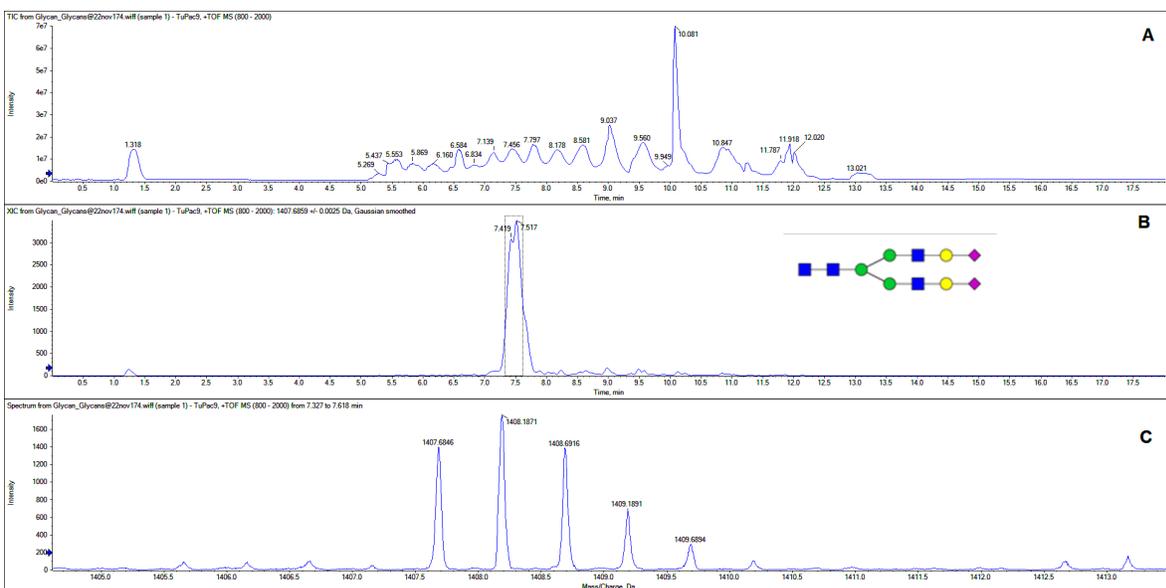


Figura 16. A. Corrente iônica total de uma amostra de tecido tumoral e no tecido colônico normal de um paciente com adenocarcinoma de cólon transverso, pT3N0, adquirida na faixa m/z 800-2.000. B. Cromatograma de íon extraído referente ao m/z 1407,6859. C. Distribuição isotópica confirmando se tratar do íon  $[M+Na]^{2+}=1407,6859$  Da.

Todos os sinais de íon detectados tiveram seu valor experimental de massa/carga (m/z), comparados manualmente com um registro de valores teóricos exatos m/z de composições de N-glicanos permetiladas e deuteradas e ionizadas com um a quatro cátions de sódio ( $Na^+$ ), das composições presentes no soro humano e nos tecidos colorretal normal e tumoral, composto por cerca de 250 estruturas conhecidas (ALDREDGE ET AL, 2012; BALOG ET AL, 2012; CERONI ET AL, 2008; SONG ET AL., 2015).

Cada sinal de íon que correspondia à estrutura de um N-glicano foi anotado, identificado quanto ao seu grau de ionização e quantificado. Para a quantificação, foi utilizado o software MultiQuant<sup>™</sup> 3.0.2 de mensuração da área relativa ao pico de intensidade de cada N-glicano.

A relação entre as áreas das formas metilada e deuterada (área CH<sub>3</sub>/área CD<sub>3</sub>) foi utilizada para quantificação relativa das estruturas, conforme descrito na secção 3.

Para maior detalhamento composicional, foi realizada a análise da fragmentação de algumas estruturas, em nova aquisição por EM (MS/MS). Os espectros dos fragmentos obtidos foram anotados e analisados com a utilização do software GritToolBox 1.2, que permitiu a resolução parcial de alguns glicanos de maior interesse (ALDREDGE ET AL, 2012; CERONI ET AL, 2008).

### 2.3.6.6 Simbologia e representação gráfica das composições de N-glicanos

Cada composição identificada de N-glicano foi representada graficamente no corpo do texto desta tese, de acordo com as normas estabelecidas pelo Consórcio de Glicômica Funcional (VARKI ET AL, 2015).

As composições foram denominadas de acordo com o tipo, número de antenas e o número de N- acetilglicosaminas (acetilhexose, HexNAc), manoses e galactoses (hexoses, Hex), fucose (Fuc) e ácidos siálicos (NeuAc), nessa ordem. Quando necessário, as relações exatas de massa/carga ( $m/z$ ) e o número de cátions das formas metilada e deuterada foram anotados.

Quando presentes dois valores da relação  $m/z$ , o primeiro valor anotado correspondeu à forma metilada e o segundo valor à forma deuterada. A anotação de apenas um valor  $m/z$  da composição correspondeu a relação massa/carga exata da forma metilada.

Nas figuras representativas das composições, cada resíduo de monossacarídeo foi representado por uma figura geométrica com uma cor relacionada.

Como exemplo, a figura 17 representa a composição complexa, bi-antenária, HexNac4Hex5Fuc1NeuAc2, composta de 4 N-acetilhexoses, 5 hexoses, 1 fucose e 2 ácidos siálicos. Essa composição, caso ionizada com 3 cátions sódio  $[M+3Na]^{3+}=1004,1501$  Da, na forma metilada e 1045,4074 Da, na forma deuterada.

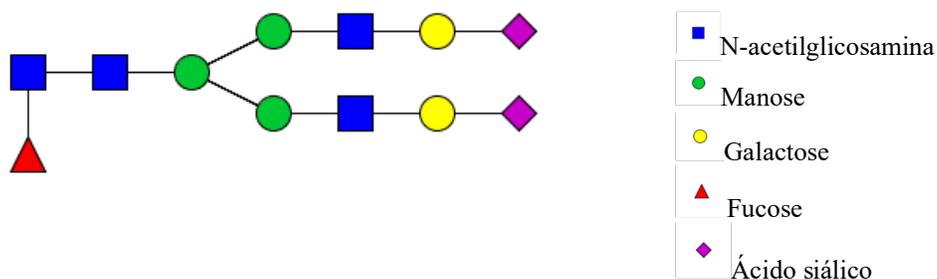


Figura 17. Representação esquemática da composição bi-antenária, metilada, HexNac4Hex5Fuc1NeuAc2,  $[M+3Na]^{3+}=1004,1501$  Da.

As figuras 18 e 19 representam a sequência das etapas experimentais envolvidas na confecção desta tese.

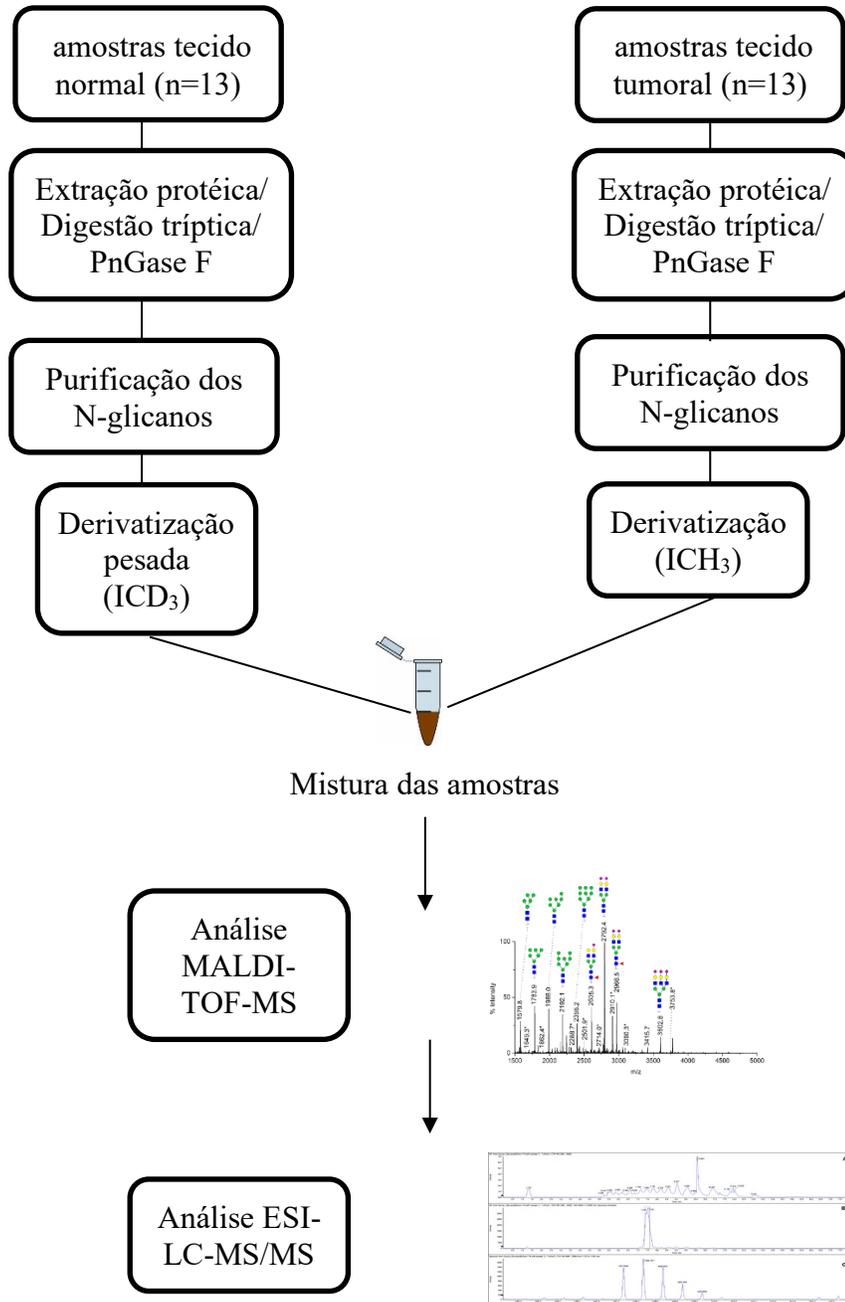


Figura 18. Representação esquemática do fluxograma do estudo para amostras de tecido.

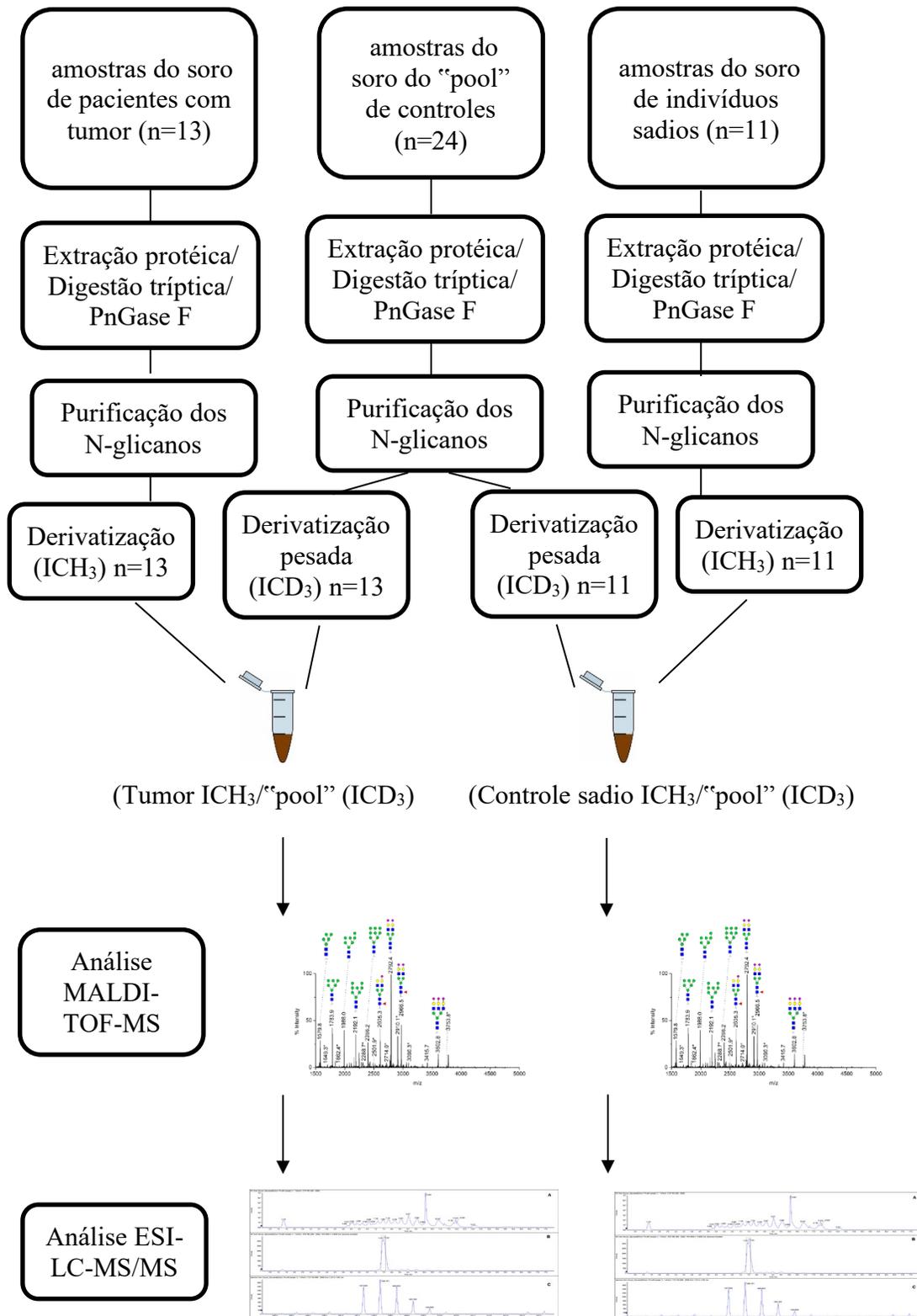


Figura 19. Representação esquemática do fluxograma do estudo para amostras de soro.

### 3. AVALIAÇÃO DOS DADOS E ANÁLISE ESTATÍSTICA

#### 3.1 ANÁLISE DAS AMOSTRAS DE SORO

Para fins de análise quantitativa dos N-glicanos, a área equivalente à intensidade de cada íon que correspondia a um glicano permetilado (soro de pacientes com tumor ou soro de indivíduos sadios) foi comparada com a área equivalente à intensidade que correspondia ao mesmo glicano na forma deuterada (“pool” do soro dos controles), criando um valor de intensidade normalizada.

No caso da detecção de um sinal de íon apenas na forma metilada, sem a correspondente detecção do sinal do seu isotópo pesado, foi utilizado como referência o sinal de um outro íon deuterado com massa e composição mais próximas do íon correspondente ao N-glicano em análise. Essa abordagem é conhecida como análise de composição mais próxima, do inglês “nearest neighbour”, por assumir que se trata de glicanos com vias de síntese semelhantes (BARBOSA ET AL, 2019).

Em seguida, foi criada a razão iônica entre o valor da intensidade normalizada de cada sinal de íon em relação ao valor da intensidade normalizada do sinal de íon HexNAc4Hex5NeuAc2,  $[M+Na]^+ = 2792,4$  Da MALDI-TOF-MS ou  $[M+2Na]^{2+} = 1407,6859$  Da ESI-LC-MS, que foi o íon com maior intensidade de sinal detectado em todas as amostras, conforme observado em estudos prévios sobre N-glicosilação de glicoproteínas totais no soro (ALDREDGE ET AL, 2012; DE VROOME ET AL, 2018; KITA ET AL, 2007; SONG ET AL, 2015).

Essas razões iônicas foram representadas em distribuição de gráfico de caixas, do inglês “box plot”, e a análise da significância estatística foi realizada pela comparação das medianas dos valores dessas razões, para cada N-glicano identificado no soro de pacientes com tumor e no soro de indivíduos sadios.

Foram considerados para análise quantitativa, apenas as composições com intensidade de sinal/ruído  $> 1000$  pós-fragmentação MS/MS que permitiu a análise composicional de pelo menos uma forma metilada ou deuterada.

Foram utilizados o teste U de ranqueamento de Mann-Whitney para dados não paramétricos e estatística z de probabilidade de variação não sistemática, considerando um valor significativo se  $p < 0,01$ .

### 3.2 ANÁLISE DA ACURÁCIA DO N-GLICOMA DO SORO EM DISCRIMINAR PACIENTES COM TUMOR DE INDIVÍDUOS SADIOS

Foi utilizado o método de Ward para a análise de agrupamento hierárquico por aglomeração, na separação pelo perfil global de N-glicosilação do soro de pacientes com tumor de indivíduos sadios. O método de Ward consiste em um algoritmo para agrupamento de diferentes dados através da análise de variâncias, transformados em distâncias espaciais como modo de representação da similaridade entre grupos (WARD, 1963).

Esse método se baseia na análise do somatório do quadrado dos erros de variância de cada agrupamento criado, em relação ao somatório do quadrado dos erros de variância do agrupamento total, durante a adição de cada novo componente do grupo.

Inicialmente cada amostra serve como um agrupamento individual, para um número de  $n$  amostras. As amostras são agrupadas duas por vez, e o agrupamento que apresentar o menor aumento no somatório do quadrado dos erros de variância da média dentro do total de amostras forma, por semelhança, o primeiro grupo.

A seguir, a nova amostra que apresentar o menor aumento no somatório do quadrado dos erros de variância da média dentro do total de amostras será agrupada a esse conjunto e assim, sucessivamente.

Dessa forma, as observações ( $n-1$ ) irão reunir agrupamentos hierárquicos semelhantes, até que se forme um conjunto final com todos os agrupamentos distribuídos espacialmente, onde a distância Euclidiana entre os pontos representa a similaridade entre eles.

Esse método tende a resultar em agrupamentos de tamanhos aproximadamente iguais devido à minimização de variação interna (MURTAGH & LEGENDRE, 2014).

O perfil de N-glicosilação global do soro foi utilizado como variável, sem referência à nenhuma composição de N-glicano em especial.

Os pacientes e controles foram agrupados sucessivamente e de modo aleatório. Cada paciente e controle foi representado por um ponto, os quais foram distribuídos espacialmente de acordo com o grau de similaridade entre eles, conforme descrito.

### 3.3 ANÁLISE DAS AMOSTRAS DE TECIDO

A área equivalente à intensidade de cada íon que correspondia a um glicano permetilado (tecido tumoral) foi comparada com a área equivalente à intensidade do íon que correspondia ao mesmo glicano na forma deuterada (tecido não-tumoral), criando um valor de intensidade relativa.

Na análise MALDI-TOF-MS foram utilizados para comparação apenas os sinais de íon que foram detectados nas duas formas: metiladas (tumor) e deuterada (tecido normal), cuja intensidade de sinal foi maior ou igual a 5% da intensidade do íon com maior sinal detectado nas aquisições.

Na análise LC-MS/MS foram utilizados para comparação apenas os sinais de íon cuja relação sinal:ruído foi maior do que 1.000, nas aquisições de ao menos 7 pacientes.

Estruturas cuja relação da área CH3/CD3 foi maior do que 1 foram consideradas aumentadas no tecido tumoral e inversamente, estruturas cuja relação da área CH3/CD3 foi menor do que 1 foram consideradas como diminuídas no tecido tumoral.

Para teste da consistência no padrão de alteração da abundância dos N-glicanos foi utilizado o teste de probabilidade binomial “one-tail” para eventos aleatórios. Foram considerados consistentemente alterados apenas os íons com probabilidade  $p < 0,005$  na análise LC-MS.

Os dados para cada N-glicano consistentemente alterado foram representados em distribuição de gráfico de caixas, do inglês “box plot”. Foram utilizados o teste pareado de Wilcoxon para dados não paramétricos e estatística z de probabilidade de variação não sistemática, considerando um valor significativo se  $p < 0,01$ .

## 4. RESULTADOS

### 4.1 CARACTERÍSTICA DOS PARTICIPANTES

Quinze pacientes concordaram em participar voluntariamente do estudo, dos quais dois foram excluídos. Um paciente se recusou a realizar o teste genético para pesquisa de mutação germinativa e um paciente do sexo masculino, com menos de 40 anos de idade, apresentou uma variante patogênica germinativa do gene *MLH1*. A tabela 1 detalha as características da casuística do estudo.

**Tabela 1.** Descrição dos casos participantes com adenocarcinoma de cólon.

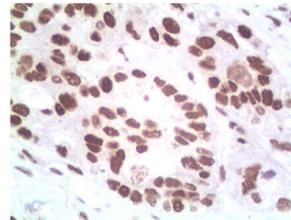
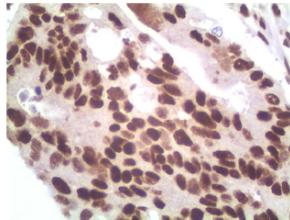
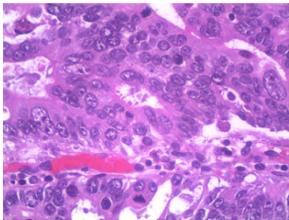
Paciente	Idade (anos)	Sexo	Local	TNM	Estadio	CEA	Tipo Histologico	Mutação de <i>KRAS</i> ou <i>BRAF</i>
1	37	Masc	Transverso	T3 N0	II	1,48	Indiferenciado	<i>KRAS</i> Mutado
2	36	Fem	Sigmóide	T3 N0	II	1,65	Bem Diferenciado	Não
3	65	Masc	Ceco	T3 N0	II	1,60	Mod Diferenciado	<i>KRAS</i> Mutado
4	55	Masc	Descendente	T3 N1b	III	5,30	Mod Diferenciado	Não
5	60	Masc	Sigmóide	T3 N0	II	7,70	Mod Diferenciado	Não
6	56	Fem	Sigmóide	T4a N0	II	2,10	Mod Diferenciado	Não
7	67	Masc	Ascendente	T3 N1a	III	2,30	Mod Diferenciado	<i>BRAF</i> Mutado
8	64	Fem	Ceco	T4a N1c	III	11,25	Indiferenciado	Não
9	63	Fem	Ceco	T3 N0	II	6,51	Mod Diferenciado	Não
10	54	Fem	Sigmóide	T3 N1b	III	3,30	Mod Diferenciado	<i>BRAF</i> Mutado
11	74	Fem	Sigmóide	T3 N1a	III	6,75	Mod Diferenciado	Não
12	64	Masc	Ceco	T3 N1a	III	5,20	Mod Diferenciado	<i>KRAS</i> Mutado
13	75	Fem	Sigmóide	T3 N0	II	1,35	Mod Diferenciado	<i>KRAS</i> Mutado

TNM: tumor, node, metastasis, CEA: antígeno carcinoembrionário (ng/dl)

Nenhum dos participantes do estudo apresentou uma variante patogênica germinativa nos 37 genes do painel genético relacionados a tumores colorretais hereditários. Entretanto, pode-se observar em 1 paciente, a presença de variante de significado incerto (VUS), do inglês “variant of unknown significance”, no gene da polimerase épsilon (*POLE*). APÊNDICE B.

Todos os tumores apresentaram expressão tecidual normal das proteínas de reparo do DNA no estudo imunohistoquímico, como demonstrado na figura 20.

marcador (anticorpo)	clone	expressão
c-erbB-2	SP3	negativa (score 0)
MLH1	ES05	positiva (figura 2)
MSH2	FE11	positiva (figura 3)
MSH6	EP49	positiva
PMS2	EP51	positiva



#### conclusão

imunoexpressão de marcadores solicitados relatada em tabela acima.

#### comentário

alterações em proteínas de reparo do DNA, ligadas à instabilidade de microssatélites, não detectadas por este método.

Figura 20. Aspecto imunohistoquímico normal da expressão tecidual dos heterodímeros correspondentes às enzimas de reparo do DNA MLH1/PMS2 e MSH2/MSH6 no epitélio tumoral, comparada com o tecido estromal adjacente normal. Paciente 1.

Seis dos 13 tumores (46,15%) apresentavam mutação somática dos oncogenes *KRAS* ou *BRAF*. Quatro pacientes (30,77%) apresentavam mutação somática do oncogene *KRAS* e 2 pacientes (15,38%) apresentavam mutação somática do oncogene *BRAF*.

Dos 6 pacientes com tumores em cólon direito, 3 apresentavam mutação somática do oncogene *KRAS* e 1 paciente apresentava mutação somática do oncogene *BRAF*. APÊNDICE C.

Todos os fragmentos de tecido colônico macroscopicamente normal foram classificados como histologicamente normais.

Quinze indivíduos sadios que preencheram os critérios para inclusão no estudo compuseram o grupo de controles. Quatro indivíduos foram excluídos do estudo, cujas aquisições pelo método LC-MS/MS apresentaram baixa intensidade de sinal, impossibilitando a deconvolução das massas e análise adequada dos sinais de íon. A tabela 2 detalha as características dos indivíduos sadios participantes do grupo controle.

**Tabela 2.** Características dos indivíduos sadios, participantes do grupo controle.

Participante	Sexo	Idade (anos)	Indicação	Laudo da colonoscopia
C1	F	67	rastreamento	Normal
C2	F	68	rastreamento	Diverticulose
C3	F	53	rastreamento	Normal
C4	F	50	rastreamento	Normal
C5	M	58	rastreamento	Diverticulose
C6	M	55	rastreamento	Normal
C7	M	56	rastreamento	Normal
C8	M	57	rastreamento	Normal
C9	M	61	rastreamento	Diverticulose
C10	M	61	rastreamento	Normal
C11	F	52	rastreamento	Normal

A distribuição por sexo dos pacientes e dos participantes do grupo controle foi semelhante e não houve diferença estatisticamente significativa entre a média de idade dos pacientes com tumores de cólon (59,2 anos; IC=52,02-66,45) e os participantes do grupo controle (58 anos; IC=56,96-63,11),  $p=0,765$ .

## 4.2 AVALIAÇÃO DA DISTRIBUIÇÃO DOS N-GLICANOS IDENTIFICADOS NO SORO DE PACIENTES COM CÂNCER DE CÓLON E INDIVÍDUOS SADIOS

Cada sinal de íon correspondente à uma composição de N-glicano detectado pelos métodos MALDI-TOF-MS e LC-MS/MS foi anotado em ordem crescente de valor da massa exata  $[M+Na]^+$  e esta notação numérica foi adotada em toda a tese.

A relação de todos os sinais de íons correspondentes a N-glicanos identificados pelos métodos MALDI-TOF-MS e LC-MS/MS, nas amostras de soro e tecido estão detalhados no APÊNDICE D.

### 4.2.1 Análise MALDI-TOF-MS

A figura 21 representa o espectro de intensidades relativas dos N-glicanos detectados no soro de um paciente com adenocarcinoma de cólon localizado em cólon transversal. Os espectros individuais dos 13 pacientes e dos 11 controles sadios participantes desse estudo estão representados no APÊNDICE E.

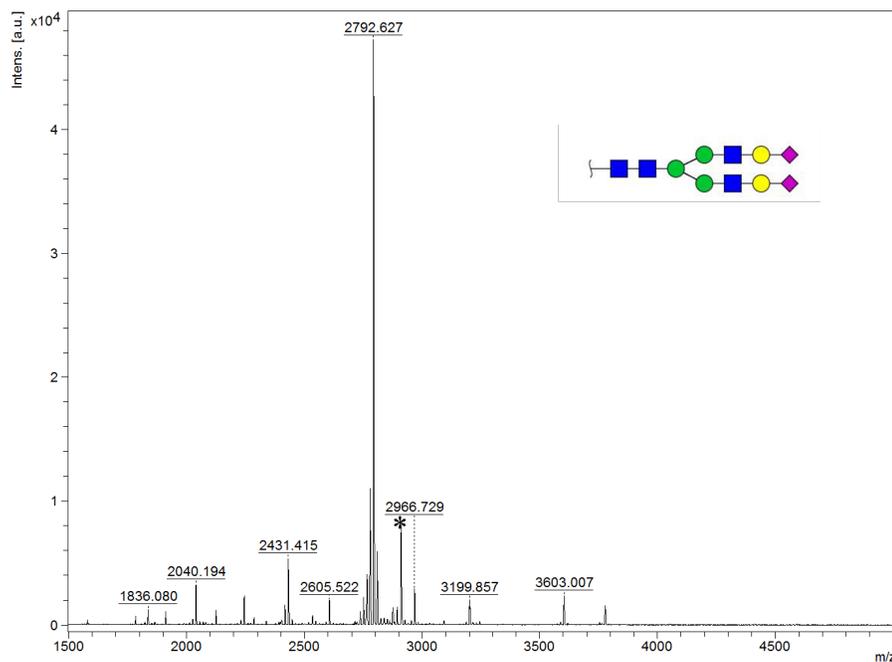


Figura 21. Espectro de MALDI-TOF/TOF-MS, intensidade e assinalamento de N-glicanos presentes no soro de um paciente com adenocarcinoma de cólon transversal, pT3N0, *KRAS* mutado e no soro do “pool” de controles. Notar a diferença de intensidade relativa da forma metilada  $[M+Na]^+ = 2792,6$  Da e deuterada  $[M+Na]^+ = 2910,1$  Da (asterisco) do íon n° 54- HexNAc4Hex5NeuAc2 (detalhe), modo refletor,  $m/z$  1.500-5.000.

Após o assinalamento das massas, 33 sinais de íon  $[M+Na]^+$  cuja relação  $m/z$  correspondia à uma composição de N-glicano foram detectados pelo método MALDI-TOF-MS.

#### 4.2.2 Análise LC-MS

A figura 22 representa o cromatograma com o assinalamento do íon  $m/z [M+2Na]^{2+} = 1407,6859$  Da, correspondente a composição bi-anténaria, n° 54- HexNAc4Hex5NeuAc2, no soro de um paciente com adenocarcinoma de cólon localizado em cólon transverso. Em detalhe, sua distribuição monoisotópica com dupla carga, na forma metilada.

A figura 23 representa o cromatograma com o assinalamento do mesmo íon  $m/z [M+2Na]^{2+} = 1466,5531$  Da, a composição bi-anténaria, n° 54- HexNAc4Hex5NeuAc2 do conjunto do soro de controlos. Em detalhe, sua distribuição monoisotópica com dupla carga, na forma deuterada.

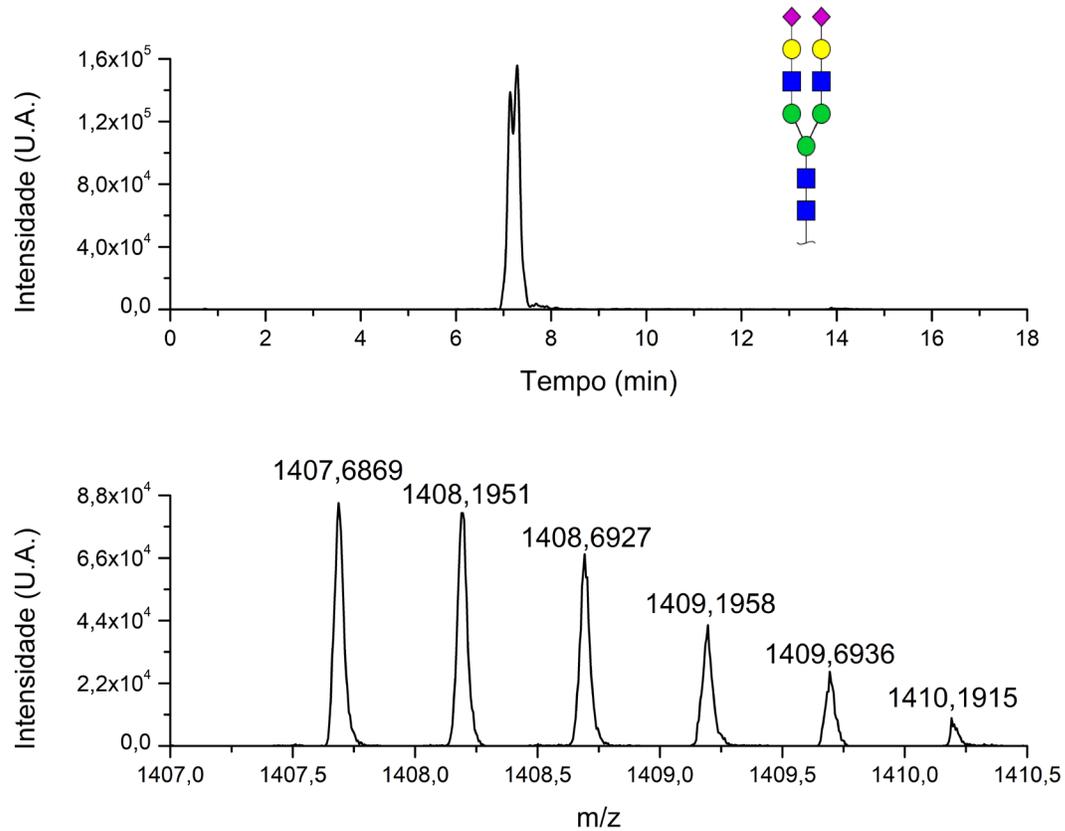


Figura 22. Análise LC-MS da amostra do soro de um paciente com adenocarcinoma de cólon, localizado em cólon transverso. Acima, extração do cromatograma do íon anotado n° 54- HexNAc2Hex5NeuAc2 na forma permetilada  $[M+2Na]^{2+}=1407,6869$  Da. Abaixo em detalhe, a distribuição monoisotópica da respectiva forma metilada (-CH<sub>3</sub>).

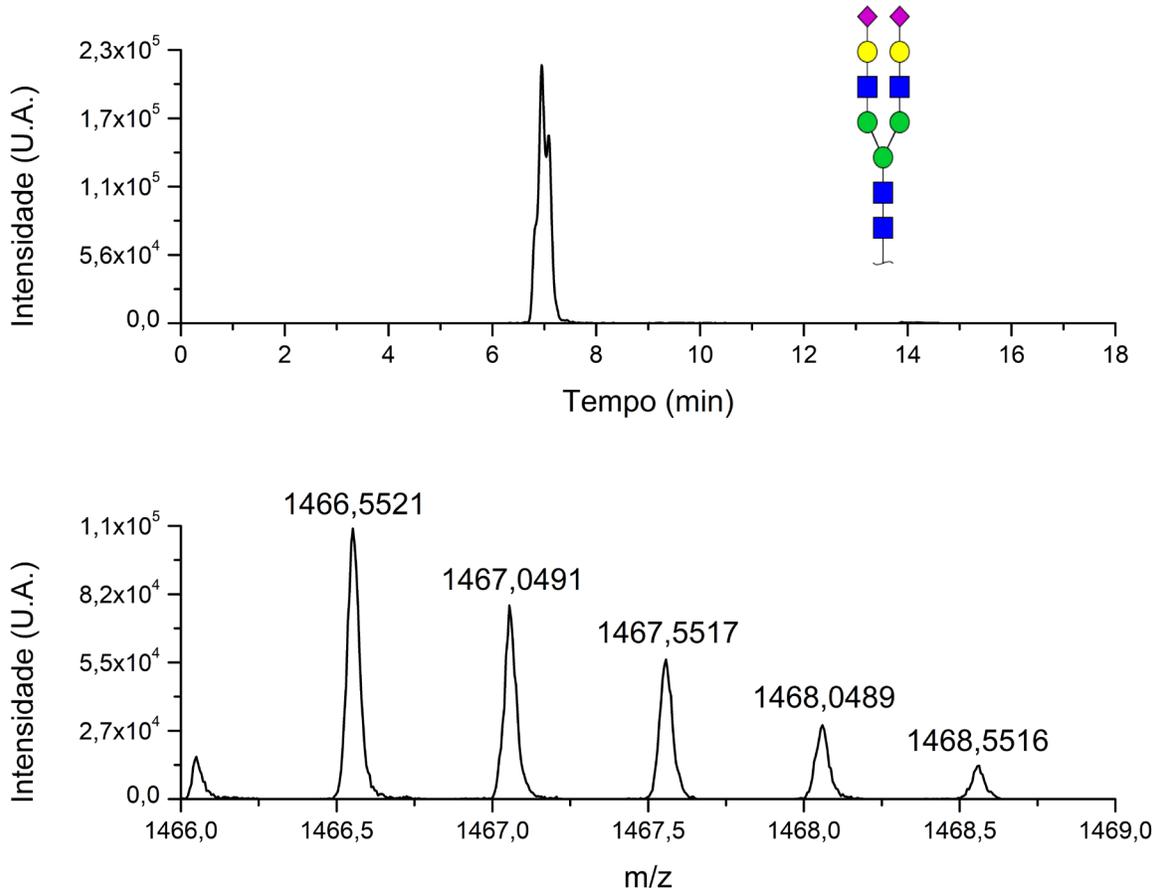


Figura 23. Análise LC-MS de uma amostra composta pelo conjunto (“pool”) do soro de controles sadios. Acima, extração do cromatograma do íon anotado nº 54- HexNAc2Hex5NeuAc2 na forma deuterada  $[M+2Na]^{+2}=1466,5521$  Da. Abaixo em detalhe, a distribuição isotópica da respectiva forma deuterada (-CD3).

Após a deconvolução das massas, 90 sinais de íon cuja relação  $m/z$  correspondiam à N-glicanos foram detectados nas amostras de soro de pacientes e de soro dos indivíduos sadios do grupo controle.

Dez sinais de íon foram detectados como composições monocarregadas  $[M+Na]^+$ , 44 sinais de íon com dupla carga  $[M+2Na]^{2+}$ , 28 sinais de íon com tripla carga  $[M+3Na]^{3+}$ , e 8 sinais de íon com quatro cargas  $[M+4Na]^{4+}$ . APÊNDICE D.

### 4.2.3 Análise LC-MS/MS

Os espectros de aquisição dos fragmentos das composições identificadas foram anotados e analisados pelos softwares GRITS Toolbox 1.2 e GlycoworkBench 2.1 para confirmação da resolução estrutural das massas relativas ao íon precursor.

Dos 90 sinais de íon identificados nas amostras de soro, a análise MS/MS (tandem MS) identificou 53 composições cujos fragmentos apresentaram intensidade de sinal suficiente e que permitiu a resolução estrutural parcial relativas às características das estruturas como p. ex. posição de resíduos de fucose e identificação de formas bissectadas.

As figuras 24 e 25 exemplificam a análise MS/MS dos fragmentos da composição rica em manose nº 17- HexNac2Hex7 e da composição bi-anténaria, fucosilada e disializada, nº 60-HexNac4Hex5Fuc1NeuAc2, respectivamente.

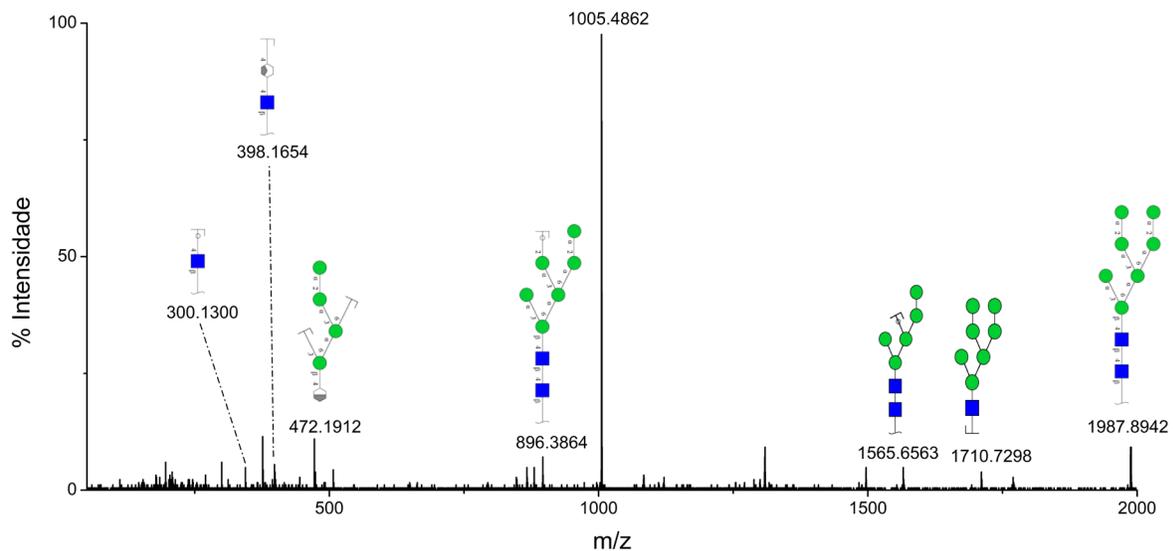


Figura 24. Espectro MS/MS do N-glicano permetilado nº17- HexNac2Hex7 (massa do precursor  $[M+2Na]^{2+} = 1005.4862$  Da) identificado no soro e um paciente com câncer obtido pelo método LC-MS/MS. Interpretação gerada pelo software GRITS.

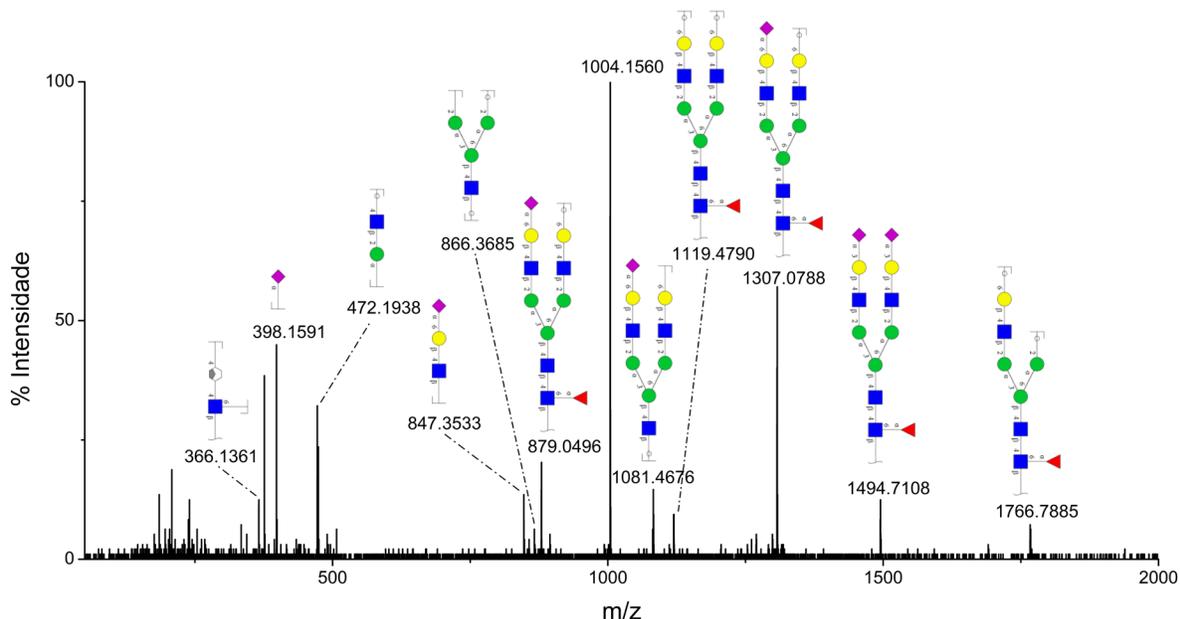


Figura 25. Espectro MS/MS do N-glicano permetilado n° 60-HexNAc4Hex5Fuc1NeuAc2 (massa do precursor  $[M+3Na]^{3+} = 1004,1560$  Da) identificado no soro de um paciente com câncer, obtido pelo método LC-MS/MS. Interpretação gerada pelo software GRITS.

### 4.3 AVALIAÇÃO QUANTITATIVA DOS N-GLICANOS IDENTIFICADOS NO SORO DE PACIENTES COM CÂNCER DE CÓLON E INDIVÍDUOS SADIOS

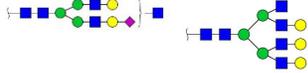
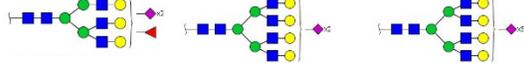
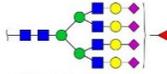
#### 4.3.1 Análise MALDI-TOF-MS

Dos 33 sinais de íon detectados na análise MALDI-TOF-MS, 29 estruturas foram consistentemente detectadas nas amostras de soro, das quais 23 foram detectadas nas formas metilada e deuterada. APÊNDICE D.

Três composições, n° 37- HexNAc4Hex5NeuAc1,  $m/z = 2533,8$ , n° 54- HexNAc4Hex5NeuAc2,  $m/z = 2910,1$  e n° 78- HexNAc5Hex6Fuc1NeuAc3,  $m/z = 3933,8$  apresentaram adequada intensidade de sinal e foram utilizadas como referência para as suas respectivas composições metiladas, bem como para a quantificação relativa das outras 6 composições detectadas apenas na forma metilada.

As composições foram escolhidas para comparação de acordo com a similaridade em estrutura e intensidade do sinal de íon mais próxima da composição metilada (“nearest neighbour”), conforme demonstrado na tabela 3.

**Tabela 3.** Relação das composições deuteradas usadas como referência para os respectivos sinais de íon das 6 composições permetiladas, detectadas nas amostras de soro pelo método MALDI-TOF-MS.

Composição metilada (CH <sub>3</sub> ) (n=6)	Composição deuterada (CD <sub>3</sub> ) de referência (n°)
	 (37)
	 (54)
	 (78)

A tabela 4 representa as razões iônicas das áreas correspondentes às intensidades dos sinais de íons detectados na amostra de soro de um paciente com adenocarcinoma de cólon localizado em cólon transversal.

**Tabela 4.** Conjunto as razões iônicas dos 29 íons correspondentes a N-glicanos detectados no soro de um paciente com adenocarcinoma de cólon localizado em cólon transversal, estadiamento II (pT3N0) e com mutação no oncogene *KRAS*.

Nº	Composição	Íon [M+Na] <sup>+</sup> Metilado*	Razão iônica†	Nº	Composição	Íon [M+Na] <sup>+</sup> Metilado*	Razão iônica†
6	HexNAc2Hex5	1579,8	0,880	46	HexNAc4Hex5Fuc1NeuAc1	2605,3	0,586
10	HexNAc2Hex6	1783,9	0,757	51	HexNAc5Hex5NeuAc1	2676,3	0,022
13	HexNAc4Hex3Fuc1	1835,9	0,594	53	HexNAc6Hex6	2764,4	0,727
14	HexNAc4Hex4	1865,9	0,012	54	HexNAc4Hex5NeuAc2	2792,4	1,000
17	HexNAc2Hex7	1988,0	0,193	55	HexNAc5Hex5Fuc1NeuAc1	2850,4	0,067
20	HexNAc4Hex4Fuc1	2040,0	0,423	60	HexNAc4Hex5Fuc1NeuAc2	2966,5	1,306
21	HexNAc4Hex5	2070,0	0,108	67	HexNAc5Hex5Fuc1NeuAc2	3211,6	0,344
25	HexNAc3Hex5NeuAc1	2186,1	0,016	72	HexNAc5Hex6Fuc1NeuAc2	3415,7	0,003
26	HexNAc2Hex8	2192,1	0,220	75	HexNAc5Hex6NeuAc3	3602,8	0,898
27	HexNAc4Hex4NeuAc1	2227,1	0,000	77	HexNAc6Hex7NeuAc2	3690,8	0,001
28	HexNAc4Hex5Fuc1	2244,1	0,628	78	HexNAc5Hex6Fuc1NeuAc3	3776,9	1,810
29	HexNAc5Hex4Fuc1	2285,1	0,421	82	HexNAc6Hex7NeuAc3	4052,0	0,001
34	HexNAc3Hex6NeuAc1	2390,2	0,067	84	HexNAc6Hex7NeuAc4	4413,2	0,028
35	HexNAc2Hex9	2396,2	0,289	85	HexNAc6Hex7Fuc1NeuAc4	4587,3	0,101
37	HexNAc4Hex5NeuAc1	2431,2	1,045				

\*Daltons. † em relação à área normalizada do íon nº 54

A tabela 5 representa as razões iônicas das áreas correspondentes às intensidades dos sinais de íons detectados na amostra de soro de um controle sadio.

Os valores das razões iônicas dos 33 sinais de íon detectados, individualizados por paciente e por controle sadio estão descritos no APÊNDICE F.

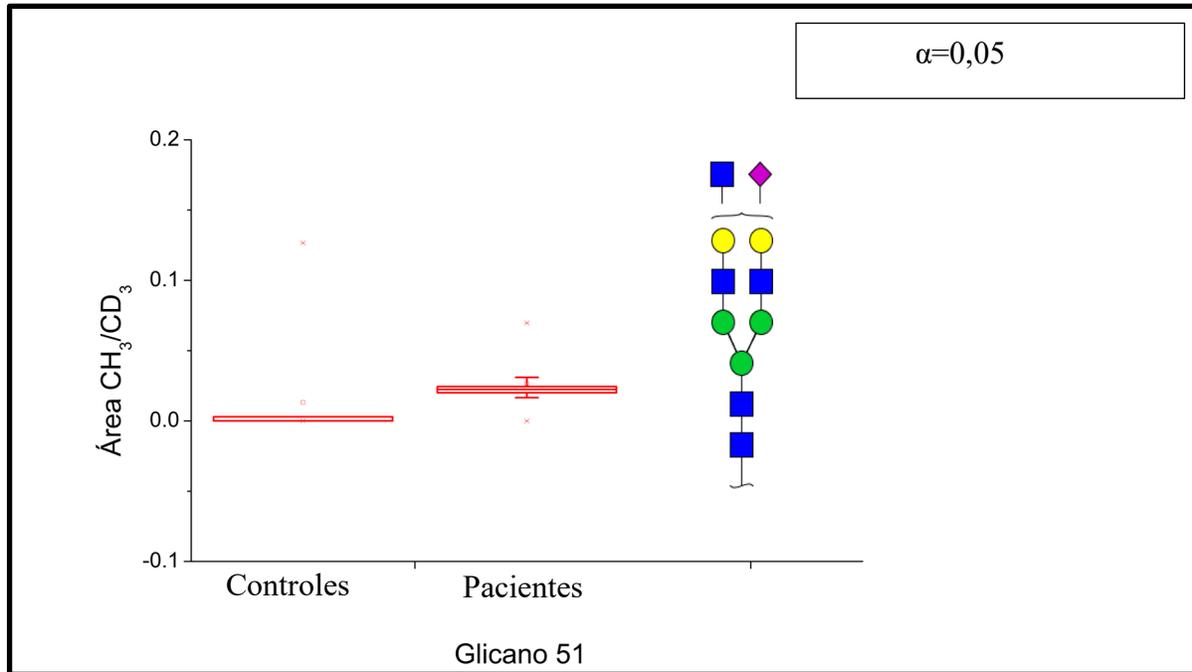
**Tabela 5.** Conjunto as razões iônicas dos 29 íons correspondentes a N-glicanos detectados no soro de um controle sadio de 67 anos e do sexo feminino.

Nº	Composição	Íon [M+Na] <sup>+</sup> Metilado*	Área (CH <sub>3</sub> /CD <sub>3</sub> )†	Nº	Composição	Íon [M+Na] <sup>+</sup> Metilado*	Área (CH <sub>3</sub> /CD <sub>3</sub> )†
6	HexNAc2Hex5	1579,8	4,050	46	HexNAc4Hex5Fuc1NeuAc1	2605,3	0,704
10	HexNAc2Hex6	1783,9	3,037	51	HexNAc5Hex5NeuAc1	2676,3	0,000
13	HexNAc4Hex3Fuc1	1835,9	3,290	53	HexNAc6Hex6	2764,4	0,447
14	HexNAc4Hex4	1865,9	0,041	54	HexNAc4Hex5NeuAc2	2792,4	1,000
17	HexNAc2Hex7	1988,0	1,012	55	HexNAc5Hex5Fuc1NeuAc1	2850,4	0,188
20	HexNAc4Hex4Fuc1	2040,0	2,913	60	HexNAc4Hex5Fuc1NeuAc2	2966,5	0,418
21	HexNAc4Hex5	2070,0	0,000	67	HexNAc5Hex5Fuc1NeuAc2	3211,6	0,000
25	HexNAc3Hex5NeuAc1	2186,1	0,000	72	HexNAc5Hex6Fuc1NeuAc2	3415,7	0,000
26	HexNAc2Hex8	2192,1	0,000	75	HexNAc5Hex6NeuAc3	3602,8	0,586
27	HexNAc4Hex4NeuAc1	2227,1	0,000	77	HexNAc6Hex7NeuAc2	3690,8	0,001
28	HexNAc4Hex5Fuc1	2244,1	1,350	78	HexNAc5Hex6Fuc1NeuAc3	3776,9	0,417
29	HexNAc5Hex4Fuc1	2285,1	1,012	82	HexNAc6Hex7NeuAc3	4052,0	0,001
34	HexNAc3Hex6NeuAc1	2390,2	0,000	84	HexNAc6Hex7NeuAc4	4413,2	0,011
35	HexNAc2Hex9	2396,2	0,000	85	HexNAc6Hex7Fuc1NeuAc4	4587,3	0,119
37	HexNAc4Hex5NeuAc1	2431,2	1,012				

\*Daltons. † área normalizada do íon em relação à área do íon nº 54

Dos 29 sinais de íon detectados, apenas a composição nº 51- HexNAc5Hex5NeuAc1, estava aumentada no soro de pacientes com câncer em relação ao soro dos controles sadios com diferença estatisticamente significativa ( $\alpha=0,05$ , Teste U de Mann-Withney). Gráfico 1.

Gráfico 1- Mediana e valores intervalares da área  $\text{CH}_3/\text{CD}_3$  da composição n° 51- HexNac5Hex5NeuAc1 alterada no soro dos pacientes com tumor (n=13) em relação aos controles sadios (n=11) pelo método MALDI-TOF-MS



#### 4.3.2 Análise LC-MS/MS

Dos 90 sinais de íon identificados no soro de pacientes com câncer e no soro de controles sadios, 53 composições apresentaram suficiente intensidade de sinal de íon pós fragmentação MS/MS. APÊNDICE D.

A tabela 6 representa os valores das razões iônicas normalizadas, em relação ao sinal de íon n° 54- HexNac4Hex5NeuAc2, correspondentes aos 53 sinais de íons identificados na amostra de soro de um paciente com adenocarcinoma de cólon localizado em cólon transversal.

**Tabela 6.** Conjunto dos valores das razões dos 53 íons correspondentes a N-glicanos identificados no soro de um paciente com adenocarcinoma de cólon localizado em cólon transversal, estadiamento II (pT3N0) e com mutação no oncogene *KRAS*.

Nº	( <i>m/z</i> )*	Área(CH <sub>3</sub> /CD <sub>3</sub> )†	Nº	( <i>m/z</i> )*	Área(CH <sub>3</sub> /CD <sub>3</sub> )†	Nº	( <i>m/z</i> )*	Área(CH <sub>3</sub> /CD <sub>3</sub> )†
5	1416,7094	0,013	38	1247,6123	0,030	82	1030,2440	0,035
6	1579,7826	0,157	42	1293,6304	0,005	84	1120,5374	0,147
8	1620,809	0,023	43	1297,1465	0,092	85	1164,0597	0,146
9	842,4125	0,020	44	1311,6353	0,004	89	1232,8439	0,000
10	903,4358	0,106	45	1312,1518	0,022	90	1276,3663	0,006
13	929,4571	0,227	46	1314,1437	0,746			
14	1865,9355	0,039	51	907,4379	0,012			
16	1002,486	1,828	52	913,1097	0,037			
17	1005,4857	0,026	53	936,7887	1,032			
18	1016,5017	0,001	54	1407,6859	1,000			
20	1031,507	0,298	55	965,4676	0,132			
21	1046,5122	0,036	57	975,4711	0,123			
23	1067,0255	0,020	58	984,8149	0,004			
24	1087,5388	0,002	59	994,8184	0,016			
25	1104,5359	0,021	60	1004,1501	0,498			
26	1107,5356	0,039	63	1033,5009	0,035			
27	1125,0492	0,106	67	1617,2937	0,138			
28	1133,5568	0,692	69	1115,2096	0,026			
29	1154,0701	0,069	70	1669,8275	0,006			
32	1191,5805	0,014	72	1153,8921	0,046			
34	1206,5858	0,022	73	1154,5640	0,021			
35	1209,5855	0,072	75	1216,2536	0,984			
36	1220,0808	0,608	77	1245,6044	0,169			
37	1227,0991	0,526	78	1274,2833	0,452			

\* massa acurada (*m/z*), † razão iônica em relação ao sinal de íon nº 54 [M+2Na]<sup>2+</sup>=1407.6859 Da

A tabela 7 representa os valores das razões iônicas normalizadas, em relação ao sinal de íon nº 54- HexNac4Hex5NeuAc2, correspondentes aos 53 sinais de íons identificados na amostra de soro de um controle sadio, respectivamente.

Os valores dos 90 sinais de íon identificados, individualizados por paciente e por controle sadio estão descritos no APÊNDICE G.

**Tabela 7.** Conjunto dos valores das razões dos 53 íons correspondentes a N-glicanos identificados no soro de um controle sadio de 67 anos e do sexo feminino.

Nº	( <i>m/z</i> )*	Área(CH <sub>3</sub> /CD <sub>3</sub> ) <sup>†</sup>	Nº	( <i>m/z</i> )*	Área(CH <sub>3</sub> /CD <sub>3</sub> ) <sup>†</sup>	Nº	( <i>m/z</i> )*	Área(CH <sub>3</sub> /CD <sub>3</sub> ) <sup>†</sup>
5	1416,7094	0,027	38	1247,6123	0,444	82	1030,2440	0,001
6	1579,7826	0,139	42	1293,6304	0,101	84	1120,5374	0,571
8	1620,809	0,140	43	1297,1465	0,737	85	1164,0597	0,287
9	842,4125	0,020	44	1311,6353	0,087	89	1232,8439	1,660
10	903,4358	0,039	45	1312,1518	2,705	90	1276,3663	0,920
13	929,4571	1,293	46	1314,1437	0,733			
14	1865,9355	0,536	51	907,4379	0,011			
16	1002,486	1,276	52	913,1097	0,031			
17	1005,4857	0,000	53	936,7887	9,108			
18	1016,5017	0,330	54	1407,6859	1,000			
20	1031,507	0,858	55	965,4676	0,063			
21	1046,5122	0,038	57	975,4711	0,850			
23	1067,0255	0,796	58	984,8149	0,048			
24	1087,5388	0,365	59	994,8184	0,247			
25	1104,5359	0,026	60	1004,1501	0,045			
26	1107,5356	0,102	63	1033,5009	0,065			
27	1125,0492	0,497	67	1617,2937	0,349			
28	1133,5568	0,562	69	1115,2096	0,181			
29	1154,0701	0,405	70	1669,8275	0,074			
32	1191,5805	1,423	72	1153,8921	0,162			
34	1206,5858	0,080	73	1154,5640	0,083			
35	1209,5855	0,280	75	1216,2536	0,811			
36	1220,0808	1,010	77	1245,6044	6,030			
37	1227,0991	0,867	78	1274,2833	0,136			

\* massa acurada (*m/z*), † razão iônica em relação ao sinal de íon n° 54 [M+2Na]<sup>2+</sup>=1407.6859 Da

Dos 53 sinais de íon quantificados, 26 apresentaram diferença estatisticamente significativa das razões iônicas no soro de pacientes com câncer quando comparadas ao soro dos controles sadios ( $\alpha=0,01$ , Teste U de Mann-Whitney). Tabela 8.

**Tabela 8.** Quantificação relativa dos 26 sinais de íon de N-glicanos alterados no soro de pacientes com câncer de cólon em relação ao soro de indivíduos saudáveis.

Nº	Composição	Mediana dos controles (n =11)	Mediana dos pacientes (n=13)	Z	$\alpha$ , Prob> Z
8	HexNAc3Hex4	0,140	0,012	3,13	0,0018
14	HexNAc4Hex4	0,685	0,023	3,03	0,0010
17	HexNAc2Hex7	0,000	0,026	-3,53	0,0004
18	HexNAc4Hex3Fuc2	0,379	0,006	2,95	0,0031
23	HexNAc5Hex4	0,882	0,020	3,77	0,0002
24	HexNAc6Hex3	0,466	0,005	2,72	0,0065
26	HexNAc2Hex8	0,149	0,051	2,72	0,0065
27	HexNAc4Hex4NeuAc1	1,619	0,160	3,30	0,0010
32	HexNAc3Hex5Fuc1NeuAc1	4,228	0,021	3,07	0,0021
35	HexNAc2Hex9	0,334	0,072	3,01	0,0026
38	HexNAc5Hex4NeuAc1	0,838	0,035	3,13	0,0018
42	HexNAc3Hex6Fuc1NeuAc1	0,413	0,000	2,97	0,0030
43	HexNAc7Hex3Fuc1	1,533	0,092	3,25	0,0012
44	HexNAc2Hex10	0,147	0,008	3,42	0,0006
45	HexNAc7Hex4	2,705	0,025	3,36	0,0008
46	HexNAc4Hex5Fuc1NeuAc1	1,659	0,772	3,01	0,0026
53	HexNAc6Hex6	9,144	0,842	3,42	0,0006
57	HexNAc5Hex6NeuAc1	0,650	0,123	2,66	0,0077
58	HexNAc6Hex5Fuc2	0,221	0,004	3,02	0,0026
59	HexNAc6Hex6Fuc1	0,439	0,030	2,66	0,0077
60	HexNAc4Hex5Fuc1NeuAc2	0,315	0,987	-3,36	0,0008
63	HexNAc5Hex6Fuc1NeuAc1	0,414	0,069	2,84	0,0045
69	HexNAc6Hex6Fuc1NeuAc1	0,633	0,050	3,07	0,0021
82	HexNAc6Hex7NeuAc3	0,001	0,226	-3,19	0,0014
89	HexNAc7Hex8NeuAc4	1,188	0,000	3,44	0,0006
90	HexNAc7Hex8Fuc1NeuAc4	0,920	0,019	2,95	0,0031

Vinte e três composições apresentaram redução no valor de quantificação das razões iônicas no soro dos pacientes com câncer, em relação aos indivíduos saudáveis.

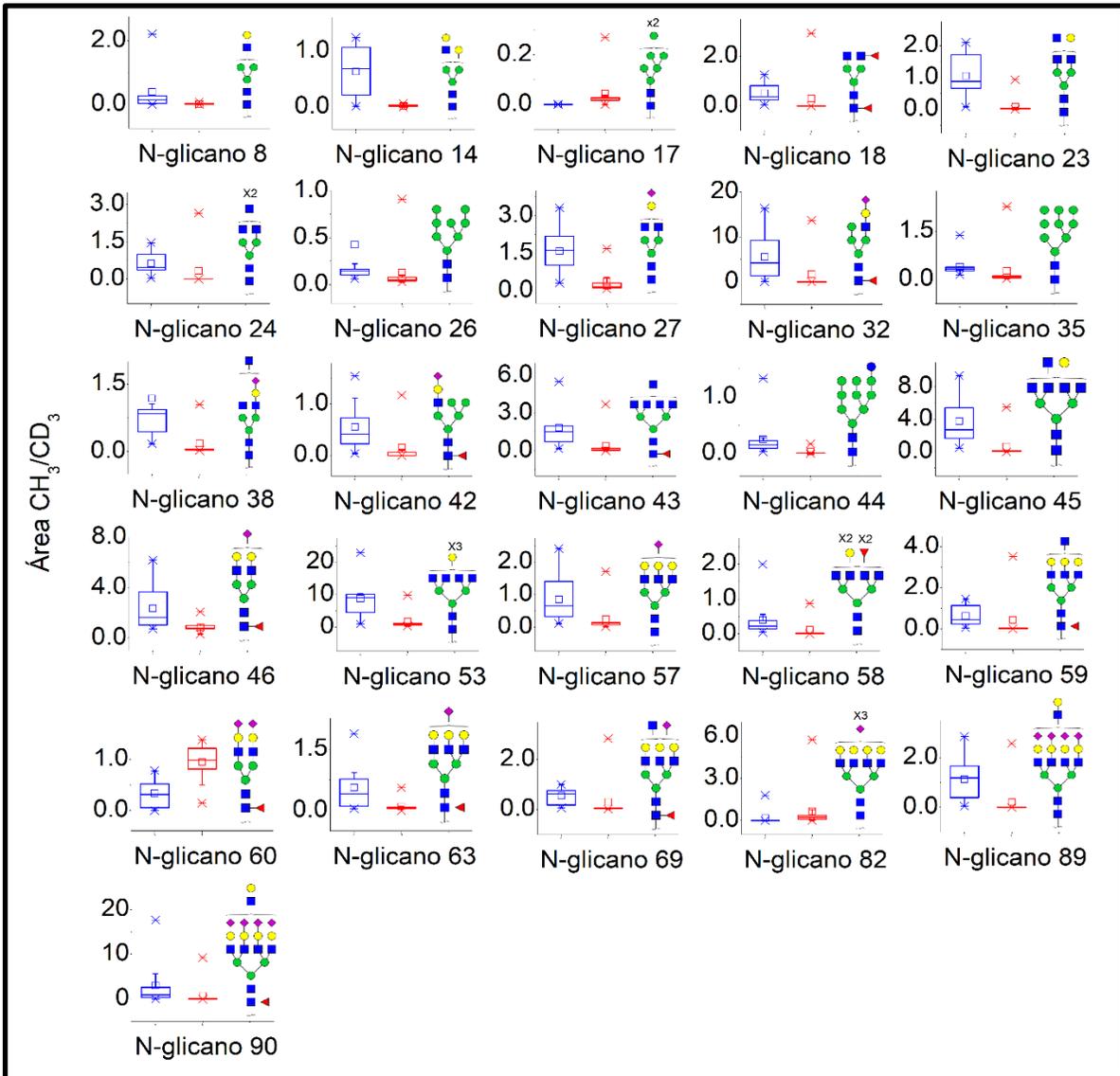
A composição nº 23- HexNAc5Hex4 [M+2Na]<sup>2+</sup>, identificada com dupla carga, apresentou a maior redução no valor de quantificação relativa no soro de pacientes com câncer, em relação ao soro de indivíduos saudáveis (p=0,0002).

As composições com dupla carga nº 17- HexNAc2Hex7 [M+2Na]<sup>2+</sup> (p=0,0004), tripla carga nº 60- HexNAc4Hex5Fuc1NeuAc2 [M+3Na]<sup>3+</sup>, (p=0,0008) e quádrupla carga nº 82-

HexNAc6Hex7NeuAc3 [M+4Na]<sup>4+</sup> (p=0,0014) apresentaram aumento no valor da quantificação relativa no soro dos pacientes com câncer, em relação ao soro de indivíduos sadios.

O gráfico 2 representa a distribuição em gráfico de caixas “box-plot” da variação dos valores intervalares das razões iônicas das 26 estruturas diferencialmente expressas no soro do grupo de pacientes com tumor (n=13, vermelho) e no soro de indivíduos do grupo controle (n=11, azul).

Gráfico 2- Mediana e valores intervalares das razões iônicas das 26 composições significativamente alteradas no soro dos pacientes com tumor (vermelho) em relação aos controles sadios (azul) pelo método LC-MS/MS ( $\alpha=0,01$ , Teste U de Mann-Whitney).



#### 4.4 ANÁLISE HIERÁRQUICA NÃO SUPERVISIONADA DOS PERFIS DE N-GLICOSILAÇÃO NO SORO DE PACIENTES COM CÂNCER DE CÓLON E DE INDIVÍDUOS SADIOS

Os valores das razões iônicas normalizadas ( $\text{CH}_3/\text{CD}_3$ ) de todos os 89 N-glicanos identificados e quantificados no soro dos pacientes e dos indivíduos sadios pelo método LC-MS/MS foram submetidos à análise de agrupamento hierárquico não supervisionada, pelo método de Ward, sem direcionamento para quantificação de nenhuma composição de N-glicano.

Os perfis da N-glicosilação individuais são representados por pontos, de modo que cada perfil é distribuído espacialmente de acordo com sua semelhança, gerando dessa forma um dendograma bidimensional conforme demonstrado na figura 26.

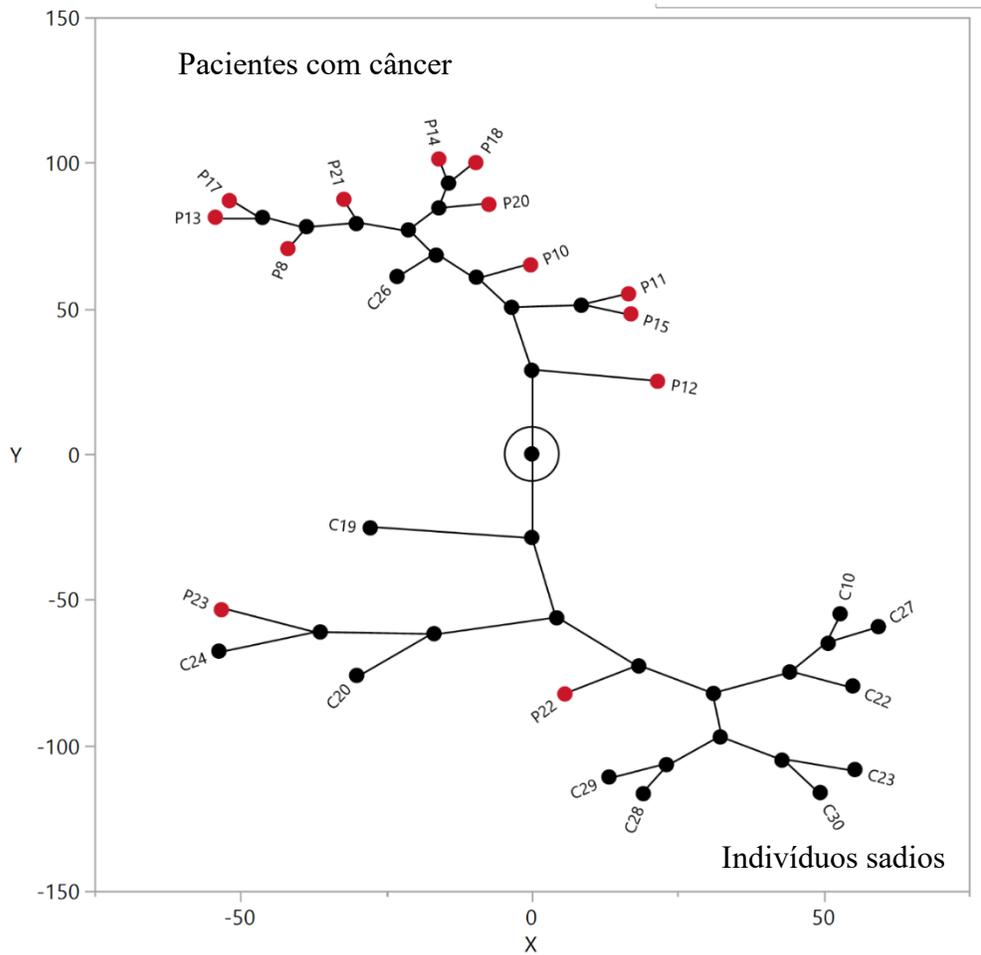


Figura 26. Dendrograma representativo da distribuição espacial por semelhança do conjunto dos valores normalizados CH<sub>3</sub>/CD<sub>3</sub> dos 89 N-glicanos quantificados no soro de pacientes (●P) e controles saudios (●C), obtidos pela análise LC-MS/MS e submetidos ao algoritmo de aglutinação hierárquica não supervisionada pelo método de Ward.

Em relação ao ponto neutro na separação dos grupos ( $X=0$ ,  $Y=0$ ), esse modelo revelou uma distribuição espacial de agrupamento diferente para pacientes com câncer (superior e à esquerda) e indivíduos saudios (inferior e à direita).

Dois pacientes com câncer apresentaram perfil de N-glicosilação semelhante ao perfil de indivíduos saudios (P12 e P13) e apenas um indivíduo sadio (C26) apresentou um padrão de N-glicosilação semelhante ao padrão de N-glicosilação observado no soro de pacientes com câncer de cólon.

## 4.5 AVALIAÇÃO DA DISTRIBUIÇÃO DOS N-GLICANOS DETECTADOS NO TECIDO TUMORAL E NORMAL DOS PACIENTES COM CÂNCER DE CÓLON

### 4.5.1 Análise MALDI-TOF-MS

A figura 27 representa o espectro de intensidades relativas dos N-glicanos no tecido tumoral e colônico normal de um paciente com adenocarcinoma de cólon localizado em cólon transverso. Os espectros individuais dos 13 pacientes participantes desse estudo estão representados no APÊNDICE H.

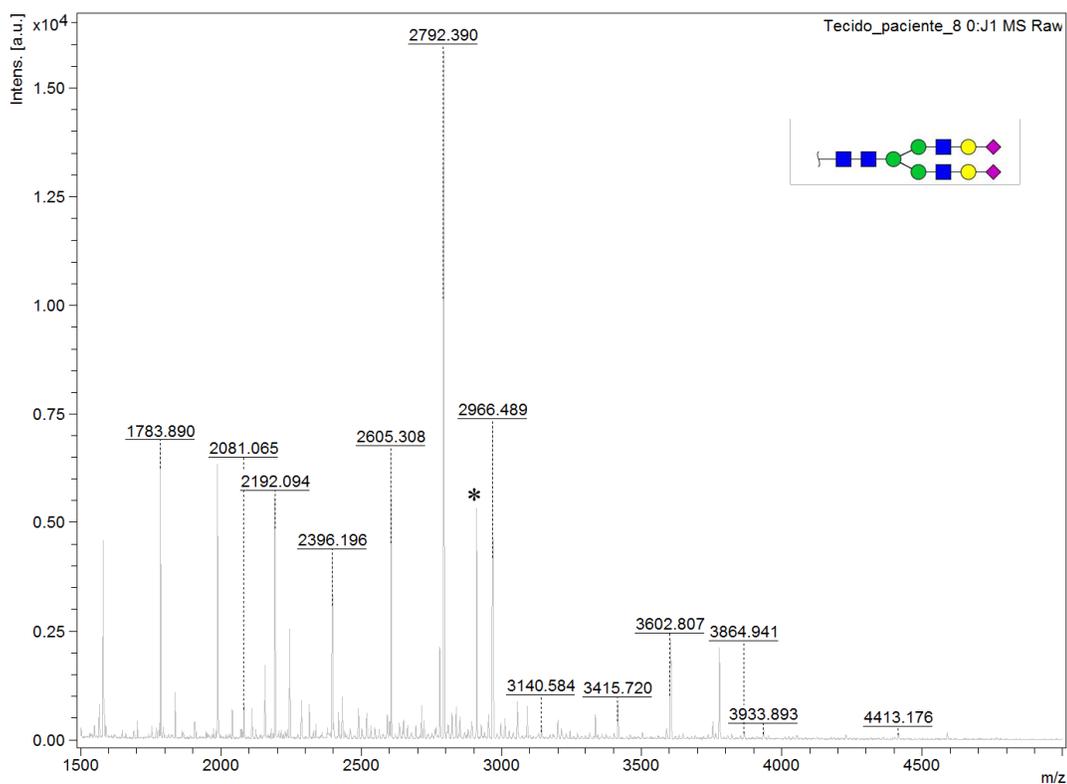


Figura 27. Espectro de MALDI-TOF/TOF-MS, intensidade e assinalamento de N-glicanos presentes no tecido tumoral e no tecido normal de um paciente com adenocarcinoma de cólon transverso, pT3N0, Kras mutado. Notar a diferença de intensidade relativa da forma metilada  $[M+Na]^+ = 2792,4$  Da (tumor) e deuterada  $[M+Na]^+ = 2910,1$  Da (normal, asterisco) do íon n° 54- HexNAc4Hex5NeuAc2 (detalhe). MALDI-MS, modo refletor,  $m/z$  1.500-5.000.

Após o assinalamento das massas, 23 sinais de íons  $[M+Na]^+$  que correspondiam a N-glicanos foram detectados em ao menos uma amostra de tecido, das quais 17 composições foram detectadas nas formas metilada e deuterada. APÊNDICE D.

Doze composições apresentaram intensidade de sinal maior do que 5% em relação a intensidade do íon com maior sinal, por aquisição MS. Tabela 9.

**Tabela 9.** Distribuição dos 12 sinais de íon utilizados para análise quantitativa no tecido pelo método MALDI-TOF-MS.

Nº	Composição	Estrutura proposta	Íon permetilado $[M+Na]^{+*}$
6	HexNAc2Hex5		1579,8
10	HexNAc2Hex6		1783,9
13	HexNAc4Hex3Fuc1		1835,9
17	HexNAc2Hex7		1988,0
26	HexNAc2Hex8		2192,1
28	HexNAc4Hex5Fuc1		2244,1
29	HexNAc5Hex4Fuc1		2285,1
35	HexNAc2Hex9		2396,2
46	HexNAc4Hex5 Fuc1NeuAc1		2605,3
54	HexNAc4Hex5NeuAc2		2792,4
60	HexNAc4Hex5Fuc1NeuAc2		2966,5
75	HexNAc5Hex6NeuAc3		3602,8

\*Daltons

## 4.5.2 Análise LC-MS

A figura 28 representa um cromatograma da contagem total de íons identificados no tecido de um paciente com adenocarcinoma de cólon localizado em cólon transverso, com o assinalamento do íon  $[M+2Na]^{2+} = 1407,6859$  Da, correspondente a composição n° 54-HexNAc4Hex5NeuAc2, identificada na forma metilada e com dupla carga.

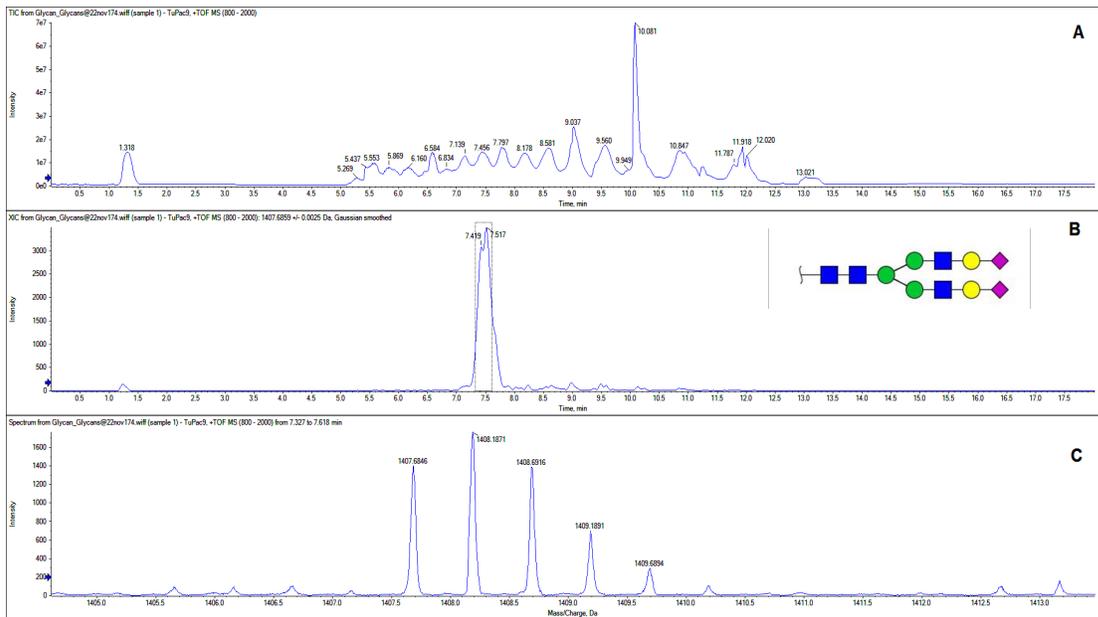


Figura 28. A. Análise LC-MS/MS mostrando a corrente iônica total (TIC) de uma amostra de tecido tumoral, de um paciente com adenocarcinoma de cólon localizado em cólon transverso, pT3N0, Kras mutado, adquirida na faixa  $m/z$  800-2.000. B. Cromatograma de íon extraído referente ao íon  $[M+2Na]^{2+} = 1407,6859$  Da C. Distribuição isotópica confirmando se tratar do íon  $[M+Na]^{2+} = 1407,6859$  Da.

Após a deconvolução das massas, foram identificados 35 sinais de íon que correspondiam a N-glicanos, dos quais 24 apresentaram relação sinal/ruído maior do que 1.000 e intensidade de sinal de íon pós-fragmentação suficiente para resolução estrutural na análise MS/MS.

Um sinal de íon foi detectado como composição monocarregada  $[M+Na]^+$ , 19 sinais de íon com dupla carga  $[M+2Na]^{2+}$ , 3 sinais de íon com tripla carga  $[M+3Na]^{3+}$  e um sinal de íon com quatro cargas  $[M+4Na]^{4+}$ . APÊNDICE D.

## 4.6 AVALIAÇÃO QUANTITATIVA DOS N-GLICANOS IDENTIFICADOS NO TECIDO TUMORAL E NORMAL DE PACIENTES COM CÂNCER DE CÓLON

### 4.6.1 Análise MALDI-TOF-MS

A tabela 10 apresenta os valores da relação entre as áreas correspondentes às intensidades dos sinais de íons, representada como área CH<sub>3</sub>/CD<sub>3</sub>, detectados na amostra do tecido tumoral e do tecido normal de um paciente com adenocarcinoma de cólon localizado em cólon transversal.

Os valores das relações de área de todos os 17 sinais de íon detectados e individualizados por paciente estão descritos no APÊNDICE I.

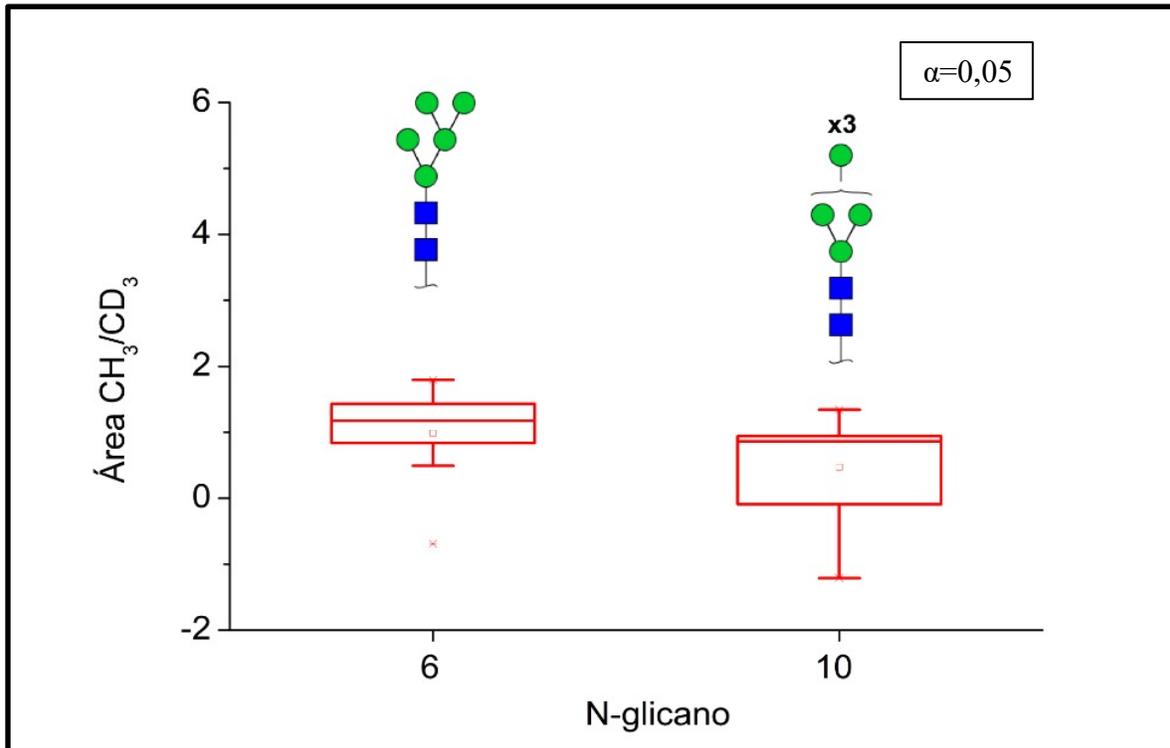
**Tabela 10.** Conjunto dos valores da relação das áreas dos 12 íons utilizados para quantificação por MALDI-TOF-MS no tecido tumoral de um paciente com adenocarcinoma de cólon localizado em cólon transversal, estadiamento II (pT3N0) e com mutação no oncogene *KRAS*.

Nº	Composição	Íon *	área (CH <sub>3</sub> /CD <sub>3</sub> )
6	HexNAc2Hex5	1579,8	29,412
10	HexNAc2Hex6	1783,9	42,632
13	HexNAc4Hex3Fuc1	1835,9	6,886
17	HexNAc2Hex7	1988,0	39,590
26	HexNAc2Hex8	2192,1	14,592
28	HexNAc4Hex5Fuc1	2244,1	7,350
29	HexNAc5Hex4Fuc1	2285,1	2,750
35	HexNAc2Hex9	2396,2	11,835
46	HexNAc4Hex5Fuc1NeuAc1	2605,3	7,604
54	HexNAc4Hex5NeuAc2	2792,4	2,413
60	HexNAc4Hex5Fuc1NeuAc2	2966,5	7,828
75	HexNAc5Hex6NeuAc3	3602,8	3,153

\* massa exata íon metilado [M+Na]<sup>+</sup>, em Daltons.

As composições oligomanosídicas n° 6- HexNAc2Hex5 e n° 10- HexNAc2Hex6 apresentaram alteração consistente nas aquisições e foram detectadas em maior intensidade no tecido tumoral em relação ao tecido colônico normal (teste de Wilcoxon,  $\alpha=0,05$ ). Gráfico 3.

Gráfico 3- Mediana e valores intervalares da área  $\text{CH}_3/\text{CD}_3$  das duas composições alteradas no tecido tumoral em relação ao tecido normal dos pacientes com tumor (n=13), pelo método MALDI-TOF-MS



#### 4.6.2 Análise LC-MS/MS

A tabela 11 apresenta os valores da relação entre as áreas  $\text{CH}_3/\text{CD}_3$  correspondentes às intensidades dos sinais de íons identificados na amostra do tecido tumoral e do tecido normal de um paciente com adenocarcinoma de cólon localizado em cólon transversal.

Os valores das relações de área dos 35 sinais de íon identificados e individualizados por paciente estão descritos no APÊNDICE J.

**Tabela 11.** Conjunto dos valores das áreas CH<sub>3</sub>/CD<sub>3</sub> dos 24 sinais de íon utilizados para análise quantitativa, identificados no tecido tumoral e no tecido normal de um paciente com adenocarcinoma de cólon localizado em cólon transversal, estadiamento II (pT3N0) e com mutação no oncogene *KRAS*. Método LC-MS

Nº	Composição	Íon (m/z) Metilado*	Área (CH <sub>3</sub> /CD <sub>3</sub> )	Nº	Composição	Íon (m/z) Metilado*	Área (CH <sub>3</sub> /CD <sub>3</sub> )
6	HexNAc2Hex5	1579,7826	0,557	38	HexNAc5Hex4NeuAc1	1247,6123	140,696
13	HexNAc4Hex3Fuc1	929,4571	0,837	43	HexNAc7Hex3Fuc1	1297,1465	20,099
17	HexNAc2Hex7	1005,4857	0,057	44	HexNAc2Hex10	1311,6353	12,647
20	HexNAc4Hex4Fuc1	1031,5070	249,312	45	HexNAc7Hex4	1312,1518	26,123
23	HexNAc5Hex4	1067,0255	167,476	46	HexNAc4Hex5Fuc1NeuAc1	1314,1437	46,274
25	HexNAc3Hex5NeuAc1	1104,5359	2,800	54	HexNAc4Hex5NeuAc2	1407,6859	10,090
26	HexNAc2Hex8	1107,5356	10,625	59	HexNAc6Hex6Fuc1	994,8184	15,448
27	HexNAc4Hex4NeuAc1	1125,0492	40,701	67	HexNAc5Hex5Fuc1NeuAc2	1617,2937	7,488
28	HexNAc4Hex5Fuc1	1133,5568	1,564	70	HexNAc6Hex7Fuc2	1669,8275	9,619
29	HexNAc5Hex4Fuc1	1154,0701	51,491	73	HexNAc7Hex8	1154,5640	1,356
35	HexNAc2Hex9	1209,5855	92,226	77	HexNAc6Hex7NeuAc2	1245,6044	4,401
37	HexNAc4Hex5NeuAc1	1227,0991	12,828	85	HexNAc6Hex7Fuc1NeuAc4	1164,0597	1,573

Onze composições apresentaram alteração consistente no tecido tumoral em relação ao tecido normal no grupo de pacientes do estudo (n=13, teste de probabilidade binomial, p<0,005). Tabela 12.

**Tabela 12.** Relação quantitativa das áreas CH<sub>3</sub>/CD<sub>3</sub> dos 11 sinais de íon consistentemente alterados no tecido dos pacientes com câncer de cólon, LC-MS/MS.

Nº	Paciente													mediana	Íon alterado /total	p*
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13			
17	0,057	0,006	0,029	<b>0,016</b>	<b>0,026</b>	<b>0,004</b>	<b>0,026</b>	<b>0,023</b>	<b>0,008</b>	<b>0,113</b>	<b>0,009</b>	0,706	0,074	0,02	8/8	0.0000
23	<b>167,476</b>	<b>53,172</b>	<b>31,467</b>	<b>38,231</b>	<b>84,416</b>	0,019	<b>7,417</b>	<b>110,193</b>	<b>1,436</b>	<b>4,607</b>	<b>6,393</b>	5,633	<b>136,412</b>	38,23	11/11	0.0000
27	<b>40,701</b>	<b>31,470</b>	<b>11,408</b>	<b>10,341</b>	<b>5,258</b>	0,007	<b>1,641</b>	<b>24,580</b>	0,229	1,374	<b>3,432</b>	4,570	<b>26,694</b>	11,41	9/9	0.0000
29	<b>51,491</b>	<b>17,163</b>	<b>46,896</b>	13,545	<b>4,199</b>	0,131	0,446	<b>43,477</b>	<b>0,790</b>	<b>1,840</b>	<b>5,271</b>	0,599	<b>19,553</b>	17,16	8/9	0.0020
35	<b>92,226</b>	<b>116,517</b>	<b>86,935</b>	<b>65,257</b>	<b>5,536</b>	1,446	<b>4,448</b>	<b>32,665</b>	<b>0,524</b>	1,148	<b>16,759</b>	1,806	<b>123,432</b>	48,96	9/10	0.0010
38	<b>140,696</b>	<b>113,151</b>	<b>59,975</b>	<b>142,749</b>	<b>17,231</b>	<b>0,065</b>	<b>1,976</b>	<b>35,804</b>	<b>0,775</b>	<b>1,699</b>	<b>56,291</b>	17,168	<b>587,412</b>	46,05	10/12	0.0032
43	<b>20,099</b>	<b>26,127</b>	<b>21,005</b>	<b>10,269</b>	<b>27,085</b>	0,075	2,272	<b>20,102</b>	0,236	1,040	<b>4,519</b>	0,159	<b>59,210</b>	20,55	8/8	0.0000
45	<b>26,123</b>	<b>10,944</b>	<b>25,557</b>	<b>6,743</b>	0,287	<b>0,010</b>	<b>1,340</b>	<b>7,671</b>	<b>0,402</b>	<b>1,056</b>	<b>1,911</b>	10,311	<b>14,292</b>	6,74	9/11	0.0059
59	<b>15,448</b>	<b>12,130</b>	<b>43,483</b>	<b>12,634</b>	<b>6,199</b>	<b>2,524</b>	<b>1,758</b>	<b>7,291</b>	<b>0,972</b>	<b>2,319</b>	<b>4,516</b>	<b>1,759</b>	<b>26,012</b>	5,36	11/12	0.0002
67	<b>7,488</b>	<b>24,865</b>	<b>6,606</b>	<b>14,674</b>	8,026	<b>0,622</b>	7,785	3,751	<b>0,455</b>	<b>2,540</b>	<b>11,358</b>	1,185	<b>19,282</b>	7,49	7/9	0.0195
70	<b>9,619</b>	<b>7,771</b>	<b>5,742</b>	<b>23,825</b>	<b>16,496</b>	0,137	1,404	<b>13,979</b>	0,120	0,719	9,243	3,618	<b>5,505</b>	9,62	7/7	0.0000

\*teste de probabilidade binomial, em negrito íons com sinal/ruído >1.000

A composição nº 17- HexNAc2Hex7 foi identificada como diminuída no tecido tumoral em relação ao tecido normal, enquanto 10 composições foram identificadas como aumentadas no tecido tumoral (teste de Wilcoxon,  $p < 0,01$ ).

O sinal de íon que correspondia à forma rica em manose nº 35- HexNAc2Hex9  $[M+2Na]^{2+}=1209,5855$  Da foi a composição que apresentou o maior aumento quantitativo, cerca de 50 vezes maior no tecido tumoral em relação ao tecido normal.

Nove formas complexas foram identificadas em maior concentração no tecido tumoral, algumas com fucosilação central, das quais 5 eram composições biantenárias, nº 23- HexNAc5Hex4, nº 27- HexNAc4Hex4NeuAc1, nº 29- HexNAc5Hex4Fuc1, nº 38- HexNAc5Hex4NeuAc1 e nº 67- HexNAc5Hex5Fuc1NeuAc2.

Quatro composições correspondiam às formas multi-antena, nº 43- HexNAc7Hex3Fuc1, nº 45- HexNAc7Hex4, nº 59- HexNAc6Hex6Fuc1 e nº 70- HexNAc6Hex7Fuc2, dentre as quais o sinal de íon nº 43- HexNAc7Hex3Fuc1  $[M+2Na]^{2+}=1297,1465$  Da foi o que apresentou o maior aumento quantitativo no tecido tumoral.

A figura 29 representa a distribuição em gráfico de caixa "box-plot" dos valores intervalares e mediana das áreas  $CH_3/CD_3$  dos 11 sinais de íons alterados nas amostras de tecido pelo método LC-MS/MS.

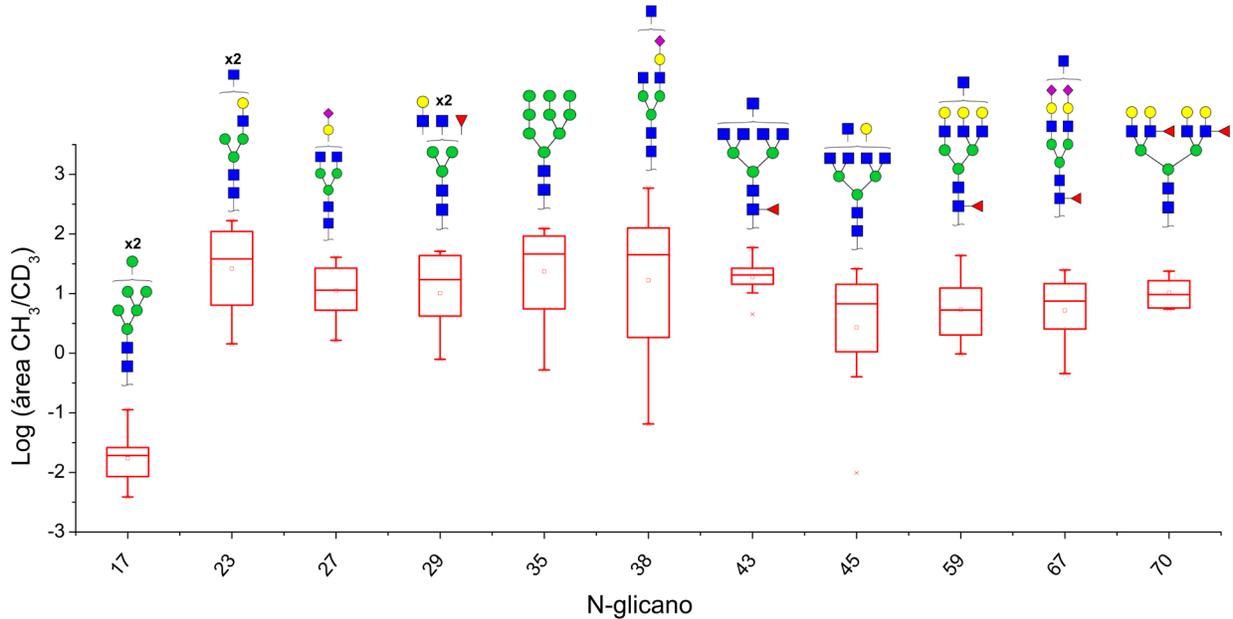
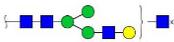
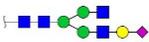
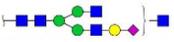
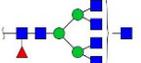
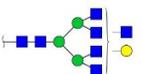
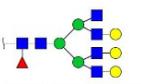


Figura 29. Distribuição em "box-plot" dos valores das razões de área  $CH_3/CD_3$  dos 11 sinais de íon diferentemente expressos no tecido tumoral em relação ao tecido normal. Método LC-MS/MS. Teste de Wilcoxon,  $\alpha=0,01$ .

#### 4.7 CORRELAÇÃO ENTRE O PERFIL DE N-GLICOSILAÇÃO NO SORO E NO TECIDO DOS PACIENTES COM CÂNCER DE CÓLON

Oito sinais de íon identificados pelo método LC-MS/MS estavam quantitativamente alterados tanto no soro quanto no tecido tumoral dos pacientes com câncer de cólon. Nenhuma composição apresentou distribuição quantitativa coincidente, presente nas amostras de soro e de tecido. Tabela 13.

**Tabela 13.** Correlação entre as relações das áreas CH<sub>3</sub>/CD<sub>3</sub> dos 8 sinais de íon identificados alterados no soro e no tecido tumoral dos pacientes com câncer de cólon (n=13).

Nº	Composição	Estrutura proposta	Correlação de áreas CH <sub>3</sub> /CD <sub>3</sub>	
			Soro	Tecido
17	HexNac2Hex7		Aumentada	Diminuída
23	HexNac5Hex4		Diminuída	Aumentada
27	HexNac4Hex4NeuAc1		Diminuída	Aumentada
35	HexNac2Hex9		Diminuída	Aumentada
38	HexNac5Hex4NeuAc1		Diminuída	Aumentada
43	HexNac7Hex3Fuc1		Diminuída	Aumentada
45	HexNac7Hex4		Diminuída	Aumentada
59	HexNac6Hex6Fuc1		Diminuída	Aumentada

## 5. DISCUSSÃO

No Brasil, tem sido identificada nas últimas décadas uma tendência de aumento progressivo tanto da incidência quanto da mortalidade relacionadas ao câncer colorretal (CCR) em contraponto ao observado em países desenvolvidos (FERLAY ET AL, 2019; KEUM & GIOVANNUCCI, 2019).

De acordo com o Instituto Nacional de Câncer do Ministério da Saúde (INCA), a expectativa para a incidência do CCR no triênio de 2020-22 é de 20.520 novos casos por ano para homens e 20.470 novos casos por ano para mulheres, situando-o como o segundo tumor em incidência por estados e capitais (Instituto Nacional de Câncer-INCA, 2020).

Some-se a isso, o envelhecimento crescente da população brasileira, com o número de pessoas acima de 60 anos estimada para 2030 em mais de 42 milhões de habitantes segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), o que projeta um cenário no qual, em breve, o CCR pode se transformar em um problema de saúde pública. (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA, 2020).

Assim, um melhor entendimento dos fenômenos envolvidos no surgimento e no comportamento dessa doença se torna cada vez mais necessário. Através dessa compreensão, a descoberta de novos marcadores tumorais, utilizados isoladamente ou em conjunto com os métodos de rastreamento e tratamento disponíveis, pode servir como ferramenta no diagnóstico e prognóstico com impacto na incidência dos tumores e na sobrevivência dos pacientes (ARNOLD ET AL, 2008; BONES ET AL, 2010; deVROOME ET AL, 2018; DOHERTY ET AL, 2018; VUCKOVIC ET AL, 2016).

Nesse mister, esta tese procurou estudar o perfil de N-glicosilação das glicoproteínas presentes no soro de pacientes com diagnóstico de adenocarcinoma de cólon em comparação com o perfil de N-glicosilação do soro de indivíduos saudáveis, como um potencial biomarcador para fins diagnósticos, através da aplicação da tecnologia de espectrometria de massas (EM) como método de quantificação de N-glicanos.

Como objetivo secundário, foi estudado o perfil da N-glicosilação no tecido tumoral, no intuito de determinar a correlação entre as modificações observadas no soro e no tecido dos pacientes com câncer.

Através de análise por EM pelos métodos MALDI-TOF/MS e ESI-LC-MS/MS pode-se determinar que pacientes com câncer de cólon esporádico apresentaram um perfil de N-glicosilação das glicoproteínas do soro diferente do perfil de N-glicosilação de indivíduos saudáveis. Na análise por LC-MS/MS, esse perfil se caracterizou pela diminuição global de composições de N-glicanos no soro de pacientes com tumor.

Ao se utilizar um modelo estatístico não hierárquico de agrupamento por semelhança, o perfil de N-glicosilação total do soro foi capaz de corretamente discriminar mais de 85% dos pacientes com câncer em relação aos indivíduos saudáveis.

Este estudo identificou ainda que o perfil de N-glicosilação no tecido tumoral, embora altamente heterogêneo, apresentou um padrão consistente nos tumores e diverso do apresentado pelo tecido colônico normal, não tumoral.

Por fim, o perfil de N-glicanos do tecido tumoral não apresentou correlação com o perfil de N-glicanos observado no soro dos pacientes com câncer, o que suscita a questão da origem das composições identificadas no soro.

Embora todos os tumores tenham como base fisiopatológica fenômenos genéticos ou epigenéticos, o câncer é na maioria das vezes o resultado dos efeitos cumulativos de diversos fatores ambientais sobre o genoma celular, que pode ser ou não um genótipo suscetível (CARETHERS & JUNG, 2015; HANAHAN & WEINBERG, 2011; SONDKA ET AL, 2018).

No CCR, define-se como genótipo suscetível duas situações principais: nos casos de pacientes que herdaram mutações patogênicas em um dos alelos de genes com alta penetrância para o surgimento do CCR, ou nos casos de pacientes portadores de alterações inflamatórias crônicas do cólon e no reto, como as encontradas na doença inflamatória intestinal (DII), em que as altas taxas de proliferação celular epitelial regenerativa levam à instabilidade cromossômica (IC) propiciando perdas cromossômicas, deleções e inserções. (CARETHERS & JUNG, 2015; FARRAYE ET AL, 2010; FEARON & VOLGESTEIN, 1990; LYNCH, 1966).

Essas duas situações respondem em conjunto, por apenas 5% de todos os adenocarcinomas colorretais. Assim, 95% dos casos de adenocarcinomas colorretais surgiriam por predomínio da influência de fatores externos, ditos esporádicos (KEUM & GIOVANNUCCI, 2019).

Cabe notar que em até um terço dos casos classificados como esporádicos, pode-se observar uma tendência familiar ao surgimento de casos de CCR, em parentes de 1º ou 2º grau e mesmo em mais de uma geração.

Nessas famílias, o risco relativo de parentes de 1º ou 2º grau em desenvolver um câncer ao longo da vida, pode ser de 2 a 4 vezes maior que o risco na população em geral, que é da ordem de 5%, aumentando para até 6 vezes a depender da idade do diagnóstico do caso índice de CCR (KEUM & GIOVANNUCCI, 2019; MONAHAM ET AL, 2019).

Não é claro se esses casos familiares se devam à predisposição genética decorrente de mutações herdadas em genes de menor penetrância ou a fatores genuinamente ambientais, comuns à essas famílias e que, por sua vez, levariam às alterações epigenéticas predisponentes ao surgimento do CCR (HARDIMAN, 2018).

Dessa forma, a análise fenotípica dos tumores colorretais pode oferecer informações relevantes a respeito das vias envolvidas na carcinogênese, que podem indicar maior ou menor influência ambiental ou familiar.

As vias da carcinogênese no câncer colorretal são atualmente descritas como: via de instabilidade cromossomal (IC), via de instabilidade microssatélite (do inglês, “MSI”) e via por hipermetilação de ilhas de CpG, ou fenótipo metilador (do inglês, “CIMP”).

Apesar de haver algum grau de sobreposição entre elas, essas três vias possuem sequência de mutações genéticas e patogênese distintas e bem definidas (DIETENSMAN ET AL, 2015; FEARON & VOLGESTEIN, 1990; GONZALEZ ET AL, 2017; THIBODEAU ET AL, 1993; TOYOTA ET AL, 1999).

Cerca de 85% dos tumores colorretais apresentam padrão de instabilidade cromossomal (IC). Os restantes 15% são classificados como microssatélite instáveis (MSI), isto é, são tumores que apresentam erros não reparados da duplicação do DNA em sequências repetidas de nucleotídeos, conhecidas como microssatélites.

Os tumores com alta instabilidade microssatélite (do inglês, “high microsatellite instability”, MSI-H) podem em até ¼ dos casos ser decorrentes de mutações germinativas patogênicas nos genes de reparo do DNA, conhecida como Sd. de Lynch (GONZALEZ ET AL, 2017; THIBODEAU ET AL, 1993).

Por outro lado, 75% dos casos de tumores MSI são decorrentes de modificações somáticas nos tumores, muitas vezes devido à mutação somática bialélica ou à hipermetilação em genes de reparo do DNA (MENSENKAMP ET AL, 2014).

De fato, há grande sobreposição entre essa última via (MSI) e a via CIMP, na qual cerca de 70% dos tumores MSI possuem também o fenótipo metilador. Nesses casos, a hipermetilação de sequência promotoras de genes das proteínas de reparo do DNA como do

gene *MLH1* acarretariam o seu silenciamento e, portanto, levariam ao acúmulo de mutações nas regiões de microssatélites (DIETENSMAN ET AL, 2015; MONAHAN ET AL, 2020; SINICROPE ET AL, 2012; TOYOTA ET AL, 1999).

Com o objetivo de uniformizar a casuística e minimizar a influência de sd. genéticas como subjacentes à patogênese dos tumores, foram estudados nesta tese apenas pacientes com tumores de cólon esporádicos e que não possuísem mutações germinativas patogênicas em um painel de 37 genes relacionados com o CCR.

Portanto, foi definido como tumor esporádico, a ausência de história familiar de câncer colorretal ou história familiar em apenas um parente de primeiro grau, com idade ao diagnóstico acima de 50 anos (MONAHAN ET AL, 2020) e cujos tumores foram histologicamente classificados como microssatélite estáveis (MSS) e não originários em casos de doença inflamatória intestinal.

Não foram incluídos no estudo casos de adenocarcinomas do reto. Uma vez que pacientes com tumores de reto em estádios II e III recebem, na sua grande maioria, neoadjuvância com radio e quimioterapia como parte do tratamento, julgou-se que qualquer procedimento local diretamente sobre o tecido tumoral realizado antes da operação, teria relevante interferência na N-glicosilação tecidual (LEE ET AL, 2010; SAUER ET AL, 2004).

Considerou-se ainda, que tumores no estadio I (pT1N0 e pT2N0), por estarem restritos à parede do órgão, poderiam não induzir uma resposta inflamatória sistêmica capaz de causar modificação detectável no N-glicoma do soro.

De fato, um estudo recente por meio de análise através de cromatografia líquida, identificou uma diminuição global de N-glicanos no soro em pacientes com CCR, mormente em composições relacionadas à glicosilação das proteínas de fase inflamatória aguda. Entretanto, essas alterações não foram identificadas em pacientes do estadio I, o que, segundo os autores, sugere a ausência de resposta inflamatória sistêmica suficiente para alterar o perfil de N-glicanos, nesses casos iniciais de doença local (DOHERTY ET AL, 2018).

De modo similar, não foram incluídos no estudo pacientes com doença metastática, estadio IV. Aqui, ao contrário do estadio I, a presença de doença disseminada desencadearia uma intensa reação inflamatória sistêmica, acarretando uma extrema subversão na glicosilação das proteínas plasmáticas, e portanto, com pouca utilidade clínica para diagnóstico.

Na primeira fase do estudo, foram analisados e quantificados através de duas técnicas de espectrometria de massas (EM) os N-glicanos presentes nas glicoproteínas totais do soro de

pacientes com câncer de cólon, comparados com os N-glicanos presentes nas glicoproteínas totais do soro de indivíduos saudáveis.

A N-glicosilação é um fenômeno altamente conservado em mamíferos e que, apesar de geneticamente determinado, é muito sensível às modificações do ambiente extracelular (HONG ET AL, 2015; MOREMEN ET AL, 2012).

Na verdade, as modificações pós-traducionais são um recurso evolutivo de adaptação às mudanças do ambiente de caráter intrageracional, o que confere aos organismos maior plasticidade e rapidez em se adequar a um novo microambiente, sem necessariamente demandar alterações genéticas ou epigenéticas, mais eficazes para a adaptação a longo prazo (LAUC & ZOLDOŠ, 2010).

Portanto, a N-glicosilação das glicoproteínas presentes no soro de pacientes com câncer reflete um aspecto fenotípico mais imediato das alterações fisiológicas, as quais um organismo ou um tecido estejam sujeitos (AIZPURUA-OLAIZOLA ET AL, 2018; KAILEMIA ET AL, 2017; LAUC & ZOLDOŠ, 2010; VREEKER ET AL, 2020).

Apesar do repertório de N-glicanos possíveis poder chegar à quase 2000 composições diferentes em humanos (CUMMINGS, 2009), estudos recentes têm demonstrado que a depender da função biológica e do método analítico utilizado, pouco mais de 100 composições diferentes têm sido consistentemente identificadas em maior abundância no soro humano (ALDREDGE ET AL, 2012; CLERC ET AL, 2016; SONG ET AL, 2015).

À exceção da albumina, todas as demais proteínas são glicosiladas. Através do uso individual ou combinado de métodos micro-analíticos como p. ex. eletroforese capilar, afinidade de composições mediada por lectinas, cromatografia líquida e espectrometria de massas, têm se evidenciado um padrão relativamente constante e reprodutível na composição dos N-glicanos, no que se pode chamar de N-glicosilação normal do soro humano (ALDREDGE ET AL, 2012; CLERC ET AL, 2016; GORNIK ET AL, 2009; KITA ET AL, 2007; KLEIN 2008; KNEŽEVIĆ ET AL, 2010; KRIŠTIĆ ET AL, 2013; KRONEWITTER ET AL, 2009; PUČIĆ ET AL, 2011; REIDING ET AL, 2016; SONG ET AL, 2015; WUHRER ET AL, 2007).

Nesta tese, foram utilizados dois métodos de espectrometria de massas para detecção de N-glicanos no soro (MALDI-TOF-MS) e para identificação e quantificação das estruturas (ESI-LC-MS/MS), os quais permitiram a identificação de 90 composições diferentes.

Na análise por EM, MALDI-TOF-MS, 33 sinais de íons monocarregados  $[M+Na]^+$ , que correspondiam à composições de N-glicanos, foram detectados no soro dos pacientes com câncer e dos controles.

Por sua vez, na análise por EM, ESI-LC-MS 90 composições ionizadas em sua maioria com dupla carga positiva foram identificadas no soro dos pacientes com câncer e dos controles.

O número de composições identificados pelos dois métodos de espectrometria de massas (EM) nesta tese estão em concordância com os estudos de quantificação de N-glicanos do soro por EM, o que indica adequada representatividade e robustez dos resultados no uso dos N-glicanos como fonte de marcadores para doença (ALDREDGE ET AL, 2012; CLERC ET AL, 2016; GORNIK ET AL, 2009; KITA ET AL, 2007; KLEIN 2008; KNEŽEVIĆ ET AL, 2010; KRIŠTIĆ ET AL, 2013; KRONEWITTER ET AL, 2009; PUČIĆ ET AL, 2011; REIDING ET AL, 2017; SONG ET AL, 2015; WUHRER ET AL, 2007).

KITA ET AL analisaram pelo método MALDI-MS, em condições experimentais muito semelhantes às desta tese, os N-glicanos extraídos de todas as glicoproteínas do soro de indivíduos saudáveis. Os autores detectaram 34 composições diferentes e propuseram um perfil qualitativo e quantitativo da N-glicosilação do soro humano (KITA ET AL, 2007).

ALDREDGE ET AL utilizaram tecnologia microanalítica nanoLC-MS/MS para detecção de N-glicanos não derivatizados no soro humano e compuseram uma biblioteca com cerca de 70 estruturas provenientes de 8 glicoproteínas, com N-glicosilação previamente conhecida (ALDREDGE ET AL, 2012).

SONG ET AL, em análise complementar a esse estudo acrescentaram ao N-glicoma do soro humano um maior número de composições, totalizando mais de 100 N-glicanos com completa resolução estrutural, massa acurada e tempo de retenção padronizados, através da comparação entre o soro de indivíduos saudáveis e amostras de glicoproteínas sintéticas (SONG ET AL, 2015).

Estes autores observaram ainda que a abundância de N-glicanos no soro é amplamente distribuída, onde os 20 N-glicanos mais abundantes respondem por cerca de 52% de todas as composições presentes. Como exemplo, a composição bi-antênaria, digalactosilada e disializada HexNac4Hex5NeuAc2, que é a composição presente em maior quantidade no soro humano, corresponde a cerca de 10% da abundância de todas as estruturas identificadas (SONG ET AL, 2015).

De acordo com o conhecimento atual, as 90 composições identificadas neste estudo representaram em variedade, a maior parte das composições conhecidas no soro humano, catalogadas pelas tecnologias hífenadas de espectrometria de massas com cromatografia líquida (ALDREDGE ET AL, 2012; CLERC ET AL, 2016; DE VROOME ET AL, 2018; REIDING ET AL, 2016; SONG ET AL, 2015).

Após sua ligação nos sítios de glicosilação das proteínas, a síntese dos N-glicanos ocorre no retículo endoplasmático e no complexo de Golgi, onde é orquestrada pela ação de diversas glicosidases e glicosiltransferases que embora estejam sob restrito controle genético, são também influenciadas por agentes ambientais (MOREMEM ET AL, 2012; VARKI ET AL, 2017).

Dessa forma, fatores como idade, sexo, índice de massa corporal (IMC) e tabagismo foram descritos como responsáveis por parte da variação observada em composições específicas entre indivíduos saudáveis (GORNIK ET AL, 2009; KNEŽEVIĆ ET AL, 2009; KNEŽEVIĆ ET AL, 2010; KRIŠTIĆ ET AL, 2013; PUČIĆ ET AL, 2011; REIDING ET AL, 2016).

KNEŽEVIĆ ET AL estudaram por método de cromatografia líquida os N-glicanos do soro de uma população de mais de 1.000 indivíduos. Os autores observaram que grupos de N-glicanos possuíam variações da ordem de até 50% em concentração para algumas composições, apesar de apenas 10% da variabilidade poder ser atribuída à idade ou ao sexo.

Em estudo de seguimento dessa mesma população, os autores atribuíram efeito ainda menor do ambiente, cerca de 5 %, quando relacionado à idade, sexo, dieta, perfil lipídico e tabagismo, sugerindo que hereditariedade ou efeitos de doenças seriam os grandes responsáveis pelas variações séricas observadas nos N-glicanos no soro da população (KNEŽEVIĆ ET AL, 2009; KNEŽEVIĆ ET AL, 2010).

Esse efeito é mais evidente e relevante quando se analisa a N-glicosilação de glicoproteínas específicas no soro, como as imunoglobulinas G (IgGs). A variabilidade observada no perfil dessa glicoproteína em indivíduos saudáveis é cerca de 3 vezes maior que a variabilidade de todas as glicoproteínas séricas, com um progressivo aumento de N-glicanos agalactosilados com o envelhecimento, mais evidente em mulheres na menopausa, isto é, a partir da sexta década de vida (50-59 anos) (KRIŠTIĆ ET AL, 2013; PUČIĆ ET AL, 2011).

Apesar dessas variações, a análise temporal em indivíduos saudáveis tem demonstrado alta estabilidade do N-glicoma do soro humano, mesmo em análises com intervalo de até 6 anos,

indicando um estrito controle genético (GORNIK ET AL, 2009; HENNIG ET AL, 2016; HONG ET AL, 2015).

Portanto, para reduzir o viés da influência dos fatores ambientais na variação fisiológica de N-glicanos no soro, utilizou-se nesta tese como grupo controle indivíduos não tabagistas, cujos exames endoscópicos eram normais, sem doenças inflamatórias sistêmicas e não diabéticos.

Não houve diferença estatística entre a média de idade e o número de homens e mulheres entre os grupos, o que indica uma distribuição similar do efeito dessas variáveis sobre a N-glicosilação para os grupos do estudo.

Ainda em atenção às variações da N-glicosilação do soro da população normal, foi utilizado um controle interno composto pelo conjunto de N-glicanos presentes no soro de todos os indivíduos saudáveis, de modo a normalizar as quantificações entre casos e controles.

Para a quantificação relativa, os N-glicanos presentes no soro de pacientes com câncer e, de modo semelhante, no soro de indivíduos saudáveis foram derivatizados com iodometano ( $\text{CH}_3$ ).

Por sua vez, os mesmos N-glicanos presentes no conjunto do soro de todos os controles normais foram derivatizados com o isótopo pesado do iodometano, o iodometano deuterado ( $\text{CD}_3$ ) (BARBOSA ET AL, 2019; ETXEBARRIA & REICHARDT, 2016; MOH ET AL, 2015).

Na análise por EM MALDI-TOF-MS e LC-MS/MS, os N-glicanos do soro de cada paciente com câncer foram adquiridos conjuntamente aos N-glicanos presentes no conjunto do soro de controles, em uma única aquisição por paciente.

De modo análogo, os N-glicanos do soro de cada controle saudável foram adquiridos conjuntamente aos N-glicanos presentes no conjunto do soro de controles, em uma única aquisição por indivíduo, perfazendo um total de 24 aquisições.

Por esse método, eliminou-se o viés por interferência na intensidade dos sinais identificados como decorrência de flutuações, p. ex., no grau de ionização das estruturas, intensidade do laser, condições da coluna de cromatografia e temperatura, nas aquisições em momentos diferentes (ATWOOD ET AL, 2008; PABST ET AL, 2008).

Apesar de não possibilitar a quantificação absoluta das composições, essa metodologia permitiu a avaliação qualitativa e quantitativa relativas, em iguais volumes de soro analisado.

É importante ressaltar que a quantificação das composições baseada na intensidade da razão  $\text{CH}_3/\text{CD}_3$  normalizada pode indicar além de alteração dos N-glicanos propriamente ditos,

modificações quantitativas das glicoproteínas às quais as composições estavam ligadas ou ainda, das duas situações em conjunto (KUZMANOV ET AL, 2013).

Esta tese teve como objetivo identificar, dentre os N-glicanos extraídos das glicoproteínas presentes no soro de pacientes com CCR, qual teria potencial em servir como marcador sérico de doença, independentemente da proteína de origem.

Alterações em diversas glicoproteínas no soro de pacientes com CCR têm sido descritas, com ampla variação de concentração entre elas (CHEN ET AL, 2020; SAJIC ET AL, 2018; SURINOVA ET AL, 2015)

Adicionalmente, à exceção das imunoglobulinas G (IgGs), a maioria das glicoproteínas possuem mais de um sítio de glicosilação, os quais estão frequentemente decorados com mais de um subtipo de glicano, fenômeno conhecido como microheterogeneidade, o que torna virtualmente impossível na análise de todas as glicoproteínas séricas, a inferência direta glicano-glicoproteína, mesmo após a quantificação protéica (CLERC ET AL, 2016; KLEIN ET AL, 2008; SONG ET AL, 2015).

Portanto e para fins desta tese, considerou-se que a quantificação protéica traria pouco acréscimo como informação adicional.

Na verdade, este método está em acordo com estudos comparativos entre a N-glicosilação de glicoproteínas totais no soro de pacientes com CCR, cujo objeto de análise se restringiu à avaliação de N-glicanos (DE VROOME ET AL, 2018; QIU ET AL, 2008; ZHAO ET AL, 2012).

Não obstante, como forma de minimizar o efeito da variação protéica, procedeu-se à análise estatística para a quantificação das composições entre os grupos, após a criação de uma razão iônica entre o valor de  $CH_3/CD_3$  de cada íon identificado e o valor de  $CH_3/CD_3$  do íon  $n^\circ$  54- HexNAc4Hex5NeuAc2, para cada paciente com câncer e para cada controle sadio.

Esse íon foi o sinal de íon mais intenso, identificado em todas as aquisições e cuja análise comparativa, antes da razão iônica, não revelou diferença quantitativa entre pacientes com câncer e controles sadios.

As condições experimentais deste estudo permitiram a identificação, por EM MALDI-TOF-MS, de 33 composições e, por EM LC-MS, de 90 composições diferentes de N-glicanos, presentes no soro de pacientes e de indivíduos sadios.

Contudo, foram consideradas para quantificação apenas 29 e 53 dessas composições, respectivamente. Essas estruturas apresentaram análise LC-MS/MS dos fragmentos de íons, de

ao menos uma forma metilada ou deuterada, com intensidade de sinal suficiente para mínima resolução estrutural.

Este estudo procurou analisar composições individuais, no lugar da análise de conjuntos de glicanos, de modo a obter informação com maior significado biológico.

Ao se direcionar a análise dos N-glicanos para o nível composicional e para algum traço particular da estrutura, se poderia, p. ex., inferir a via enzimática envolvida no processo de síntese do N-glicano alterado e sua relação com a carcinogênese no CCR.

No nosso estudo, a análise por EM MALDI-TOF-MS detectou um íon, n° 51-HexNAc5Hex5NeuAc1, com maior intensidade de sinal relativa no soro de pacientes com câncer, de modo estatisticamente significante.

Por sua vez, a análise por EM ESI-LC-MS/MS, revelou um padrão heterogêneo de composições, caracterizado principalmente por uma diminuição de N-glicanos no soro de pacientes com câncer de cólon em relação à expressão no soro de indivíduos saudáveis.

Vinte e seis composições apresentaram diferenças quantitativas das quais, 23 estavam diminuídas no soro de pacientes com câncer de cólon em relação ao grupo controle. Em particular, a composição bi-antênaria monogalactosilada e não sializada n° 23- HexNAc5Hex4, foi a forma com a maior diminuição identificada no soro.

Esse padrão de diminuição de N-glicanos extraídos de todas as glicoproteínas no soro, tem sido relatado na literatura tanto em estudos de CCR quanto para outros tumores do trato digestivo, como p. ex. o adenocarcinoma gástrico (BONES ET AL, 2010; DE VROOME ET AL, 2018; DOHERTY ET AL, 2018; QIU ET AL, 2008; ZHAO ET AL, 2012).

BONES ET AL (2010) estudaram o perfil de N-glicosilação das 4 glicoproteínas mais abundantes do soro de pacientes com adenocarcinoma gástrico pelo método LC-UPLC (Ultra Performance Liquid Chromatography) e observaram redução na expressão de formas bi-antênarias asializadas ou monosializadas e com fucosilação central, à medida que os pacientes apresentavam estágios mais avançados da doença. Além disso, as formas disializadas e com fucosilação central apresentaram uma redução inicial em estádios I e II com progressivo aumento em estádio III e na doença metastática.

Por sua vez, estudos que analisaram o perfil global de N-glicanos do soro de pacientes com CCR têm igualmente demonstrado um padrão heterogêneo na distribuição das composições. Em geral, essas análises têm demonstrado uma diminuição global de formas bi-antena incompletas e com fucosilação central e, ao mesmo tempo, um aumento na sialização e

fucosilação em várias glicoproteínas, associado a um aumento de formas multi-antenas polisializadas e ricas em galactose (DOHERTY ET AL, 2018; QIU ET AL, 2008; ZHAO ET AL, 2012).

Deve-se notar que esses estudos além de utilizarem diferentes métodos de análise quantitativa de glicanos como eletroforese capilar, afinidade mediada por lectinas e cromatografia líquida exclusiva, têm igualmente analisado os N-glicanos presentes em frações de glicoproteínas no soro, o que pode em grande medida explicar os achados discrepantes em relação aos resultados do nosso estudo (QIU ET AL, 2008).

Até nosso conhecimento, apenas dois estudos avaliaram o perfil de N-glicosilação de todas as glicoproteínas do soro de pacientes com CCR com a utilização de metodologia microanalítica por espectrometria de massas, semelhante à empregada nesta tese (DE VROOME ET AL, 2018; SNYDER ET AL, 2016).

SNYDER ET AL (2016) em estudo com tecnologia por MALDI-TOF-MS e eletroforese observaram no soro de pacientes com CCR diminuição de formas bi-antênarias, digalactosiladas e com fucosilação central e aumento de formas com fucosilação antenária, como o antígeno Lewis X, composto pela  $\alpha$ -3 fucosilação da N-acetilglicosamina terminal, em especial, isômeros de composições tetra-antênarias.

No estudo de DE VROOME ET AL (2018), os autores identificaram por tecnologia MALDI-TOF-MS, 83 N-glicanos expressos no soro de pacientes com CCR e em controles sadios. Dessas, 20 composições apresentaram quantificação relativa com potencial de discriminar os casos dos controles.

De modo similar aos nossos resultados, esses trabalhos observaram um padrão heterogêneo na N-glicosilação composto de uma diminuição de algumas composições como p. ex. formas bi-antena incompletas (mono- ou asializadas) e com fucosilação central e, por outro lado, aumento de formas tri-, tetra-antênarias e sializadas, em especial, composições com fucosilação antenária como o antígeno sLewisX.

A despeito da maioria dos N-glicanos estar diminuída no soro dos pacientes com tumores, nenhum padrão especial foi observado quando classificamos as formas em ricas em manose, híbridas ou complexas.

Em nível composicional, foi observado o mesmo quanto ao número de antenas, grau de fucosilação ou sialização. Entretanto, excluídas as 3 formas ricas em manose n° 26-

HexNAc<sub>2</sub>Hex<sub>8</sub>, n° 35- HexNAc<sub>2</sub>Hex<sub>9</sub> e n° 44- HexNAc<sub>2</sub>Hex<sub>10</sub>, 17 das 20 composições diminuídas possuíam em sua estrutura ao menos um resíduo de galactose (● Gal).

Estudos prévios na análise do N-glicoma sérico total de pacientes com CCR identificaram um padrão de diminuição de formas galactosiladas, mormente bi-antênárias, associado ao aumento de formas tri e tetra-antena poligalactosiladas (DE VROOME ET AL, 2018; DOHERTY ET AL, 2018; DOTZ & WUHRER, 2019).

A despeito das limitações da associação direta glicano-glicoproteína, é lícito inferir qual possível glicoproteína ou grupo de proteínas podem ser responsáveis pelas alterações no perfil de N-glicanos expressos no soro dos pacientes com tumor.

Com o desenvolvimento dos métodos microanalíticos de alta performance, isto é, que permitem a análise simultânea de grande quantidade de composições diferentes, o conhecimento detalhado dos N-glicanos presentes nos sítios de glicosilação das proteínas do soro humano aumentou sobremaneira na última década (ALDREDGE ET AL, 2012; CLERC ET AL, 2016; HONG ET AL, 2015; KLEIN, 2008; SONG ET AL, 2015).

CLERC ET AL (2016) em trabalho seminal reuniram os dados da literatura sobre a análise do perfil de N-glicosilação do soro humano por vários métodos microanalíticos, em nível composicional e de microheterogeneidade das 24 glicoproteínas mais abundantes do soro, o que corresponde à 99% do total das glicoproteínas séricas.

As imunoglobulinas, em especial as IgGs são as glicoproteínas com maior concentração sérica. Possuem um único sítio de glicosilação na sua porção Fc localizado na asparagina 297 (Asn 297), que é na maioria das vezes N-glicosilada por formas bi-antênárias, mono, di- ou agalactosiladas e com fucosilação central (BÖHM ET AL, 2014; CLERC ET AL, 2016; HONG ET AL, 2015).

As imunoglobulinas são produzidas pelos linfócitos B em resposta ao reconhecimento de antígenos estranhos ao organismo, como p. ex as células tumorais, o que deflagra a resposta imunológica mediada por anticorpos. Mais importante, a propriedade pró- ou anti-inflamatória das IgGs é altamente regulada pela composição do N-glicano presente em seu sítio de glicosilação (BÖHM ET AL, 2014).

Sabe-se que a retirada da fucose central ou a redução do número de resíduos de galactose do glicano bi-antênario, muda a conformação terciária da porção Fc das IgGs aumentando sua atividade inflamatória na resposta mediada por anticorpos em até 100 vezes (ANTHONY & NIMMERJAHN, 2011).

Devido a essas propriedades, o perfil da N-glicosilação das IgGs tem sido objeto de estudo em doenças auto-imunes, como na artrite reumatóide e no câncer colorretal (LIU ET AL, 2021; PAREKH ET AL, 1985; THEODORATOU ET AL, 2016; VUCKOVIC ET AL, 2016).

Esses trabalhos têm demonstrado um padrão consistente de diminuição de formas bi-antena, galactosiladas, monosializadas e com fucosilação central, composições predominantemente encontradas nas imunoglobulinas G (IgGs) e em menor proporção nas haptoglobulinas.

Estudos que utilizaram CL (HILIC-Hydrophilic Interaction Chromatography) e MALDI-TOF/MS para caracterização da N-glicosilação das IgGs no soro de pacientes com CCR identificaram uma diminuição de composições bi-antenárias galactosiladas, sializadas e com fucosilação central, mormente das formas monosializadas (LIU ET AL, 2021; VUCKOVIC ET AL, 2016).

THEODORATOU ET AL (2016) associaram pior prognóstico à uma mudança no perfil de N-glicosilação das IgGs em uma coorte de mais de 1.000 pacientes com CCR. Os autores observaram uma progressiva redução na galactosilação e sialização associada ao aumento em formas bissectadas das IgGs, com consequente maior atividade inflamatória das imunoglobulinas, mais evidente no estadio IV da doença.

Conforme mencionado, nossos resultados demonstraram diminuição de composições bi-antenárias monosializadas n° 27- HexNAc4Hex4NeuAc1, n° 38- HexNAc5Hex4NeuAc1 e monosializadas com fucosilação central n° 32- HexNAc3Hex5Fuc1NeuAc1, n° 42- HexNAc3Hex6Fuc1NeuAc1 e n° 46- HexNAc4Hex5Fuc1NeuAc1. Dentre as estruturas galactosiladas e diminuídas identificadas no soro dos pacientes com tumor, a composição n° 23- HexNAc5Hex4 apresentou a maior redução quantitativa.

Essa composição é um N-glicano sem fucose na sua composição, bi-antena, asializado e com uma galactose na sua estrutura. Essa forma, dita neutra por não possuir ácidos siálicos, é predominantemente encontrada nas IgGs. A presença dos ácidos siálicos negativamente carregados conferem uma alteração estrutural importante nas IgGs com redução no efeito em sua função (SONDERMANN ET AL, 2013).

Não é totalmente conhecido o efeito dos N-glicanos na regulação da atividade inflamatória das IgGs. Em geral, a redução na sialização, na fucosilação e no número de resíduos de galactose dos N-glicanos das IgGs acarretam maior atividade inflamatória, o que

pode estar relacionado com a evolução e prognóstico do CCR (LAUC ET AL, 2016; LIU ET AL, 2021; THEODORATOU ET AL, 2016).

Portanto, a redução dessas composições no soro de pacientes com câncer de cólon pode indicar uma modificação na microheterogeneidade dos sítios de glicosilação de um grupo de glicoproteínas, como p. ex. as IgGs, com o efeito de privilegiar glicofomas de imunoglobulinas com maior atividade inflamatória.

Por esse raciocínio, durante o surgimento e a progressão da doença, modificações na N-glicosilação nos linfócitos B levariam ao aumento na síntese de glicofomas de IgGs com progressiva maior atividade pró-inflamatória que teria como função, maior efetividade na resposta imunológica contra o tumor (HASLAM ET AL, 2008; LAUC ET AL, 2016; RUDD ET AL, 2001).

No nosso estudo, a despeito da diminuição de formas bi-antenaárias galactosiladas, não foi identificado um aumento associado de formas tri- ou tetra-antenaárias galactosiladas.

Ao contrário, tanto as composições bi-antenaárias, quanto as composições tri- ou tetra-antenaárias poligalactosiladas estavam diminuídas no soro de pacientes com tumor, o que pode indicar uma diminuição global das composições que contenham galactose, relacionada à redução na síntese de glicoproteínas específicas ou à mudança na microheterogeneidade em seus sítios de glicosilação.

Em contraste à diminuição global dos N-glicanos galactosilados, 3 composições apresentaram quantificação aumentada de modo estatisticamente significativa, no soro de pacientes com câncer em relação aos controles sadios, as composições nº 17- HexNAc2Hex7, nº 60- HexNAc4Hex5Fuc1NeuAc2 e nº 82- HexNAc6Hex7NeuAc3.

A composição nº 17- HexNAc2Hex7 é um N-glicano rico em manose.

Os compostos ricos em manose são encontrados em menor proporção nas glicoproteínas do soro, em comparação com formas complexas e estão diferentemente distribuídos, de modo que as composições com 7 ou menos resíduos encontram-se habitualmente nas glicoproteínas  $\alpha$ -2-macroglobulina e na imunoglobulina M (IgM) enquanto as composições com 8 e 9 resíduos na apolipoproteína B-100 (CLERC ET AL, 2016; HONG ET AL, 2015).

Quando foi analisada a quantificação das formas ricas em manose em conjunto, pode-se observar um aumento da composição com 7 resíduos de manose associada à diminuição das composições com 10 (nº 44- HexNAc2Hex10), 9 (nº 35- HexNAc2Hex9) e 8 resíduos (nº 26- HexNAc2Hex8), além de quantificação semelhante das composições com 6 e 5 resíduos.

Durante a síntese dos N-glicanos ocorre a retirada progressiva de resíduos de manose por ação das  $\alpha$ -manosidases I (manose-8), IA (manose-7) e IB (manoses-5 e 6) até a formação da composição HexNac2Hex5 que serve como substrato para a síntese de formas híbridas ou complexas (MOREMEM ET AL, 2012; VARKI ET AL, 2017).

Dessa forma, especulamos que durante o processamento das formas ricas em manose, a ação sequencial de aumento e diminuição na atividade das manosidases, no tecido hepático e nos linfócitos B dos pacientes com câncer, levariam ao relativo acúmulo da composição com 7 resíduos de manose, em detrimento de formas com mais resíduos, sem alteração nas formas oligomanosídicas.

Por outro lado, não se pode excluir que as alterações nas concentrações das glicoproteínas  $\alpha$ -2-macroglobulina, IgM e apolipoproteína B-100, ou mesmo o predomínio de glicofomas decoradas com a composição n° 17- HexNac2Hex7, no soro de pacientes com CCR, estejam relacionadas com o aumento relativo dessa forma rica em manose.

De fato, alterações na concentração de apolipoproteína B-100 e nas IgMs têm sido observadas em pacientes com CCR, embora os efeitos da glicosilação na atividade das glicoproteínas não sejam conhecidos (CHANDLER ET AL, 2016; FITZGERALD ET AL, 2019).

A forma complexa fucosilada e disializada n° 60- HexNac4Hex5Fuc1NeuAc2 também apresentou maior quantificação sérica em pacientes com tumor.

Como já mencionado, as formas bi-antênárias e com fucosilação central, encontram-se predominantemente nos sítios de N-glicosilação das IgGs e em menor proporção de IgMs. Essas composições são em sua maioria formas com um ou dois resíduos de galactose, asializadas ou monosializadas, com efeito progressivamente pró-inflamatório sobre a atividade das imunoglobulinas à medida que são retirados os ácidos siálicos, os monômeros de galactose e a fucose central (ANTHONY & NIMMERJAHN, 2011; ARNOLD ET AL, 2007).

Por sua vez, o aumento da composição fucosilada, galactosilada e disializada nos sítios de glicosilação das IgGs exerce um efeito anti-inflamatório por modificação na estrutura do anticorpo (SONDERMANN ET AL, 2013).

Portanto, diferentemente da diminuição das formas bi-antênárias neutras, o aumento da expressão dessa composição disializada no soro pode refletir um fenômeno mais amplo na alteração da concentração de um grupo particular de glicoproteínas ou da microheterogeneidade nos seus sítios de glicosilação, não restrito às IgGs.

Ao contrário das composições asialo ou monosializadas, as formas disializadas derivam de outras proteínas do soro que não apenas da imunoglobulina G. Essas composições também podem ocupar os sítios de glicosilação das IgMs, uma imunoglobulina abundante no soro e que aumenta a sua concentração em condições de inflamação sistêmica (CLERC ET AL, 2016; PABST ET AL, 2015).

Finalmente, a composição tetra-antênaria e polisializada n° 82- HexNAc6Hex7NeuAc3 foi identificada aumentada no soro dos pacientes com tumor.

Formas multi-antena e polisializadas têm sido descritas no soro de pacientes com CCR, em especial formas com fucosilação antênaria como o antígeno Lewis X sializado (sLeX) (DE VROOME ET AL, 2018; DOHERTY ET AL, 2018; DOTZ & WUHRER, 2019; HOLST ET AL, 2015).

Apesar do aumento de formas tri- e tetra-antena sializadas e com fucosilação antênaria ter sido identificada em IgGs do soro de pacientes com CCR, em geral, as composições com 3 ou 4 antenas são em grande parte encontradas N-ligadas à  $\alpha$ 1-glicoproteína ácida (CLERC ET AL, 2016; DOHERTY EY AL, 2018; SNYDER ET AL, 2016).

Essa glicoproteína pertence ao que se conhece como proteínas de fase aguda da inflamação, produzidas pelos hepatócitos em resposta às citocinas e outros estímulos imunológicos durante episódios agudos e crônicos de inflamação (ARNOLD ET AL, 2008; NOVOKMET ET AL, 2014).

Seus efeitos estão relacionados com o controle da resposta inflamatória, através da modulação da ativação do complemento e transporte do excesso de substâncias lipofílicas do local da inflamação (CLERC ET AL, 2016; DOTZ & WUHRER, 2019).

Dessa maneira, esse efeito não estaria restrito ao câncer colorretal, mas ao contrário, relacionado com outros tumores e mesmo com doenças inflamatórias.

De fato, estudos da N-glicosilação em pacientes com tumores gástricos e pacientes com doença inflamatória intestinal têm identificado uma correlação entre os níveis séricos de  $\alpha$ 1-glicoproteína ácida e proteína C-reativa, um marcador de inflamação sistêmica, e o aumento consistente de formas multi-antena sializadas (BONES ET AL, 2010; DOHERTY ET AL, 2018; DOTZ & WUHRER, 2019)

Entretanto, diferentemente do conhecimento dos efeitos da glicosilação sobre a atividade das IgGs, os efeitos sobre a  $\alpha$ 1-glicoproteína ácida são em grande parte desconhecidos. Ao contrário das IgGs que possuem um único sítio de glicosilação, a  $\alpha$ 1-glicoproteína ácida possui

5 sítios de glicosilação com ampla microheterogeneidade entre eles, o que dificulta a análise do padrão de composições associadas.

A despeito do objeto desta tese não ser a completa resolução estrutural ou de ligação dos N-glicanos, 53 das 90 composições identificadas foram confirmadas pela análise LC-MS/MS (tandem MS), com intensidade de sinal suficiente para a resolução estrutural, mesmo parcial, seja na forma metilada, deuterada ou em ambas.

Portanto, é lícito supor que o perfil de N-glicanos alterados no soro de pacientes com câncer seja em grande parte, reflexo de modificações na glicosilação das proteínas de fase aguda, decorrente por sua vez da resposta inflamatória sistêmica crônica induzida pela presença do tecido tumoral estranho.

Esse perfil particular de N-glicosilação do soro de pacientes com câncer foi submetido à análise estatística para separação de grupos que utilizou o método de aglutinação (WARD, 1966).

Por esse método, a comparação entre a variância dos valores de mediana das 53 composições quantificadas em cada paciente e controle permite identificar um padrão de semelhança que é progressivamente agrupado. Desse modo, um novo indivíduo é acrescentado ao grupo e posicionado espacialmente mais próximo do conjunto em que haja o menor desvio causado no somatório do quadrado do erro de variância dos valores de todo o conjunto, e assim sucessivamente.

Esse método minimiza o efeito de grandes alterações na variância e é capaz portanto de distribuir, de modo bidimensional, amostras que sejam semelhantes entre si (MURTAGH & LEGENDRE, 2014).

Essa análise revelou um padrão de aglomeração de toda a casuística com distribuição diversa, separando os casos dos controles de modo espacialmente oposto. O padrão de glicosilação no soro de pacientes com câncer foi altamente semelhante entre si, com apenas 1 indivíduo sadio tendo apresentado um padrão compatível.

Por outro lado, dois pacientes com câncer apresentaram um padrão semelhante ao perfil global de glicosilação de indivíduos normais.

É importante ressaltar que essa classificação foi baseada na quantificação de todos os 53 N-glicanos, de modo que formas aumentadas, diminuídas ou não alteradas, avaliadas em conjunto, podem ter exercido efeito somatório ou de cancelamento entre si, causando uma diminuição no poder de separação entre grupos.

A despeito da identificação de uma composição em especial ou mesmo de um número reduzido de composições alteradas se tratar de informação relevante, consideramos mais adequado o modelo estatístico que utilizou o perfil total de composições na classificação de grupos.

A utilização de apenas uma ou de um grupo de composições com alto poder discriminatório poderia incorrer em um erro estatístico tipo I, devido ao acaso, e não propriamente pelo valor discriminatório da composição em si, em virtude do número de casos e controle estudados (n=24).

Como exemplo, foi realizada a análise através de método de curva ROC, do inglês, "receiver operating characteristics" para cálculo do poder de classificação entre grupos, da composição n° 60- HexNAc4Hex5Fuc1NeuAc2 aumentada no soro de pacientes com câncer, que revelou poder de 100% em separar casos de controles.

Grande parte das proteínas glicosiladas estão localizadas na membrana plasmática ou são secretadas para o meio extracelular (CHRISTIANSEN ET AL, 2014; MOREMEN ET AL, 2012; SCHIESS ET AL, 2008; VARKE ET AL, 2017).

Muitas glicoproteínas presentes nos tecidos são compartilhadas na circulação sistêmica, de modo que é razoável supor que o perfil sérico de N-glicosilação pode refletir em alguma medida, o perfil de N-glicosilação presente no microambiente tumoral.

Esse raciocínio fundamenta o conceito de biópsia líquida, através do qual a análise de elementos presentes no soro ou plasma permitem reproduzir as informações de aspectos biológicos dos tumores, com evidentes vantagens do ponto de vista prático e relevantes aplicações clínicas (DE OLIVEIRA ET AL, 2018; LAUC ET AL, 2016; RUSSO ET AL, 2017).

No CCR o único marcador sérico utilizado na vigilância dos pacientes e com relevância para prognóstico é o antígeno carcinoembrionário (CEA), uma glicoproteína encontrada no tecido tumoral e aumentada no soro de pacientes com CCR em até 60% dos casos (ZHANG ET AL, 2017).

Portanto, na segunda fase do estudo foi avaliado o perfil de N-glicosilação das proteínas presentes no tecido tumoral em comparação ao perfil de N-glicosilação das proteínas presentes no tecido não tumoral dos pacientes com câncer de cólon.

Considerou-se para análise a quantidade de tecido pulverizado, em massa (mg), de acordo com a menor quantidade que permitisse a melhor qualidade em intensidade de sinal dos N-glicanos, nos espectros das aquisições por MALDI-TOF-MS.

Nas condições experimentais dessa tese, observou-se que a quantidade mínima de tecido com a melhor qualidade em aquisições foi de 60 mg.

É importante notar que ao contrário do soro humano, não há descrição do que seria o perfil de N-glicosilação dito "normal" para o tecido colônico, ou para qualquer outro tecido humano, de modo que todos os estudos que avaliaram as modificações na N-glicosilação no CCR têm utilizado a análise comparativa entre o tecido tumoral e o tecido do próprio cólon histologicamente normal, como modo de quantificação relativa, em acordo com o que foi realizado nesta tese. (BALOG ET AL, 2012; BROWN ET AL, 2016; DALL'OLIO ET AL, 1989; MIRNEZAMI ET AL, 2013; MUINELLO-ROMAY ET AL, 2008; SETHI ET AL, 2015; ZHANG ET AL, 2017; ZHANG ET AL, 2019; ZHAO ET AL, 2018).

Não obstante alguns estudos terem demonstrado um padrão semelhante de hipermetilação na mucosa normal de indivíduos sadios e na mucosa colônica normal de pacientes com tumor primário no cólon, apenas poderia se definir como "normal" o perfil de N-glicosilação de amostras provenientes do cólon de indivíduos sem lesões endoscópicas como inflamações, pólipos ou tumores (BELSHAW ET AL, 2010; SHEN ET AL, 2005).

Entretanto, a coleta de material mediante biópsias endoscópicas em indivíduos assintomáticos e sem lesões colônicas, dificilmente se justificaria como desenho experimental ético, em um estudo prospectivo. Por esta razão, ao contrário do que foi adotado na análise das amostras de soro, não se utilizou um conjunto de amostras dos tecidos normais, como controle interno para normalização das amostras de tecido.

Em substituição, foi utilizada como controle de normalidade a mucosa macroscopicamente e histologicamente normal, localizada distante 10 cm do tumor primário. Considerou-se essa medida, como a maior distância permitida em decorrência da extensão disponível nas peças cirúrgicas, para a coleta de dois fragmentos de 1 X 1 cm, do tecido colônico normal.

Pacientes com tumores colorretais esporádicos possuem uma probabilidade maior do que a população geral em desenvolver um novo tumor primário. Esse raciocínio é o que fundamenta a vigilância da mucosa colorretal em pacientes após a ressecção dos tumores colorretais e após polipectomias, especialmente no caso de lesões avançadas (LOCHHEAD ET AL, 2015).

Isso implica na hipótese de que não apenas o local da lesão primária, mas toda a mucosa colorretal estaria suscetível ao surgimento de um novo câncer, em especial a região peritumoral. Contudo, esse efeito no caso dos tumores esporádicos seria decorrente dos eventos repetidos e

estocásticos de agentes carcinogênicos sobre o epitélio do cólon, portanto, fora de algum controle experimental (GRAHAM ET AL, 2011; KEUM & GIOVANNUCCI, 2019).

Pode-se questionar ainda que, em tumores esporádicos, amostras da mucosa 10 cm distantes do tumor ainda estariam sob influência dos efeitos ambientais que deram origem à lesão primária.

Há mais de 60 anos, SLAUGHTER ET AL (1953) estudaram o fenótipo de surgimento dos tumores da cavidade oral e propuseram que as alterações intracelulares que condicionam clones celulares com vantagem proliferativas, que eventualmente irão evoluir para um tecido maligno, estão presentes em áreas da mucosa oral de variável extensão, muito tempo antes do desenvolvimento da lesão macroscopicamente visível.

Os autores propuseram o que se chama de efeito de campo, através do qual essas modificações genéticas seriam mais intensas próximas à lesão primária, embora possam ser detectadas em outras áreas do epitélio, em sua maioria não identificáveis por análise histológica convencional (SLAUGHTER ET AL, 1953).

Embora não se conheça a extensão desse efeito, estudos têm sugerido que o efeito de campo seja muito restrito, em geral limitado à proximidade da lesão primária, haja vista que a maioria dos tumores colorretais são derivados de adenomas, oriundos por sua vez de mutações cumulativas em uma ou em apenas algumas criptas da mucosa do cólon (CURTIUS ET AL, 2018; HUMPHRIES & WRIGHT, 2008; LUEBECK & MOOLGAVKAR, 2002).

De modo similar, estudos recentes a respeito da extensão do efeito de campo em alterações de metabólitos celulares têm revelado um padrão distinto entre o tecido tumoral e os tecidos adjacente e distante do tumor (BOYAVAL ET AL, 2020; BROWN ET AL, 2016; MINERZAMI ET AL, 2013).

Em relação à extensão do efeito de campo sobre a N-glicosilação em tecido de tumores colorretais, BOYAVAL ET AL estudaram através de imageamento em EM por MALDI-MSI, do inglês "mass spectrometry imaging", a distribuição espacial de N-glicanos em tumores de cólon estágio II. Os autores observaram um perfil de composições semelhante no estroma do tecido tumoral e no estroma na área da transição do tumor para o tecido normal, composto principalmente por formas ricas em manose, multi-antenárias e sializadas, mas não no tecido peritumoral distante da lesão primária, o que sugere um padrão restrito à área peritumoral (BOYAVAL ET AL, 2020).

Por essas razões, o tecido colônico histologicamente normal e distante 10 cm da margem macroscópica da lesão primária foi considerado adequado como modelo de referência para análise da N-glicosilação normal, em amostras de tecido dos pacientes com CCR.

Na análise por EM MALDI-TOF-MS, 23 sinais de íons monocarregados  $[M+Na]^+$ , que correspondiam à composições de N-glicanos, foram detectados em amostras de tecido tumoral e não-tumoral dos pacientes com câncer.

Ao contrário do observado na análise das amostras de soro, os sinais de íons apresentavam distribuição heterogênea entre as amostras de tecido, com algumas composições identificadas em apenas uma das amostras.

Com o intuito de identificar um padrão consistente na expressão dos glicanos em tecidos, foram quantificados apenas os sinais de íon detectados tanto na forma metilada ( $CH_3$ ) quanto na forma deuterada ( $CD_3$ ) e cuja intensidade de sinal representasse 5% ou mais da intensidade do sinal de íon mais intenso, em cada aquisição.

Doze sinais de íon que atenderam esses requisitos foram analisados, dos quais 2 foram detectados consistentemente aumentados no tecido tumoral em relação ao tecido normal, as composições oligomanosídicas nº 6- HexNAc2Hex5 e nº 10- HexNAc2Hex6.

De modo similar, na análise por EM ESI-LC-MS apenas os sinais de íon com relação sinal/ruído  $>1.000$  nas aquisições MS/MS foram considerados, o que permitiu a identificação de 24 composições ionizadas em sua maioria com dupla carga positiva, nos tecidos tumoral e não tumoral dos pacientes com câncer.

Onze composições foram identificadas consistentemente alteradas nas amostras, cujo teste binomial para probabilidade de variação ao acaso foi significativo ( $p<0,005$ ).

Dez composições foram identificadas aumentadas e 1 composição diminuída nas amostras de tecido tumoral em relação às amostras de tecido não tumoral.

À exceção da composição nº 67- HexNac5Hex5Fuc1NeuAc2, das dez composições aumentadas, 4, nº 23- HexNac5Hex4, nº 27- HexNac4Hex4NeuAc1, nº 29- HexNac5Hex4Fuc1, nº 38- HexNac5Hex4NeuAc1, eram composições bi-antenárias ditas incompletas, isto é, formas neutras e monogalactosiladas.

Durante a síntese dos N-glicanos, a sequência coordenada de glicosiltransferases produz como estrutura final a forma biantenária, bigalactosilada e com dois resíduos de ácido siálico (composição nº 54- HexNac4Hex5NeuAc2), e este tem sido identificado como o sinal de íon mais comum e abundante no soro de controles normais, como reproduzido nesta tese.

APÊNDICE E. (ALDRIDGE ET AL, 2012; CLERC ET AL, 2016; HONG ET AL, 2015; SONG ET AL, 2015).

A despeito da grande heterogeneidade no perfil de N-glicosilação observada nas amostras de tecido a composição n° 54- HexNac4Hex5NeuAc2 que corresponde ao íon  $[M+Na]^+=2792,4$  Da (MALDI-MS),  $[M+2Na]^{2+}=1407,6859$  Da (LC-MS) foi igualmente o sinal de íon com maior intensidade de sinal tanto no tecido tumoral quanto no tecido normal nas amostras de tecido.

Como descrito, esse N-glicano é a composição mais abundante nos sítios de glicosilação de glicoproteínas do soro de indivíduos normais, em especial das imunoglobulinas G (IgG) (BÖHM ET AL, 2014; CLERC ET AL, 2016; HONG ET AL, 2015).

Dessa forma, é lícito supor que semelhante ao que se observa no soro, as composições bi-antênárias representariam em grande parte o perfil de N-glicosilação dessa imunoglobulina no microambiente tumoral, local de intensa reação inflamatória em resposta ao tecido estranho do câncer (KANEKO ET AL, 2016; RUDD ET AL, 2001).

Independentemente do tecido de origem, o tipo de N-glicano presente no sítio de glicosilação exerce grande influência na atividade inflamatória das IgGs. Como exemplo, à medida que são subtraídos das composições os resíduos de ácidos siálicos, galactose e a fucose da posição  $\alpha 1,6$ , ocorre um progressivo aumento na afinidade da porção Fc das IgGs com as células efectoras "natural killer" (NK), na resposta celular mediada por anticorpos (ADCC) (ANTHONY & NIMMERJAHN, 2011; BÖHM ET AL, 2014).

Por esse raciocínio, o aumento das composições bi-antênárias incompletas observadas no tecido tumoral pode estar associado à disrupção na síntese de N-glicanos pela modificação da ação de glicosiltransferases, decorrente do processo de malignização tecidual, de modo a favorecer a síntese de glicoformas pró-inflamatórias do anticorpo.

Associado ao aumento de formas bi-antênárias incompletas, pode-se identificar no nosso estudo um aumento de formas multi-antena no tecido tumoral em relação ao tecido normal.

Além das formas bi-antênárias, 4 composições tetra-antênárias foram identificadas como aumentadas no tecido tumoral.

Durante a síntese dos N-glicanos no complexo de Golgi, a ação de glicosiltransferases adiciona progressivamente à estrutura central um ou dois resíduos de N-acetilglicosamina formado inicialmente, composições bi-antênárias (MOREMEN ET AL. 2012; VARKI ET AL 2017).

Em sequência, a ação competitiva entre duas glicosaminiltransferases,  $\beta$ 1-4N-acetilglicosaminiltransferase (GNT-III) e  $\beta$ 1-6Nacetilglicosaminiltransferase (GNT-V) determina se a composição será uma forma multi-antênaria ou não.

A ação da enzima GNT-V adiciona uma N-acetilglicosamina na posição  $\beta$ 1,6 da manose da estrutura central, o que permite a formação de glicanos tetra-antena e o posterior alongamento dessa composição, p. ex. com cadeias poli-N-acetilactosamina (DI LELLA ET AL, 2011; PINHO & REIS, 2015).

Por outro lado, a adição de um resíduo de N-acetilglicosamina na posição  $\beta$ 1,4 na manose da estrutura central dá origem às formas ditas bissectadas. Essas formas por sua vez, não servem como substrato para a ação da GNT-V, interrompendo assim a síntese de formas multi-antena (SCHACHTER, 2000; TANIGUCHI & KOREKANE, 2011).

Esse fenômeno é regulado geneticamente pelos genes  $\beta$ -1,4-manosilglicoproteína 4- $\beta$ -N-Acetilglicosaminiltransferase (*MGAT-3*) e  $\alpha$ -1,6-manosilglicoproteína 6- $\beta$ -N-Acetilglicosaminiltransferase (*MGAT-5*) para as transferases GNT-III e GNT-V, respectivamente e ação competitiva entre essas enzimas têm sido associada com a degeneração maligna em tecidos epiteliais, bem como maior potencial metastático em tumores (CHRISTIANSEN ET AL, 2014; DE FREITAS & MORGADO-DIAZ, 2015; GU ET AL, 2008; GUO ET AL, 2003; HÄUSELMANN & BORSIG, 2014; HOLST ET AL, 2015; PINHO & REIS, 2015; TANIGUCHI & KIZUKA, 2015; XU ET AL, 2011).

O predomínio de glicoproteínas decoradas com N-glicanos multi-antena nas células tumorais parece estar relacionado com vantagens fenotípicas ligadas à menor adesão intercelular, manutenção na ativação de receptores de proliferação celular, indução à transição epitelial-mesenquimal, maior motilidade em meio extracelular e capacidade de metastatização (CARVALHO ET AL, 2016; DENNIS ET AL, 1987; GUO ET AL, 2003; HÄUSELMANN & BORSIG, 2014; OLIVEIRA-FERRER ET AL, 2017; TANIGUCHI & KIZUKA, 2015).

Estudos em modelos murinos identificaram maior adesão ao meio extra-celular e capacidade de metastatização em linhagens celulares que apresentavam aumento na expressão de *MGAT-5* em tumores de pulmão e de mama, com reversão do potencial metastático e de crescimento dos tumores quando da supressão desse gene (DEMETRIOU ET AL, 1995; GRANOVSKY ET AL, 2000; PINHO & REIS, 2015; SEBERGER & CHANEY, 1999).

No CCR, a expressão da enzima GNT-V tem sido associada como fator de pior prognóstico (MURATA ET AL, 2000). O aumento de composições multi-antenárias, em especial composições tetra-antenárias e a diminuição de formas bissectadas são reconhecidas como as modificações mais comumente observadas na N-glicosilação do tecido tumoral, assim como, aumento na sialização, predomínio de formas ricas em manose, paucimanosídicas e formas com fucosilação central (BALOG ET AL, 2012; HOLST ET AL, 2015; MUNKLEY & ELLIOTT, 2016; VAJARIA E PATEL, 2017).

No nosso estudo, embora não tenha sido analisada a expressão do gene MGAT-5 responsável pela transcrição dessa enzima, todas as composições aumentadas eram formas multi-antena tetra-antenárias, em concordância com a literatura atual que refere aumento dessas formas em tecidos de tumores colorretais, o que sugere um aumento na ação da GnT-V (CARVALHO ET AL, 2016; DENNIS ET AL, 1987; GUO ET AL, 2003; HÄUSELMANN & BORSIG, 2014; OLIVEIRA-FERRER ET AL, 2017; TANIGUCHI & KIZUKA, 2015).

As vantagens proliferativas que essas modificações na N-glicosilação induzem na célula tumoral parecem estar relacionadas à três principais alterações fenotípicas: aumento da ativação dos receptores de proliferação celulares, perda da coesão celular e maior adesão ao meio extracelular (GU ET AL, 2008; MARKOWSKA ET AL, 2011; NI ET AL, 2014).

A interação e adesão celulares no epitélio colônico normal se dá em grande parte pela atividade das E-caderinas localizadas na região basolateral das células epiteliais (HOFFMAN & YAP, 2015). Essas glicoproteínas são decoradas em geral com N-glicanos bi-antenários, muitos deles bisectados, que garantem maior afinidade na inibição de contato intercelular.

Durante a transformação maligna, a progressiva ocupação dos sítios de glicosilação das E-caderinas por N-glicanos multi-antena reduzem a afinidade e desse modo a adesão celular, o que permite às células tumorais maior capacidade de transição epitelial-mesenquimal e conseqüente maior potencial de migração celular (CARVALHO ET AL, 2016; DEMETRIOU ET AL, 1995; MURATA ET AL, 2000).

Adicionalmente, o aumento na extensão das composições multi-antenárias ligadas às glicoproteínas de superfície das células malignas permite maior adesão ao meio extracelular, mediada pela interação com galectinas e maior potencial metastático (HÄUSELMANN & BORSIG, 2014; ICHIKAWA ET AL, 1999).

As formas multi-antenárias servem muitas vezes como substrato para a adição sequencial de um resíduo de N-acetilglicosamina e de galactose, criando cadeias de poli-(n) lactosamina

com grande afinidade por proteínas do meio extracelular, em especial a galectina-3, que possuem a capacidade de reconhecer essas composições na superfície celular (CHEN ET AL, 2014; MURATA ET AL, 2000; NI ET AL, 2014).

A interação entre as cadeias poli-(n) lactosamina com as galectinas no meio extracelular também está envolvida na estabilização na membrana celular e consequente ativação sustentada de receptores de proliferação celular, como p. ex., o receptor do fator de crescimento derivado do epitélio (EGFR) (DE FREITAS & MORGADO-DIAZ, 2015; HIRABAYASHI ET AL, 2002).

Por fim, pode-se identificar um aumento no tecido tumoral da forma rica em manose n° 35- HexNAc2Hex9 associada à diminuição da forma rica em manose n° 17- HexNAc2Hex7, na análise LC-MS/MS e um aumento das formas oligomanosídicas n° 6- HexNAc2Hex5 e n° 10- HexNAc2Hex6, na análise MALDI-MS.

A síntese dos N-glicanos se inicia no retículo endoplasmático (RE) com a adição da estrutura formada por 2 N-acetil glicosaminas, 3 monômeros de glicose e 9 monômeros de manose, à proteína recém-sintetizada, de modo que a remoção sequencial dos monômeros de glicose orienta a maturação e conformação terciária apropriada da proteína (CUMMINGS, 2009; DALL'OLLIO, 2012; MOREMEN ET AL. 2012; VARKI ET AL 2017).

Desse ponto em diante, as estruturas trafegam até o complexo de Golgi (*cis*-Golgi) onde têm progressivamente removidos os resíduos de manose por ação das  $\alpha$ -manosidases IA, IB e II.

Posteriormente, a composição formada por 5 resíduos de manose tem uma N-acetilglicosamina adicionada ao núcleo central do glicano por ação da enzima codificada pelo gene manosil-N-acetilglicosaminil-transferase 1 (MGAT-1).

Essa sequência de reações é considerada fundamental para a síntese de novas estruturas. Alterações nessas etapas iniciais reduzem o repertório de estruturas complexas, e como efeito a função de muitas glicoproteínas, com consequências significativas na atividade celular (VARKI ET AL, 2017).

Por esse entendimento, nossos resultados indicam que o acúmulo da composição com nove resíduos de manose no tecido tumoral, assim como o aumento das formas oligomanosídicas podem se dever à uma disrupção precoce no processamento dos N-glicanos nos tumores.

Essa disrupção na síntese dos N-glicanos em tumores leva ao acúmulo de formas ricas em manose, o que por sua vez, privilegia a ocupação dos sítios de N-glicosilação por essas composições, com consequente efeito de ganho de função das proteínas durante a carcinogênese.

Essas modificações se traduzem em vantagens proliferativas conferida aos tecidos tumorais, sendo que alguns autores já consideram o predomínio de formas ricas em manose como uma das principais características das modificações da N-glicosilação presente nos tumores colorretais (HOLST ET AL, 2015; SETHI & FANAYAN, 2015).

Na verdade, esse fenômeno de predomínio das composições ricas em manose tem sido sistematicamente identificado em vários estudos que utilizaram a quantificação relativa de N-glicanos, seja em linhagens celulares ou no ambiente de tumores epiteliais (BALOG ET AL, 2012; CHIK ET AL, 2014; DE LEOZ ET AL, 2011; PARK ET AL, 2020; SETHI ET AL, 2014; SETHI ET AL, 2015; SETHI & FANAYAN, 2015; TAKAYAMA ET AL, 2020; VERCOUTTER-EDOUART ET AL, 2008; ZHANG ET AL, 2019; ZHAO ET AL, 2008).

SETHI ET AL (2014) estudaram linhagens celulares de CCR e observaram que as composições ricas em manose foram os N-glicanos mais abundantes, assim como linhagens originárias de tumores metastáticos apresentaram diferentes perfis de N-glicosilação, relacionados com a conformação de ligação dos ácidos siálicos.

A expressão de N-glicanos ricos em manose no glicocálix de enterócitos parece estar relacionada à uma maior adesão de patógenos às células epiteliais e das próprias células epiteliais ao meio extracelular. Desse modo, como forma de manutenção da homeostase e da coesão epitelial intestinal, o tecido diferenciado de mamíferos raramente expressa glicoproteínas decoradas com estruturas ricas em manose (PARK ET AL, 2015; PARK ET AL 2016; TAO ET AL, 2008).

Assim, durante a diferenciação e a migração da base das glândulas do epitélio intestinal até o lumen, as células totipotenciais, do inglês "stem cells", sofrem uma mudança progressiva no perfil de glicosilação das proteínas da membrana plasmática, o que permite sua maturação adequada, adesão intercelular e consequente integridade do epitélio intestinal (SATOMAA ET AL, 2009).

Ao contrário, durante a transformação maligna as células tumorais retornariam ao seu estado totipotencial indiferenciado, com concomitante retorno ao perfil de N-glicosilação embriológico, composto por composições ricas em manose, o que facilitaria o destacamento

celular da superfície epitelial, a transição epitelial-mesenquimal (EMT) e finalmente a migração através do meio extracelular (PARK ET AL 2015; TAN ET AL, 2014).

É importante salientar que a maioria dos estudos que identificaram essas modificações fenotípicas analisaram o fenômeno da glicosilação aberrante de modo indireto, isto é, por métodos de imuno-histoquímica para composições de N-glicanos, afinidade por aglutininas ou pela análise da expressão nos tecidos dos genes relacionados com a síntese de N-glicanos, como p. ex., os genes *MGAT-3* e *MGAT-5* para formas bissectadas e multi-antena, respectivamente (DEMETRIOU ET AL, 1995; GU ET AL, 2008; GUO ET AL, 2003; MURATA ET AL, 2000).

Nesta tese ao contrário, foram identificadas e quantificadas no tecido colônico as composições de N-glicanos separados das glicoproteínas de origem, através dos métodos micro-analíticos de espectrometria de massas, MALDI-MS e LC-MS/MS, o que permitiu analisar as composições propriamente ditas e representar de modo mais fidedigno a repercussão fenotípica pós-traducional, presente no ambiente tumoral.

Dessa maneira, nossos resultados devem ser comparados com os estudos que analisaram a N-glicosilação em tecidos de tumores colorretais em relação ao tecido não tumoral de pacientes com CCR, através do uso de tecnologia por espectrometria de massas MALDI-TOF-MS e LC-MS (BALOG ET AL, 2012; HOLM ET AL, 2020; HOLST ET AL, 2015; KAPRIO ET AL, 2014; SETHI ET AL, 2015; ZHANG ET AL, 2019).

BALOG ET AL (2012) foram os primeiros autores a identificar através de análise MALDI-TOF-MS um aumento de antígeno Lewis sializados, formas sulfatadas e de composições oligomanosídicas, bem como, diminuição de formas bissectadas no tecido de tumores colorretais.

De modo similar, KAPRIO ET AL (2014), através de análise por MALDI-TOF-MS comparativa da N-glicosilação entre adenomas e o tecido tumoral de pacientes com câncer de reto, observaram aumento de formas sializadas, mono-antênárias e paucimanosídicas no tecido tumoral e associação com pior prognóstico nos pacientes cujos tumores apresentaram aumento de formas paucimanosídicas.

Por sua vez, SETHI ET AL (2015), em estudo com tecnologia LC-MS para análise da N-glicosilação de proteínas de membrana celular em fragmentos de tumores colorretais e do tecido peritumoral, igualmente identificaram um aumento na expressão de formas ricas em manose, oligomanosídicas e de N-glicanos  $\alpha$ 2,6 sializados.

Adicionalmente, esses autores evidenciaram correlação entre a expressão de receptores de fator de crescimento derivado do epitélio (EGFR) e o perfil de N-glicosilação, na qual tumores EGFR + apresentaram maior expressão de formas bissectadas e de N-glicanos  $\alpha$ 2,3 sializados.

ZHANG ET AL (2019) utilizaram a análise por EM acoplada à cromatografia líquida para comparação e resolução estrutural de N-glicanos derivatizados, presentes no tecido colônico tumoral e peritumoral normal. N-glicanos ricos em manose foram identificados aumentados, enquanto formas bissectadas foram identificadas como diminuídas no tecido tumoral, com redução mais evidente em estádios mais avançados de doença.

Os autores demonstraram ainda que essas alterações são próprias dos tumores colorretais, uma vez que não foram observadas diferenças dessas estruturas, na comparação do tecido normal e tumoral em amostras de carcinoma espinocelular do esôfago.

Em estudo recente, HOLM ET AL (2020) utilizaram o método MALDI-TOF-MS para quantificação de N-glicanos em amostras de tumores de cólon em pacientes com tumores de estadios II e III em relação ao tecido normal, e observaram um aumento de composições neutras, em sua maioria formas ricas em manose no tecido tumoral, sem relação com lateralidade ou estadiamento do tumor primário.

Pelo exposto, pode se observar que nossos resultados reproduzem em grande parte o conhecimento atual sobre a N-glicosilação no CCR.

A despeito da semelhança entre os nossos resultados e o conhecimento atual em espectrometria de massas, até nosso conhecimento, apenas um estudo identificou alteração de formas multi-antena em tumores, por metodologia de EM em condições experimentais semelhantes às que esta tese foi realizada (BOYAVAL ET AL, 2020).

Nesse estudo os autores investigaram através de MALDI-MSI “imaging” o perfil de N-glicanos distribuídos em todo o tecido tumoral, na interface da lesão e no tecido normal adjacente.

Por esse método, os autores observaram um aumento da sialização, de formas ricas em manose e de formas mono- e bi-antênárias no tecido e estroma do tumor em relação à mucosa adjacente.

Entretanto, ao contrário dos nossos resultados, os autores identificaram uma progressiva diminuição de formas tri- e tetra-antênárias no tecido tumoral.

Essa discrepância pode ser explicada pelo fato de que esse estudo avaliou apenas casos de tumores estágio II. Nesta tese, estudamos tumores estádios II e III em conjunto e o predomínio de formas tetra-anténarias pode se dever à mudança no perfil de N-glicosilação por atividade aumentada da enzima GNT-V em estádios mais avançados do câncer, o que merece especial atenção em estudos futuros relativos ao papel da N-glicosilação como marcador na progressão de doença.

Por fim, a comparação entre as composições identificadas no soro dos pacientes com câncer e as composições de N-glicanos diferentemente expressas no tecido tumoral compuseram a última fase deste estudo.

Ao se compararem as 26 composições discriminantes no soro com as 11 composições alteradas nos tumores pelo método LC-MS/MS, 8 composições foram identificadas tanto em amostras de soro, quanto em amostras de tecido dos pacientes com câncer.

Nenhuma das 8 composições apresentou alteração quantitativa, quer fosse em aumento ou em diminuição, concordantes entre soro e tecido.

Algumas hipóteses podem explicar essa discrepância como a heterogeneidade intratumoral, a localização do tumor primário no cólon, o estadiamento da doença ou o perfil mutacional *RAS/RAF*.

Embora tenha sido possível identificar um padrão de N-glicosilação no tecido tumoral, semelhante ao padrão observado em estudos prévios, nossos resultados indicaram uma grande heterogeneidade de composições nas amostras de tecido (BALOG ET AL, 2012; KAPRIO ET AL, 2014; SETHI ET AL, 2015; ZHANG ET AL, 2019; ZHAO ET AL, 2018).

O conhecimento atual indica que o microambiente dos tumores epiteliais é composto por vários clones de diversos perfis mutacionais, distribuídos aleatoriamente no tecido dos tumores. Desse modo, a análise de 2 fragmentos de tumor não poderia, por óbvio, representar a N-glicosilação em todo o microambiente tumoral (BOYAVAL ET AL, 2020; MUZNY ET AL, 2012; SCHIESS ET AL, 2008).

Mesmo ao se considerar que as amostras representassem rigorosamente o perfil de N-glicosilação de todo o microambiente tumoral, há que se acrescentar ainda os efeitos do estadiamento, perfil mutacional *RAS/RAF* e localização primária do tumor no cólon na heterogeneidade de composições identificadas.

Sabe-se que a mutação na via de proliferação celular que envolve as proteínas-quinases *RAS/RAF*, assim como a localização primária do tumor no cólon possuem impacto no

comportamento biológico e no prognóstico, de modo que é razoável supor que essas diferenças podem se estender aos perfis de N-glicosilação tecidual (PUCCINNI ET AL, 2018).

Alguns autores têm relatado diferentes perfis de N-glicosilação em estádios mais avançados, durante a evolução da doença de pacientes com CCR (KAPRIO ET AL, 2014; NODA ET AL, 2018; SETHI ET AL, 2015; ZHANG ET AL, 2019; ZHAO ET AL, 2018).

Recentemente, HOLM ET AL (2020) estudaram o perfil de N-glicosilação de tumores de cólon direito e esquerdo, em estádios II e III comparados ao tecido colônico normal. Os autores identificaram aumento de composições ricas em manose e sializadas no tecido tumoral, contudo sem diferença no perfil de N-glicosilação para composições neutras nos tumores do cólon direito e esquerdo, independentemente do estadiamento.

Ao contrário, os autores identificaram um aumento da composição neutra HexNAc5Hex3 em amostras do estágio II, restrita apenas aos pacientes com tumores do cólon direito e de formas ácidas, com ao menos um resíduo de ácido siálico, em amostras de tumores estágio III.

Nesta tese as amostras de tumor foram analisadas em conjunto, independentemente do estadiamento, localização do tumor primário e perfil mutacional, o que pode ter ocultado características particulares de N-glicosilação referentes à essas variáveis.

Entretanto, quando os pacientes foram estratificados por estadiamento, perfil mutacional ou lateralidade, nenhuma composição demonstrou alteração estatisticamente significativa, embora o número pequeno de casos previsto para cada grupo impediu a análise estatística mais robusta.

Por outro lado, a evidência atual sugere que o perfil de abundância dos N-glicanos no soro humano seria derivado em sua maior parte de um grupo de glicoproteínas em especial, muitas delas sem expressão significativa nos tecidos (ANDERSON & ANDERSON, 2002; BONES ET AL, 2010; CLERC ET AL, 2016; DE VROOME ET AL, 2018; DOHERTY ET AL, 2018).

Um estudo recente observou a quase ausência de expressão do epítipo sializado Lewis A (sLeA), conhecido como CA 19-9, do inglês “carbohydrate antigen” 19-9, em tecido de tumores colorretais, associado à concomitante elevação desse antígeno no soro de pacientes com CCR, sugerindo uma origem não tecidual (MARE ET AL, 2013).

A concentração de algumas proteínas no soro humano pode variar à grandeza de 12 ordens de magnitude. À exceção da albumina, a proteína mais abundante no soro, as demais proteínas estão divididas em ordem decrescente de abundância em: proteínas típicas do soro, como p. ex. as imunoglobulinas, as transferrinas e a  $\alpha$ 1-glicoproteína ácida; em proteínas originárias dos

tecidos e em interleucinas e citocinas (ANDERSON & ANDERSON, 2002; CLERC ET AL, 2016).

As proteínas típicas do soro são em sua maioria proteínas relacionadas à resposta inflamatória sistêmica induzida por agentes externos estranhos ao organismo, como p. ex. o tecido tumoral.

Assim, durante a resposta inflamatória desencadeada no microambiente tumoral, citocinas pró-inflamatórias estimulariam a produção pelo tecido hepático das proteínas de fase aguda. Essa resposta, composta em sua maioria por glicoproteínas abundantes no soro como IgGs, haptoglobina, transferrina e  $\alpha$ 1-glicoproteína ácida representaria em grande parte, o grupo de proteínas responsável pelo perfil de N-glicosilação identificado (ARNOLD ET AL, 2008; LAUC ET AL, 2016; NOVOKMET ET AL, 2014).

NOVOKMET ET AL (2014), em estudo sobre as alterações observadas na N-glicosilação do soro decorrentes da resposta inflamatória aguda ao trauma cirúrgico, observaram modificações importantes no perfil das glicofomas de IgGs, algumas delas ligadas inclusive à maior mortalidade operatória.

Por sua vez, ARNOLD ET AL (2008), em revisão sobre o tema, descreveram duas modificações como as mais frequentes no perfil de N-glicosilação de pacientes com câncer, quais sejam, o aumento de formas multi-antênárias e o aumento da sialização das composições. Os autores também identificaram aumento de formas bi-antênárias e agalactosiladas, em especial, com fucosilação central.

Conforme descrito anteriormente, essas modificações estão ligadas às proteínas de fase aguda haptoglobina,  $\alpha$ 1-glicoproteína ácida e às imunoglobulinas G.

Embora não se conheçam os mecanismos envolvidos na regulação da N-glicosilação no tecido hepático e nos linfócitos B, essas modificações teriam como efeito biológico conferir uma maior capacidade da resposta imunológica do organismo frente aos tumores, através da facilitação da migração leucocitária para o tecido tumoral, dependente de composições sializadas, como o antígeno Lewis sializado (sLeX) presente no endotélio p. ex., bem como uma maior atividade pró-inflamatória das IgGs, predominantemente decoradas com formas agalactosiladas.

Por esse raciocínio, é razoável supor que as alterações observadas na N-glicosilação do soro de pacientes com câncer não sejam devidas apenas à presença de composições provenientes das glicoproteínas do tecido tumoral, mas principalmente, decorrentes das

modificações na N-glicosilação das proteínas de fase aguda da resposta inflamatória desencadeada pelo tecido tumoral.

A discrepância observada entre o perfil de N-glicosilação nos tecidos e no soro de pacientes com câncer de cólon, evidente em nossos resultados, corroboram a hipótese da resposta inflamatória como indutora da síntese das composições predominantes no soro, embora não se possa excluir que a heterogeneidade dos tumores da casuística aqui estudada tenha contribuído nesse fenômeno.

Ao contrário do que ocorre na síntese protéica ou na duplicação do DNA, a síntese dos glicanos não envolve um modelo predeterminado e se processa pela adição sequencial e regulada de monossacarídeos durante a maturação proteica, o que permite em teoria, numerosas possibilidades de composições estruturais (CUMMINGS, 2009; KRONEWITTER ET AL, 2009).

Frente à essa inerente diversidade composicional, a análise qualitativa e quantitativa dos N-glicanos só é possível graças às tecnologias micro-analíticas modernas como p. ex., os espectrômetros de massa (EM).

Na verdade, a espectrometria de massas é o método mais eficaz em combinar resolução estrutural e quantificação de estruturas presentes em quantidades muito pequenas na natureza. Além disso, essa tecnologia tolera diferentes tipos de amostra, bem como é um método rápido na análise e obtenção dos dados, altamente reprodutível e com excelente relação entre intensidade de sinal e quantificação (DE OLIVEIRA ET AL, 2018; HARVEY ET AL, 2006; RUHAAK ET AL, 2018; WADA ET AL, 2007).

Nosso estudo utilizou como ferramenta de análise a tecnologia de espectrometria de massas, pelo método de ionização por adsorção associada a matriz (MALDI), que consiste na quantificação das composições pelo espectrômetro através de ionização mediada pela adição de cátions, como p. ex. o sódio, ao analito em estudo (HARVEY ET AL, 2006; TANAKA ET AL, 1988).

Apesar desse método, classificado como um método de ionização de baixa energia, do inglês “soft-ionization”, acarretar mínima interferência na integridade dos analitos, pode-se observar frequentemente a perda de ácidos siálicos na região terminal ou de capeamento do N-glicano, durante o processo de ionização.

Mais ainda, os ácidos siálicos terminais que decoram muitos dos N-glicanos complexos são naturalmente moléculas negativamente carregadas, o que cria uma dificuldade adicional na

aquisição, uma vez que requer a análise das amostras em duas etapas: uma no modo positivo e outra no modo negativo do espectrômetro (MECHREF ET AL, 2013; MORELLE & MICHALSKI, 2007; RUHAAK ET AL, 2010).

Dessa forma, vários métodos são usados para estabilizar, neutralizar e aumentar a capacidade de ionização dos N-glicanos, conhecidos em conjunto como derivatização, em especial a permetilação que foi o método utilizado nesta tese (BANAZADEH ET AL, 2016; CIUCANU ET AL, 1984; KAILEMIA ET AL, 2014; MORELLE & MICHALSKI, 2007).

Esse método foi descrito por CIUCANU ET AL (1984) e consiste em substituir o hidrogênio de cada hidroxila (-OH), aminas (C-NH<sub>2</sub>) e carboxilas (R-COOH) dos carboidratos constituintes do glicano, por um radical metil (-CH<sub>3</sub>), em meio básico e em ambiente inerte. Esse processo confere ao glicano maior estabilidade, convertendo-o de uma forma polar para uma forma apolar, mais facilmente ionizável (CIUCANU ET AL, 1984; HUNG ET AL, 2012; KANG ET AL, 2005; MORELLE & MICHALSKI, 2007; REIDING ET AL, 2014).

O método de derivatização por permetilação permite ainda a marcação das estruturas de acordo com a amostra de origem o que facilita a análise quantitativa relativa das composições, conforme adotado nesta tese (ALVAREZ-MANILLA ET AL, 2007; CIUCANU ET AL, 2003; HU ET AL, 2016; KANG ET AL, 2007; RUHAAK ET AL, 2010; ZHOU ET AL, 2017).

Todas as relações *m/z* dos sinais de íon que correspondiam a uma composição de N-glicano detectado pelo método MALDI-TOF-MS teve como denominador carga (*z*)=1, uma vez que foram ionizadas com um íon sódio [M+Na]<sup>+</sup>, o que é característico desse método de ionização e facilita a detecção rápida e acurada dos sinais de íon componentes das amostras (HARVEY ET AL, 2006; KAILEMIA ET AL, 2014; RUHAAK ET AL, 2018).

A despeito do método MALDI-TOF-MS permitir a análise simples e rápida através da detecção dos sinais de íon pela sua massa nominal, a informação obtida diz respeito apenas ao número de unidades de monossacarídeos presente nas composições, sem nenhuma informação a respeito das ligações, conformação anomérica ou tampouco da posição dos monômeros em cada composição (HARVEY ET AL, 2018; JEONG ET AL, 2012; RUHAAK ET AL, 2018).

Além disso, a relação entre intensidade de sinal e quantificação é muitas vezes problemática, haja vista que íons muito abundantes nas amostras podem interferir na detecção de outros íons de menor abundância, causando o que se chama de supressão de sinal (HARVEY ET AL, 2006; KAILEMIA ET AL, 2014; RUHAAK ET AL, 2018).

Por essas razões, outros métodos com maior poder de separação e quantificação por espectrometria de massas têm sido utilizados na análise dos N-glicanos. Tecnologias ditas hífenadas, na qual dois métodos micro-analíticos são utilizados em sequência, possibilitam uma maior capacidade de separação de formas isotópicas, a identificação de maior número de composições e conseqüentemente a quantificação mais acurada das estruturas nas amostras (DE OLIVEIRA, 2018; KAILEMIA ET AL, 2014; RUHAAK ET AL, 2018).

A tecnologia que associa a espectrometria de massas com a cromatografia líquida (LC-MS) tem sido o modelo mais utilizado em estudos recentes pela maior versatilidade na análise de compostos com diferentes propriedades físico-químicas, bem como, pela facilidade de combinação entre esses dois métodos (ALLEY ET AL, 2010; HU ET AL, 2016; PABST ET AL, 2015).

Ao contrário da tecnologia MALDI-TOF-MS, no método ESI-LC-MS/MS a aquisição pelo espectrômetro é feita após a passagem das estruturas apolares pelas colunas de carbono 18 (C<sub>18</sub>) do cromatógrafo, neste estudo em fase reversa (do inglês, RPLC- reversed-phase liquid chromatography), através da eluição sequencial de formas com polaridade decrescente e ordem crescente de massa (RITAMO ET AL, 2013; VREEKER ET AL, 2017; WALKER ET AL, 2012).

Esse método possui ainda maior eficácia no processo de ionização, com a adição de um ou mais cátions, o que aumenta a capacidade na identificação do número de composições.

Dessa forma, foi utilizada nesta tese além da tecnologia por MALDI-MS, a tecnologia de EM hífenada LC-MS/MS, como método para identificação e quantificação relativa dos N-glicanos.

Na identificação de N-glicanos no soro dos pacientes com câncer e dos indivíduos saudáveis, 33 e 90 composições foram identificadas pelos métodos MALDI-TOF-MS e ESI-LC-MS/MS, respectivamente, o que está em acordo com a literatura atual (HU & MECHERF, 2012).

Por sua vez, na análise de tecidos, o método MALDI-TOF-MS detectou 23 composições em ao menos uma amostra de tecidos tumoral ou normal enquanto o método ESI-LC-MS/MS identificou 35 composições expressas no tecido tumoral e no tecido colônico normal.

É importante notar que todas as composições detectadas pelo método MALDI-TOF-MS nas amostras do estudo foram igualmente identificadas pelo método LC-MS. Por sua vez, a análise pelo método LC-MS/MS acrescentou 57 composições no soro e 12 composições no

tecido, o que demonstra boa concordância entre as metodologias e maior acurácia deste último, independentemente da amostra de origem.

Portanto, no tocante à análise qualitativa, o estudo pelo método LC-MS/MS foi mais sensível em identificar as composições de N-glicanos presentes em menores quantidade nas amostras em estudo. Por essa razão, foi o método utilizado na quantificação de N-glicanos no soro e no tecido e na interpretação dos resultados desta tese.

Adicionalmente, a metodologia hifenada LC-MS/MS permitiu nas condições experimentais do estudo, um maior detalhamento estrutural das composições, uma vez que a depender da conformação intramolecular dos N-glicanos, diferentes composições foram eluídas em tempos diferentes.

Assim, composições com poucos resíduos de monossacarídeos ou bi-antênrias complexas possuem conformação intramolecular mais compacta, o que limita o número de grupos metil ( $\text{CH}_3$ ) que interagem com a coluna cromatográfica e portanto, apresentaram um tempo de eluição mais precoce.

Por outro lado, formas multi-antena ou bissectadas por possuírem mais grupos metil ( $\text{CH}_3$ ) para interação com as colunas, foram eluídos em tempo mais tardio na cromatografia de fase reversa.

Por esse raciocínio, isômeros ou formas anoméricas  $\alpha$  e  $\beta$ , podem ser diferenciados pelos tempos de retenção, o que permite aumentar o grau de complexidade e separação dos N-glicanos (HU & MECHREF, 2012; HU ET AL, 2016; RUHAAK ET AL, 2018).

Para tanto, tem se tentado desenvolver tempos de retenção padronizados em condições experimentais restritas, para os diversos graus de ionização em composições derivatizadas (ALDREDGE ET AL, 2012; HU ET AL, 2016; RITAMO ET AL, 2013; SONG ET AL, 2015).

Entretanto, pequenas variações no grau de pureza do analito, diferentes graus de ionização, temperatura da coluna, dentre outros dificultam o estabelecimento de valores padronizados de tempos de retenção como forma de se obter maior resolução estrutural das composições (ALDREDGE ET AL, 2012; SONG ET AL, 2015).

Uma alternativa está na análise dos fragmentos obtidos de N-glicanos submetidos à colisão com elétrons e quebra das ligações glicosídicas ou do anel das hexoses. Esse procedimento é conhecido como "tandem/MS" ( $\text{MS}^n$ ), onde n significa o número de aquisições após cada fragmentação necessária, até a completa resolução estrutural da molécula precursora (KAILEMIA ET AL, 2014; RUHAAK ET AL, 2018).

Uma limitação desse procedimento se relaciona à abundância das composições nas amostras, uma vez que quanto menos analito disponível, menor a qualidade do sinal na identificação dos fragmentos e, portanto, maior dificuldade para elucidação das posições dos monômeros e das ligações nos compostos (HU ET AL, 2016; RITAMO ET AL, 2013).

Por essa razão, neste estudo apenas 53 das 90 composições no soro e 24 das 36 composições no tecido foram quantificadas, as quais apresentaram sinal adequado após aquisição MS/MS para análise composicional detalhada.

Na quantificação das amostras de soro, 26 composições apresentaram potencial em discriminar os pacientes com câncer dos controles sadios e nas amostras de tecido, 11 composições apresentaram potencial em discriminar o tecido normal do tecido tumoral, pelo método LC-MS/MS.

Por sua vez na análise MALDI-TOF-MS, apenas uma composição no soro e duas composições nas amostras de tecido demonstraram poder discriminante.

Essa diminuição na acurácia entre os métodos pode ser explicada pela maior competição entre as composições durante o processo de ionização no método MALDI. Neste método, os glicanos em maior abundância competem com as formas menos abundantes, impedindo a ionização adequada com consequente saturação das formas abundantes na detecção pelo equipamento (HARVEY ET AL, 2006).

Além disso, artefatos porventura presentes durante o processo de purificação dos glicanos, podem interferir na ionização dos analitos no método MALDI, o que não ocorre no método LC-MS, uma vez que são previamente eluídos e ionizados após a separação (HU & MECHERF, 2012; KAILEMIA ET AL, 2014; RUHAAK ET AL, 2018; SETHI ET AL, 2016).

Muitas composições que demonstraram capacidade de discriminação no soro na análise por LC-MS eram formas menos abundantes e, como consequência, foram identificadas com menor intensidade de sinal, como p. ex., o N-glicano n° 60- HexNAc4Hex5Fuc1NeuAc2, identificado como aumentado no soro de pacientes com câncer.

Na análise MALDI-TOF-MS, essa composição apresentou baixo sinal nas aquisições com a mesma tendência de aumento no soro dos pacientes com câncer, entretanto sem significância estatística.

Assim, pode se supor que a análise por MALDI-TOF-MS carece de sensibilidade em detectar pequenas modificações na N-glicosilação que ocorrem em composições presentes em

baixas concentrações no soro, as quais por sua vez, são exatamente as estruturas a sofrer maior efeito da interferência da supressão de sinal, causada pelos íons mais abundantes.

Essa limitação foi mais evidente nas amostras de tecido. Neste caso, a grande heterogeneidade de composições nas amostras reduziu o número de N-glicanos consistentemente detectados e alterados no tecido tumoral.

Assim como nas amostras de soro, muitas composições na análise MALDI-TOF-MS das amostras de tecido foram detectadas em baixas concentrações, isto é, com baixa intensidade de sinal. Dessa forma, a inclusão apenas de composições com sinal adequado para a análise MS/MS limitou o número de estruturas com potencial poder discriminante, nesse caso restrita aos dois N-glicanos n° 6- HexNAc2Hex5 e n° 10- HexNAc2Hex6.

Em resumo, os nossos resultados indicam que no câncer de cólon esporádico microsatélite estável (MSS):

- O perfil de N-glicosilação de todas as glicoproteínas do soro de pacientes com câncer de cólon difere do perfil de N-glicosilação de indivíduos saudáveis, com tendência à diminuição relativa de composições, muitas delas com ao menos um resíduo de galactose.
- Três composições foram identificadas aumentadas no soro de pacientes com câncer de cólon, cuja possível origem seriam glicoproteínas ligadas à resposta inflamatória sistêmica como as imunoglobulinas G, apolipoproteína B e a  $\alpha$ 1-glicoproteína ácida.
- Tomado em conjunto, o perfil global de N-glicosilação do soro foi capaz de discriminar os pacientes com câncer dos controles saudáveis.
- O perfil de N-glicosilação de todas as glicoproteínas do tecido tumoral em relação ao tecido colônico normal dos pacientes com câncer de cólon é altamente heterogêneo. Ainda assim, apresenta um perfil identificável composto pelo aumento de formas multi-antena, bi-antenárias incompletas, ricas em manose e oligomanosídicas.
- Não houve correlação entre o perfil de N-glicosilação observado no soro e no tecido tumoral de pacientes com câncer de cólon, o que sugere que a origem das composições do soro não está diretamente relacionada com a N-glicosilação do microambiente tumoral.

- As metodologias LC-MS/MS e MALDI-TOF-MS apresentam boa concordância entre si, com maior sensibilidade para a tecnologia LC-MS/MS mais evidente para as composições com mais alto sinal no soro e no tecido tumoral de pacientes com câncer de cólon.

## 6. CONCLUSÃO

Nas condições em que este estudo foi conduzido e baseado nos seus resultados, pode-se concluir que o perfil de N-glicosilação do soro de pacientes com adenocarcinoma de câncer cólon esporádico nos estadios II e III difere do perfil de N-glicosilação de indivíduos sadios, com potencial utilidade como marcador de doença.

Apesar de heterogêneo, o perfil de N-glicosilação no tecido tumoral apresentou um padrão particular de composições em relação ao tecido normal, sem correlação com o perfil de N-glicosilação sérico.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMCZYK, B.; THARMALINGAM, T.; RUDD, P. M. Glycans as cancer biomarkers. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, vol. 1820, n. 9, p. 1347–53, Sep. 2012.
- AIZPURUA-OLAIZOLA, O.; SASTRE TORAÑO, J.; FALCON-PEREZ, J. M.; WILLIAMS, C.; REICHARDT, N.; BOONS, G.-J. Mass spectrometry for glycan biomarker discovery. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, vol. 100, p. 7–14, Mar. 2018. doi:10.1016/j.trac.2017.12.015
- ALDREDGE, D.; AN, H. J.; TANG, N.; WADDELL, K.; LEBRILLA, C. B. Annotation of a Serum N-Glycan Library for Rapid Identification of Structures. **J Proteome Res** vol. 11, n. 3, p. 1958–1968, Mar. 2012. doi:10.1021/pr2011439
- ALLEY, W.R.; MADERA, M.; MECHREF, Y.; NOVOTNY, M.V. Chip-based Reversed-phase Liquid Chromatography–Mass Spectrometry of Permethyated N-Linked Glycans: A Potential Methodology for Cancer-biomarker Discovery. **Anal Chem**, vol. 82, n. 12, p. 5.095–5.106, Jun. 2010. doi:10.1021/ac100131e
- ALVAREZ-MANILLA, G.; WARREN, N. L.; ABNEY, T.; ATWOOD, J.; AZADI, P.; YORK, W. S.; PIERCE, M.; ORLANDO, R. Tools for glycomics: relative quantitation of glycans by isotopic permethylation using <sup>13</sup>CH<sub>3</sub>I. **Glycobiology**, vol. 17, n. 7, p. 677–687, Jul. 2007. doi:10.1093/glycob/cwm033
- ALWERS, E.; JIA, M.; KLOOR, M.; BLÄKER, H.; BRENNER, H.; HOFFMEISTER, M. Associations between molecular classifications of colorectal cancer and patient survival: a systematic review. **Clin Gastroenterol Hepatol**, vol. 17, n. 3, p. 402–410.e2, Feb. 2019. doi: 10.1016/j.cgh.2017.12.038
- AMIN, M. B. editor in chief. Implementation of AJCC 8th Edition Cancer Staging System. **American Joint Committee on Cancer**. Available at <https://cancerstaging.org/About/news/Pages/Implementation-of-AJCC-8th-Edition-Cancer-Staging-System.aspx>. Accessed: January 4, 2017.
- ANDERSON, N. L.; ANDERSON, N. G. The Human Plasma Proteome. **Mol Cell Proteomics**, vol. 1, n. 11, p. 845–867, Nov. 2002. doi:10.1074/mcp.r200007-mcp200
- ANTHONY, R. M.; NIMMERJAHN, F. The role of differential IgG glycosylation in the interaction of antibodies with FcγRs in vivo. **Curr Opin Organ Transplant**, vol. 16, n. 1, p. 7–14, Feb. 2011. doi:10.1097/mot.0b013e328342538f
- ARNOLD, J. N.; WORMALD, M. R.; SIM, R. B.; RUDD, P. M.; DWEK, R. A. The Impact of Glycosylation on the Biological Function and Structure of Human Immunoglobulins. **Annu Rev Immunol**, vol. 25, n. 1, p. 21–50, 2007. doi:10.1146/annurev.immunol.25.022106.141702

ARNOLD, J. N.; SALDOVA, R.; HAMID, U. M. A.; RUDD, P. M. Evaluation of the serum N-linked glycome for the diagnosis of cancer and chronic inflammation. **Proteomics**, vol. 8, n. 16, p. 3.284–3.293. Aug. 2008. doi:10.1002/pmic.200800163

ATWOOD, J. A.; CHENG, L.; ALVAREZ-MANILLA, G.; WARREN, N. L.; YORK, W.S.; ORLANDO, R. Quantitation by isobaric labeling: applications to glycomics. **J Proteome Res**, vol. 7, n.1, p. 367–374, Jan. 2008.

BALOG, C. I. A.; STAVENHAGEN, K.; FUNG, W. L. J.; KOELEMAN, C.A.; McDONNELL, L. C.; VEHROEVEN, A.; MESKER, W.E.; TOLLENAAR, R.A.E.M.; DEELDER, A. M.; WUHRER, M. N-glycosylation of colorectal cancer tissues: A liquid chromatography and mass spectrometry-based investigation. **Mol Cell Proteomics**, vol. 11, n. 9, p. 571–585. Sep. 2012.

BANAZADEH, A.; VEILLON, L.; WOODING, K. M.; ZABET, M.; MECHREF, Y. Recent advances in mass spectrometric analysis of glycoproteins. **Electrophoresis**, vol. 38, n. 1, p. 162-189, Jan. 2017. doi:10.1002/elps.201600357

BARBOSA, E. A.; FONTES, N. DO C.; SANTOS, S.C.L.; LEFEBER, D.J.; BLOCH, C.; BRUM, J.M.; BRAND, G.D. Relative quantification of plasma N-glycans in type II congenital disorder of glycosylation patients by mass spectrometry. **Clin Chim Acta**, vol. 492, p. 102–113. May. 2019. doi:10.1016/j.cca.2019.02.013.

BELSHAW, N. J.; PAL, N.; TAPP, H. S.; DAINTY, J. R.; LEWIS, M. P. N.; WILLIAMS, M. R.; LUND, E. K.; JOHNSON, I. T. Patterns of DNA methylation in individual colonic crypts reveal aging and cancer-related field defects in the morphologically normal mucosa. **Carcinogenesis**, vol. 31, n. 6, p. 1158–1163, June. 2010. doi:10.1093/carcin/bgq077

BERTELSEN, CLAUS A; NEUENSCHWANDER, ANDERS U; JANSEN, JENS E; TENMA, JUTAKA R; WILHELMSSEN, MICHAEL; KIRKEGAARD-KLITBO, ANDERS; IVERSEN, ELSE R; BOLS, BIRGITTE; INGEHOLM, PETER; RASMUSSEN, LEIF A; JEPSEN, LARS V; BORN, PERNILLE W; KRISTENSEN, BENT; KLEIF, JAKOB. 5-year outcome after complete mesocolic excision for right-sided colon cancer: a population-based cohort study. **Lancet oncol**, vol. 20, n. 11, 1556-1565, Nov. 2019. doi: 10.1016/S1470-2045(19)30485-1

BETTINGTON, M.; WALKER, N.; CLOUSTON, A.; BROWN, I.; LEGGETT, B.; WHITEHALL, V. The serrated pathway to colorectal carcinoma: current concepts and challenges. **Histopathology**, vol. 62, n. 3, p. 367-86. Feb. 2013.

BÖHM, S.; KAO, D.; NIMMERJAHN, F. Sweet and Sour: The Role of Glycosylation for the Anti-inflammatory Activity of Immunoglobulin G. In: Daeron M., Nimmerjahn F. (eds) Fc Receptors. **Curr Top Microbiol Immunol**, vol. 382. 2014. Springer, Cham. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-07911-0\\_18](https://doi.org/10.1007/978-3-319-07911-0_18)

BONES, J.; MITTERMAYR, S.; O'DONOGHUE, N.; GUTTMAN, A.; RUDD, P. M. Ultra Performance Liquid Chromatographic Profiling of Serum N-Glycans for Fast and Efficient Identification of Cancer Associated Alterations in Glycosylation. **Anal Chem**, vol. 82, n. 24, p. 10208–10215. Dec. 2010. doi:10.1021/ac102860w

BOYAVAL, F.; VAN ZEIJL, R.; DALEBOUT, H.; HOLST, S.; VAN PELT, G.W.; FARIÑA-SARASQUETA, A.; MESKER, W.E.; TOLLENAAR, R.; MORREAU, H.; WUHRER, M.; HEIJS, B. N-glycomic signature of stage II colorectal cancer and its association with the tumor microenvironment. **Mol Cell Proteomics**, vol. 20, mcp.RA120.002215, Oct. 2020. doi:10.1074/mcp.RA120.002215

BRAY, F.; FERLAY, J.; SOERJOMATARAM, I.; SIEGEL, R. L.; TORRE, L. A.; JEMAL, A. Global Cancer Statistics 2018: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. **CA Cancer J Clin**. vol. 68, n. 6, p. 392-424, Nov. 2018. doi:10.3322/caac.21492

BROWN, D. G.; RAO, S.; WEIR, T. L.; O'MALIA, J.; BAZAN, M.; BROWN, R. J.; RYAN, E. P. Metabolomics and metabolic pathway networks from human colorectal cancers, adjacent mucosa, and stool. **Cancer Metabol**, vol. 4, n. 1, p. 11–23, Jan. 2016. doi:10.1186/s40170-016-0151-y

BUUNEM, M.; VELDKAMP, R.; HOP, W.C. Survival after laparoscopic surgery versus open surgery for colon cancer: long-term outcome of a randomised clinical trial. **Lancet Oncol**, vol. 10, n. 1, p. 44–52, Jan. 2009. doi:10.1016/s1470-2045(08)70310-3

CARETHERS, J. M.; JUNG, B. H. Genetics and Genetic Biomarkers in Sporadic Colorectal Cancer. **Gastroenterology**, vol. 149, n. 5, p. 1177–1190. Oct. 2015. e3. doi:10.1053/j.gastro.2015.06.047

CARVALHO, S.; REIS, C. A.; PINHO, S. S. Cadherins Glycans in Cancer: Sweet Players in a Bitter Process. **Trends Cancer**, vol. 2, n. 9, 519–531. Sep. 2016. doi:10.1016/j.trecan.2016.08.003

CERONI, A.; MAASS, K.; GEYER, H.; GEYER, R.; DELL, A.; HASLAM, S.M. GlycoWorkbench: a tool for the computer-assisted annotation of mass spectra of glycans. **J Proteome Res**, vol. 7, n. 4, p. 1650–1659. Apr. 2008.

CHANDLER, P. D.; SONG, Y.; LIN, J.; ZHANG, S.; SESSO, H. D.; MORA, S.; GIOVANNUCCI, E. L.; REXRODE, K. E.; MOORTHY, M. V.; LI, C.; RIDKER, P. M.; LEE, I.-M.; MANSON, J.O.A. E.; BURING, J. E.; WANG, L. Lipid biomarkers and long-term risk of cancer in the Women's Health Study. **Am J Clin Nutr**, vol. 103, n. 6, p. 1397–1407, June. 2016. doi:10.3945/ajcn.115.124321

CHANDRASEKARAN, E. V.; XUE, J.; NEELAMEGHAM, S.; MATTA, K. L. The pattern of glycosyl- and sulfotransferase activities in cancer cell lines: A predictor of individual cancer-associated distinct carbohydrate structures for the structural identification of sig- nature glycans. **Carbohydrate Res**, vol. 341, n. 8, p. 983–94. June. 2006.

CHEN, C.-H.; WANG, S.-H.; LIU, C.-H.; WU, Y.-L.; WANG, W.-J.; HUANG, J., HUNG, J.-S.; LAI, I.-R.; LIANG, J.-T.; HUANG, M.-C.  $\beta$ -1,4-Galactosyltransferase III suppresses  $\beta$ 1 integrin-mediated invasive phenotypes and negatively correlates with metastasis in colorectal cancer. **Carcinogenesis**, vol. 35, n. 6, p. 1258–1266, June. 2014. <http://dx.doi.org/10.1093/carcin/bgu007>

CHEN, X.; SUN, J.; WANG, X.; YUAN, Y.; CAI, L.; XIE, Y.; FAN, Z.; LIU, K.; JIAO, X. A Meta-Analysis of Proteomic Blood Markers of Colorectal Cancer. **Curr Med Chem**, vol. 21, n. 4, p. 1-21, Apr. 2020. doi: 10.2174/0929867327666200427094054

CHIK, J. H. L.; ZHOU, J.; MOH, E. S. X.; CHRISTOPHERSON, R.; CLARKE, S. J.; MOLLOY, M. P.; PACKER, N. H. Comprehensive glycomics comparison between colon cancer cell cultures and tumours: Implications for biomarker studies. **J Proteomics**, vol. 108, p. 146–162. Aug. 2014. doi:10.1016/j.jprot.2014.05.002

CHRISTIANSEN, M. N.; CHIK, J.; LEE, L.; ANUGRAHAM, M.; ABRAHAMS, J. L.; PACKER, N. H. Cell surface protein glycosylation in cancer. **Proteomics**, vol. 14, n. 4-5, p. 525–546, Mar. 2014. doi:10.1002/pmic.201300387

CIUCANU, I.; KERERK, F. A simple and rapid method for the permethylation of carbohydrates. **Carbohydr Res**, vol. 131, n. 2, p. 209–217, Aug. 1984.

CIUCANU, I.; COSTELLO, C. E. Elimination of oxidative degradation during the per-methylation of carbohydrates. **J Am Chem Soc**, vol. 125, n. 52, p. 16213–16219, Dec. 2003.

CLERC, F.; REIDING, K. R.; JANSEN, B. C.; KAMMEIJER, G. S. M.; BONDT, A.; WUHRER, M. Human plasma protein N-glycosylation. **Glycoconj J**, vol. 33, n. 3, p. 309–343. June. 2016. doi:10.1007/s10719-015-9626-2

CONROY, T.; LAMFICHEKH, N.; ETIENNE, P.-L.; RIO, E.; FRANCOIS, E.; MESGOUEZ-NEBOUT, N.; VENDRELY, V.; ARTIGNAN, X.; BOUCHÉ, O.; GARGOT, D.; BOIGE, V.; BONICHON-LAMICHHANE, N.; LOUVET, C.; MORAND, C.; DE LA FOUCHARDIERE, C.; JUZYNA, B.; RULLIER, E.; MARCHAL, F.; CASTAN, F.; BORG, C. Total neoadjuvant therapy with mFOLFIRINOX versus preoperative chemoradiation in patients with locally advanced rectal cancer: final results of PRODIGE 23 phase III trial, a UNICANCER GI trial. **J Clin Oncol**, vol. 38, n. 34, 15\_suppl, 4007-4007, Dec. 2020. doi: 10.1200/JCO.2020.38.15\_SUPPL.4007

CUMMINGS, R. D. The repertoire of glycan determinants in the human glycome. **Mol BioSyst**, vol. 5, n. 10, p. 1087-1104, Oct. 2009. doi:10.1039/b907931a

CURTIUS, K.; WRIGHT, N. A.; GRAHAM, T. A. An evolutionary perspective on field cancerization. **Nat Rev Cancer**, vol. 18, n. 1, p. 19–32, Jan. 2018. doi:10.1038/nrc.2017.102

DALL'OLIO, F.; MALAGOLINI, N.; DI STEFANO, G.; MINNI, F.; MARRANO, D.; SERAFINI-CESSI, F. Increased CMP-NeuAc:Gal $\beta$ 1,4GlcNAc-R  $\alpha$ 2,6 sialyltransferase activity in human colorectal cancer tissues. **Int J Cancer**, vol. 44, n. 3, p. 434–439. Sep. 1989. doi:10.1002/ijc.2910440309

DALL'OLIO, F. Mechanisms of cancer-associated glycosylation changes. **Front Biosci**, vol. 17, n. 9, p. 670-699. Jan. 2012. doi:10.2741/3951

DE FREITAS JUNIOR J.C.; MORGADO-DIAZ J.A. The Role of N-glycans in Colorectal Cancer Progression: Potential Biomarkers and Therapeutic Applications. **Oncotarget**, vol. 7, n. 15, p. :19395–19413, Nov. 2016 doi:10.18632/oncotarget.6283

DE LEOZ, M. L. A.; YOUNG, L. J. T.; AN, H. J.; KRONEWITTER, S. R.; KIM, J.; MIYAMOTO, S.; BOROWSKY, A. D.; CHEW, H. K.; LEBRILLA, C. B. High-mannose glycans are elevated during breast cancer progression. **Mol Cell Proteomics**, vol. 10, n. 1, p. 110.002717, Jan. 2011. doi:10.1074/mcp.M110.002717.

DE OLIVEIRA, R. M.; ORNELAS, C. A. R.; MARTINS, A A. M. Use of Mass Spectrometry to Screen Glycan Early Markers in Hepatocellular Carcinoma. **Front Oncol**, vol. n. 7, 328, Jan. 2018. doi:10.3389/fonc.2017.00328

DE VROOME, S. W.; HOLST, S.; GIRONDO, M. RODRIGUEZ; VAN DER BURGT, Y. E.M.; MESKER, W. E.; TOLLENAAR, R. A.E.M.; WUHRER, M. Serum N-glycome alterations in colorectal cancer associate with survival. **Oncotarget**, n. 9, p. 30610-30623. June. 2018. doi.org/10.18632/oncotarget.25753

DEMETRIOU, M.; NABI, I. R.; COPPOLINO, M.; DEDHAR, S.; DENNIS, J. W. Reduced contact-inhibition and substratum adhesion in epithelial cells expressing GlcNAc-transferase V. **J Cell Biol**. vol.130, n. 2, p. 383–392, Jul. 1995. doi: 10.1083/jcb.130.2.383.

DENNIS, J.W.; LAFERTE, S.; WAGHORNE, C.; BREITMAN, M.L.; KERBEL, R.S. Beta 1–6 branching of Asn-linked oligosaccharides is directly associated with metastasis. **Science**, vol. 236, n. 4801, p. 582–585, May. 1987. doi: 10.1126/science.2953071

DI LELLA, SANTIAGO; SUNDBLAD, VICTORIA; CERLIANI, JUAN P.; GUARDIA, CARLOS M.; ESTRIN, DARIO A.; VASTA, GERARDO R.; RABINOVICH, GABRIEL A. When Galectins Recognize Glycans: From Biochemistry to Physiology and Back Again. **Biochemistry**, vol. 50, n. 37, p. 7842–7857, Aug. 2011. doi:10.1021/bi201121m

DIENSTMANN, R.; VERMEULEN, L.; GUINNEY, J.; KOPETZ, S.; TEJPAR, S.; TABERNEIRO, J. Consensus molecular subtypes and the evolution of precision medicine in colorectal cancer. **Nat Rev Cancer**, vol. 17, n. 2, p. 79-92. Feb. 2017.

DOHERTY, M.; THEODORATOU, E.; WALSH, I.; ADAMCZYK, B.; STÖCKMANN, H.; AGAKOV, F.; TIMOFEEVA, M.; TRBOJEVIĆ-AKMAČIĆ, I.; VUČKOVIĆ, F.; DUFY, F.; MCMANUS, C. A.; FARRINGTON, S. M.; DUNLOP, M. G.; PEROLA, M.; GORDAN LAUC, G.; CAMPBELL, H.; RUDD, P. M. Plasma N-glycans in colorectal cancer risk. **Sci Rep**, vol. 8, n. 1, p. 8655-8666, June. 2018 doi:10.1038/s41598-018-26805-7

DOTZ, V.; WUHRER, M. N-glycome signatures in human plasma: associations with physiology and major diseases. **FEBS Letters**, vol. 593, n. 21, p. 2966-2976, Sep. 2019, doi:10.1002/1873-3468.13598

DUNNE, P. D.; MCART, D. G.; BRADLEY, C. A.; O'REILLY, P. G.; BARRETT, H. L.; CUMMINS, R.; O'GRADY, T.; ARTHUR, K.; LOUGHREY, M.; ALLEN, W. L.; MCDADE, S.; WAUGH, D. J.; HAMILTON, P. W.; LONGLEY, D. B.; KAY, E. W.; JOHNSTON, P. G.; LAWLER, M.; SALTO-TELLEZ, M.; VAN SCHAEYBROECK, S. Challenging the cancer molecular stratification dogma: intratumoral heterogeneity undermines consensus molecular subtypes and potential diagnostic value in colorectal cancer. **Clin Cancer Res**, vol. 22, n. 16, p. 4095-4104, Aug. 2016. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-16-0032.

EDGE, S. B.; BYRD, D. R.; COMPTON, C. C.; FRITZ, A. G.; GREENE, F. L.; & TROTTI, A. (Eds.). **AJCC cancer staging manual (7th ed)**. New York, NY: Springer. ISBN 978-0-387-88440. 2010.

ETXEBARRIA, J.; REICHARDT, N.-C. Methods for the absolute quantification of N-glycan biomarkers. **BBA- General Subjects**, vol. 1860, n. 8, p. 1676-1687, Mar. 2016. doi:10.1016/j.bbagen.2016.03.003

FARRAYE, F. A.; ODZE, R. D.; EADEN, J.; ITZKOWITZ, S. H. AGA Technical Review on the Diagnosis and Management of Colorectal Neoplasia in Inflammatory Bowel Disease. **Gastroenterology**, vol. 138, n. 2, p. 746-774, e4. Feb. 2010. doi:10.1053/j.gastro.2009.12.035

FEARON, E. R.; VOGELSTEIN, B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. **Cell**, vol. 61, n. 5, p. 759-67. Jun. 1990.

FERLAY, J.; COLOMBET, M.; SOERJOMATARAM, I.; MATHERS, C.; PARKIN, D.M.; PIÑEROS, M.; ZNAOR, A.; BRAY, F. Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods. **Int J Cancer**, New York, v. 144, n. 8, p. 1941-1953, Apr. 2019. doi: 10.1002/ijc.31937

FITZGERALD, S.; O'REILLY, J. A.; WILSON, E.; JOYCE, A.; FARRELL, R.; KENNY, D.; KAY, E.W.; FITZGERALD, J.; BYRNE, B.; KIJANKA, G.; O'KENNEDY, R. Measurement of the IgM and IgG autoantibody immune responses in human serum has high predictive value for the presence of colorectal cancer. **Clin Colorectal Cancer**, vol. 18, n. 1, p. e53-e60, Mar. 2019. doi:10.1016/j.clcc.2018.09.009

GOLDBERG, D.; SUTTON-SMITH, M.; PAULSON, J.; DELL, A. Automatic annotation of matrix-assisted laser desorption/ionization N-glycan spectra. **Proteomics**, vol. 5, n. 4, p. 865-875, Mar. 2005. doi:10.1002/pmic.200401071

GONZALEZ, R. S.; WASHINGTON, K; SHI, C. Current applications of molecular pathology in colorectal carcinoma. **Appl Cancer Res**, vol. 37, n. 13, May. 2017. doi:10.1186/s41241-017-0020-1

GORNIK, O.; WAGNER, J.; PUCIC, M.; KNEZEVIC, A.; REDZIC, I.; LAUC, G. Stability of N-glycan profiles in human plasma. **Glycobiology**, vol. 19, n. 12, p. 1547–1553, Dec. 2009. doi:10.1093/glycob/cwp134

GRAHAM, T. A.; MCDONALD, S. A.; WRIGHT, N. A. Field cancerization in the GI tract. **Future Oncol**, vol. 7, n. 8, p. 981–993, Aug. 2011. doi:10.2217/fon.11.70

GRANOVSKY, M.; FATA, J.; PAWLING, J.; MULLER, W. J.; KHOKHA, R.; DENNIS, J. W. Suppression of tumor growth and metastasis in Mgat5- deficient mice. **Nat Med**, vol. 6, n. 3, p. 306–312, Apr. 2000. doi: 10.1038/73163

GU, J.; SATO, Y.; KARIYA, Y.; ISAJI, T.; TANIGUCHI, N.; FUKUDA, T. A mutual regulation between cell–cell adhesion and N-glycosylation: Implication of the bisecting GlcNAc for biological functions. **J Proteome Res**, vol. 8, n. 2, p. 431–435, Feb. 2008. doi: 10.1021/pr800674g.

GUINNEY, J.; DIENSTMANN, R.; WANG, X.; DE REYNIÈS, A.; SCHLICKER, A.; SONESON, C.; MARISA, L.; ROEPMAN, P.; NYAMUNDANDA, G.; ANGELINO, P.; BOT, B.M.; MORRIS, J.S.; SIMON, I.M.; GERSTER, S.; FESSLER, E.; DE SOUSA E MELO, F.; MISSIAGLIA, E.; RAMAY, H.; BARRAS, D.; HOMICKO, K.; MARU, D.; MANYAM, G.C.; BROOM, B.; BOIGE, V.; PEREZ-VILLAMIL, B.; LADERAS, T.; SALAZAR, R.; GRAY, J.W.; HANAHAN, D.; TABERNERO, J.; BERNARDS, R.; FRIEND, S.H.; LAURENT-PUIG, P.; MEDEMA, J.P.; SADANANDAM, A.; WESSELS, L.; DELORENZI, M.; KOPETZ, S.; VERMEULEN, L.; TEJPAR, S. The consensus molecular subtypes of colorectal cancer. **Nat Medicine**, vol. 21, n. 11, p. 1350-1356, Nov. 2015. doi: 10.1038/nm.3967.

GUO, H. B.; LEE, I.; KAMAR, M.; PIERCE, M. N-acetylglucosaminyltransferase V expression levels regulate cadherin-associated homotypic cell-cell adhesion and intra- cellular signaling pathways. **J Biol Chem**, vol. 278, n. 52, p. 52412–52424. Dec. 2003.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A.. Hallmarks of cancer: The next generation. **Cell**, vol. 144, n. 5, p. 646–674. Mar. 2011.

HARDIMAN, K. Update on Sporadic Colorectal Cancer Genetics. **Clin Colon Rectal Surg**, vol. 31, n. 3, p. 147–152, May. 2018. doi:10.1055/s-0037-1602234

HARVEY, D. J.; DWEK, R. A.; RUDD, P. M. Determining the Structure of Glycan Moieties by Mass Spectrometry. **Curr Prot Protein Sci**, Chapter 12: unit 12.7.1–12.7.18. Mar. 2006. doi:10.1002/0471140864.ps1207s43

HARVEY, D. J. Analysis of carbohydrates and glycoconjugates by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry: An update for 2013-2014. **Mass Spectrom Rev**, vol. 37, n. 4, p. 353-491, July. 2018 doi: 10.1002/mas.21530.

HASLAM, S. M.; JULIEN, S.; BURCHELL, J. M.; MONK, C. R.; CERONI, A.; GARDEN, O. A.; DELL, A. Characterizing the glycome of the mammalian immune system. **Immunol Cell Biol**, vol. 86, n. 7, p. 564–573, Oct. 2008. doi:10.1038/icb.2008.54

HÄUSELMANN, I.; BORSIG, L. Altered Tumor-Cell Glycosylation Promotes Metastasis. **Front Oncol**, vol.4, n. 28, p. 1-15. Feb. 2014. doi:10.3389/fonc.2014.00028

HENNIG, R.; CAJIC, S.; BOROWIAK, M.; HOFFMANN, M.; KOTTLER, R.; REICHL, U.; RAPP, E. Towards personalized diagnostics via longitudinal study of the human plasma N-glycome. **Biochim Biophys Acta**, vol. 1860, n. 8, p. 1728-1738, Aug. 2016. doi: 10.1016/j.bbagen.2016.03.035.

HIRABAYASHI, J.; HASHIDATE, T.; ARATA, Y.; NISHI, N.; NAKAMURA, T.; HIRASHIMA, M.; URASHIMA, T.; OKA, T.; FUTAI, M.; MULLER, W. E.; YAGI, F.; KASAI, K. Oligosaccharide specificity of galectins: a search by frontal affinity chromatography. **BBA General Subjects**, vol. 1572, n. 2-3, p. 232–254, Sep. 2002. [https://doi.org/10.1016/S0304-4165\(02\)00311-2](https://doi.org/10.1016/S0304-4165(02)00311-2)

HOFFMAN, B.D.; YAP, A.S. Towards a dynamic understanding of cadherin-based mechanobiology. **Trends Cell Biol**. vol. 25, n. 12, p. 803–814, Dec. 2015. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2015.09.008>

HOHENBERGER, W.; WEBER, K.; MATZEL, K.; T. PAPADOPOULOS, T.; MERKEL, S. Standardized surgery for colonic cancer: complete mesocolic excision and central ligation – technical notes and outcome. **Colorectal Diseases**, vol. 11, n. 4, p. 354-364. Apr. 2009. <https://doi.org/10.1111/j.1463-1318.2008.01735.x>

HOLM, M.; NUMMELA, P.; HEISKANEN, A.; SATOMAA, T.; KAPRIO, T.; MUSTONEN, H.; RISTIMÄKI, A.; HAGLUND, C. N-glycomic profiling of colorectal cancer according to tumor stage and location. **PLoS One**, vol. 15, n. 6, e0234989. June. 2020. doi:10.1371/journal.pone.0234989

HOLST, S.; STAVENHAGEN, K.; BALOG, C. I. A.; KOELEMAN, C.A.; MCDONNELL, L.M.; MAYBORODA, O.A.; VERHOEVEN, A.; MESKER, W.E.; TOLLENAAR, R.A.; DEELDER, A.M.; WUHRER, M. Investigations on aberrant glycosylation of glycosphingolipids in colorectal cancer tissues using liquid chromatography and matrix-assisted laser desorption time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS). **Mol Cell Proteomics: MCP**, vol.12, n. 11, p. 3081–93. Nov. 2013. doi: 10.1074/mcp.M113.030387.

HOLST, S.; WHURER, M.; ROMBOUTS, Y. Glycosylation characteristics of colorectal cancer. **Advances in Cancer Research**, Elsevier. vol. 126, p. 203-56. ISSN 0065-230X. 2015.

HONG, Q.; RUHAAK, L. R.; STROBLE, C.; PARKER, E.; HUANG, J.; MAVERAKIS, E.; LEBRILLA, C. B. A Method for Comprehensive Glycosite Mapping and Direct Quantitation of Serum Glycoproteins. **J Proteome Res.**, vol. 14, n. 12, p. 5179–5192, Dec. 2015 <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.5b00756>.

HOSPERS, G.A.P; BAHADOER, R.R.; DIJKSTRA, E.A.; VAN ETEN, B.; MARIJNEN, C.A.M.; PUTTER, H.; KRANENBARG, E.M.; ROODVOETS, A.G.H.; NAGTEGAAL, I.D.; BEETS-TAN, R.G.H.; BLOMQVIST, L.K.; FOKSTUEN, T.; TEN TIJE, A.J.; CAPDEVILA, J.; HENDRIKS, M.P.; EDHEMOVIC, I.; CERVANTES, A.; NILSSON, P.J.; GLIMELIUS, B.; VAN DE VELDE, C.J.H. Short-course radiotherapy followed by chemotherapy before total mesorectal excision (TME) versus preoperative chemoradiotherapy, TME, and optional adjuvant chemotherapy in locally advanced rectal cancer (RAPIDO): a randomised, open-label, phase 3 trial. **Lancet Oncol.** Vol. 22, n.1, p. 29-42, Jan. 2021. doi:10.1016/s1470-2045(20)30555-6

HU, Y.; MECHREF, M. Comparing MALDI-MS, RP-LC-MALDI-MS and RP-LC-ESI-MS glycomic profiles of permethylated N-glycans derived from model glycoproteins and human blood serum. **Electrophoresis**, vol. 33, n. 12, p. 1768–1777. July. 2012. doi:10.1002/elps.201100703

HU, Y.; DESANTOS-GARCIA, J. L.; MECHREF, Y. Comparative glycomic profiling of isotopically permethylated N-glycans by liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry. **Rapid Commun Mass Spectrom**, vol. 27, n. 8, p. 865–877. Apr. 2013. doi:10.1002/rcm.6512

HU, Y.; SHIHAB, T.; ZHOU, S.; WOODING, K.; MECHREF, Y. LC-MS/MS of permethylated N-glycans derived from model and human blood serum glycoproteins. **Electrophoresis**, vol. 37, n. 11, p. 1498–1505, June. 2016. doi:10.1002/elps.201500560

HUMPHRIES, A.; WRIGHT, N. A. Colonic crypt organization and tumorigenesis. **Nat Rev Cancer**, vol. 8, n. 6, p. 415–424. May. 2008. doi:10.1038/nrc2392

HUNG, W.-T.; WANG, S.-H.; CHEN, Y.-T.; YU, H.-M.; CHEN, C.-H.; YANG, W.-B. MALDI-TOF MS analysis of native and permethylated or benzimidazole-derivatized polysaccharides. **Molecules**, vol. 17, n. 5, p. 4950–4961. Apr. 2012. doi:10.3390/molecules17054950

HUNG, J. S.; HUANG, J.; LIN, Y. C.; HUANG, M.-J. C1GALT1 overexpression promotes the invasive behavior of colon cancer cells through modifying O-glycosylation of FGFR2. **Oncotarget**, vol. 5, n. 8, p. 2096–2106, Apr. 2014. doi: 10.18632/oncotarget.1815

ICHIKAWA, T.; NAKAYAMA, J.; SAKURA, N.; HASHIMOTO, T.; FUKUDA, M.; FUKUDA, M. N.; TAKI, T. Expression of N-acetylglucosaminyltransferase ( $\beta$ 4GalT-I) during adenoma-carcinoma sequence in the human colorectum. **J Histochem Cytochem**, vol. 47, n. 12, p. 1593–1601, Dec. 1999. <http://dx.doi.org/10.1177/002215549904701211>.

IMIELINSKI, M.; CHA, S.; REJTAR, T.; RICHARDSON, E.A.; KARGER, B.L.; SGROI D. C. Integrated proteomic, transcriptomic, and Biological Network Analysis of Breast Carcinoma Reveals Molecular Features of Tumorigenesis and Clinical Relapse. **Mol Cell Proteomics: MCP**, vol.11, n. 6, p. M111.014910. June. 2012. doi: 10.1074/mcp.M111.014910.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Projeção da população do Brasil e Unidades da Federação por sexo e idade para o período 2000-2030**. Rio de Janeiro: IBGE, 2020. Disponível em: [https://ww2.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/projecao\\_da\\_populacao/2013/default\\_tab.shtm](https://ww2.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/projecao_da_populacao/2013/default_tab.shtm).

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. **Estimativas de incidência: Incidência de Câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA, 2020. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/estimativa>.

JEONG, H. J.; KIM, Y. G.; YANG, Y. H.; KIM, B. G. Highthroughput quantitative analysis of total N-glycans by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. **Anal Chem**, vol. 84, n. 7, p. 3453–3460, Mar. 2012. <https://doi.org/10.1021/ac203440c>

KAILEMIA, M. J.; RUHAAK, L. R.; LEBRILLA, C. B.; AMSTER, I. J. Oligosaccharide analysis by mass spectrometry: a review of recent developments. **Anal Chem**, vol. 86, n. 1, p. 196–212, Jan. 2014. doi:10.1021/ac403969n

KAILEMIA, M. J.; PARK, D.; LEBRILLA, C. B. Glycans and glycoproteins as specific biomarkers for cancer. **Anal Bioanal Chem**, vol. 409, n. 2, p. 395–410. Jan. 2017. doi:10.1007/s00216-016-9880-6

KANEKO, Y.; NIMMERJAHN, F.; RAVETCH, J. V. Anti-Inflammatory Activity of Immunoglobulin G Resulting from Fc Sialylation. **Science**, vol. 313, n. 5787, p. 670–673, Aug. 2016. doi:10.1126/science.1129594

KANG, P.; MECHREF, Y.; KLOUCKOVA, I.; NOVOTNY, M.V. Solid-phase permethylation of glycans for mass spectrometric analysis. **Rapid Commun Mass Spectrom**, vol. 19, n. 23, p. 3421–3428, Dec. 2005. <https://doi.org/10.1002/rcm.2210>

KANG, P.; MECHREF, Y.; KYSELOVA, Z.; GOETZ, J. A.; NOVOTNY, M. V. Comparative glycomic mapping through quantitative permethylation and stable-isotope labeling. **Anal Chem**, vol. 79, n. 16, p. 6064–6073, Aug. 2007. doi:10.1021/ac062098r

KAPRIO, T.; SATOMAA, T.; HEISKANEN, A.; HOKKE, C. H.; DEELDER, A. M. MUSTONEN, H.; HAGSTRÖM, J.; CARPEN, O.; SAARINEN, J.; HAGLUND, C. N-glycomic Profiling as a Tool to Separate Rectal Adenomas from Carcinomas. **Mol Cell Proteomics-MCP**, vol. 14, n.2, p. 277–288, 2014 doi:10.1074/mcp.m114.041632

KEUM, N.; GIOVANNUCCI, E. Global burden of colorectal cancer: emerging trends, risk factors and prevention strategies. **Nat Rev Gastroenterol Hepatol**, vol. 16, p. 713–732, Dec. 2019. <https://doi.org/10.1038/s41575-019-0189-8>

KITA, Y.; MIURA, Y.; FURUKAWA, J.-I.; NAKANO, M.; SHINOHARA, Y.; OHNO, M.; TAKIMOTO, A.; NISHIMURA, S.-I. Quantitative glycomics of human whole serum glycoproteins based on the standardized protocol for liberating N-glycans. **Mol Cell Proteomics MCP**, vol. 6, n. 8, p. 1437–1445, 2007. doi:10.1074/mcp.T600063-MCP200

KLEIN, A. Human Total Serum N-Glycome. In Gregory S. Makowski, editor: **Advances in Clinical Chemistry**, vol. 46, Burlington: Academic Press, 2008, pp. 51-85. ISBN: 978-0-12-374209-4

KNEŽEVIĆ, A.; POLAŠEK, O.; GORNIK, O.; RUDAN, I.; CAMPBELL, H.; HAYWARD, C.; WRIGHT, A.; KOLČIĆ, I.; O'DONOGHUE, N.; BONES, J.; RUDD, P.M.; LAUC, G. Variability, Heritability and Environmental Determinants of Human Plasma N-Glycome. **J Proteome Res**, vol. 8, n. 2, p. 694–701, Feb. 2009. doi:10.1021/pr800737u

KNEŽEVIĆ, A.; GORNIK, O.; POLAŠEK, O.; PUČIĆ, M.; REDŽIĆ, I.; NOVOKMET, M.; RUDD, P.M.; WRIGHT, A.F.; CAMPBELL, H.; RUDAN, I.; LAUC, G. Effects of aging, body mass index, plasma lipid profiles, and smoking on human plasma N-glycans. **Glycobiology**, vol. 20, n. 8, p. 959–969, Aug. 2010. doi:10.1093/glycob/cwq051

KRIŠTIĆ, J.; VUČKOVIĆ, F.; MENNI, C.; KLARIĆ, L.; KESER, T.; BECEHELI, I.; PUČIĆ-BAKOVIĆ, M.; NOVOKMET, M.; MANGINO, M.; THAQI, K.; RUDAN, P.; NOVOKMET, N.; ŠARAC, J.; MISSONI, S.; KOLČIĆ, I.; POLAŠEK, O.; RUDAN, I.; CAMPBELL, H.; HAYWARD, C.; AULCHENKO, Y.; VALDES, A.; WILSON, J.F.; GORNIK, O.; PRIMORAC, D.; ZOLDOŠ, V.; SPECTOR, T.; LAUC, G. Glycans Are a Novel Biomarker of Chronological and Biological Ages. **J Gerontol: Series A**, vol. 69, n. 7, p. 779–789, July 2013. doi:10.1093/gerona/glt190

KRONEWITTER, S. R.; AN, H. J.; DE LEOZ, M. L.; LEBRILLA, C. B.; MIYAMOTO, S.; LEISEROWITZ, G. S. The development of retrosynthetic glycan libraries to profile and classify the human serum N-linked glycome. **Proteomics**, vol. 9, n. 11, p. 2986–2994, June 2009. <https://doi.org/10.1002/pmic.200800760>

KUDO, T.; IKEHARA, Y.; TOGAYACHI, A.; MOROZUMI, K.; WATANABE, M.; NAKAMURA, M.; NISHIHARA, S.; NARIMATSU, H. Up-regulation of a set of glycosyltransferase genes in human colorectal cancer. **Lab Invest**, vol. 78, n. 7, p. 797–811, July. 1998.

KUZMANOV, U.; KOSANAM, H.; DIAMANDIS, E. P. The sweet and sour of serological glycoprotein tumor biomarker quantification. **BMC Med**, vol. 11, n. 1, article 31, Feb. 2013. <https://doi.org/10.1186/1741-7015-11-31>

KYSELOVA, Z.; MECHREF, Y.; KANG, P.; GOETZ, J.A.; DOBROLECKI, L.E.; SLEDGE, G. W.; SCHNAPER, L.; HICKEY, R.J.; MALKAS, L.H.; NOVOTNY, M. V. Breast cancer diagnosis and prognosis through quantitative measurements of serum glycan profiles. **Clin Chem**, vol. 54, n. 7, p. 1166-1225, July 2008. doi:10.1373/clinchem.2007.087148

LAUC, G.; ZOLDOŠ, V. A. Protein glycosylation—an evolutionary crossroad between genes and environment. **Mol BioSyst**, vol. 6, n. 12, p. 2373-2379, Dec. 2010. doi:10.1039/c0mb00067a

LAUC, G.; ESSAFI, A.; HUFFMAN, J. E.; HAYWARD, C.; KNEŽEVIĆ, A.; KATTLA, J. J.; POLASĀEK, O.; GORNIK, O.; VITART, V.; ABRAHAMS, J. L.; PUCĀICĀ, M.; NOVOKMET, M.; REDZĀICĀ, I.; CAMPBELL, S.; WILD, S. H.; BOROVECĀKI, F.; WANG, W.; KOLCĀIC, I.; ZGAGA, L.; GYLLENSTEN, U.; WILSON, J. F.; WRIGHT, A. F.; HASTIE, N. D.; CAMPBELL, H.; RUDD, P. M.; RUDAN, I. B. Genomics meets glycomics—the first GWAS study of human N-glycome identifies HNF1 $\alpha$  as a master regulator of plasma protein fucosylation. **PLoS Genetics**, vol. 6, n. 12, e1001256. Dec. 2010. doi:10.1371/journal.pgen.1001256

LAUC, G.; PEZER, M.; RUDAN, I.; CAMPBELL, H. Mechanisms of disease: The human N-glycome. **BBA - General Subjects**, vol. 1860, n. 8, p. 1574–1582, Aug. 2016. doi:10.1016/j.bbagen.2015.10.016

LE, D.T.; URAM, J.N.; WANG, H.; BARTLETT, B.R.; KEMBERLING, H.; EYRING, A.D.; SKORA, A.D.; LUBER, B.S.; AZAD, N.S.; LAHERU, D.; BIEDRZYCKI, B.; DONEHOWER, R.C.; ZAHEER, A.; FISHER, G.A.; CROCENZI, T.S.; LEE, J.J.; DUFFY, S.M.; GOLDBERG, R.M.; DE LA CHAPELLE, A.; KOSHIJI, M.; BHAIJEE, F.; HUEBNER, T.; HRUBAN, R.H.; WOOD, L.D.; CUKA, N.; PARDOLL, D.M.; PAPADOPOULOS, N.; KINZLER, K.W.; ZHOU, S.; CORNISH, T.C.; TAUBE, J.M.; ANDERS, R.A.; ESHLEMAN, J.R.; VOGELSTEIN, B.; DIAZ L.A. Jr. PD-1 blockade in tumors with mismatch-repair deficiency. **N Engl J Med**, vol. 372, n. 26, p. 2509-2520, June 2015. doi: 10.1056/NEJMoa1500596

LEE, M.; LEE, H. J.; SEO, W. D.; PARK, K. H.; LEE, Y. S. Sialylation of integrin beta1 is involved in radiation-induced adhesion and migration in human colon cancer cells. **Int J Rad Oncol Biol Phys** vol. 76, n. 5, p. 1528–1536, 2010. http://dx.doi.org/10.1016/j.ijrobp.2009.11.022

LI, Q.; XIE, Y.; WONG, M.; LEBRILLA, C. B. Characterization of cell glycocalyx with mass spectrometry methods. **Cells**, vol. 8, n. 8, p. 882-908, Aug. 2019. doi:10.3390/cells8080882

LIU, S.; YU, Y.; LIU, Y.; LIN, J.; FU, Y.; CHENG, L.; LIU, X. Revealing the changes of IgG subclass-specific N-glycosylation in colorectal cancer progression by high-throughput assay. **Proteome Clin Applic**, Apr. 2021. 10.1002/prca.202000022

LOCHHEAD, P.; CHAN, A. T.; NISHIHARA, R.; FUCHS, C. S.; BECK, A. H.; GIOVANNUCCI, E.; OGINO, S. Etiologic field effect: reappraisal of the field effect concept in cancer predisposition and progression. **Mod Pathol**, vol. 28, n. 1, p. 14–29, Jan. 2015. doi:10.1038/modpathol.2014.81

LUEBECK, E. G.; MOOLGAVKAR, S. H. Multistage carcinogenesis and the incidence of colorectal cancer. **PNAS**, vol. 99, n. 23, p. 15095–15100, Nov. 2002. doi:10.1073/pnas.222118199

LYNCH, H. T.; SHAW, M. W.; MAGNUSON, C. W.; LARSEN, A. L.; KRUSH, A. J. Hereditary factors in cancer. Study of two large midwestern kindreds. **Arch Int Med**, vol. 117, n. 2, p. 206–212. Feb. 1966.

MARE, L.; CARETTI, A.; ALBERTINI, R.; TRINCHERA, M. CA19.9 antigen circulating in the serum of colon cancer patients: Where is it from? **Int J Biochem Cell Biol**, vol. 45, n. 4, p. 792–797, Apr. 2013. doi:10.1016/j.biocel.2013.01.004

MARKOWSKA, A. I.; JEFFERIES, K. C.; PANJWANI, N. Galectin-3 protein modulates cell surface expression and activation of vascular endothelial growth factor receptor 2 in human endothelial cells. **J Biol Chem**, vol. 286, n. 34, p. 29913–29921, Aug. 2011. doi: 10.1074/jbc.M111.226423

MAXWELL, E.; TAN, Y.; TAN, Y.; HAN, H.; GARY, B.; KONSTANTIN, A.; SHANNON, C.; STAPLES, G. O.; SLYSZ, G. W.; SMITH, R. D.; ZAIA, J.; KARAMANOS, N. K. GlycReSoft: a software package for automated recognition of glycans from LC/MS data. **PLoS ONE**, vol. 7, n. 9, e45474, Sep. 2012. doi.org/10.1371/journal.pone.0045474

MAZUREK, N.; BYRD, J. C.; SUN, Y.; HAFLEY, M.; RAMIREZ, K.; BURKS, J.; BRESALIER, R.S. Cell- surface galectin-3 confers resistance to TRAIL by impeding trafficking of death receptors in metastatic colon adenocarcinoma cells. **Cell Death Differ**, vol. 19, n. 3, p. 523–533, Mar. 2012. doi: 10.1038/cdd.2011.123.

MEACHAM, C.E.; MORRISON, S. J. Tumour heterogeneity and cancer cell plasticity. **Nature**, vol. 501, n. 7467, p. 328–337, Sep. 2013. <https://doi.org/10.1038/nature12624>

MECHREF, Y; HU, Y. ; DESANTOS-GARCIA, J. L. et al. Quantitative Glycomics Strategies. **Mol Cell Proteomics MCP**, vol. 12, n. 4, p. 874-884. Apr. 2013. <https://doi.org/10.1074/mcp.R112.026310>

MENSENKAMP, A.R.; VOGELAAR, I.P.; VAN ZELST–STAMS, W.A.G.; GOOSSENS, M.; OUCHENE, H.; HENDRIKS–CORNELISSEN, S.J.B.; KWINT, M. P.; HOOGERBRUGGE, N.; NAGTEGAAL, I. D.; LIGTENBERG M. J.L. Somatic Mutations in MLH1 and MSH2 Are a Frequent Cause of Mismatch-Repair Deficiency in Lynch Syndrome-Like Tumors. **Gastroenterology**, vol. 146, n. 3, p. 643–646.e8, 2014 doi:10.1053/j.gastro.2013.12.002

MIRNEZAMI, R.; SPAGOU, K.; VORKAS, P.A.; LEWIS, M.R.; KINROSS, J.; WANT, E.; SHION, H.; GOLDIN, R.D.; DARZI, A.; TAKATS, Z.; HOLMES, E.; CLOAREC, O.; NICHOLSON, J.K. Chemical mapping of the colorectal cancer microenvironment via MALDI imaging mass spectrometry (MALDI-MSI) reveals novel cancer-associated field effects. **Mol Oncol**, vol. 8, n. 1, p. 39-49, Feb 2014. doi: 10.1016/j.molonc.2013.08.010.

MONAHAN, K. J.; BRADSHAW, N.; DOLWANI, S.; DESOUZA, B.; DUNLOP, M. G.; EAST, J. E.; ILYAS, M.; KAUR, A.; LALLOO, F.; LATCHFORD, A.; RUTTER, M. D.; TOMLINSON, I.; THOMAS, H. J. W.; HILL, J. Guidelines for the management of hereditary colorectal cancer from the British Society of Gastroenterology (BSG)/Association of Coloproctology of Great Britain and Ireland (ACPGBI)/United Kingdom Cancer Genetics Group (UKCGG). **Gut**, vol. 69, n. 3, p. 411–444, Mar. 2020 doi:10.1136/gutjnl-2019-319915

MOH, E.S.; THAYSEN-ANDERSEN, M.; PACKER, N.H. Relative versus absolute quantitation in disease glycomics. **Proteomics Clin Appl**, vol. 9, n. 3-4, p. 368–382, Apr. 2015. doi: 10.1002/prca.201400184

MORELLE, W. ; MICHALSKI, J.C. Analysis of protein glycosylation by mass spectrometry. **Nat Protoc**, vol. 2, n. 7, p. 1585-1602, July 2007. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.227>

MOREMEN, K.W.; TIEMEYER, M.; NAIRN, A.V. Vertebrate protein glycosylation: diversity, synthesis and function. **Nat Rev Mol Cell Biol**, vol. 12, n. 7, p. 448-462, June 2012. doi: 10.1038/nrm3383

MUINELO-ROMAY, L.; VAZQUEZ-MARTIN, C.; VILLAR-PORTELA, S.; CUEVAS ALVAREZ, E.; GIL-MARTÍN, E.; FERNÁNDEZ-BRIERA, A. Expression and enzyme activity of  $\alpha(1,6)$ fucosyltransferase in human colorectal cancer. **Int J Cancer**, vol. 123, n. 3, p. 641–646, Aug. 2008. <https://doi.org/10.1002/ijc.23521>

MUNKLEY, J. & ELLIOTT, D. J. Hallmarks of glycosylation in cancer. **Oncotarget**, vol. 7, n. 23, p. 35478–35489. Mar. 2016. doi:10.18632/oncotarget.8155

MURATA, K.; MIYOSHI, E.; KAMEYAMA, M.; ISHIKAWA, O.; KABUTO, T.; SASAKI, Y.; HIRATSUKA, M.; OHIGASHI, H.; ISHIGURO, S.; ITO, S.; HONDA, H.; TAKEMURA, F.; TANIGUCHI, N.; IMAOKA, S. Expression of N-acetylglucosaminyltransferase V in colorectal cancer correlates with metastasis and poor prognosis. **Clin Cancer Res** vol. 6, n. 5, p. 1772–1777, 2000.

MURTAGH, F.; LEGENDRE, P. Ward's Hierarchical Agglomerative Clustering Method: Which Algorithms Implement Ward's Criterion? **J Classif**, vol.31, n. 3, p. 274–295, Oct. 2014 doi:10.1007/s00357-014-9161-z

MUZNY, D.; BAINBRIDGE, M.; CHANG, K. CANCER GENOME ATLAS NETWORK. Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer. **Nature**, vol. 487, n. 7407, p. 330–337, July 2012. <https://doi.org/10.1038/nature11252>

NI, J.; JIANG, Z.; SHEN, L.; GAO, L.; YU, M.; XU, X.; ZOU, S.; HUA, D.; WU, S. beta3GnT8 regulates the metastatic potential of colorectal carcinoma cells by altering the glycosylation of CD147. **Oncol Rep**, vol. 31, n. 4, p. 1795–1801, Apr. 2014. <https://doi.org/10.3892/or.2014.3042>

NODA, M., OKAYAMA, H., TACHIBANA, K., SAKAMOTO, W., SAITO, K., THAR MIN, A. K.; ASHIZAWA, M.; NAKAJIMA, T.; AOTO, K.; MOMMA, T.; KATAKURA, K.; OHKI, S.; KONO, K. Glycosyltransferase gene expression identifies a poor prognostic colorectal cancer subtype associated with mismatch repair deficiency and incomplete glycan synthesis. **Clin Cancer Res**, vol. 24, n. 18, p. 4468-4481, Sep. 2018. doi:10.1158/1078-0432.ccr-17-3533

NOVOKMET, M.; LUKIĆ, E.; VUČKOVIĆ, F.; –DURIĆ, Ž.; KESER, T.; RAJŠL, K.; REMONDINI, D.; CASTELLANI, G.; GAŠPAROVIĆ, H.; GORNIK, O.; LAUC, G. Changes in IgG and total plasma protein glycomes in acute systemic inflammation. **Sci Rep**, vol. 4, n. 4347, Mar. 2014. doi:10.1038/srep04347

OLIVEIRA-FERRER, L.; LEGLER, K.; MILDE-LANGOSCH, K. Role of protein glycosylation in cancer metastasis. **Semin Cancer Biol**, vol. 44, p. 141-152, S1044579X17300408– June 2017. doi:10.1016/j.semcancer.2017.03.002

PABST, M.; ALTMANN, F. Influence of electrosorption, solvent, temperature, and ion polarity on the performance of LCESI-MS using graphitic carbon for acidic oligosaccharides. **Anal Chem**, vol. 80, p. 7534–7542, 2008.

PABST, M.; KÜSTER, S. K.; WAHL, F.; KRISMER, J.; DITTRICH, P. S.; ZENOBI, R. A microarray-Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-mass spectrometry approach for site-specific protein N-glycosylation analysis, as demonstrated for human serum immunoglobulin M (IgM). **Mol Cell Proteomics MCP**, vol. 14, n. 6, p. 1645–1656, June 2015. doi:10.1074/mcp.o114.046748

PAREKH, R. B.; DWEK, R. A.; SUTTON, B. J.; FERNANDES, D. L.; LEUNG, A.; STANWORTH, D.; RADEMACHER, T.W.; MIZUOCHI, T.; TANIGUCHI, T.; MATSUTA, K.; KOBATA, A. Association of rheumatoid arthritis and primary osteoarthritis with changes in the glycosylation pattern of total serum IgG. **Nature**, vol. 316, n. 6027, p. 452–457, Aug. 1985. doi:10.1038/316452a0

PARK, D.; BRUNE, K. A.; MITRA, A.; MARUSINA, A. I.; MAVERAKIS, E.; LEBRILLA, C. B. Characteristic changes in cell surface glycosylation accompany intestinal epithelial cell (IEC) differentiation: high mannose structures dominate the cell surface glycome of undifferentiated enterocytes. **Mol Cell Proteomics**, vol. 14, n. 11, 2910–2921, Nov. 2015. doi:10.1074/mcp.m115.053983

PARK, D.; ARABYAN, N.; WILLIAMS, C. C.; SONG, T.; MITRA, A.; WEIMER, B. C.; MAVERAKIS, E.; LEBRILLA, C. B. Salmonella typhimurium enzymatically landscapes the host intestinal epithelial cell (IEC) surface glycome to increase invasion. **Mol Cell Proteomics MCP**, vol. 15, n. 12, p. 3653–3664, Dec. 2016. doi:10.1074/mcp.m116.063206

PARK, D. D.; PHOOMAK, C.; XU, G.; OLNEY, L. P.; TRAN, K. A.; PARK, S. S.; HAIGH, N.E.; LUXARDI, G.; LERT-ITTHIPORN, W.; SHIMODA, M.; LI, Q.; MATOBA, N.; FIERRO, F.; WONGKHAM, S.; MAVERAKIS, E.; LEBRILLA, C. B. Metastasis of cholangiocarcinoma is promoted by extended high-mannose glycans. **PNAS**, vol. 117, n. 14, p. 7633-7644, Apr. 2020. doi:10.1073/pnas.1916498117

PARK, J. J.; LEE, M. Increasing the alpha 2, 6 sialylation of glycoproteins may contribute to metastatic spread and therapeutic resistance in colorectal cancer. **Gut Liver**, vol. 7, n. 6, p. 629–41. Nov. 2013. doi: [10.5009/gnl.2013.7.6.629](https://doi.org/10.5009/gnl.2013.7.6.629)

PATSOS, G.; HEBBE-VITON, V.; ROBBE-MASSELOT, C.; MASSELOT, D.; SAN MARTIN, R.; GREENWOOD, R.; PARASKEVA, C.; KLEIN, A.; GRAESSMANN, M.; MICHALSKI, J.C.; GALLAGHER, T.; CORFIELD, A. O-glycan inhibitors generate arylglycans, induce apoptosis and lead to growth inhibition in colorectal cancer cell lines. **Glycobiology**, vol. 19, n. 4, 382–398, Apr. 2009. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwn149>

PINHO, S.S.; FIGUEIREDO, J.; CABRAL, J. et al.. E-cadherin and adherens-junctions stability in gastric carcinoma: functional implications of glycosyltransferases involving N-glycan branching biosynthesis, N-acetylglucosaminyltransferases III and V. **Biochim Biophys Acta**, vol. 1830, n. 3, p. 2690-2700, Mar. 2013. doi: 10.1016/j.bbagen.2012.10.021

PINHO, S.S.; REIS, C.A. Glycosylation in cancer: mechanisms and clinical implications. **Nat Rev Cancer**, vol. 15, n. 9, p. 540-555, Sep. 2015. doi: 10.1038/nrc3982

PUČIĆ, M.; KNEŽEVIĆ, A.; VIDIČ, J.; ADAMCZYK, B.; NOVOKMET, M.; POLAŠEK, O.; GORNIK, O.; ŠUPRAHA-GORETA, S.; WORMALD, M.R.; REDŽIĆ, I.; CAMPBELL, H.; WRIGHT, A.; HASTIE, N.D.; WILSON, J.F.; RUDAN, I.; WUHRER, M.; RUDD, P.M.; JOSIĆ, D.; LAUC, G. High throughput isolation and glycosylation analysis of IgG–variability and heritability of the IgG glycome in three isolated human populations. **Mol Cell Proteomics MCP**, vol. 10, n. 10, M111.010090, Oct. 2011. doi:10.1074/mcp.m111.010090

PUCCINI, A.; MARSHALL, J. L.; SALEM, M. E. Molecular variances between right- and left-sided colon cancers. **Curr Colorectal Cancer Rep**, vol. 14, p. 152-158, 2018. doi:10.1007/s11888-018-0411-z

QIU, Y.; PATWA, T. H.; XU, L.; SHEDDEN, K.; MISEK, D. E.; TUCK, M.; JIN, G.; RUFFIN, M. T.; TURGEON, D. K.; SYNAL, S.; BRESALIER, O. R.; MARCON, N.; BRENNER, D.E.; LUBMAN, D. M. Plasma glycoprotein profiling for colorectal cancer biomarker identification by lectin glycoarray and lectin blot. **J Proteome Res**, vol. 7, n. 4, p. 1693–1703, Apr. 2008. doi:10.1021/pr700706s

REIDING, K. R.; BLANK, D.; KUIJPER, D. M.; DEELDER, A. M.; WUHRER, M. High-throughput profiling of protein N-glycosylation by MALDI-TOF-MS employing linkage-specific sialic acid esterification. **Anal Chem**, vol. 86, n. 12, p. 5784–5793. Dec. 2014. doi:10.1021/ac500335t

REIDING, K. R.; RUHAAK, L. R.; UH, H.-W.; EL BOUHADDANI, S.; VAN DEN AKKER, E. B.; PLOMP, R.; MCDONNELL, L.A.; HOUWING-DUISTERMAAT, J. J.; SLAGBOOM, P. E.; BEEKMAN, M.; WUHRER, M. Human plasman-glycosylation as analyzed by matrix-assisted laser desorption/ionization-fourier transform ion cyclotron resonance-MS associates with markers of inflammation and metabolic health. **Mol Cell Proteomics MCP**, vol. 16, n. 2, p. 228–242, Feb. 2016. doi:10.1074/mcp.m116.065250

REIS, C. A.; OSORIO, H.; SILVA, L.; GOMES, C.; DAVID, L. Alterations in glycosylation as biomarkers for cancer detection. **J Clin Pathol**, vol. 63, n. 4, p. 322–9. Apr. 2010. <http://dx.doi.org/10.1136/jcp.2009.071035>

RITAMO, I.; RABINA, J.; NATUNEN, S.; VALMU, L. Nanoscale reversed-phase liquid chromatography–mass spectrometry of permethylated N-glycans. **Anal Bioanal Chem**, vol. 405, n. 8, p. 2469–2480, Mar. 2013. doi:10.1007/s00216-012-6680-5

RUDD, P. M.; ELLIOTT, T.; CRESSWELL, P.; WILSON, I. A.; DWEK, R. A. Glycosylation and the immune system. **Science**, vol. 291, n. 5512, p. 2370–2376, Mar. 2001. doi:10.1126/science.291.5512.2370

RUHAAK, L. R.; ZAUNER, G.; HUH, C.; BRUGGINK, C.; DEELDER, A. M.; WUHRER, M. Glycan labeling strategies and their use in identification and quantification. **Anal Bioanal Chem**, vol. 397, p. 3457–3481, Aug. 2010. doi: 10.1007/s00216-010-3532-z

RUHAAK, L.R.; MIYAMOTO, S.; LEBRILLA, C.B. Developments in the identifications of glycan biomarkers for the detection of cancer. **Mol Cell Proteomics MCP**, vol. 12, n. 4, p. 846–855, Apr. 2013. doi: <https://doi.org/10.1074/mcp.R112.026799>

RUHAAK, L. R.; XU, G.; LI, Q.; GOONATILLEKE, E.; LEBRILLA, C. B. Mass spectrometry approaches to glycomic and glycoproteomic analyses. **Chem Rev**, vol. 118, n.17, p. 7886–7930, Mar. 2018. doi:10.1021/acs.chemrev.7b00732

RUSSO, A.; GIORDANO, A. & ROLFO C. (Eds.). Liquid Biopsy in Cancer Patients. **Current Clinical Pathology**, Humana Press. New York, NY: Springer. ISBN 978-3-319-55659-8. 2017.

RUSSO, M.; SIRAVEGNA, G.; BLASZKOWSKY, L. S. CORTI, G.; CRISAFULLI, G.; AHRONIAN, L.G.; MUSSOLIN, B.; KWAK, E.L.; BUSCARINO, M.; LAZZARI, L.; VALTORTA, E.; TRUINI, M.; JESSOP, N.A.; ROBINSON, H.E.; HONG, T.S.; MINO-KENUDSON, M.; DI NICOLANTONIO, F.; THABET, A.; SARTORE-BIANCHI, A.; SIENA, S.; IAFRATE, A.J.; BARDELLI, A.; CORCORAN, R.B. Tumor heterogeneity and lesion-specific response to targeted therapy in colorectal cancer. **Cancer Discov**, vol. 6, n. 2, p. 147–153, Feb. 2016. doi: [10.1158/2159-8290.CD-15-1283](https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-15-1283)

SAELAND, E.; BELO, A. I.; MONGERA, S., VAN DIE, I.; MEIJER, G.A.; VAN KOOYK, Y. Differential glycosylation of MUC1 and CEACAM5 between normal mucosa and tumour tissue of colon cancer patients. **Int J Cancer. Journal International du Cancer**, vol. 131, n. 1, p. 117–128, July. 2012. doi: [10.1002/ijc.26354](https://doi.org/10.1002/ijc.26354)

SAJIC, T.; LIU, Y.; ARVANITI, E.; SURINOVA, S.; WILLIAMS, E. G.; SCHIESS, R.; HÜTTENHAIN, R.; SETHI, A.; PAN, S.; BRETNALL, T. A.; CHEN, R.; BLATTMANN, P.; FRIEDRICH, B.; NIMÉUS, E.; MALANDER, S.; OMLIN, A.; GILLESSEN, S.; CLAASSEN, M.; AEBERSOLD, R. Similarities and Differences of Blood N-Glycoproteins in Five Solid Carcinomas at Localized Clinical Stage Analyzed by SWATH-MS. **Cell Rep**, vol. 23, n. 9, p. 2819–2831, 2018.e5. doi:10.1016/j.celrep.2018.04.114

SALEM, M.E.; PUCCINI, A.; TIE, J. Redefining Colorectal Cancer by Tumor Biology. **Am Soc Clin Oncol Educ Book**, vol. 40, p.1-13. Mar, 2020.doi: 10.1200/EDBK\_279867. PMID: 32207671.

SANZ-PAMPLONA, R.; BERENQUER, A.; CORDERO, D.; RICCADONNA, S.; SOLÉ, X.; CROUS-BOU, M.; GUINÓ, E.; SANJUAN, X.; BIONDO, S.; SORIANO, A.; JURMAN, G.; CAPELLA, G.; FURLANELLO, C.; MORENO, V. Clinical value of prognosis gene expression signatures in colorectal cancer: a systematic review. **PLoS One**, vol. 7, n. 11, p. e48877, Nov. 2012. doi: 10.1371/journal.pone.0048877

SATOMAA, T.; HEISKANEN, A.; MIKKOLA, M.; OLSSON, C.; BLOMQVIST, M.; TIITTANEN, M.; JAATINEM, T.; AITIO, O.; OLONEM, A.; HELIN, J.; HILTUNEM, J.; NATUNEM, J.; TUURI, T.; OTOKONKOSKI, T.; SAARINEM, J.; LAINE, J. The N-glycome of human embryonic stem cells. **BMC Cell Biol**, vol. 10, n. 42, 2009. doi:10.1186/1471-2121-10-42

SAUER, R.; BECKER, H.; HOHENBERGER, W.; RÖDEL, C.; WITTEKIND, C.; FIETKAU, R.; RAAB, R. Preoperative versus Postoperative Chemoradiotherapy for Rectal Cancer. **NEJM**, vol. 351, n. 17, p. 1731–1740, Oct. 2004. doi:10.1056/nejmoa040694

SCHACHTER, H. The joys of HexNAc. The synthesis and function of N- and O-glycan branches. **Glycoconj J**, vol. 17, n. 7-9, p. 465–83. Jul. 2000.

SCHIESS, R.; WOLLSCHIED, B.; AEBERSOLD, R. Targeted proteomic strategy for clinical biomarker discovery. **Mol Oncol**, vol. 3, n. 1, p. 33–44, Feb. 2008. doi:10.1016/j.molonc.2008.12.001

SCHMOLL, H. J.; VAN CUTSEM, E.; STEIN, A. VALENTINI, V.; GLIMELIUS, B.; HAUSTERMANS, K.; NORDLINGER, B.; VAN DE VELDE C.J.; BALMANA, J.; REGULA, J.; NAGTEGAAL, I.D.; BEETS-TAN, R.G.; ARNOLD, D.; CIARDIELLO, F.; HOFF, P.; KERR, D.; KÖHNE, C.H.; LABIANCA, R.; PRICE, T.; SCHEITHAUER, W.; SOBRERO, A.; TABERNERO, J.; ADERKA, D.; BARROSO, S.; BODOKY, G.; DOUILLARD, J.Y.; EL GHAZALY, H.; GALLARDO, J.; GARIN, A.; GLYNNE-JONES, R.; JORDAN, K.; MESHCHERYAKOV, A.; PAPAMICHAIL, D.; PFEIFFER, P.; SOUGLAKOS, I.; TURHAL, S.; CERVANTES A. ESMO Consensus Guidelines for management of patients with colon and rectal cancer. A personalized approach to clinical decision making. **Ann Oncol**, vol. 23, n. 10, p. 2479–2516, Oct. 2012. doi: 10.1093/annonc/mds236

SEBAG-MONTEFIORE, D.; STEPHENS, R. J.; STEELE, R.; MONSON, J.; GRIEVE, R.; KHANNA, S.; PARMAR, M. Preoperative radiotherapy versus selective postoperative chemoradiotherapy in patients with rectal cancer (MRC CR07 and NCIC-CTG C016): a multicentre, randomised trial. **The Lancet**, vol. 373, n. 9666, p. 811–820, Mar. 2009. doi:10.1016/s0140-6736(09)60484-0

SEBERGER, P. J.; CHANEY, W. G. Control of metastasis by Asn-linked,  $\beta$ 1–6 branched oligosaccharides in mouse mammary cancer cells. **Glycobiology** vol. 9, n. 3, p. 235–241, Mar. 1999. doi: 10.1093/glycob/9.3.235

SETHI, M. K.; THAYSEN-ANDERSEN, M.; SMITH, J. T.; BAKER, M. S.; PACKER, N. H.; HANCOCK, W. S.; FANAYAN, S. Comparative N-Glycan Profiling of Colorectal Cancer Cell Lines Reveals Unique Bisecting GlcNac and  $\alpha$ -2,3-Linked Sialic Acid Determinants Are Associated with Membrane Proteins of the More Metastatic/Aggressive Cell Lines. **J Proteome Res**, vol. 13, n. 1, p. 277–288, 2014. Jan. doi:10.1021/pr400861m

SETHI, M.K.; KIM, H.; PARK, C.K.; BAKER, M.S.; PAIK, Y.K.; PACKER, N.H.; HANCOCK, W.S.; FANAYAN, S.; THAYSEN-ANDERSEN, M. In-depth N-glycome profiling of paired colorectal cancer and non-tumorigenic tissues reveals cancer-, stage- and EGFR-specific protein N-glycosylation. **Glycobiology**, vol. 25, n. 10, p. 1064–78. Oct. 2015. doi: 10.1093/glycob/cwv042

SETHI, M.; FANAYAN, S. Mass Spectrometry-Based N-Glycomics of Colorectal Cancer. **Int J Mol Sci**, vol. 16, n. 12, p. 29278–29304, Dec. 2015. doi:10.3390/ijms161226165

SETHI, M.K.; HANCOCK, W.S.; FANAYAN, S. Identifying N-Glycan Biomarkers in Colorectal Cancer by Mass Spectrometry. **Acc Chem Res**, vol. 49, n. 10, p. 2099–2106, Oct. 2016. doi: [10.1021/acs.accounts.6b00193](https://doi.org/10.1021/acs.accounts.6b00193)

SHEN, L.; KONDO, Y.; ROSNER, G.L.; XIAO, L.; HERNANDEZ, N.S.; VILAYTHONG, J.; HOULIHAN, P.S.; KROUSE, R.S.; PRASAD, A.R.; EINSPAHR, J.G.; BUCKMEIER, J.; ALBERTS, D.S.; HAMILTON, S.R.; ISSA, J.P. MGMT promoter methylation and field defect in sporadic colorectal cancer. **J Natl Cancer Inst**, vol. 97, n. 18, p. 1330–1338, Sep. 2005. doi: 10.1093/jnci/dji275

SIEGEL, R.L.; MILLER, K.D.; SAUER, A.G.; FEDEWA, S.A.; BUTTERLY, L.F.; ANDERSON, J.C.; CERCEK, A.; SMITH, R.A.; JEMAL, A. Colorectal cancer statistics, 2020. **CA: A Cancer J Clinicians**, vol. 70, n. 3, p. 145–164, May/June. 2020. doi: 10.3322/caac.21601

SIEGEL, R.L.; MILLER, K.D.; FUCHS, H.E.; JEMAL, A. Cancer Statistics, 2021. **CA Cancer J Clin**. vol. 71, n. 1, p. 7–33, Jan. 2021. doi: 10.3322/caac.21654. Epub 2021 Jan 12. PMID: 33433946.

SINICROPE, F.A.; SARGENT, D.J. Molecular pathways: microsatellite instability in colorectal cancer: prognostic, predictive, and therapeutic implications. **Clin Cancer Res**, vol. 18, n. 6, p.1506–1512, Mar. 2012 doi: 10.1158/1078-0432

SLAUGHTER, D.P.; SOUTHWICK, H.W.; SMEJKAL, W. Field cancerization in oral stratified squamous epithelium; clinical implications of multicentric origin. **Cancer** vol. 6, n. 5, p. 963–968, Sep. 1953. doi: 10.1002/1097-0142(195309)6:5<963::aid-cncr2820060515>3.0.co;2-q

SNYDER, C. M.; ALLEY, W. R.; CAMPOS, M. I.; SVOBODA, M.; GOETZ, J. A.; VASSEUR, J. A.; JACOBSON, S.C.; NOVOTNY, M. V. Complementary Glycomic Analyses of Sera Derived from Colorectal Cancer Patients by MALDI-TOF-MS and Microchip Electrophoresis. **Anal Chem**, vol. 88, n. 19, p. 9597–9605, Aug. 2016. doi:10.1021/acs.analchem.6b02310

SONDERMANN, P.; PINCETIC, A.; MAAMARY, J.; LAMMENS, K.; RAVETCH, J. V. General mechanism for modulating immunoglobulin effector function. **Proc Natl Acad Sci USA**, vol. 110, n. 24, p. 9868–9872, Jun. 2013. doi:10.1073/pnas.1307864110

SONDKA, Z.; BAMFORD, S.; COLE, C. G.; WARD, S. A.; DUNHAM, I.; FORBES, S. A. The COSMIC Cancer Gene Census: describing genetic dysfunction across all human cancers. **Nat Rev Cancer**, vol. 18, n.11, p. 696-705, Nov. 2018. doi:10.1038/s41568-018-0060-1

SONG, T.; ALDREDGE, D.; LEBRILLA, C.B. A Method for In-Depth Structural Annotation of Human Serum Glycans That Yields Biological Variations. **Anal Chem**, vol. 87, n.15, p. 7754-7762, Aug. 2015. doi: 10.1021/acs.analchem.5b01340

SPIRO, R. G. Protein glycosylation: nature, distribution, enzymatic formation, and disease implications of glycopeptide bonds. **Glycobiology**, vol. 12, n. 4, p. 43R–56R. Apr. 2002. DOI:10.1093/glycob/12.4.43R

SUNG, H.; FERLAY, J.; SIEGEL, R.L.; LAVERSANNE, M.; SOERJOMATARAM, I.; JEMAL, A.; BRAY, F. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA Cancer J Clin**, Feb. 2021. doi: 10.3322/caac.21660

SURINOVA, S.; CHOI, M.; TAO, S.; SCHUFFLER, P. J.; CHANG, C.-Y.; CLOUGH, T.; VYSLOUZIL, K.; KHOYLOU, M.; SROVNAL, J.; LIU, Y.; MATONDO, M.; HUTTENHAIN, R.; WEISSER, H.; BUHMANN, J. M.; HAJDUCH, M.; BRENNER, H.; VITEK, O.; AEBERSOLD, R. Prediction of colorectal cancer diagnosis based on circulating plasma proteins. **EMBO Molecular Medicine**, vol. 7, n. 9, 1166–1178. Sep. 2015. doi:10.15252/emmm.201404873

SWINDALL, A. F.; BELLIS, S. L.. Sialylation of the Fas death receptor by ST6Gal-I provides protection against Fas-mediated apoptosis in colon carcinoma cells. **J Biol Chem**, vol. 286, n. 26, p. 22982–22990, Jul. 2011. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.211375>

TAKAYAMA, H.; OHTA, M.; IWASHITA, Y.; UCHIDA, H.; SHITOMI, Y.; YADA, K.; INOMATA, M. Altered glycosylation associated with dedifferentiation of hepatocellular carcinoma: a lectin microarray-based study. **BMC Cancer**, vol. 20, n. 192, Mar. 2020. doi:10.1186/s12885-020-6699-5

TAN, Z.; LU, W.; LI, X.; YANG, G.; GUO, J.; YU, H.; LI, Z.; GUAN, F. Altered N-Glycan Expression Profile in Epithelial-to-Mesenchymal Transition of NMuMG Cells Revealed by an Integrated Strategy Using Mass Spectrometry and Glycogene and Lectin Microarray Analysis. **J Proteome Res**, vol. 13, n. 6, p. 2783–2795, Apr. 2014. doi:10.1021/pr401185z

TANAKA, K.; WAKI, H.; IDO, Y.; AKITA, S.; YOSHIDA, Y.; YOSHIDA, T.; MATSUO, T. Protein and polymer analyses up to  $m/z$  100 000 by laser ionization time-of-flight mass spectrometry. **Rapid Comm Mass Spect**, vol. 2, n. 8, p. 151–153, Aug. 1988. doi:10.1002/rcm.1290020802

TANIDA, S.; AKITA, K.; ISHIDA, A.; MORI, Y.; TODA, M.; INOUE, M.; OHTA, M.; YASHIRO, M.; SAWADA, T.; HIRAKAWA, K.; NAKADA, H. Binding of the sialic acid-binding lectin, Siglec-9, to the membrane mucin, MUC1, induces recruitment of beta-catenin and subsequent cell growth. **J Biol Chem**, vol. 288, n. 44, p. 31842–52. Nov. 2013. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.471318>

TANIGUCHI, N.; KOREKANE, H. Branched n-glycans and their implications for cell adhesion, signaling and clinical applications for cancer biomarkers and in therapeutics. **BMB Rep.**, vol. 44, n. 12, p. 772–781, Dec. 2011. <https://doi.org/10.5483/bmbrep.2011.44.12.772>

TANIGUCHI, N.; KIZUKA, Y. Glycans and cancer: role of N-glycans in cancer biomarker, progression and metastasis, and therapeutics. **Adv Cancer Res**, vol. 126, p. 11–51, Feb. 2015. <https://doi.org/10.1016/bs.acr.2014.11.001> PMID: 25727145

TAO, S.-C.; LI, Y.; ZHOU, J.; QIAN, J.; SCHNAAR, R. L.; ZHANG, Y.; GOLDSTEIN, I.J.; ZHU, H.; SCHNECK, J. P. Lectin microarrays identify cell-specific and functionally significant cell surface glycan markers. **Glycobiology**, vol. 18, n. 10, p. 761–769, July. 2008. doi:10.1093/glycob/cwn063

THEODORATOU, E.; THAÇI, K.; AGAKOV, F.; TIMOFEEVA, M. N.; ŠTAMBUK, J.; PUČIĆ-BAKOVIĆ, M.; VUČKOVIĆ, F.; ORCHARD, P.; AGAKOVA, A.; DIN, F. V. N.; BROWN, E.; RUDD, P. M.; FARRINGTON, S. M.; DUNLOP, M. G.; CAMPBELL, H.; LAUC, G. Glycosylation of plasma IgG in colorectal cancer prognosis. **Sci Rep**, vol. 6, n. 1, p. 28098–28110, June. 2016. doi:10.1038/srep28098

THIBODEAU, S.N.; BREN, G.; SCHAID, D. Microsatellite instability in cancer of the proximal colon. **Science**, vol. 260, n. 5109, p. 816 – 819, May. 1993. doi:10.1126/science.8484122

THIERY, J.P.; SLEEMAN, J.P. Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions. **Nat Rev Mol Cell Biol**, vol. 7, n. 2, p. 131–142, Feb. 2006. doi:10.1038/nrm1835.

TOYOTA, M.; HO, C.; AHUJA, N.; KAM-WING, J.; LI, Q.; OHE-TOYOTA, M.; BAYLIN, S.B.; ISSA, J-P.J. Identification of Differentially Methylated Sequences in Colorectal Cancer by Methylated CpG Island Amplification. **Cancer Res**, vol. 59, n. 10, p. 2307–2312. May. 1999.

UMAR, A.; BOLAND, C.R.; TENDIMAN, J.P.; SYNGAL, S.; DE LA CHAPELLE, A.; HAMILTON, S. R.; HIATT, R. A.; JASS, J.; LINDBLOM, A.; LYNCH, H. T.; PELTOMAKI, P.; RAMSEY, S. D.; RODRIGUEZ-BIGAS, M. A.; VASEN, H. F. A.; SRIVASTAVA, S. Revised Bethesda Guidelines for Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer (Lynch Syndrome) and Microsatellite Instability. **J Nat Cancer Inst**, vol. 96, n. 4, p. 261–268, Feb. 2004. doi: 10.1093/jnci/djh034

VAJARIA, B.N. & PATEL, P.S. Glycosylation: a hallmark of cancer? **Glycoconj J**, vol. 34, p. 147–156, Apr. 2017. <https://doi.org/10.1007/s10719-016-9755-2>

VARKI, A.; CUMMINGS, R. D.; AEBI, M.; PACKER, N. H.; SEEBERGER, P. H.; ESKO, J. D.; STANLEY, P.; HART, G.; DARVILL, A.; KINOSHITA, T.; PRESTEGARD, J. J.; SCHNAAR, R. L.; FREEZE, H. H.; MARTH, J. D.; BERTOZZI, C. R.; ETZLER, M. E.; FRANK, M.; Vliegenthart, J. F.G.; LÜTTEKE, T.; PEREZ, S.; BOLTON, E.; RUDD, P.; PAULSON, J.; KANEHISA, M.; TOUKACH, P.; AOKI-KINOSHITA, K. F.; DELL, A.; NARIMATSU, H.; YORK, W.; TANIGUCHI, N.; KORNFELD, S. Symbol Nomenclature for Graphical Representations of Glycans. **Glycobiology**, vol. 25, n. 12, p. 1323–1324. 2015. doi:10.1093/glycob/cwv091

VARKI, A.; GAGNEUX P., in: Varki, A., Cummings, R. D., Esko, J. D., Freeze, H. H. (Eds.), Biological functions of glycans. **Essentials of Glycobiology**, Cold Spring Harbor, NY 2017, pp. 77–88.

VASCONCELOS-DOS-SANTOS, A.; OLIVEIRA, I.A.; LUCENA, M.C.; MANTUANO, N.R.; WHELAN, S.A.; DIAS, W.B.; TODESCHINI, A.R. Biosynthetic machinery involved in aberrant glycosylation: promising targets for developments of drugs against cancer. **Front Oncol**, vol. 5, n. 138, p. 1-23, June. 2015. <https://doi.org/10.3389/fonc.2015.00138>

VASEN, H.F.A.; BLANCO, I.; AKTAN-COLLAN, K.; ALONSO, A.; ARETZ, S.; BERNSTEIN, I.; BERTARIO, L.; BURN, J.; CAPELLA, G.; COLAS, C.; ENGEL, C.; FRAYLING, I.M.; GENUARDI, M.; HEINIMANN, K.; HES, F.J.; HODGSON, S.V.; KARAGIANNIS, J.A.; LALLOO, F.; LINDBLOM, A.; MECKLIN, J.P.; MØLLER, P.; MYRHOJ, T.; NAGENGAST, F.M.; PARC, Y.; PONZ DE LEON, M.; RENKONEN-SINISALO, L.; SAMPSON, J.R.; STORMORKEN, A.; SIJMONS, R.H.; TEJPAR, S.; THOMAS, H.J.; RAHNER, N.; WIJNEN, J.T.; JÄRVINEN, H.J.; MÖSLEIN, G; Mallorca group. Revised guidelines for the clinical management of Lynch syndrome (HNPCC): recommendations by a group of European experts. **Gut**, vol. 62, n. 2, p. 812–823, Feb. 2013. doi: 10.1136/gutjnl-2012-304356

VERCOUTTER-EDOUART, A.-S.; SLOMIANNY, M.-C.; DEKEYZER-BESEME, O.; HAEUW, J.-F.; MICHALSKI, J.-C. Glycoproteomics and glycomics investigation of membrane N-glycosylproteins from human colon carcinoma cells. **Proteomics**, vol. 8, n. 16, p. 3236–3256, Aug. 2008. doi:10.1002/pmic.200800151

VENKITACHALAM, S.; REVOREDO, L.; VARADAN, V.; FECTEAU, R. E.; RAVI, L.; LUTTERBAUGH, J.; MARKOWITZ, S.D.; WILLIS, J.E.; THOMAS A. GERKEN, T.A.; GUDA, K. Biochemical and functional characterization of glycosylation-associated mutational landscapes in colon cancer. **Sci Rep**, vol. 6, n. 23642, Mar. 2016. doi:10.1038/srep23642

VREEKER, G. C. M.; WUHRER, M. Reversed-phase separation methods for glycan analysis. **Anal Bioanal Chem**, vol. 409, n. 2, p. 359–378, Jan. 2017. doi:10.1007/s00216-016-0073-0

VREEKER, G. C. M.; HANNA-SAWIRES, R. G.; MOHAMMED, Y.; BLADERGROEN, M. R.; NICOLARDI, S.; DOTZ, V.; NOUTA, J.; BONSING, B.A.; MESKER, W.E.; VAN DER BURGT, Y.E.M.; WUHRER, M.; TOLLENAAR, R. A. E. M. Serum N-Glycome analysis reveals pancreatic cancer disease signatures. **Cancer Med**, vol. 9, p. 8519-8529, Aug. 2020. doi:10.1002/cam4.3439

VUCKOVIC, F.; THEODORATOU, E.; THACI, K.; TIMOFEEVA, M.; VOJTA, A.; STAMBUK, J.; PUČIĆ-BAKOVIĆ, M.; RUDD, P.; ĐEREK, L.; SERVIS, D.; WENNERSTRÖM, A.; FARRINGTON, S. M.; PEROLA, M.; AULCHENKO, Y.; DUNLOP, M. G.; CAMPBELL, H.; LAUC, G. IgG Glycome in Colorectal Cancer. **Clin Cancer Res**, vol. 22, n. 12, p. 3078–3086, June. 2016. doi:10.1158/1078-0432.

WADA, Y.; PARASTOO, A.; COSTELLO, C. E.; DELL, A.; DWEK, R.A.; GEYER, H.; GEYER, R.; KAKEHI, K.; KARLSSON, N.G.; KATO, K.; KAWASAKI, N.; KHOO, K.-H.; KIM, S.; KONDO, A.; LATTOVA, E.; MECHREF, Y.; MIYOSHI, E.; NAKAMURA, K.; NARIMATSU, H.; NOVOTNY, M.V.; PACKER, N. H.; PERREAULT, H.; PETER-KATALINIĆ, J.; POHLENTZ, G.; REINHOLD, V. N.; RUDD, P. M.; SUZUKI, A.; TANIGUCHI, N. Comparison of the methods for profiling glycoprotein glycans—HUPO Human Disease Glycomics/Proteome Initiative multi- institutional study. **Glycobiology**, vol. 17, n. 4, p. 411–422. Apr. 2007. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwm041>

WALKER, S. H.; BRANDON, C.; MUDDIMAN, D. C. Systematic Comparison of Reverse Phase and Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography Platforms for the Analysis of N-Linked Glycans. **Anal Chem**, vol. 84, n. 19, p. 8198–8206, Sep. 2012. doi:10.1021/ac3012494

WARBURG, O. On the origin of cancer cells. **Science**, vol. 123, n. 3191, p. 309–314. Feb. 1956. doi: 10.1126/science.123.3191.309

WARD, J.H. Hierarchical Grouping to Optimize an Objective Function. **J Am Stat Assoc**, vol. 58, p. 236–244, 1963. doi:10.1080/01621459.1963.10500845

WUHRER, M.; STAM, J. C.; VAN DE GEIJN, F. E.; KOELEMAN, C. A. M.; VERRIPS, C. T.; DOLHAIN, R. J. E. M.; HOOKE, C.H.; DEELDER, A. M. Glycosylation profiling of immunoglobulin G (IgG) subclasses from human serum. **Proteomics**, vol. 7, n. 22, p. 4070–4081, Nov. 2007. doi:10.1002/pmic.200700289

WUHRER, M. Glycomics using mass spectrometry. **Glycoconjugate J**. vol. 30, n. 1, p. 11–22. Jan. 2013. <https://doi.org/10.1007/s10719-012-9376-3>

XIE, W.; KANEHARA, K.; SAYEED, A.; NG, D. T. Intrinsic conformational determinants signal protein misfolding to the Hrd1/Htm1 endoplasmic reticulum-associated degradation system. **Mol Biol Cell**, vol. 20, n. 14, p. 3317–3329, July. 2009. <https://doi.org/10.1091/mbc.e09-03-0231>

XU, Q.; AKAMA, R.; ISAJI, T.; LU, Y.; HASHIMOTO, H.; KARIYA, Y.; FUKUDA, T.; DU, Y.; GU, J. Wnt/ $\beta$ -Catenin Signaling Down-regulates N-Acetylglucosaminyltransferase III Expression. **J Biol Chem**, vol. 286, n. 6, p. 4310–4318, Feb. 2011. doi:10.1074/jbc.m110.182576

ZHANG, B.; WANG, J.; WANG, X.; ZHU, J.; LIU, Q.; SHI, Z.; CHAMBERS, M. C.; ZIMMERMAN, L.J.; SHADDOX, K. F.; KIM, S.; DAVIES, S. R.; WANG, S.; WANG, P.; KINSINGER, C. R.; RIVERS, R.C.; HENRY RODRIGUEZ, H.; TOWNSEND, R.R.; ELLIS, M. J. C.; CARR, S. A.; TABB, D. L.; COFFEY, R. J.; SLEBOS, R. J. C.; LIEBLER, D. C. Proteogenomic characterization of human colon and rectal cancer. **Nature**, vol. 513, n. 9, p. 382–387, Sep. 2014. <https://doi.org/10.1038/nature13438>

ZHANG, D.; XIE, Q.; WANG, Q.; WANG, Y.; MIAO, J.; LI, L.; ZHANG, T.; CAO, X.; LI, Y. Mass spectrometry analysis reveals aberrant N-glycans in colorectal cancer tissues. **Glycobiology**, vol. 29, n. 5, p. 372–384, May 2019. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwz005>

ZHANG, S.; LU, J.; XU, Z.; ZOU, X.; SUN, X.; XU, Y.; SHAN, A.; LU, J.; YAN, X.; CUI, Y.; YAN, W.; DU, Y.; GU, J.; ZHENG, M.; FENG, B.; ZHANG, Y. Differential expression of ST6GAL1 in the tumor progression of colorectal cancer. **Biochem Biophys Res Comm**, vol. 486, n. 4, p. 1090–1096, May. 2017. doi:10.1016/j.bbrc.2017.03.167

ZHAO, Q.; ZHAN, T.; DENG, Z.; LI, Q.; LIU, Y.; YANG, S.; JI, D.; LI, Y. Glycan analysis of colorectal cancer samples reveals stage-dependent changes in CEA glycosylation patterns. **Clin Proteomics**, vol. 15, n. 9, Mar. 2018. doi:10.1186/s12014-018-9182-4

ZHAO, Y.-Y.; TAKAHASHI, M.; GU, J.-G.; MIYOSHI, E.; MATSUMOTO, A.; KITAZUME, S.; TANIGUCHI, N. Functional roles of N-glycans in cell signaling and cell adhesion in cancer. **Cancer Sci**, vol. 99, n. 7, p. 1304–1310, May. 2008. doi:10.1111/j.1349-7006.2008.00839.x

ZHAO, Y.-P.; RUAN, C.-P.; WANG, H.; HU, Z.-Q.; FANG, M.; GU, X.; JI, J.; ZHAO, J. -Z.; GAO, C. -F. Identification and assessment of new biomarkers for colorectal cancer with serum N-glycan profiling. **Cancer**, vol. 118, n. 3, p. 639–650. Feb. 2012. <https://doi.org/10.1002/cncr.26342>

ZHOU, S.; VEILLON, L.; DONG, X.; HUANG, Y.; MECHREF, Y. Direct Comparison of Derivatization Strategies for LC-MS/MS Analysis of N-Glycans. **Analyst**, vol. 142, p. 4446–4455, Dec. 2017. 10.1039/C7AN01262D-. doi:10.1039/C7AN01262D

ZHUO, Y.; CHAMMAS, R.; BELLIS, S. L. Sialylation of beta1 integrins blocks cell adhesion to galectin-3 and protects cells against galectin-3-induced apoptosis. **J Biol Chem**, vol. 283, n. 32, p. 22177–22185, Aug. 2008. doi: <https://doi.org/10.1074/jbc.M800015200>

## APÊNDICES

### APÊNDICE A- TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO



FACULDADE DE MEDICINA

#### *Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - TCLE*

O (a) Senhor(a) está sendo convidado(a) a participar do projeto: **Estudo do microambiente tumoral por espectrometria de massas de adenocarcinomas colorretais esporádicos, com e sem instabilidade microsatélite.**

Este estudo é a minha tese de doutorado onde irei avaliar as diferenças existentes entre tipos de câncer do intestino. Vou estudar pequenos fragmentos retirados do tumor e utilizar um novo método que procura substâncias diferentes no câncer do intestino, o que pode melhorar o tratamento, aumentando as chances de cura e o tempo de vida de pessoas como o sr (a) que tem câncer de intestino.

O objetivo deste estudo é saber se o método que irei utilizar, chamado Espectrometria de massas (exame que estuda a presença de substâncias muito pequenas no câncer), poderá descobrir se o seu tumor, assim como o de outras pessoas com tumores semelhantes ao seu, respondem melhor ou não a um determinado tipo de tratamento, o que evitaria o uso de medicações desnecessárias. O meu estudo também pode identificar se essas substâncias vão ajudar o médico a dar um diagnóstico mais cedo do câncer de intestino.

O(a) senhor(a) receberá todos os esclarecimentos necessários antes e no decorrer da pesquisa e lhe asseguramos que seu nome não aparecerá, sendo mantido o mais rigoroso sigilo através da omissão total de quaisquer informações que permitam identificá-lo(a), trazer discriminação ou estigma de qualquer natureza. Apenas o pesquisador principal e aqueles diretamente envolvidos no trabalho terão acesso aos dados de prontuário, resultados de exames e testes realizados.

O(a) senhor(a) terá acesso a todos dados relativos ao seu caso, tendo a livre escolha de querer saber ou não quais foram esses resultados.

A sua participação será através da concordância de que possamos colher uma quantidade pequena de sangue (1 ml) e retirar pequenas partes (fragmentos) do tumor do seu intestino, depois da operação a qual o(a) senhor(a) será submetido(a). A coleta de sangue será feita antes da operação e a retirada das partes do câncer ocorrerá no centro cirúrgico pelo pesquisador principal. A retirada desses partes (fragmentos) não trará nenhum prejuízo para seu diagnóstico e tratamento.

Esse estudo poderá lhe trazer como benefício um melhor conhecimento do seu tipo de câncer de intestino, o que significa um tratamento personalizado, e no caso de necessidade de aconselhamento genético será oferecida toda a indicação de profissionais e assistência no HUB sem custos.

Ao concordar em participar do estudo o(a) senhor(a) estará autorizando o armazenamento de dados genéticos obtidos apenas durante a pesquisa e que o(a) senhor(a) poderá suspender a qualquer momento mediante documento por escrito e assinado, com validade a partir da data da comunicação da decisão, sem nenhum prejuízo. Esses dados estarão armazenados nos laboratórios de Anatomia Patológica do Hospital Universitário de Brasília (HUB) e no Hospital Regional de Sobradinho (HRS).

Informamos que o(a) Senhor(a) pode se recusar a responder qualquer questão, ou participar de qualquer procedimento que lhe traga constrangimento, podendo desistir de participar da pesquisa em qualquer momento sem nenhum prejuízo para o(a) senhor(a). Sua participação é voluntária, isto é, não há pagamento por sua colaboração.

Os resultados da pesquisa serão divulgados na Instituição **Universidade de Brasília por ocasião da defesa de doutoramento** podendo ser publicados posteriormente. Os dados e materiais utilizados na pesquisa ficarão sob a guarda do pesquisador por um período de no mínimo cinco anos, após isso serão destruídos ou mantidos na instituição.

Se o(a) Senhor(a) tiver qualquer dúvida em relação à pesquisa, por favor telefone para: Marcelo de Melo Andrade Coura, na instituição Universidade de Brasília telefone: 32330850, 999792527, a qualquer horário.

**APÊNDICE A- TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO  
(continuação).**

Este projeto foi Aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília. As dúvidas com relação à assinatura do TCLE ou os direitos do sujeito da pesquisa podem ser obtidos através do telefone: (61) 3107-1918 ou do e-mail cepfm@unb.br.

Este documento foi elaborado em duas vias, que deverão ser assinadas pelo sujeito da pesquisa ou responsável e pelo pesquisador responsável, uma via ficará com o pesquisador responsável e a outra com o sujeito da pesquisa.

\_\_\_\_\_

Nome / assinatura

\_\_\_\_\_

Pesquisador Responsável

Nome e assinatura

Brasília, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_

# APÊNDICE B- PERFIL DAS MUTAÇÕES GENÉTICAS GERMINATIVAS PATOGENÉTICAS IDENTIFICADAS NO CONJUNTO DE GENES RELACIONADOS COM O CÂNCER COLORRETAL HEREDITÁRIO DOS PARTICIPANTES (N=13 PACIENTES).

## Paciente 1.

Sexo: Masculino  
 Data de nascimento: 25/12/1979  
 Solicitante: Marcelo de Melo Andrade Coura (CRM-DF 9.608)  
 Sumário clínico: Investigação para predisposição hereditária ao câncer.  
 Material: DNA extraído de SWAB bucal enviado ao laboratório.  
 Data de entrada de amostra: 17/07/2018  
 Data de liberação do resultado: 30/07/2018

Exame: Painel de Câncer Hereditário (Principais Genes)

### Resultado

Ausência de variantes patogênicas nos genes analisados.

#### Genes analisados:

APC ATM BARD1 BLM BRCA1 BRCA2 BRIP1 CDH1 CDK4 CDKN2A CHEK2 EGFR EPCAM FANCC MEN1 MET MLH1 MSH2 MSH6 MUTHYH NBN NF1 NF2 PALB2 PIK3CA PMS2 PTEN RAD51C RAD51D RBB1 RECQL RET STK11 TP53 WT1 POLD1 POLE

## Paciente 2.

Sexo: Feminino  
 Data de nascimento: 09/01/1981  
 Solicitante: Marcelo de Melo Andrade Coura (CRM-DF 9.608)  
 Sumário clínico: Investigação para predisposição hereditária ao câncer.  
 Material: DNA extraído de SWAB bucal enviado ao laboratório.  
 Data de entrada de amostra: 17/07/2018  
 Data de liberação do resultado: 30/07/2018

Exame: Painel de Câncer Hereditário (Principais Genes)

### Resultado

Ausência de variantes patogênicas nos genes analisados.

#### Genes analisados:

APC ATM BARD1 BLM BRCA1 BRCA2 BRIP1 CDH1 CDK4 CDKN2A CHEK2 EGFR EPCAM FANCC MEN1 MET MLH1 MSH2 MSH6 MUTHYH NBN NF1 NF2 PALB2 PIK3CA PMS2 PTEN RAD51C RAD51D RBB1 RECQL RET STK11 TP53 WT1 POLD1 POLE

## Paciente 3.

Sexo: Masculino  
 Data de nascimento: 05/08/1952  
 Solicitante: Marcelo de Melo Andrade Coura (CRM-DF 9.608)  
 Sumário clínico: Investigação para predisposição hereditária ao câncer.  
 Material: DNA extraído de SWAB bucal enviado ao laboratório.  
 Data de entrada de amostra: 26/06/2018  
 Data de liberação do resultado: 15/07/2018

Exame: Painel de Câncer Hereditário (Principais Genes)

### Resultado

Ausência de variantes patogênicas nos genes analisados. Ver comentários adicionais.

#### Genes analisados:

APC ATM BARD1 BLM BRCA1 BRCA2 BRIP1 CDH1 CDK4 CDKN2A CHEK2 EGFR EPCAM FANCC MEN1 MET MLH1 MSH2 MSH6 MUTHYH NBN NF1 NF2 PALB2 PIK3CA PMS2 PTEN RAD51C RAD51D RBB1 RECQL RET STK11 TP53 WT1 POLD1 POLE

## Paciente 4.

Sexo: Masculino  
 Data de nascimento: 22/08/1962  
 Solicitante: Marcelo de Melo Andrade Coura (CRM-DF 9.608)  
 Sumário clínico: Investigação para predisposição hereditária ao câncer.  
 Material: DNA extraído de SWAB bucal enviado ao laboratório.  
 Data de entrada de amostra: 15/08/2018  
 Data de liberação do resultado: 05/09/2018

Exame: Painel de Câncer Hereditário (Principais Genes)

### Resultado

Ausência de variantes patogênicas nos genes analisados.

#### Genes analisados:

APC ATM BARD1 BLM BRCA1 BRCA2 BRIP1 CDH1 CDK4 CDKN2A CHEK2 EGFR EPCAM FANCC MEN1 MET MLH1 MSH2 MSH6 MUTHYH NBN NF1 NF2 PALB2 PIK3CA PMS2 PTEN RAD51C RAD51D RBB1 RECQL RET STK11 TP53 WT1 POLD1 POLE

## Paciente 5.

Sexo: Masculino  
 Data de nascimento: 06/01/1957  
 Solicitante: Marcelo de Melo Andrade Coura (CRM-DF 9.608)  
 Sumário clínico: Investigação para predisposição hereditária ao câncer.  
 Material: DNA extraído de SWAB bucal enviado ao laboratório.  
 Data de entrada de amostra: 17/07/2018  
 Data de liberação do resultado: 30/07/2018

Exame: Painel de Câncer Hereditário (Principais Genes)

### Resultado

Ausência de variantes patogênicas nos genes analisados.

#### Genes analisados:

APC ATM BARD1 BLM BRCA1 BRCA2 BRIP1 CDH1 CDK4 CDKN2A CHEK2 EGFR EPCAM FANCC MEN1 MET MLH1 MSH2 MSH6 MUTHYH NBN NF1 NF2 PALB2 PIK3CA PMS2 PTEN RAD51C RAD51D RBB1 RECQL RET STK11 TP53 WT1 POLD1 POLE

## Paciente 6.

Sexo: Feminino  
 Data de nascimento: 01/01/1961  
 Solicitante: Marcelo de Melo Andrade Coura (CRM-DF 9.608)  
 Sumário clínico: Investigação para predisposição hereditária ao câncer.  
 Material: DNA extraído de SWAB bucal enviado ao laboratório.  
 Data de entrada de amostra: 17/07/2018  
 Data de liberação do resultado: 30/07/2018

Exame: Painel de Câncer Hereditário (Principais Genes)

### Resultado

Ausência de variantes patogênicas nos genes analisados. Ver comentários adicionais.

#### Genes analisados:

APC ATM BARD1 BLM BRCA1 BRCA2 BRIP1 CDH1 CDK4 CDKN2A CHEK2 EGFR EPCAM FANCC MEN1 MET MLH1 MSH2 MSH6 MUTHYH NBN NF1 NF2 PALB2 PIK3CA PMS2 PTEN RAD51C RAD51D RBB1 RECQL RET STK11 TP53 WT1 POLD1 POLE

# APÊNDICE B- PERFIL DAS MUTAÇÕES GENÉTICAS GERMINATIVAS PATOGÊNICAS IDENTIFICADAS NO CONJUNTO DE GENES RELACIONADOS COM O CÂNCER COLORRETAL HEREDITÁRIO DOS PARTICIPANTES (N=13 PACIENTES)(continuação).

## Paciente 7.

Sexo: Masculino  
 Data de nascimento: 03/08/1950  
 Solicitante: Marcelo de Melo Andrade Coura (CRM-DF 9.608)  
 Sumário clínico: Investigação para predisposição hereditária ao câncer.  
 Material: DNA extraído de SWAB bucal enviado ao laboratório.  
 Data de entrada da amostra: 17/07/2018  
 Data de liberação do resultado: 30/07/2018

Exame: PAINEL DE CÂNCER HEREDITÁRIO (PRINCIPAIS GENES)

### Resultado

Ausência de variantes patogênicas nos genes analisados.

#### Genes analisados:

APC ATM BARD1 BLM BRCA1 BRCA2 BRIP1 CDH1 CDK4 CDKN2A CHEK2 EGFR EPCAM FANCC MEN1 MET MLH1 MSH2 MSH6 MUTHYH NBN NFI NF2 PALB2 PIK3CA PMS2 PTEN RAD51C RAD51D RBB1 RECQL RET STK11 TP53 WTI POLD1 POLE

## Paciente 8.

Sexo: Feminino  
 Data de nascimento: 15/07/1953  
 Solicitante: Marcelo de Melo Andrade Coura (CRM-DF 9.608)  
 Sumário clínico: Investigação para predisposição hereditária ao câncer.  
 Material: DNA extraído de SWAB bucal enviado ao laboratório.  
 Data de entrada da amostra: 26/06/2018  
 Data de liberação do resultado: 15/07/2018

Exame: PAINEL DE CÂNCER HEREDITÁRIO (PRINCIPAIS GENES)

### Resultado

Ausência de variantes patogênicas nos genes analisados.

#### Genes analisados:

APC ATM BARD1 BLM BRCA1 BRCA2 BRIP1 CDH1 CDK4 CDKN2A CHEK2 EGFR EPCAM FANCC MEN1 MET MLH1 MSH2 MSH6 MUTHYH NBN NFI NF2 PALB2 PIK3CA PMS2 PTEN RAD51C RAD51D RBB1 RECQL RET STK11 TP53 WTI POLD1 POLE

## Paciente 9.

Sexo: Feminino  
 Data de nascimento: 05/12/1954  
 Solicitante: Marcelo de Melo Andrade Coura (CRM-DF 9.608)  
 Sumário clínico: Investigação para predisposição hereditária ao câncer.  
 Material: DNA extraído de SWAB bucal enviado ao laboratório.  
 Data de entrada da amostra: 17/07/2018  
 Data de liberação do resultado: 30/07/2018

Exame: PAINEL DE CÂNCER HEREDITÁRIO (PRINCIPAIS GENES)

### Resultado

Ausência de variantes patogênicas nos genes analisados.

#### Genes analisados:

APC ATM BARD1 BLM BRCA1 BRCA2 BRIP1 CDH1 CDK4 CDKN2A CHEK2 EGFR EPCAM FANCC MEN1 MET MLH1 MSH2 MSH6 MUTHYH NBN NFI NF2 PALB2 PIK3CA PMS2 PTEN RAD51C RAD51D RBB1 RECQL RET STK11 TP53 WTI POLD1 POLE

## Paciente 10.

Sexo: Feminino  
 Data de nascimento: 08/10/1963  
 Solicitante: Marcelo de Melo Andrade Coura (CRM-DF 9.608)  
 Sumário clínico: Investigação para predisposição hereditária ao câncer.  
 Material: DNA extraído de SWAB bucal enviado ao laboratório.  
 Data de entrada da amostra: 26/06/2018  
 Data de liberação do resultado: 15/07/2018

Exame: PAINEL DE CÂNCER HEREDITÁRIO (PRINCIPAIS GENES)

### Resultado

Ausência de variantes patogênicas nos genes analisados. Ver comentários adicionais.

#### Genes analisados:

APC ATM BARD1 BLM BRCA1 BRCA2 BRIP1 CDH1 CDK4 CDKN2A CHEK2 EGFR EPCAM FANCC MEN1 MET MLH1 MSH2 MSH6 MUTHYH NBN NFI NF2 PALB2 PIK3CA PMS2 PTEN RAD51C RAD51D RBB1 RECQL RET STK11 TP53 WTI POLD1 POLE

## Paciente 11.

Sexo: Feminino  
 Data de nascimento: 24/09/1944  
 Solicitante: Marcelo de Melo Andrade Coura (CRM-DF 9.608)  
 Sumário clínico: Investigação para predisposição hereditária ao câncer.  
 Material: DNA extraído de SWAB bucal enviado ao laboratório.  
 Data de entrada da amostra: 15/08/2018  
 Data de liberação do resultado: 07/09/2018

Exame: PAINEL DE CÂNCER HEREDITÁRIO (PRINCIPAIS GENES)

### Resultado

Ausência de variantes patogênicas nos genes analisados. Ver comentários adicionais.

#### Genes analisados:

APC ATM BARD1 BLM BRCA1 BRCA2 BRIP1 CDH1 CDK4 CDKN2A CHEK2 EGFR EPCAM FANCC MEN1 MET MLH1 MSH2 MSH6 MUTHYH NBN NFI NF2 PALB2 PIK3CA PMS2 PTEN RAD51C RAD51D RBB1 RECQL RET STK11 TP53 WTI POLD1 POLE

## Paciente 12.

Sexo: Masculino  
 Data de nascimento: 05/08/1954  
 Solicitante: Marcelo de Melo Andrade Coura (CRM-DF 9.608)  
 Sumário clínico: Investigação para predisposição hereditária ao câncer.  
 Material: DNA extraído de SWAB bucal enviado ao laboratório.  
 Data de entrada da amostra: 31/08/2018  
 Data de liberação do resultado: 23/09/2018

Exame: PAINEL DE CÂNCER HEREDITÁRIO (PRINCIPAIS GENES)

### Resultado

Ausência de variantes patogênicas nos genes analisados. Ver comentários adicionais.

#### Genes analisados:

APC ATM BARD1 BLM BRCA1 BRCA2 BRIP1 CDH1 CDK4 CDKN2A CHEK2 EGFR EPCAM FANCC MEN1 MET MLH1 MSH2 MSH6 MUTHYH NBN NFI NF2 PALB2 PIK3CA PMS2 PTEN RAD51C RAD51D RBB1 RECQL RET STK11 TP53 WTI POLD1 POLE

## APÊNDICE B- PERFIL DAS MUTAÇÕES GENÉTICAS GERMINATIVAS PATOGÊNICAS IDENTIFICADAS NO CONJUNTO DE GENES RELACIONADOS COM O CÂNCER COLORRETAL HEREDITÁRIO DOS PARTICIPANTES (N=13 PACIENTES)(continuação).

### Paciente 13.

Sexo: Feminino  
 Data de nascimento: 24/12/1940  
 Solicitante: Marcelo de Melo Andrade Coura (CRM-DF 9.608)  
 Sumário clínico: Investigação para predisposição hereditária ao câncer.  
 Material: DNA extraído de SWAB bucal enviado ao laboratório.  
 Data de entrada da amostra: 31/08/2018  
 Data de liberação do resultado: 24/09/2018

Exame: Paine de Câncer Hereditário (Principais Genes)

#### Resultado

Ver comentários adicionais.

#### Genes analisados:

APC ATM BARD1 BLM BRCA1 BRCA2 BRIP1 CDH1 CDK4 CDKN2A CHEK2 EGFR EPCAM FANCC MEN1 MET MLH1 MSH2 MSH6 MUTYH NBN NF1 NF2 PALB2 PIK3CA PMS2 PTEN RAD51C RAD51D RB1 RECQL RET STK11 TP53 WT1 POLD1 POLE

#### Parâmetros de qualidade de sequenciamento

Porcentagem de bases-alvo com pelo menos 10 leituras: 98,8%  
 Número médio de vezes que cada base foi lida: 134  
 Número de sequências geradas: 4.571.645

#### Variantes de significado incerto (VUS)

Pelo conhecimento atual não é possível definir a patogenicidade da(s) variante(s) abaixo. Portanto, recomenda-se que essas informações não sejam usadas para fundamentar decisões clínicas. Sugere-se, ainda, acompanhamento da literatura científica a respeito das mesmas.

Gene	Crom.	Posição	Varição	Consequência	Cópias
POLE	12	133.201.369	G > A	p.Arg2259Trp ENST00000320574	Heterozigose (1 cópia)

#### Comentários

A análise genômica por sequenciamento de nova geração foi realizada para investigar se o paciente apresenta variantes que possam estar associadas aos genes acima relacionados.

Não foram encontradas variantes reconhecidamente patogênicas ou variações do número de cópias (CNVs), pela técnica de sequenciamento de nova geração (NGS), no(s) gene(s) investigado(s).

Este resultado não permite descartar alteração em região não codificante dos genes analisados, como regiões reguladoras, sequências intergênicas e intrônicas distantes dos éxons, que não são objeto desta análise. É importante ressaltar que a análise é guiada pelo conhecimento científico atual e pode sofrer mudanças ao longo do tempo. A cobertura deste exame foi suficiente para assegurar boa qualidade na quase totalidade das sequências-alvo dos genes analisados.

## APÊNDICE C- PERFIL DAS MUTAÇÕES SOMÁTICAS DOS ONCOGENES *KRAS/BRAF*, PRESENTES NOS TUMORES COLÔNICOS ESTUDADOS.

### Paciente 1.

Nome:	Protocolo:	<b>KR190260</b>
Médico: Marcelo de Melo Andrade Coura	Senha:	367139
Coleta: 18/3/2019	Convênio:	AMGEN

Diagnóstico:

> **Mutação detectada em KRAS códon 13.**

Material:

A - Peça cirúrgica, adenocarcinoma intestinal, segmento não informado. - Bloco: 1634-17/13.

Avaliação:

#### Análise da Família RAS

**Aplicação:** Predição de resposta à terapia alvo-específica.

**Método:** Avaliação histológica e PCR em tempo real - Idylla/Biocartis.

**Porcentagem tumoral na amostra avaliada:** 70% das células.

**Tipo histológico na amostra avaliada:** Adenocarcinoma composto mucinoso\*.

Mutação detectada em **KRAS** códon 13.

Mutação - G13D

Proteína - p.Gly13Asp

Alteração do nucleotídeo - c.38G>A

**Parecer Molecular:** foi detectada uma mutação clinicamente relevante no gene da família RAS na amostra avaliada.

### Paciente 2.

Nome:	Protocolo:	<b>KR190261</b>
Médico: Marcelo de Melo Andrade Coura	Senha:	254088
Coleta: 18/3/2019	Convênio:	AMGEN

Diagnóstico:

> **Mutação não detectada em KRAS, NRAS, BRAF e EGFR.**

Material:

A - Peça cirúrgica, adenocarcinoma intestinal, segmento não informado. - Bloco: 2073-17/13.

## APÊNDICE C- PERFIL DAS MUTAÇÕES SOMÁTICAS DOS ONCOGENES *KRAS/BRAF*, PRESENTES NOS TUMORES COLÔNICOS ESTUDADOS (continuação).

### Paciente 3.

Nome:	Protocolo:	<b>KR190262</b>
Médico: Marcelo de Melo Andrade Coura	Senha:	572564
Coleta: 18/3/2019	Convênio:	AMGEN

Diagnóstico:

> **Mutação detectada em KRAS códon 12.**

Material:

A - Peça cirúrgica, adenocarcinoma intestinal, segmento não informado. - Bloco: 1732-18/10.

Avaliação:

#### Análise da Família RAS

**Aplicação:** Predição de resposta à terapia alvo-específica.

**Método:** Avaliação histológica e PCR em tempo real - Idylla/Biocartis.

**Porcentagem tumoral na amostra avaliada:** 80% das células.

**Tipo histológico na amostra avaliada:** Adenocarcinoma cribriforme - comedo\*.

Mutação detectada em **KRAS** códon 12.

Mutação - G12V

Proteína - p.Gly12Val

Alteração do nucleotídeo - c.35G>T

**Parecer Molecular:** foi detectada uma mutação clinicamente relevante no gene da família RAS na amostra avaliada.

### Paciente 4.

Nome:	Protocolo:	<b>KR190263</b>
Médico: Marcelo de Melo Andrade Coura	Senha:	213064
Coleta: 18/3/2019	Convênio:	AMGEN

Diagnóstico:

> **Mutação não detectada em KRAS, NRAS, BRAF e EGFR.**

Material:

A - Peça cirúrgica, adenocarcinoma intestinal, segmento não informado. - Bloco: B4940-18/8

### Paciente 5.

Nome:	Protocolo:	<b>KR190285</b>
Médico: Marcelo de Melo Andrade Coura	Senha:	744446
Coleta: 19/3/2019	Convênio:	AMGEN

Diagnóstico:

> **Mutação não detectada em KRAS, NRAS e BRAF.**

Material:

A - Peça cirúrgica, adenocarcinoma intestinal, segmento não informado. - Bloco: B2469-17

## APÊNDICE C- PERFIL DAS MUTAÇÕES SOMÁTICAS DOS ONCOGENES *KRAS/BRAF*, PRESENTES NOS TUMORES COLÔNICOS ESTUDADOS (continuação).

### Paciente 6.

Nome: \_\_\_\_\_ Protocolo: **KR190264**  
 Médico: Marcelo de Melo Andrade Coura Senha: 493392  
 Coleta: 18/3/2019 Convênio: AMGEN

Diagnóstico:

> **Mutação não detectada em KRAS, NRAS, BRAF e EGFR.**

Material:

A - Peça cirúrgica, adenocarcinoma intestinal, segmento não informado. - Bloco: B2781-17/4.

### Paciente 7.

Nome: \_\_\_\_\_ Protocolo: **KR190270**  
 Médico: Marcelo de Melo Andrade Coura Senha: 775917  
 Coleta: 18/3/2019 Convênio: AMGEN

Diagnóstico:

> **Mutação detectada em BRAF códon 600.**

Material:

A - Peça cirúrgica, adenocarcinoma intestinal, segmento não informado. - Bloco: B0298-18/7

Avaliação:

#### Análise da Família RAS

**Aplicação:** Predição de resposta à terapia alvo-específica.  
**Método:** Avaliação histológica e PCR em tempo real - Idylla/Biocartis.  
**Porcentagem tumoral na amostra avaliada:** 80% das células.  
**Tipo histológico na amostra avaliada:** Adenocarcinoma SOE alto grau\*.

Mutação detectada em **BRAF** códon 600.  
 Mutação - V600E/D  
 Proteína - p.Val600Glu / p.Val600Asp  
 Alteração do nucleotídeo - c.1799T>A ; c.1799\_1800delinsAA / c.1799\_1800delinsAC

Genótipo **KRAS** - Mutação não detectada nos códons 12, 13, 59, 61, 117, 146 do KRAS.  
 Genótipo **NRAS** - Mutação não detectada nos códons 12, 13, 59, 61, 117, 146 do NRAS.  
 Genótipo **EGFR** - Mutação não detectada no códon 492 do EGFR.

**Parecer Molecular:** foi detectada uma mutação clinicamente relevante no gene BRAF na amostra avaliada.

### Paciente 8.

Nome: \_\_\_\_\_ Protocolo: **KR190266**  
 Médico: Marcelo de Melo Andrade Coura Senha: 228845  
 Coleta: 18/3/2019 Convênio: AMGEN

Diagnóstico:

> **Mutação não detectada em KRAS, NRAS, BRAF e EGFR.**

Material:

A - Peça cirúrgica, adenocarcinoma intestinal, segmento não informado. - Bloco: B0993-18/7

## APÊNDICE C- PERFIL DAS MUTAÇÕES SOMÁTICAS DOS ONCOGENES *KRAS/BRAF*, PRESENTES NOS TUMORES COLÔNICOS ESTUDADOS (continuação).

### Paciente 9.

Nome:	Protocolo: <b>KR190265</b>
Médico: Marcelo de Melo Andrade Coura	Senha: 347476
Coleta: 18/3/2019	Convênio: AMGEN

Diagnóstico:

> **Mutação não detectada em KRAS, NRAS, BRAF e EGFR.**

Material:

A - Peça cirúrgica, adenocarcinoma intestinal, segmento não informado. - Bloco: B1417-18/3.

### Paciente 10.

Nome:	Protocolo: <b>KR190284</b>
Médico: Marcelo de Melo Andrade Coura	Senha: 366302
Coleta: 19/3/2019	Convênio: AMGEN

Diagnóstico:

> **Mutação detectada em BRAF códon 600.**

Material:

A - Peça cirúrgica, adenocarcinoma intestinal, segmento não informado. - Bloco: B2097-18/8

Avaliação:

#### Análise da Família RAS

**Aplicação:** Predição de resposta à terapia alvo-específica.  
**Método:** Avaliação histológica e PCR em tempo real - Idylla/Biocartis.  
**Porcentagem tumoral na amostra avaliada:** 50% das células.  
**Tipo histológico na amostra avaliada:** Adenocarcinoma composto mucinoso\*.

Mutação detectada em **BRAF** códon 600.  
 Mutação - V600E/D  
 Proteína - p.Val600Glu / p.Val600Asp  
 Alteração do nucleotídeo - c.1799T>A ; c.1799\_1800delinsAA / c.1799\_1800delinsAC

Genótipo **KRAS** - Mutação não detectada nos códons 12, 13, 59, 61, 117, 146 do KRAS.  
 Genótipo **NRAS** - Mutação não detectada nos códons 12, 13, 59, 61, 117, 146 do NRAS.

**Parecer Molecular:** foi detectada uma mutação clinicamente relevante no gene BRAF na amostra avaliada.

### Paciente 11.

Nome:	Protocolo: <b>KR190267</b>
Médico: Marcelo de Melo Andrade Coura	Senha: 640835
Coleta: 18/3/2019	Convênio: AMGEN

Diagnóstico:

> **Mutação não detectada em KRAS, NRAS, BRAF e EGFR.**

Material:

A - Peça cirúrgica, adenocarcinoma intestinal, segmento não informado. - Bloco: B0329-19/4

## APÊNDICE C- PERFIL DAS MUTAÇÕES SOMÁTICAS DOS ONCOGENES *KRAS/BRAF*, PRESENTES NOS TUMORES COLÔNICOS ESTUDADOS (continuação).

### Paciente 12.

Nome:	Protocolo:	<b>KR190269</b>
Médico: Marcelo de Melo Andrade Coura	Senha:	700873
Coleta: 18/3/2019	Convênio:	AMGEN

Diagnóstico:

> **Mutação detectada em KRAS códon 12.**

Material:

A - Peça cirúrgica, adenocarcinoma intestinal, segmento não informado. - Bloco: B3204-18/5.

Avaliação:

#### Análise da Família RAS

**Aplicação:** Predição de resposta à terapia alvo-específica.

**Método:** Avaliação histológica e PCR em tempo real - Idylla/Biocartis.

**Porcentagem tumoral na amostra avaliada:** 80% das células.

**Tipo histológico na amostra avaliada:** Adenocarcinoma composto mucinoso\*.

Mutação detectada em **KRAS** códon 12.

Mutação - G12V

Proteína - p.Gly12Val

Alteração do nucleotídeo - c.35G>T

**Parecer Molecular:** foi detectada uma mutação clinicamente relevante no gene da família RAS na amostra avaliada.

### Paciente 13.

Nome:	Protocolo:	<b>KR190268</b>
Médico: Marcelo de Melo Andrade Coura	Senha:	561672
Coleta: 18/3/2019	Convênio:	AMGEN

Diagnóstico:

> **Mutação detectada em KRAS códon 13.**

Material:

A - Peça cirúrgica, adenocarcinoma intestinal, segmento não informado. - Bloco: B3360-18/13.

Avaliação:

#### Análise da Família RAS

**Aplicação:** Predição de resposta à terapia alvo-específica.

**Método:** Avaliação histológica e PCR em tempo real - Idylla/Biocartis.

**Porcentagem tumoral na amostra avaliada:** 90% das células.

**Tipo histológico na amostra avaliada:** Adenocarcinoma medular\*.

Mutação detectada em **KRAS** códon 13.

Mutação - G13D

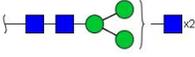
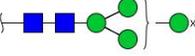
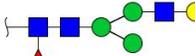
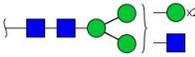
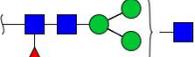
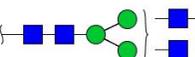
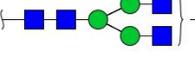
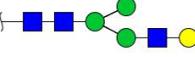
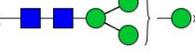
Proteína - p.Gly13Asp

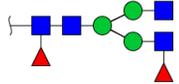
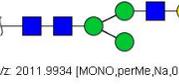
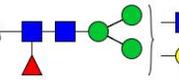
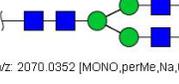
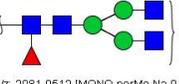
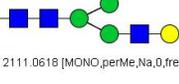
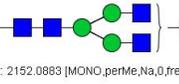
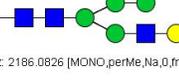
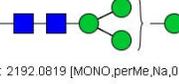
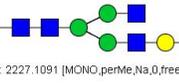
Alteração do nucleotídeo - c.38G>A

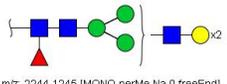
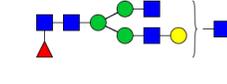
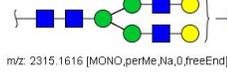
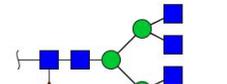
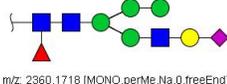
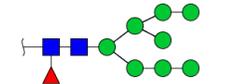
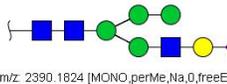
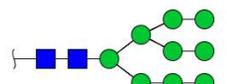
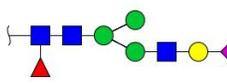
**Parecer Molecular:** foi detectada uma mutação clinicamente relevante no gene da família RAS na amostra avaliada.

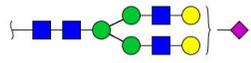
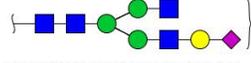
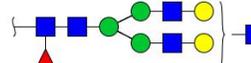
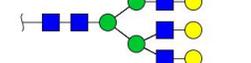
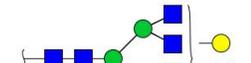
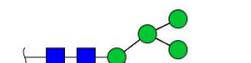
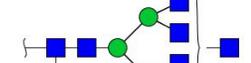
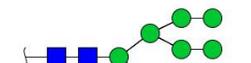
**APÊNDICE D- LISTA DE TODAS AS COMPOSIÇÕES DE N-GLICANOS IDENTIFICADOS NO SORO E NO TECIDO DOS PACIENTES COM CÂNCER DE CÓLON E NO SORO DE INDIVÍDUOS SADIOS, PELOS MÉTODOS MALDI-TOF-MS e LC-MS/MS.**

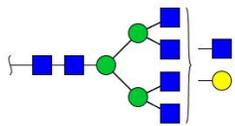
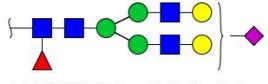
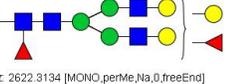
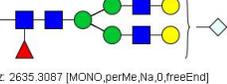
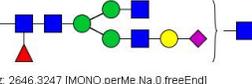
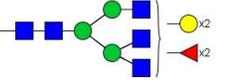
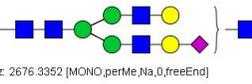
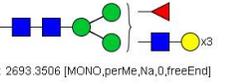
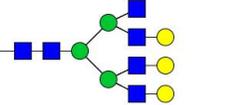
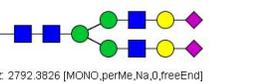
Nº	Estrutura proposta, massa exata teórica e composição (Soro/Tecido)	Massa usada para quantificação (LC-MS) <sup>a</sup>	Aduto (LC-MS)	Isótopo pesado usado como referência (soro) <sup>b</sup>		Isótopo pesado usado como referência (tecido) <sup>b</sup>		Estrutura confirmada por MS/MS <sup>c</sup>
				LC-MS	MALDI	LC-MS	MALDI	
1	 m/z: 1124,5572 [MONO,perMe,Na,0,freeEnd] HexNAc2Hex1NeuAc1	1124,5572	[M+Na] <sup>+</sup>	13	-	1		-
2	 m/z: 1171,5831 [MONO,perMe,Na,0,freeEnd] HexNAc2Hex3	1171,5831	[M+Na] <sup>+</sup>	13	-	2		-
3	 m/z: 1345,6723 [MONO,perMe,Na,0,freeEnd] HexNAc2Hex3Fuc1	1345,6723	[M+Na] <sup>+</sup>	13	-	3		-
4*	 m/z: 1375,6828 [MONO,perMe,Na,0,freeEnd] HexNAc2Hex4	1375,6828*	[M+Na] <sup>+</sup>	13	-	4		-
5	 m/z: 1416,7094 [MONO,perMe,Na,0,freeEnd] HexNAc3Hex3	1416,7094	[M+Na] <sup>+</sup>	13	-	-		✓✓
6	 m/z: 1579,7826 [MONO,perMe,Na,0,freeEnd] HexNAc2Hex5	1579,7826	[M+Na] <sup>+</sup>	54	6	6	6	✓✓
7	 m/z: 1590,7986 [MONO,perMe,Na,0,freeEnd] HexNAc3Hex3Fuc1	1590,7986	[M+Na] <sup>+</sup>	28	-	7	28	-
8	 m/z: 1620,8091 [MONO,perMe,Na,0,freeEnd] HexNAc3Hex4	1620,8090	[M+Na] <sup>+</sup>	20	-			*

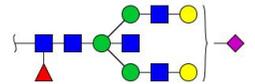
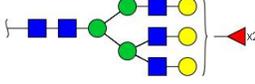
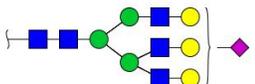
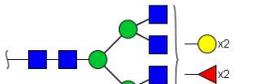
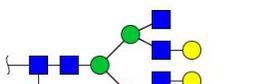
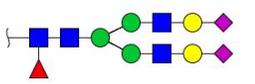
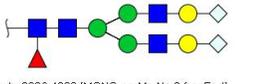
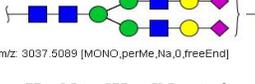
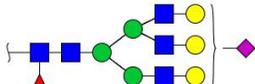
9	 <p>m/z: 1661.8357 [MONO_perMe_Na_0_freeEnd]</p> <p>HexNAc4Hex3</p>	842,4125*	[M+2Na] <sup>+</sup>	13	-			✓✓
10	 <p>m/z: 1783.8824 [MONO_perMe_Na_0_freeEnd]</p> <p>HexNAc2Hex6</p>	903,4358	[M+2Na] <sup>2+</sup>	54	10	-	10	✓✓
11	 <p>m/z: 1794.8984 [MONO_perMe_Na_0_freeEnd]</p> <p>HexNAc3Hex4Fuc1</p>	908,9438	[M+2Na] <sup>2+</sup>	28	-		28	-
12	 <p>m/z: 1824.9089 [MONO_perMe_Na_0_freeEnd]</p> <p>HexNAc3Hex5</p>	1824,9089	[M+Na] <sup>+</sup>	54	-			-
13	 <p>m/z: 1835.9249 [MONO_perMe_Na_0_freeEnd]</p> <p>HexNAc4Hex3Fuc1</p>	929,4571	[M+2Na] <sup>2+</sup>	13	13	13	13	✓✓
14	 <p>m/z: 1865.9355 [MONO_perMe_Na_0_freeEnd]</p> <p>HexNAc4Hex4</p>	1865,9355	[M+Na] <sup>+</sup>	20	14			✓✓
15	 <p>m/z: 1906.9620 [MONO_perMe_Na_0_freeEnd]</p> <p>HexNAc5Hex3</p>	964,9756	[M+2Na] <sup>2+</sup>	13	-		15	-
16	 <p>m/z: 1981.9828 [MONO_perMe_Na_0_freeEnd]</p> <p>HexNAc3Hex4NeuAc1</p>	1002,4860	[M+2Na] <sup>2+</sup>	16	-			✓✓
17	 <p>m/z: 1987.9821 [MONO_perMe_Na_0_freeEnd]</p> <p>HexNAc2Hex7</p>	1005,4857*	[M+2Na] <sup>2+</sup>	54	17	17	17	✓✓

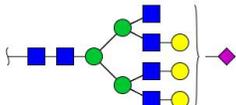
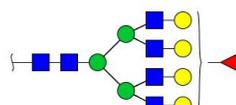
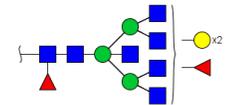
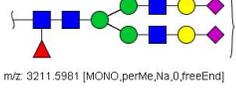
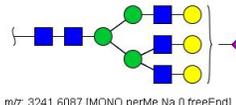
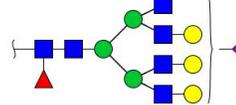
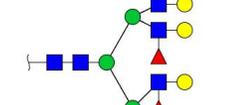
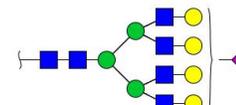
18	 <p>m/z: 2010.0141 [MONO,perMe,Na,0,freeEnd]</p> <p>HexNAc4Hex3Fuc2</p>	1016,5017	[M+2Na] <sup>2+</sup>	13	-	-		✓✓
19	 <p>m/z: 2011.9934 [MONO,perMe,Na,0,freeEnd]</p> <p>HexNAc3Hex4NeuGc1</p>	1017,4913	[M+2Na] <sup>2+</sup>	37	-			-
20	 <p>m/z: 2040.0247 [MONO,perMe,Na,0,freeEnd]</p> <p>HexNAc4Hex4Fuc1</p>	1031,5070	[M+2Na] <sup>2+</sup>	20	20	20	20	✓✓
21	 <p>m/z: 2070.0352 [MONO,perMe,Na,0,freeEnd]</p> <p>HexNAc4Hex5</p>	1046,5122	[M+2Na] <sup>2+</sup>	54	21			✓✓
22	 <p>m/z: 2081.0512 [MONO,perMe,Na,0,freeEnd]</p> <p>HexNAc5Hex3Fuc1</p>	1052,0202	[M+2Na] <sup>2+</sup>	13	13	-	13	-
23	 <p>m/z: 2111.0618 [MONO,perMe,Na,0,freeEnd]</p> <p>HexNAc5Hex4</p>	1067,0255	[M+2Na] <sup>2+</sup>	20	-	23		*
24	 <p>m/z: 2152.0883 [MONO,perMe,Na,0,freeEnd]</p> <p>HexNAc6Hex3</p>	1087,5388*	[M+2Na] <sup>2+</sup>	13	-			✓
25	 <p>m/z: 2186.0826 [MONO,perMe,Na,0,freeEnd]</p> <p>HexNAc3Hex5NeuAc1</p>	1104,5359*	[M+2Na] <sup>2+</sup>	54	25	25		✓✓
26	 <p>m/z: 2192.0819 [MONO,perMe,Na,0,freeEnd]</p> <p>HexNAc2Hex8</p>	1107,5356	[M+2Na] <sup>2+</sup>	54	26	26	26	✓✓
27	 <p>m/z: 2227.1091 [MONO,perMe,Na,0,freeEnd]</p> <p>HexNAc4Hex4NeuAc1</p>	1125,0492	[M+2Na] <sup>2+</sup>	27	27	27		✓✓

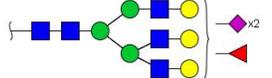
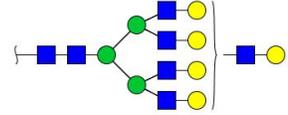
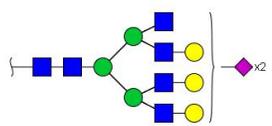
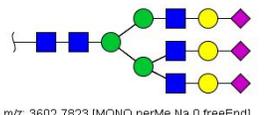
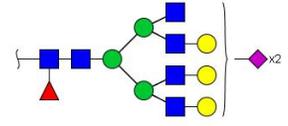
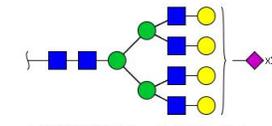
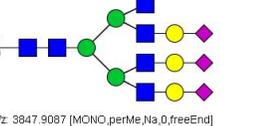
28	 <p>m/z: 2244.1245 [MONO_perMe_Na,0_freeEnd]</p> <p>HexNAc4Hex5Fuc1</p>	1133,5568	[M+2Na] <sup>2+</sup>	28	28	28	28	✓✓
29	 <p>HexNAc5Hex4Fuc1</p>	1154,0701	[M+2Na] <sup>2+</sup>	29	29	29	29	✓✓
30	 <p>m/z: 2315.1616 [MONO_perMe_Na,0_freeEnd]</p> <p>HexNAc5Hex5</p>	1169,0754	[M+2Na] <sup>2+</sup>	28	-	-	-	-
31	 <p>m/z: 2326.1776 [MONO_perMe_Na,0_freeEnd]</p> <p>HexNAc6Hex3Fuc1</p>	1174,5834	[M+2Na] <sup>2+</sup>	13	-	-	-	-
32	 <p>m/z: 2360.1718 [MONO_perMe_Na,0_freeEnd]</p> <p>HexNAc3Hex5Fuc1NeuAc1</p>	1191,5805	[M+2Na] <sup>2+</sup>	28	-	-	32	✓✓
33	 <p>m/z: 2366.1711 [MONO_perMe_Na,0_freeEnd]</p> <p>HexNAc2Hex8Fuc1</p>	1194,5802	[M+2Na] <sup>2+</sup>	54	-	-	-	-
34	 <p>m/z: 2390.1824 [MONO_perMe_Na,0_freeEnd]</p> <p>HexNAc3Hex6NeuAc1</p>	1206,5858	[M+2Na] <sup>2+</sup>	54	34	-	-	✓✓
35	 <p>m/z: 2396.1817 [MONO_perMe_Na,0_freeEnd]</p> <p>HexNAc2Hex9</p>	1209,5855	[M+2Na] <sup>2+</sup>	54	35	35	35	✓✓
36	 <p>m/z: 2401.1983 [MONO_perMe_Na,0_freeEnd]</p> <p>HexNAc4Hex4Fuc1NeuAc1</p>	1220,0808	[M+Na+K] <sup>2+</sup>	36	-	-	36	✓✓

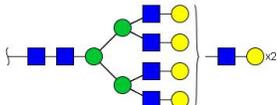
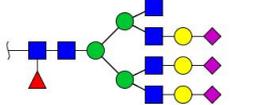
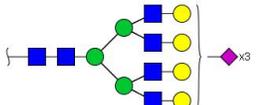
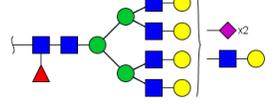
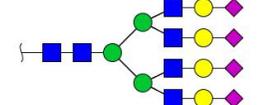
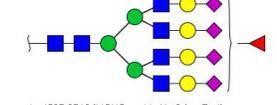
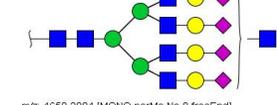
37	 <p>m/z: 2431.2089 [MONO,perMe,Na,0,freeEnd]</p> <p>HexNAc4Hex5NeuAc1</p>	1227,0991	[M+2Na] <sup>2+</sup>	37	37	37	37	✓✓
38	 <p>m/z: 2472.2355 [MONO,perMe,Na,0,freeEnd]</p> <p>HexNAc5Hex4NeuAc1</p>	1247,6123	[M+2Na] <sup>2+</sup>	54	-	38		✓✓
39	 <p>m/z: 2489.2508 [MONO,perMe,Na,0,freeEnd]</p> <p>HexNAc5Hex5Fuc1</p>	1256,1200	[M+2Na] <sup>2+</sup>	28	28	39	28	-
40	 <p>m/z: 2519.2613 [MONO,perMe,Na,0,freeEnd]</p> <p>HexNAc5Hex6</p>	1271,1253	[M+2Na] <sup>2+</sup>	75	-			-
41	 <p>m/z: 2530.2773 [MONO,perMe,Na,0,freeEnd]</p> <p>HexNAc6Hex4Fuc1</p>	1276,6333	[M+2Na] <sup>2+</sup>	28	-			-
42	 <p>m/z: 2564.2716 [MONO,perMe,Na,0,freeEnd]</p> <p>HexNAc3Hex6Fuc1NeuAc1</p>	1293,6304*	[M+2Na] <sup>2+</sup>	28	-			✓✓
43	 <p>m/z: 2571.3039 [MONO,perMe,Na,0,freeEnd]</p> <p>HexNAc7Hex3Fuc1</p>	1297,1465	[M+2Na] <sup>2+</sup>	78	-	43		*
44	 <p>m/z: 2600.2815 [MONO,perMe,Na,0,freeEnd]</p> <p>HexNAc2Hex10</p>	1311,6353	[M+2Na] <sup>2+</sup>	54	-	44		✓

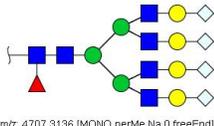
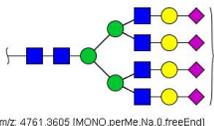
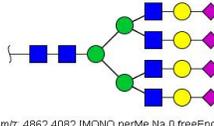
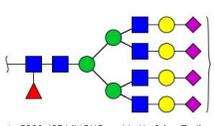
45	 <p>m/z: 2601.3144 [MONO,perMe,Na,0,freeEnd]</p> <p>HexNAc7Hex4</p>	1312,1518	[M+2Na] <sup>2+</sup>	75	-	45		✓
46	 <p>m/z: 2605.2981 [MONO,perMe,Na,0,freeEnd]</p> <p>HexNAc4Hex5Fuc1NeuAc1</p>	1314,1437	[M+2Na] <sup>2+</sup>	46	46	46	46	✓✓
47	 <p>m/z: 2622.3134 [MONO,perMe,Na,0,freeEnd]</p> <p>HexNAc4Hex6Fuc2</p>	1322,6513	[M+2Na] <sup>2+</sup>	28	-	-		-
48	 <p>m/z: 2635.3087 [MONO,perMe,Na,0,freeEnd]</p> <p>HexNAc4Hex5Fuc1NeuGc1</p>	1329,149	[M+2Na] <sup>2+</sup>	28	-			-
49	 <p>m/z: 2646.3247 [MONO,perMe,Na,0,freeEnd]</p> <p>HexNAc5Hex4Fuc1NeuAc1</p>	1334,6569*	[M+2Na] <sup>2+</sup>	28	-	-		-
50	 <p>m/z: 2663.3400 [MONO,perMe,Na,0,freeEnd]</p> <p>HexNAc5Hex5Fuc2</p>	903,1061	[M+3Na] <sup>3+</sup>	28	28			-
51	 <p>m/z: 2676.3352 [MONO,perMe,Na,0,freeEnd]</p> <p>HexNAc5Hex5NeuAc1</p>	907,4379*	[M+3Na] <sup>3+</sup>	37	37	-		✓
52	 <p>m/z: 2693.3506 [MONO,perMe,Na,0,freeEnd]</p> <p>HexNAc5Hex6Fuc1</p>	913,1097	[M+3Na] <sup>3+</sup>	28	-	-		✓
53	 <p>m/z: 2764.3877 [MONO,perMe,Na,0,freeEnd]</p> <p>HexNAc6Hex6</p>	936,7887	[M+3Na] <sup>3+</sup>	75	37			✓
54	 <p>m/z: 2792.3826 [MONO,perMe,Na,0,freeEnd]</p> <p>HexNAc4Hex5NeuAc2</p>	1407,6859	[M+2Na] <sup>2+</sup>	54	54	54	54	✓✓

55	 <p>m/z: 2850.4244 [MONO,perMe,Na,0,freeEnd]</p> <p>HexNAc5Hex5Fuc1NeuAc1</p>	965,4676	$[M+3Na]^{3+}$	28	55	-	55	✓✓
56	 <p>m/z: 2867.4398 [MONO,perMe,Na,0,freeEnd]</p> <p>HexNAc5Hex6Fuc2</p>	971,1394	$[M+3Na]^{3+}$	28	-	56	-	-
57	 <p>m/z: 2880.4350 [MONO,perMe,Na,0,freeEnd]</p> <p>HexNAc5Hex6NeuAc1</p>	975,4711	$[M+3Na]^{3+}$	75	-	-	-	✓✓
58	 <p>m/z: 2908.4663 [MONO,perMe,Na,0,freeEnd]</p> <p>HexNAc6Hex5Fuc2</p>	984,8149	$[M+3Na]^{3+}$	28	-	-	-	✓
59	 <p>m/z: 2938.4769 [MONO,perMe,Na,0,freeEnd]</p> <p>HexNAc6Hex6Fuc1</p>	994,8184	$[M+3Na]^{3+}$	28	-	59	28	✓
60	 <p>m/z: 2966.4718 [MONO,perMe,Na,0,freeEnd]</p> <p>HexNAc4Hex5Fuc1NeuAc2</p>	1004,1501	$[M+3Na]^{3+}$	28	60	-	60	✓✓
61	 <p>m/z: 3026.4929 [MONO,perMe,Na,0,freeEnd]</p> <p>HexNAc4Hex5Fuc1NeuGc1</p>	1532,728	$[M+Na+K]_{2+}$	28	-	-	-	-
62	 <p>m/z: 3037.5089 [MONO,perMe,Na,0,freeEnd]</p> <p>HexNAc5Hex5NeuAc2</p>	1027,8291	$[M+3Na]^{3+}$	54	-	-	-	-
63	 <p>m/z: 3054.5242 [MONO,perMe,Na,0,freeEnd]</p> <p>HexNAc5Hex6Fuc1NeuAc1</p>	1033,5009*	$[M+3Na]^{3+}$	28	-	-	28	✓

64	 <p>m/z: 3125.5613 [MONO_perMe_Na,0_freeEnd]</p> <p>HexNAc6Hex6NeuAc1</p>	1057,1799	$[M+3Na]^{3+}$	75	-			-
65	 <p>m/z: 3142.5766 [MONO_perMe_Na,0_freeEnd]</p> <p>HexNAc6Hex7Fuc1</p>	1062,8517	$[M+3Na]^{3+}$	28	-	65		-
66	 <p>m/z: 3153.5926 [MONO_perMe_Na,0_freeEnd]</p> <p>HexNAc7Hex5Fuc2</p>	1066,5237	$[M+3Na]^{3+}$	66	-			-
67	 <p>m/z: 3211.5981 [MONO_perMe_Na,0_freeEnd]</p> <p>HexNAc5Hex5Fuc1NeuAc2</p>	1617,2937	$[M+2Na]^{2+}$	28	67	67		✓✓
68	 <p>m/z: 3241.6087 [MONO_perMe_Na,0_freeEnd]</p> <p>HexNAc5Hex6NeuAc2</p>	1095,8624	$[M+3Na]^{3+}$	75	54			-
69	 <p>m/z: 3299.6505 [MONO_perMe_Na,0_freeEnd]</p> <p>HexNAc6Hex6Fuc1NeuAc1</p>	1115,2096	$[M+3Na]^{3+}$	28	-			✓
70	 <p>m/z: 3316.6669 [MONO_perMe_Na,0_freeEnd]</p> <p>HexNAc6Hex7Fuc2</p>	1669,8275*	$[M+2Na]^{2+}$	28	-	70		✓
71	 <p>m/z: 3329.6611 [MONO_perMe_Na,0_freeEnd]</p> <p>HexNAc6Hex7NeuAc1</p>	1125,2132	$[M+3Na]^{3+}$	84	-			-

72	 <p>m/z: 3415.6979 [MONO_perMe_Na,0,freeEnd]</p> <p>HexNAc5Hex6Fuc1NeuAc2</p>	1153,8921	[M+3Na] <sup>3+</sup>	28	54			✓
73	 <p>m/z: 3417.7135 [MONO_perMe_Na,0,freeEnd]</p> <p>HexNAc7Hex8</p>	1154,5640*	[M+3Na] <sup>3+</sup>	84	-	73		✓
74	 <p>m/z: 3486.7350 [MONO_perMe_Na,0,freeEnd]</p> <p>HexNAc6Hex6NeuAc2</p>	1177,5711*	[M+3Na] <sup>3+</sup>	75	-	74		-
75	 <p>m/z: 3602.7823 [MONO_perMe_Na,0,freeEnd]</p> <p>HexNAc5Hex6NeuAc3</p>	1216,2536	[M+3Na] <sup>3+</sup>	75	75		75	✓✓
76	 <p>m/z: 3660.8242 [MONO_perMe_Na,0,freeEnd]</p> <p>HexNAc6Hex6Fuc1NeuAc2</p>	1235,6009*	[M+3Na] <sup>3+</sup>	28	-			-
77	 <p>m/z: 3690.8348 [MONO_perMe_Na,0,freeEnd]</p> <p>HexNAc6Hex7NeuAc2</p>	1245,6044	[M+3Na] <sup>3+</sup>	84	54		77	✓
78	 <p>m/z: 3776.8716 [MONO_perMe_Na,0,freeEnd]</p> <p>HexNAc5Hex6Fuc1NeuAc3</p>	1274,2833	[M+3Na] <sup>3+</sup>	28	78			✓✓
79	 <p>m/z: 3847.9087 [MONO_perMe_Na,0,freeEnd]</p> <p>HexNAc6Hex6NeuAc3</p>	1297,9624	[M+3Na] <sup>3+</sup>	75	-			-

<p><b>80</b></p>  <p>m/z: 3866.9396 [MONO_perMe_Na_0_freeEnd]</p> <p>HexNAc8Hex9</p>	<p>1944,9644</p>	<p><math>[M+2Na]^{2+}</math></p>	<p>84</p>	<p>-</p>	<p>80</p>			<p>-</p>
<p><b>81</b></p>  <p>m/z: 4021.9979 [MONO_perMe_Na_0_freeEnd]</p> <p>HexNAc6Hex6Fuc1NeuAc3</p>	<p>1355,9921</p>	<p><math>[M+3Na]^{3+}</math></p>	<p>28</p>	<p>-</p>				<p>-</p>
<p><b>82</b></p>  <p>m/z: 4052.0084 [MONO_perMe_Na_0_freeEnd]</p> <p>HexNAc6Hex7NeuAc3</p>	<p>1030,2440</p>	<p><math>[M+4Na]^{4+}</math></p>	<p>84</p>	<p>54</p>				<p>✓</p>
<p><b>83</b></p>  <p>m/z: 4314.1501 [MONO_perMe_Na_0_freeEnd]</p> <p>HexNAc7Hex8Fuc1NeuAc2</p>	<p>1453,3762</p>	<p><math>[M+3Na]^{3+}</math></p>	<p>83</p>	<p>-</p>				<p>-</p>
<p><b>84</b></p>  <p>m/z: 4413.1821 [MONO_perMe_Na_0_freeEnd]</p> <p>HexNAc6Hex7NeuAc4</p>	<p>1120,5374</p>	<p><math>[M+4Na]^{4+}</math></p>	<p>84</p>	<p>84</p>				<p>✓✓</p>
<p><b>85</b></p>  <p>m/z: 4587.2713 [MONO_perMe_Na_0_freeEnd]</p> <p>HexNAc6Hex7Fuc1NeuAc4</p>	<p>1164,0597</p>	<p><math>[M+4Na]^{4+}</math></p>	<p>84</p>	<p>78</p>	<p>85</p>			<p>✓</p>
<p><b>86</b></p>  <p>m/z: 4658.3084 [MONO_perMe_Na_0_freeEnd]</p> <p>HexNAc7Hex7NeuAc4</p>	<p>1181,8190*</p>	<p><math>[M+4Na]^{4+}</math></p>	<p>84</p>	<p>-</p>				<p>-</p>

87	 <p>m/z: 4707.3136 [MONO_perMe_Na,0_freeEnd]</p> <p>HexNAc6Hex7Fuc1NeuGc4</p>	1194,0703*	[M+4Na] <sup>4+</sup>	84	-			-
88	 <p>m/z: 4761.3605 [MONO_perMe_Na,0_freeEnd]</p> <p>HexNAc6Hex7Fuc2NeuAc4</p>	1207,5820*	[M+4Na] <sup>4+</sup>	84	-			-
89	 <p>m/z: 4862.4082 [MONO_perMe_Na,0_freeEnd]</p> <p>HexNAc7Hex8NeuAc4</p>	1232,8439*	[M+4Na] <sup>4+</sup>	84	-			*
90	 <p>m/z: 5036.4974 [MONO_perMe_Na,0_freeEnd]</p> <p>HexNAc7Hex8Fuc1NeuAc4</p>	1276,3663*	[M+4Na] <sup>4+</sup>	84	-			✓

<sup>a</sup> Quantificação por MALDI-TOF-MS baseada nos valores de massa exata correspondentes aos adutos [M+Na]<sup>+</sup>;

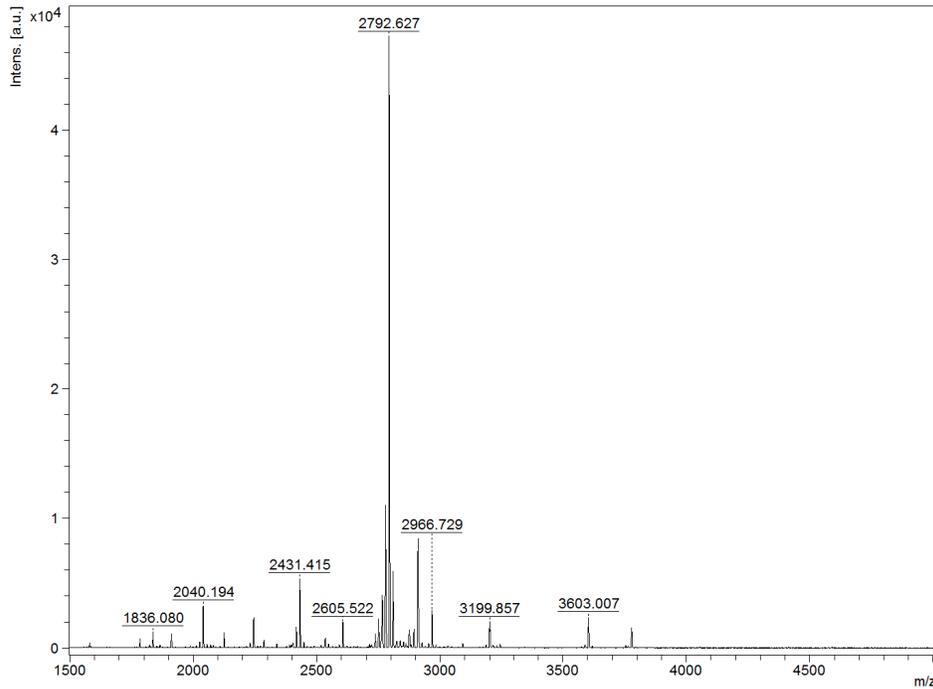
<sup>b</sup> Quantificação de N-glicanos isolados dos tecidos, em comparação com o isótopo pesado da mesma composição;

<sup>c</sup> Uma conferência indica que só a forma metilada foi confirmada, enquanto dupla conferência indica que ambas formas (metilada e deuterada) foram confirmadas. O asterisco indica que apenas a forma deuterada foi confirmada.

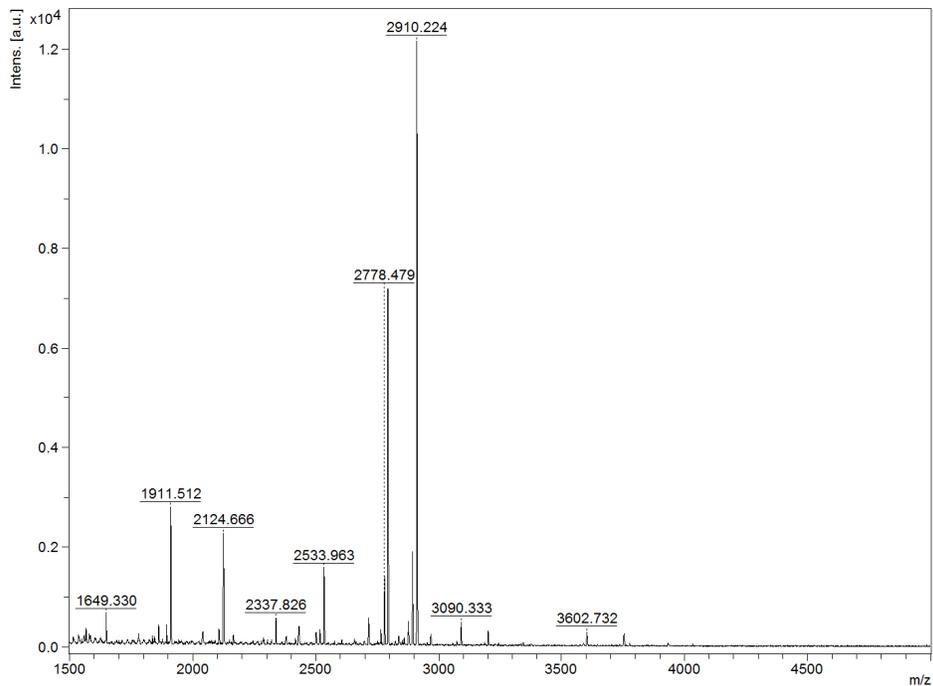
Legenda: ■ N-acetilglicosamina (HexNac), ● Manose/Hexose (Man/Hex), ● Galactose/Hexose (Gal/Hex), ◄ Fucose (Fuc), ◆ Ácido siálico (NeuAc).

**APÊNDICE E. CONJUNTO DOS ESPECTROS DE AQUISIÇÃO DE N-GLICANOS DETECTADOS NO SORO DE PACIENTES COM CÂNCER DE CÓLON (n=13 pacientes), MALDI-TOF-MS.**

**Paciente 1. Masculino, 37 anos, cólon transverso, estadio II, tumor KRAS mutado**

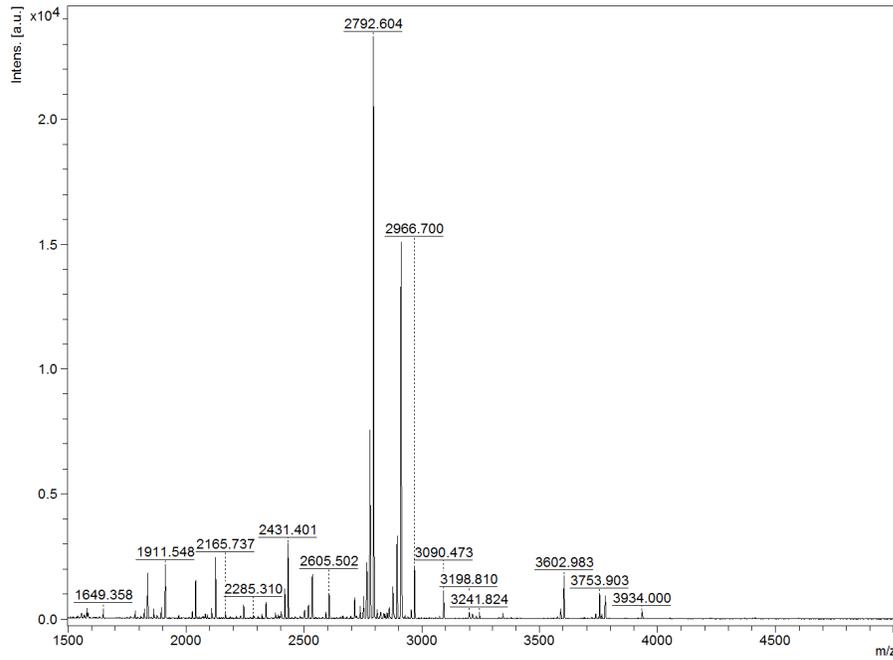


**Paciente 2. Feminino, 36 anos, cólon sigmóide, estadio II, tumor sem mutação**

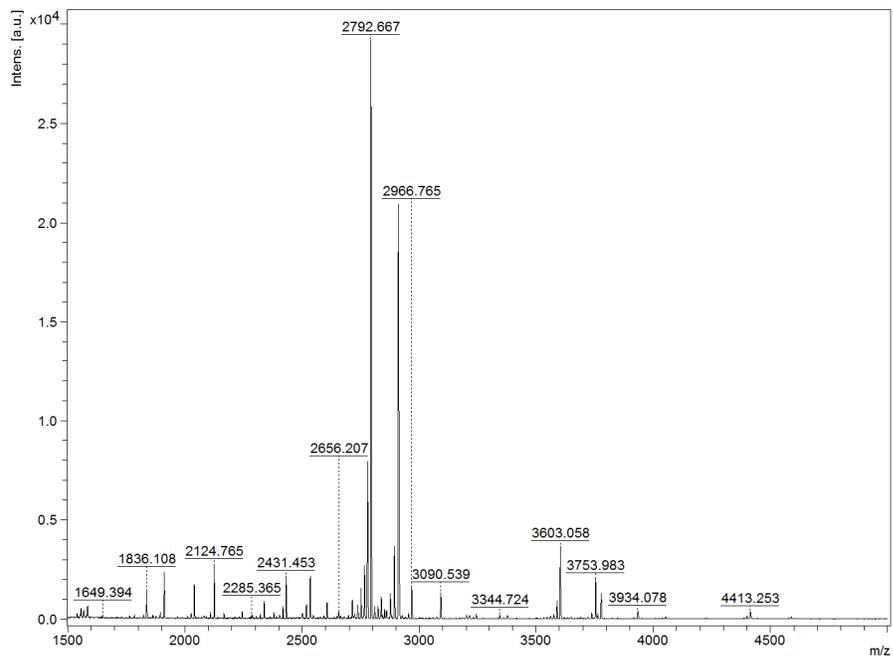


**APÊNDICE E- CONJUNTO DOS ESPECTROS DE AQUISIÇÃO DE N-GLICANOS DETECTADOS NO SORO DE PACIENTES COM CÂNCER DE CÓLON (n=13 pacientes), MALDI-TOF-MS (continuação).**

**Paciente 3. Masculino, 65 anos, ceco, estadio II, tumor *KRAS* mutado**

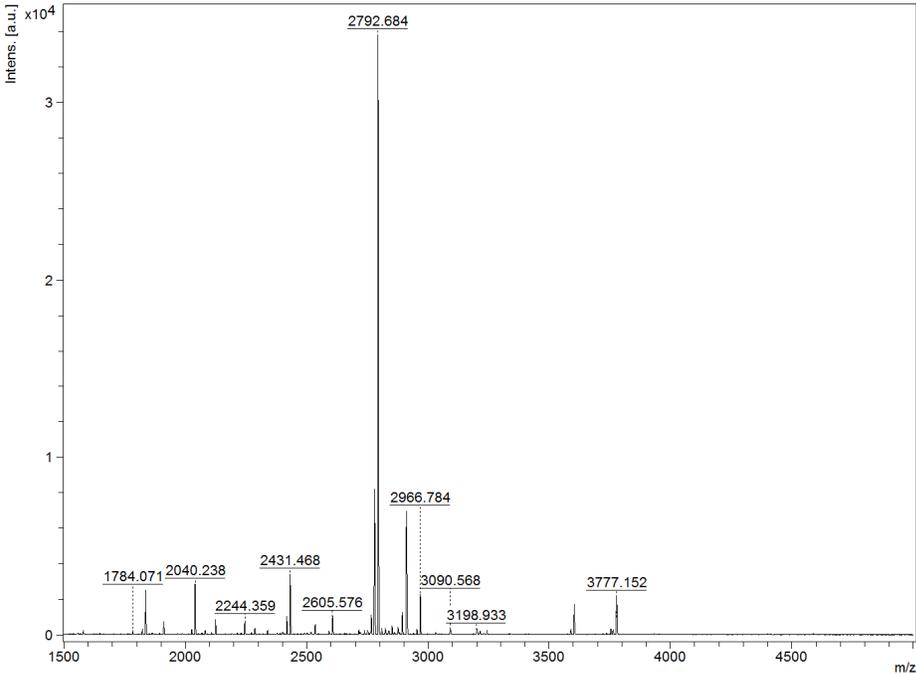


**Paciente 4. Masculino, 55 anos, cólon descendente, estadio III, tumor sem mutação**

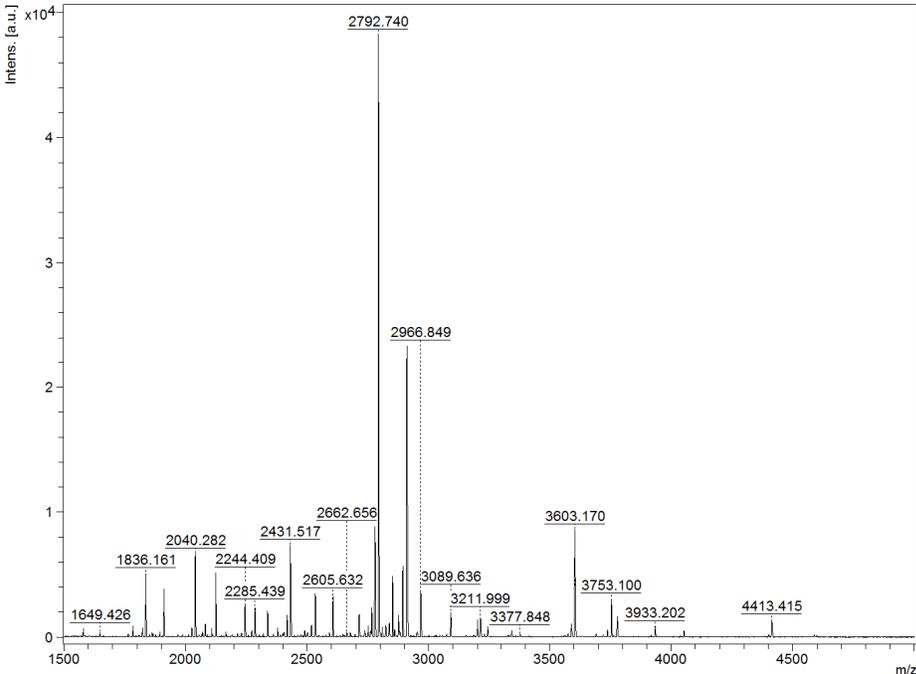


**APÊNDICE E- CONJUNTO DOS ESPECTROS DE AQUISIÇÃO DE N-GLICANOS DETECTADOS NO SORO DE PACIENTES COM CÂNCER DE CÔLON (n=13 pacientes), MALDI-TOF-MS (continuação).**

**Paciente 5. Masculino, 60 anos, cólon sigmóide, estadio II, tumor sem mutação**

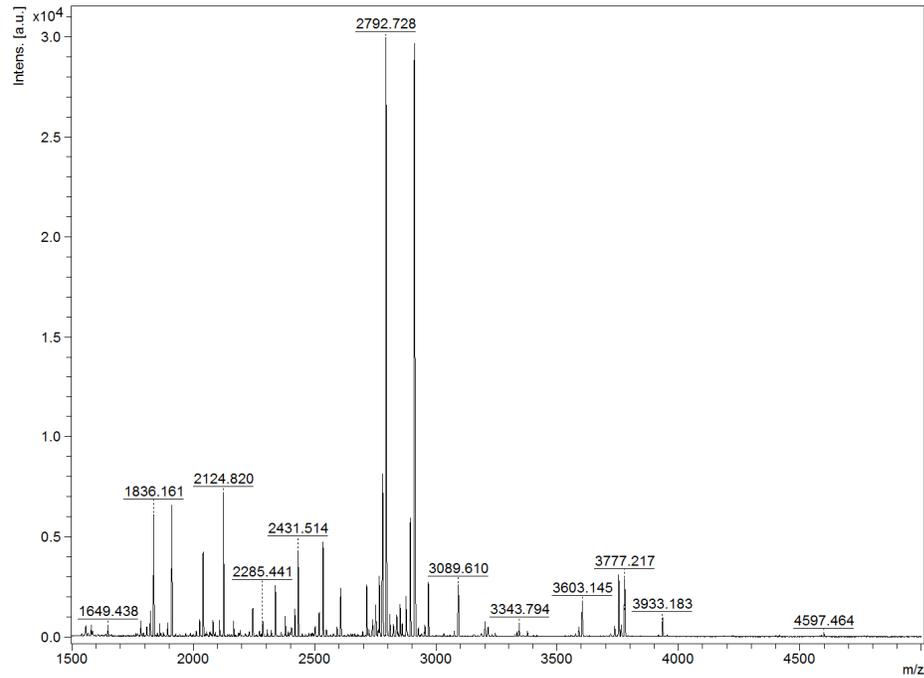


**Paciente 6. Feminino, 56 anos, cólon sigmóide, estadio II, tumor sem mutação**

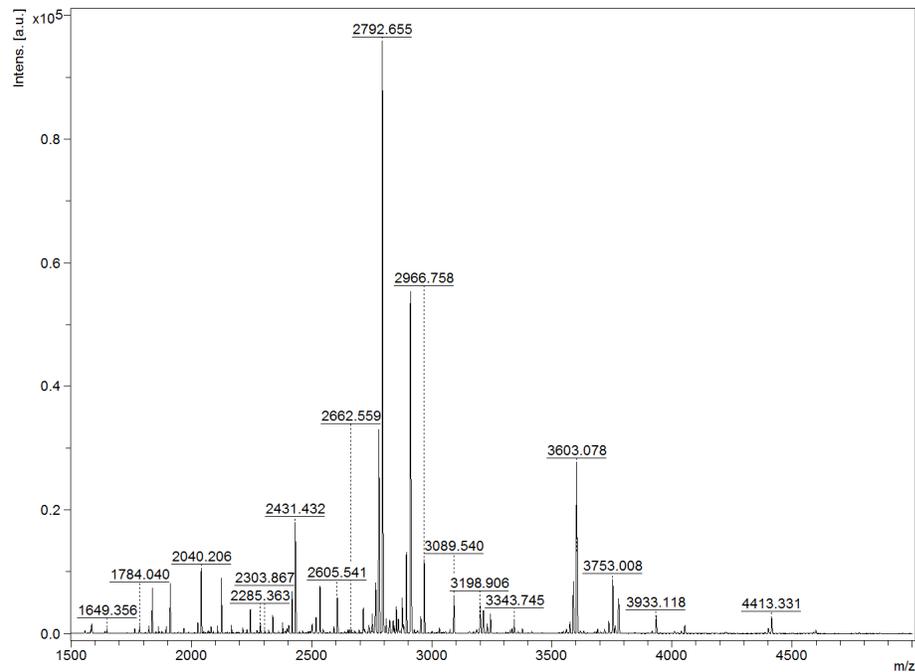


**APÊNDICE E- CONJUNTO DOS ESPECTROS DE AQUISIÇÃO DE N-GLICANOS DETECTADOS NO SORO DE PACIENTES COM CÂNCER DE CÓLON (n=13 pacientes), MALDI-TOF-MS (continuação).**

**Paciente 7. Masculino, 67 anos, cólon ascendente, estadio III, tumor *BRAF* mutado**

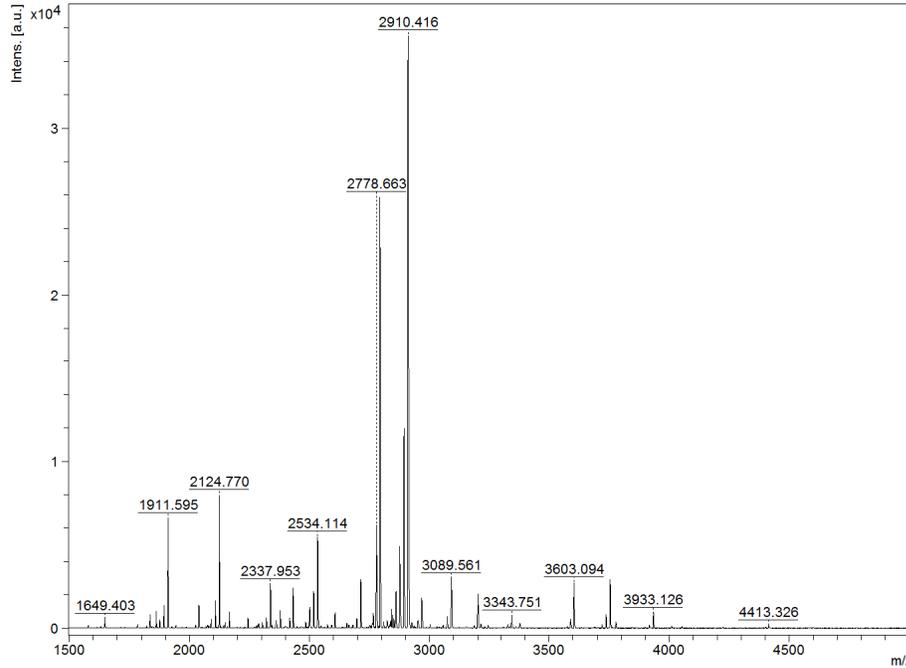


**Paciente 8. Feminino, 64 anos, ceco, estadio III, tumor sem mutação**

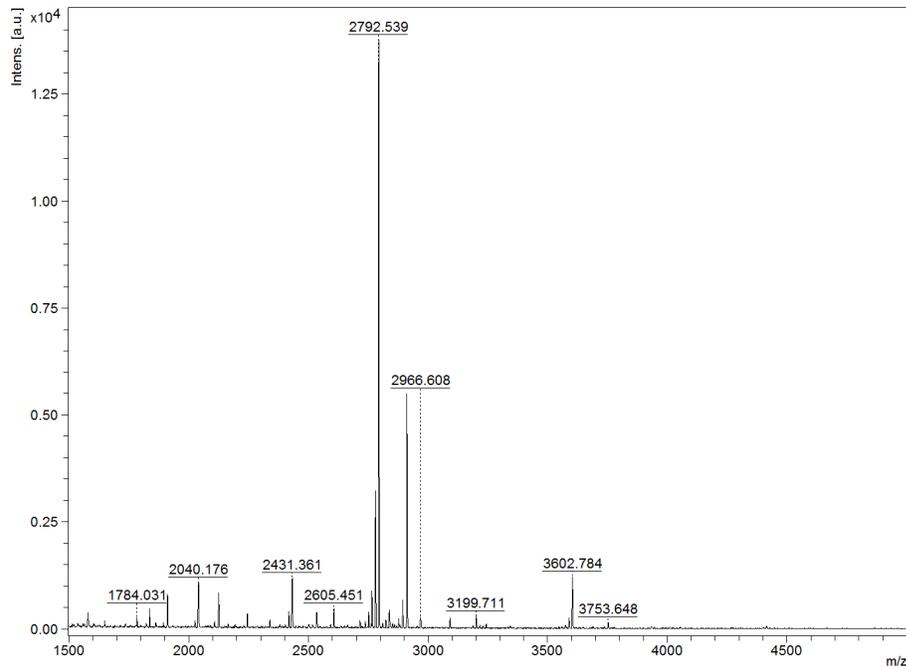


**APÊNDICE E- CONJUNTO DOS ESPECTROS DE AQUISIÇÃO DE N-GLICANOS DETECTADOS NO SORO DE PACIENTES COM CÂNCER DE CÓLON (n=13 pacientes), MALDI-TOF-MS (continuação).**

**Paciente 9. Feminino, 63 anos, ceco, estadio II, tumor sem mutação**

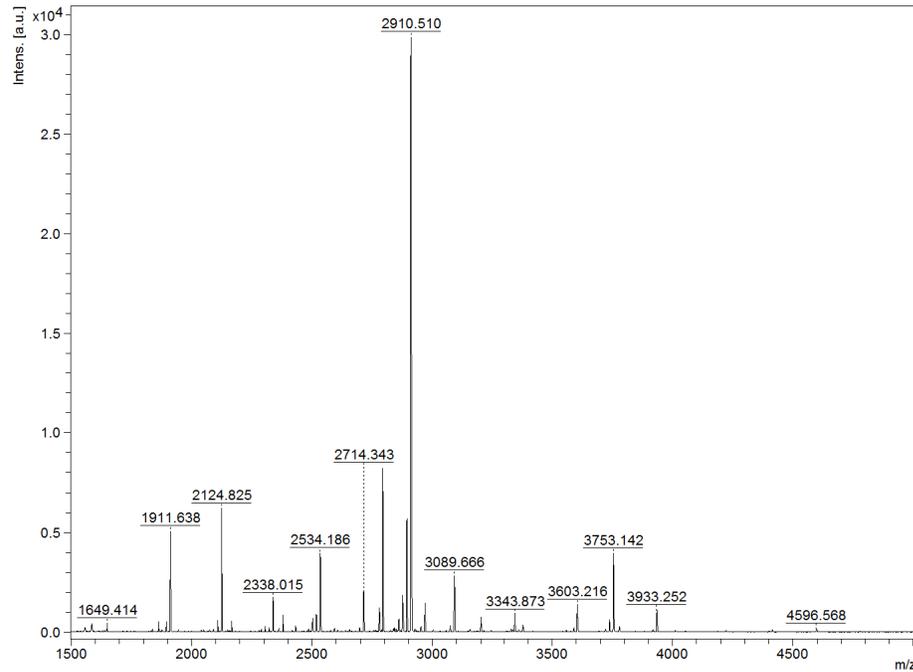


**Paciente 10. Feminino, 54 anos, cólon sigmóide, estadio III, tumor *BRAF* mutado**

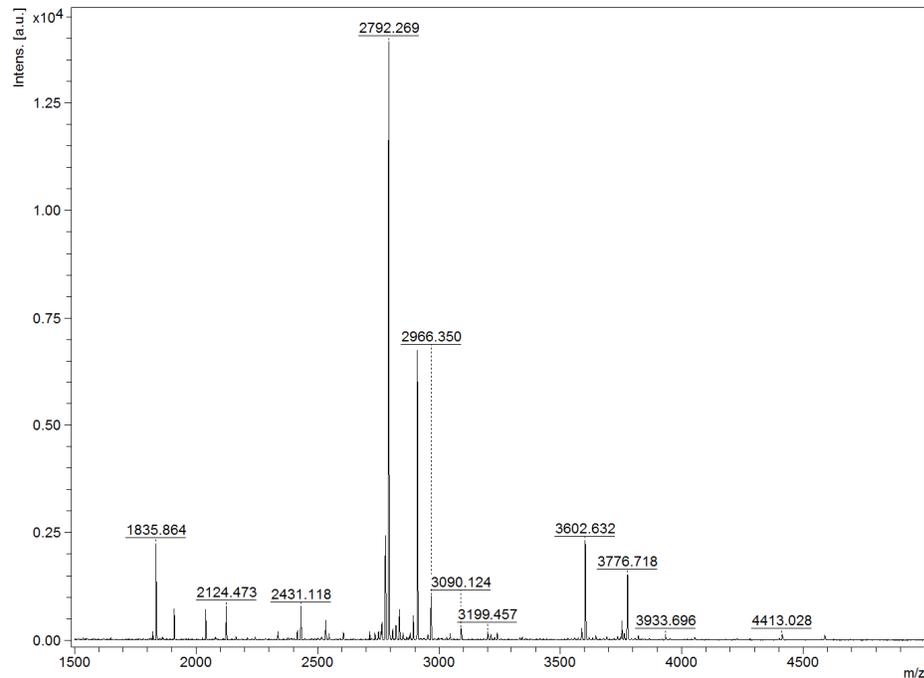


**APÊNDICE E- CONJUNTO DOS ESPECTROS DE AQUISIÇÃO DE N-GLICANOS DETECTADOS NO SORO DE PACIENTES COM CÂNCER DE CÓLON (n=13 pacientes), MALDI-TOF-MS (continuação).**

**Paciente 11. Feminino, 74 anos, cólon sigmóide, estadio III, tumor sem mutação**

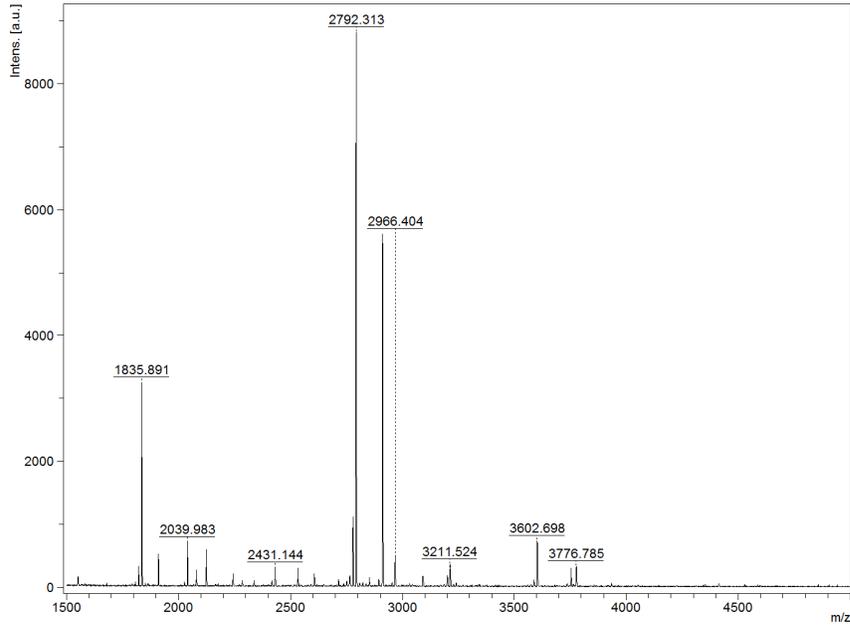


**Paciente 12. Masculino, 64 anos, ceco, estadio III, tumor *KRAS* mutado**



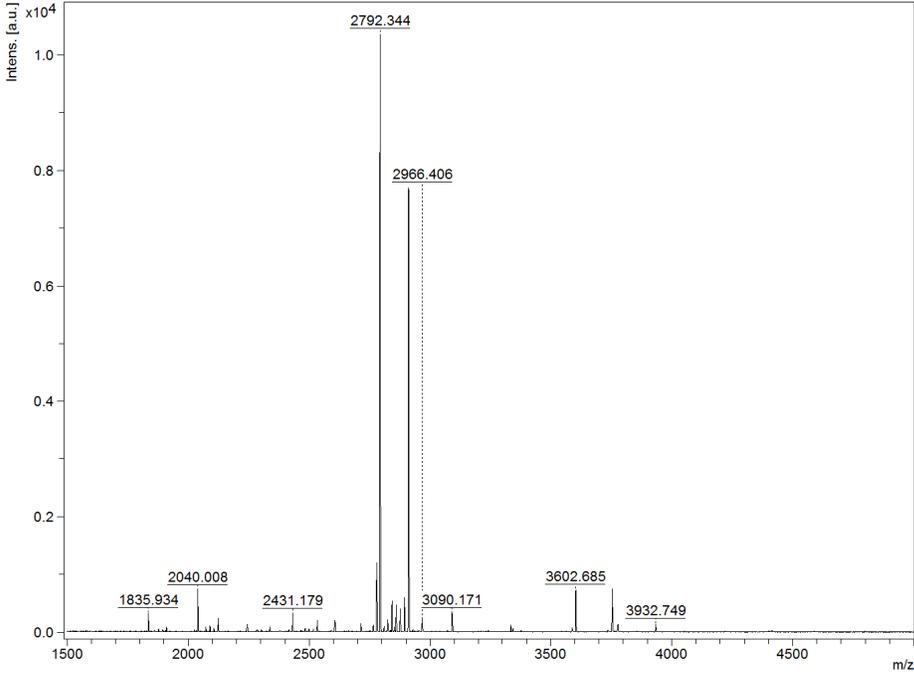
**APÊNDICE E- CONJUNTO DOS ESPECTROS DE AQUISIÇÃO DE N-GLICANOS DETECTADOS NO SORO DE PACIENTES COM CÂNCER DE CÓLON (n=13 pacientes), MALDI-TOF-MS (continuação).**

**Paciente 13. Feminino, 75 anos, cólon sigmóide, estadio II, tumor *KRAS* mutado**

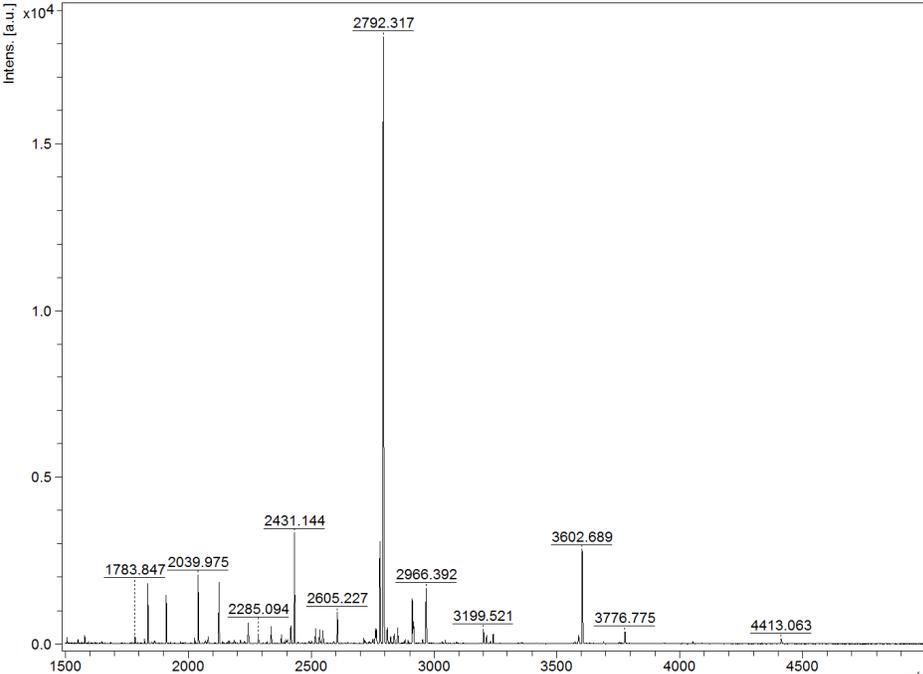


**APÊNDICE E- CONJUNTO DOS ESPECTROS DE AQUISIÇÃO DE N-GLICANOS DETECTADOS NO SORO DE INDIVÍDUOS SADIOS (n=11), MALDI-TOF-MS.**

**Paciente 1. Feminino, 67 anos**

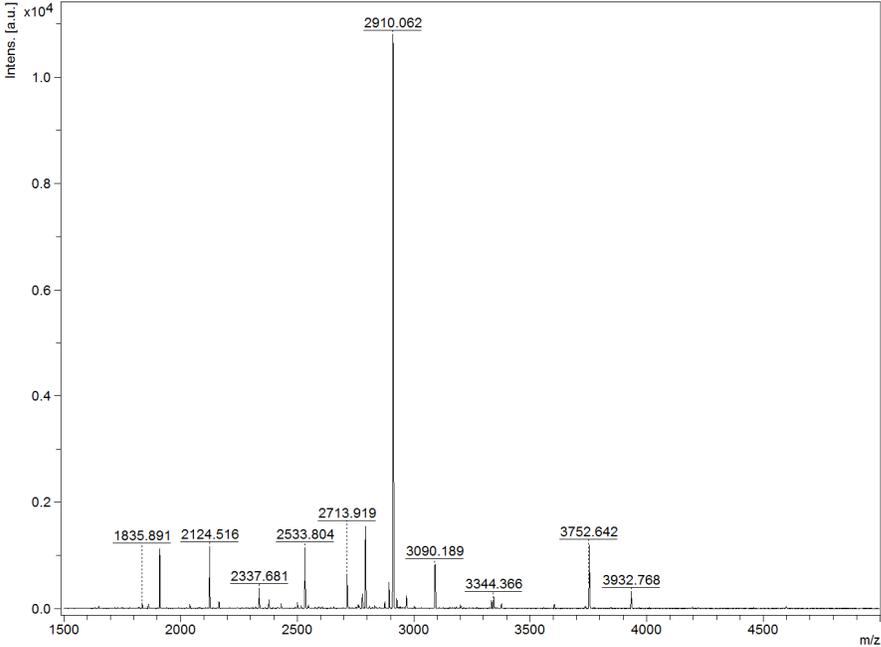


**Paciente 2. Feminino, 68 anos**

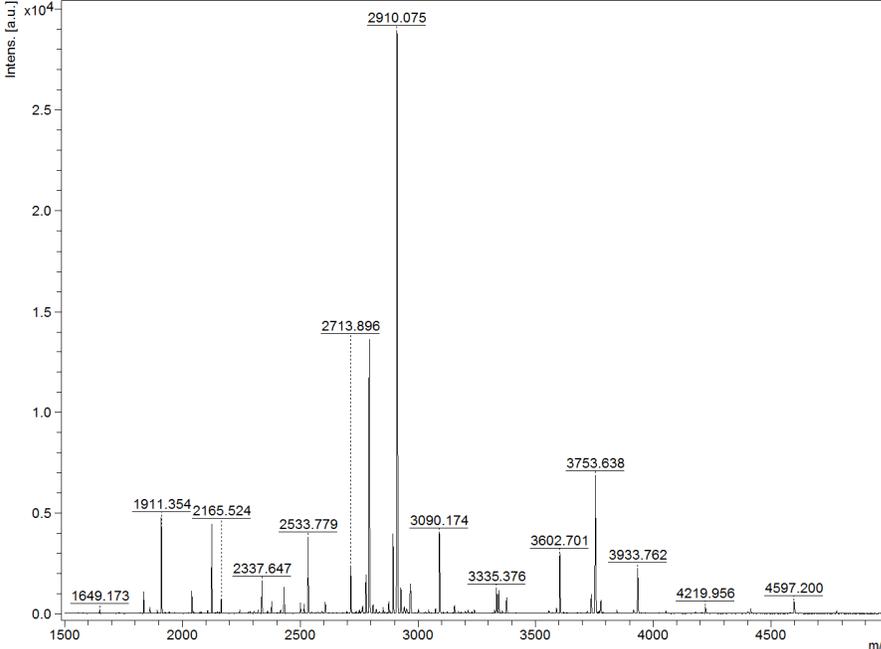


**APÊNDICE E- CONJUNTO DOS ESPECTROS DE AQUISIÇÃO DE N-GLICANOS DETECTADOS NO SORO DE INDIVÍDUOS SADIOS (n=11), MALDI-TOF-MS (continuação).**

**Paciente 3. Feminino, 53 anos**

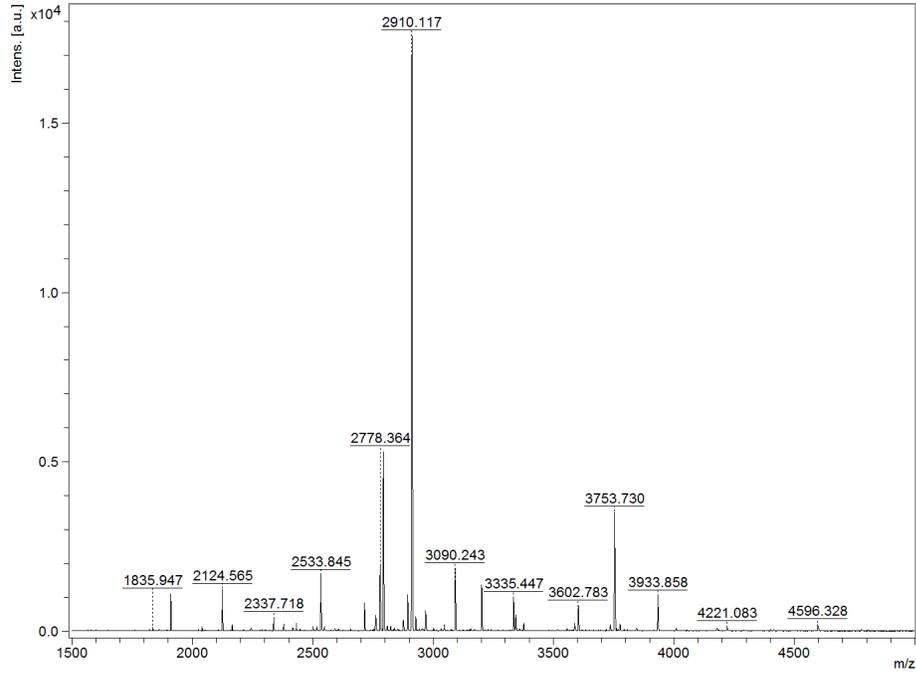


**Paciente 4. Feminino, 50 anos**

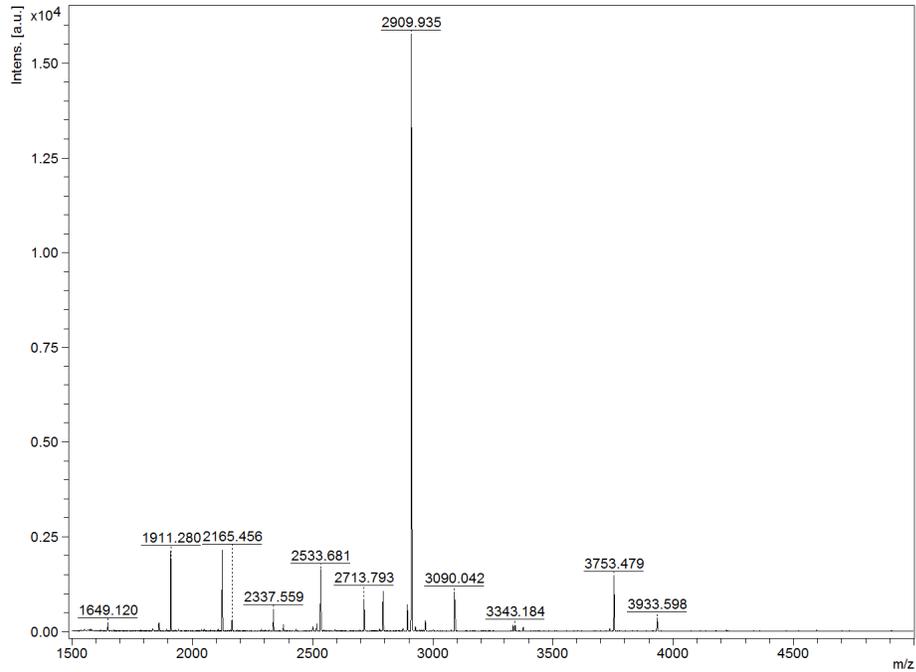


**APÊNDICE E- CONJUNTO DOS ESPECTROS DE AQUISIÇÃO DE N-GLICANOS DETECTADOS NO SORO DE INDIVÍDUOS SADIOS (n=11), MALDI-TOF-MS (continuação).**

**Paciente 5. Masculino, 58 anos**

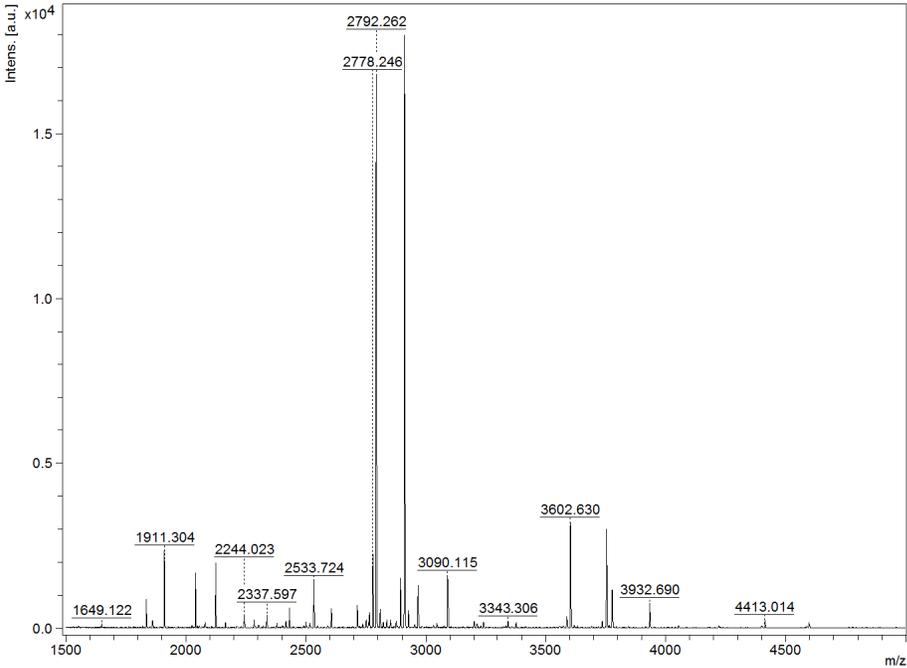


**Paciente 6. Masculino, 55 anos**

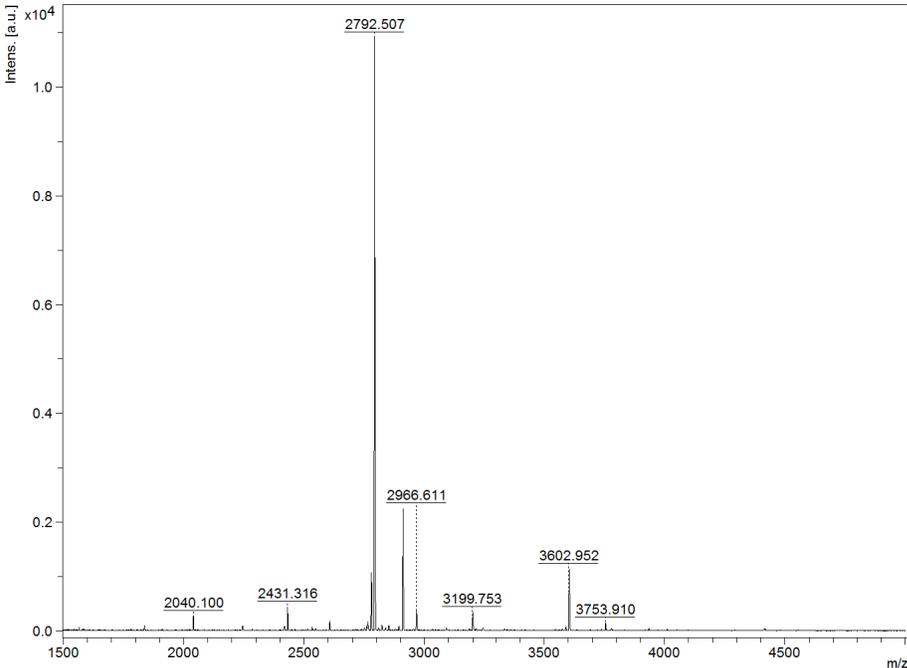


**APÊNDICE E- CONJUNTO DOS ESPECTROS DE AQUISIÇÃO DE N-GLICANOS DETECTADOS NO SORO DE INDIVÍDUOS SADIOS (n=11), MALDI-TOF-MS (continuação).**

**Paciente 7. Masculino, 56 anos**

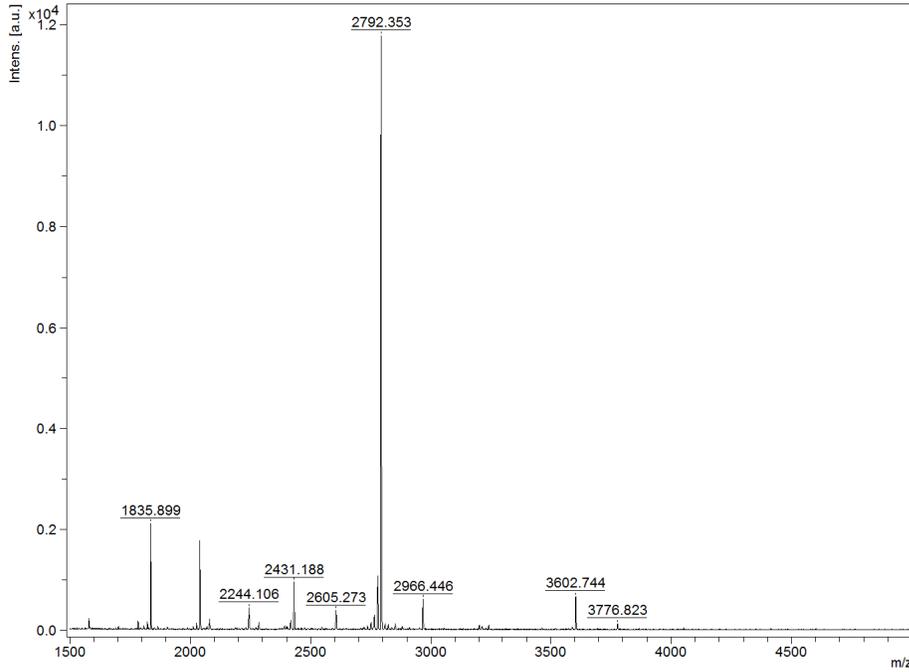


**Paciente 8. Masculino, 57 anos**

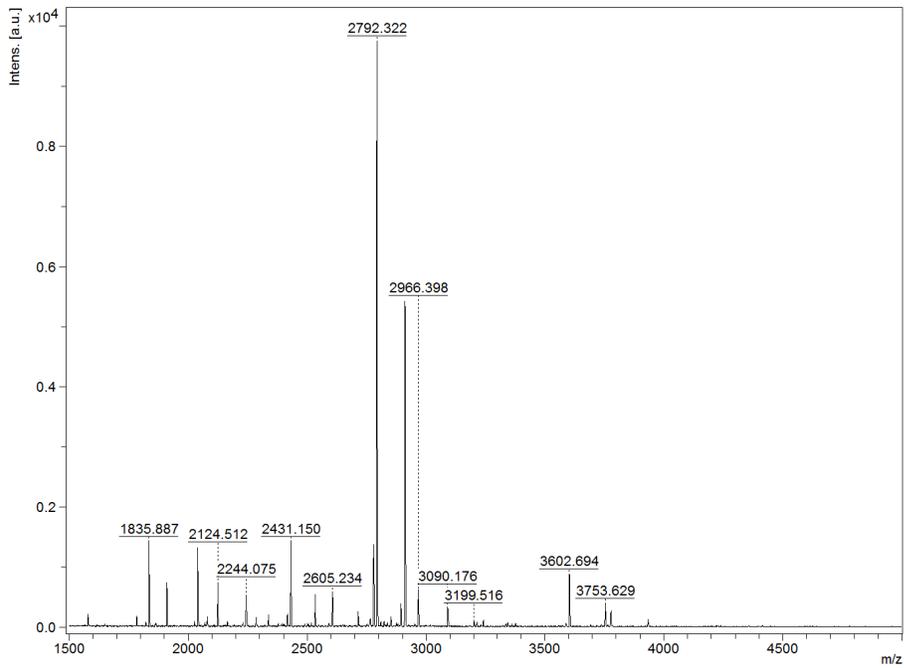


**APÊNDICE E- CONJUNTO DOS ESPECTROS DE AQUISIÇÃO DE N-GLICANOS DETECTADOS NO SORO DE INDIVÍDUOS SADIOS (n=11), MALDI-TOF-MS (continuação).**

**Paciente 9. Masculino, 61 anos**

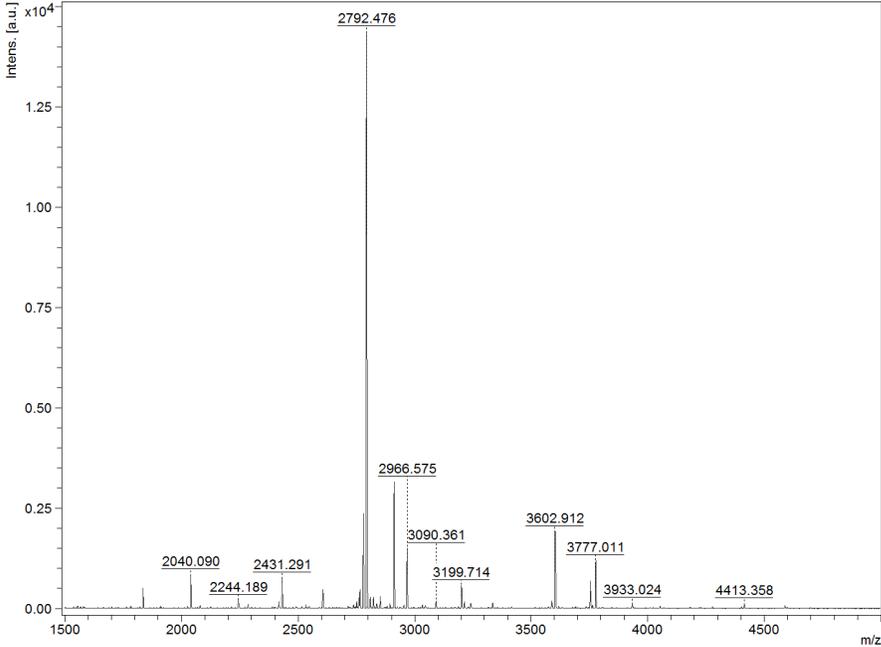


**Paciente 10. Masculino, 61 anos**



**APÊNDICE E- CONJUNTO DOS ESPECTROS DE AQUISIÇÃO DE N-GLICANOS DETECTADOS NO SORO DE INDIVÍDUOS SADIOS (n=11), MALDI-TOF-MS (continuação).**

**Paciente 11. Feminino, 52 anos**



**APÊNDICE F- RAZÕES IÔNICAS DAS ÁREAS CH<sub>3</sub>/CD<sub>3</sub> DOS 33 SINAIS DE ÍON CORRESPONDENTES A N-GLICANOS DETECTADOS NO SORO PACIENTES COM CÂNCER DE CÓLON, EM RELAÇÃO A ÁREA CH<sub>3</sub>/CD<sub>3</sub> DO ÍON 54. MÉTODO MALDI-TOF-MS (n=13).**

Número	Paciente												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
6	0,880	1,195	0,470	1,478	1,708	0,540	0,686	0,994	0,271	1,053	0,605	0,403	0,921
10	0,757	0,903	0,495	1,624	2,788	1,112	0,915	0,442	0,452	0,702	1,250	0,388	0,709
13	0,594	0,425	0,562	0,828	1,341	0,638	0,228	0,084	1,659	5,098	0,210	0,093	0,177
14	0,012	0,040	0,020	0,026	0,025	0,019	0,022	0,000	0,022	0,054	0,025	0,087	0,029
17	0,193	0,366	0,102	0,327	0,589	0,241	0,229	0,000	0,000	0,000	0,215	0,164	0,087
20	0,423	0,466	0,660	0,730	0,773	0,748	0,316	0,101	0,470	0,881	0,463	0,266	0,458
21	0,108	0,092	0,082	0,094	0,128	0,107	0,060	0,000	0,070	0,172	0,094	0,606	0,093
22	0,075	0,039	0,065	0,176	0,182	0,118	0,044	0,000	0,084	0,370	0,041	0,093	0,030
25	0,016	0,019	0,019	0,015	0,040	0,014	0,010	0,000	0,012	0,000	0,015	0,049	0,034
26	0,220	0,195	0,178	0,400	0,942	0,305	0,331	0,000	0,000	0,000	0,215	0,209	0,199
27	0,000	0,014	0,019	0,011	0,016	0,010	0,000	0,000	0,008	0,000	0,010	0,063	0,029
28	0,628	0,341	0,632	0,708	0,813	0,829	0,427	0,181	0,193	1,508	1,091	0,543	0,841
29	0,421	0,353	0,694	1,532	0,906	0,380	0,226	0,202	0,317	1,729	0,485	1,317	0,360
34	0,067	0,045	0,031	0,026	0,071	0,033	0,000	0,021	0,020	0,000	0,058	0,070	0,049
35	0,289	0,220	0,152	0,436	0,628	0,754	0,331	0,000	0,362	0,468	0,338	0,164	0,124
37	1,045	0,646	1,135	0,905	0,896	1,120	0,570	0,310	0,427	0,538	1,183	0,634	0,810
39	0,061	0,041	0,060	0,120	0,083	0,076	0,041	0,091	0,070	0,259	0,065	0,167	0,082
46	0,586	0,430	0,519	0,785	0,902	0,464	0,385	0,161	0,307	0,678	0,965	0,684	0,696
50	0,155	0,102	0,065	0,120	0,074	0,170	0,119	0,181	0,105	0,129	0,055	0,314	0,140
51	0,022	0,017	0,017	0,031	0,022	0,024	0,000	0,021	0,020	0,056	0,022	0,070	0,024
53	0,727	0,764	0,383	0,315	0,634	0,535	0,243	0,166	0,335	0,415	1,067	0,397	0,708
54	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
55	0,067	0,122	0,144	0,546	0,292	0,218	0,094	0,124	0,136	0,258	0,127	0,084	0,093
60	1,306	0,734	1,087	0,763	0,839	1,029	0,782	0,446	1,229	1,684	1,246	1,112	0,428
67	0,344	0,258	0,286	0,795	0,488	0,616	0,315	0,212	0,457	2,903	0,148	0,506	0,148
68	0,004	0,004	0,003	0,010	0,003	0,018	0,003	0,007	0,005	0,007	0,003	0,012	0,006
72	0,003	0,003	0,003	0,003	0,003	0,003	0,000	0,005	0,003	0,003	0,001	0,000	0,000
75	0,898	1,124	0,626	1,270	0,393	1,549	0,945	1,162	1,581	1,124	1,376	1,502	2,507
77	0,001	0,001	0,001	0,003	0,001	0,004	0,001	0,005	0,002	0,002	0,001	0,005	0,002
78	1,810	2,109	3,926	0,711	2,563	0,818	0,400	0,880	6,748	3,480	3,467	1,756	0,421
82	0,001	0,002	0,001	0,004	0,002	0,004	0,001	0,006	0,003	0,003	0,001	0,000	0,002
84	0,028	0,067	0,014	0,102	0,013	0,065	0,028	0,075	0,042	0,032	0,041	0,000	0,129
85	0,101	0,192	0,076	0,068	0,056	0,027	0,000	0,055	0,271	0,409	0,094	0,000	0,000

**APÊNDICE F- RAZÕES IÔNICAS DAS ÁREAS CH<sub>3</sub>/CD<sub>3</sub> DOS 33 SINAIS DE ÍON CORRESPONDENTES A N-GLICANOS DETECTADOS NO SORO DOS CONTROLES SADIOS, EM RELAÇÃO A ÁREA CH<sub>3</sub>/CD<sub>3</sub> DO ÍON 54. MÉTODO MALDI-TOF-MS (n=11).**

Número	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10	C11
	Controle										
6	4,050	0,153	2,143	0,591	3,659	8,515	0,392	0,463	0,038	1,767	1,551
10	3,037	0,156	2,143	0,591	1,220	5,677	0,588	0,463	0,034	1,599	1,994
13	3,290	0,076	0,882	0,554	0,424	0,781	0,447	0,742	0,198	1,170	2,078
14	0,041	0,002	0,000	0,000	0,024	0,000	0,024	0,066	0,005	0,047	0,083
17	1,012	0,037	0,000	0,000	1,220	2,838	0,000	0,116	0,008	0,210	0,443
20	2,913	0,062	0,516	0,633	0,362	0,604	1,027	1,655	0,168	1,078	3,933
21	0,000	0,009	0,000	0,000	0,136	0,000	0,114	0,232	0,000	0,247	0,222
22	0,152	0,010	0,203	0,048	0,061	0,000	0,142	0,185	0,025	0,147	0,305
25	0,000	0,015	0,057	0,000	0,047	0,261	0,015	0,058	0,002	0,029	0,000
26	0,000	0,030	0,000	0,295	3,659	0,000	0,327	0,000	0,005	0,210	1,330
27	0,000	0,007	0,000	0,000	0,032	0,000	0,011	0,000	0,001	0,034	0,000
28	1,350	0,056	0,824	0,273	0,610	0,000	1,620	2,086	0,000	1,592	1,662
29	1,012	0,039	0,000	0,233	0,000	0,000	1,682	0,463	0,019	1,082	0,000
34	0,000	0,011	0,000	0,012	0,000	0,000	0,030	0,000	0,004	0,019	0,222
35	0,000	0,060	0,000	0,394	0,000	0,000	0,000	0,000	0,018	0,379	0,886
37	1,012	0,478	0,401	0,589	0,268	0,782	0,376	1,912	0,050	1,355	3,957
39	0,000	0,004	0,000	0,026	0,000	0,543	0,171	0,348	0,000	0,082	0,277
46	0,704	0,753	0,322	0,252	0,103	0,700	0,449	0,590	0,067	1,157	0,653
50	0,270	0,004	0,000	0,026	0,000	0,000	0,000	0,232	0,000	0,027	0,000
51	0,000	0,003	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,015	0,127
53	0,447	0,081	0,573	0,222	0,237	0,000	0,325	1,304	0,015	0,155	2,279
54	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
55	0,188	0,054	0,115	0,144	0,095	0,174	0,159	0,348	0,007	0,165	1,330
60	0,418	1,392	0,536	0,609	0,190	0,700	0,847	0,969	0,074	0,784	1,959
67	0,000	0,298	0,000	0,257	0,385	0,000	0,528	0,154	0,006	0,437	0,507
68	0,003	0,008	0,010	0,007	0,000	0,000	0,004	0,003	0,005	0,006	0,004
72	0,000	0,002	0,000	0,002	0,000	0,000	0,002	0,001	0,001	0,001	0,002
75	0,586	3,231	0,198	0,710	0,374	0,478	0,944	0,956	0,079	0,879	0,499
77	0,001	0,001	0,005	0,003	0,002	0,014	0,002	0,001	0,002	0,001	0,001
78	0,417	0,281	0,919	0,507	0,419	1,250	1,324	0,099	0,013	0,797	1,277
82	0,001	0,001	0,005	0,004	0,002	0,021	0,001	0,001	0,001	0,001	0,002
84	0,011	0,067	0,066	0,019	0,028	0,239	0,031	0,029	0,003	0,024	0,025
85	0,119	0,009	0,000	0,031	0,090	1,250	0,060	0,033	0,003	0,066	0,039

**APÊNDICE G- RAZÕES IÔNICAS DAS ÁREAS CH<sub>3</sub>/CD<sub>3</sub> DOS 90 SINAIS DE ÍON CORRESPONDENTES A N-GLICANOS IDENTIFICADOS NO SORO DOS PACIENTES COM CÂNCER DE CÓLON, EM RELAÇÃO A ÁREA CH<sub>3</sub>/CD<sub>3</sub> DO ÍON 54. MÉTODO LC-MS/MS (n=13).**

Nº	Paciente 1	Paciente 2	Paciente 3	Paciente 4	Paciente 5	Paciente 6	Paciente 7	Paciente 8	Paciente 9	Paciente 10	Paciente 11	Paciente 12	Paciente 13
1	0,001	0,079	0,007	0,075	0,001	0,001	0,001	0,000	0,002	0,044	0,001	0,006	0,006
2	0,003	0,014	0,009	0,021	0,001	0,012	0,019	0,002	0,004	0,003	0,003	8,556	4,863
3	0,003	0,005	0,001	0,000	0,002	0,009	0,002	0,003	0,008	0,006	0,012	0,022	0,099
4	0,040	0,092	0,026	0,065	0,000	0,025	0,063	0,016	0,000	0,036	0,003	3,805	3,508
5	0,013	0,001	0,022	0,388	0,011	0,028	0,120	0,024	0,020	0,001	0,008	0,013	0,024
6	0,157	0,077	0,145	0,057	0,133	0,226	0,293	0,182	0,133	0,207	0,106	0,000	0,002
7	0,009	0,010	0,013	0,049	0,017	0,018	0,044	0,014	0,003	0,035	0,007	0,000	0,000
8	0,023	0,007	0,012	0,007	0,006	0,029	0,080	0,026	0,010	0,028	0,012	0,004	0,003
9	0,020	0,031	0,044	0,264	0,029	0,000	0,000	0,000	0,110	0,030	0,000	0,107	0,471
10	0,106	0,079	0,094	0,102	0,007	0,132	0,159	0,078	0,020	0,089	0,084	0,086	0,003
11	0,029	0,010	0,070	0,008	0,010	0,032	0,247	0,000	0,001	0,021	0,002	0,295	0,000
12	0,009	0,002	0,003	1,685	0,004	0,008	0,015	0,003	0,003	0,018	0,002	0,007	0,004
13	0,227	0,247	0,542	0,000	0,500	0,676	1,052	0,394	0,396	0,299	0,232	5,128	3,195
14	0,039	0,018	0,019	0,066	0,023	0,038	0,006	0,034	0,034	0,033	0,001	0,000	0,000
15	0,008	0,050	0,016	2,007	0,007	0,006	0,012	0,010	0,015	0,035	0,072	0,933	0,580
16	1,828	2,418	0,228	0,085	0,030	0,440	1,398	0,081	1,252	2,695	0,994	1,982	3,008
17	0,026	0,017	0,027	0,272	0,023	0,037	0,062	0,015	0,029	0,026	0,029	0,001	0,000
18	0,001	0,005	0,005	0,020	0,000	0,005	0,000	0,006	0,019	0,006	0,020	1,157	2,933
19	0,102	0,017	0,084	1,650	0,054	0,116	0,247	0,075	0,055	0,020	0,033	0,114	0,062
20	0,298	0,344	0,429	0,041	0,438	0,652	0,772	0,419	0,440	0,603	0,250	2,446	0,693
21	0,036	0,009	0,015	0,228	0,021	0,032	0,023	0,017	0,018	0,021	0,008	0,000	0,087
22	0,037	0,050	0,088	0,085	0,078	0,151	0,200	0,047	0,057	0,018	0,034	1,801	1,999
23	0,020	0,006	0,027	0,018	0,016	0,039	0,053	0,032	0,024	0,004	0,015	0,000	0,931
24	0,002	0,005	0,006	0,053	0,003	0,000	0,004	0,004	0,010	0,011	0,002	1,533	2,655
25	0,021	0,009	0,023	0,113	0,022	0,024	0,049	0,019	0,015	0,014	0,011	0,102	0,000
26	0,039	0,034	0,042	0,912	0,031	0,058	0,103	0,051	0,075	0,030	0,049	0,171	0,081
27	0,106	0,117	0,160	1,693	0,212	0,261	0,326	0,118	0,085	0,154	0,108	0,551	1,039
28	0,692	0,393	0,590	0,293	0,520	0,665	0,927	0,536	0,547	0,903	0,425	3,035	6,044
29	0,069	0,045	0,081	0,093	0,093	0,192	0,202	0,071	0,076	0,032	0,051	0,479	0,343
30	0,009	0,013	0,012	0,000	0,013	0,029	0,018	0,006	0,019	0,013	0,007	0,578	2,064
31	0,001	0,025	0,000	0,189	0,000	0,000	0,000	0,001	0,000	0,008	0,000	0,000	4,813
32	0,014	0,060	0,000	0,041	0,014	0,026	0,021	0,000	0,018	0,088	0,012	8,286	13,700
33	0,013	0,010	0,006	0,335	0,006	0,010	0,012	0,014	0,017	0,015	0,015	0,319	0,362
34	0,022	0,042	0,000	0,077	0,038	0,047	0,028	0,015	0,026	0,026	0,030	0,285	0,139
35	0,072	0,032	0,066	2,265	0,056	0,090	0,111	0,078	0,066	0,043	0,046	0,309	0,312

**APÊNDICE G- RAZÕES IÔNICAS DAS ÁREAS CH<sub>3</sub>/CD<sub>3</sub> DOS 90 SINAIS DE ÍON CORRESPONDENTES A N-GLICANOS IDENTIFICADOS NO SORO DOS PACIENTES COM CÂNCER DE CÓLON, EM RELAÇÃO A ÁREA CH<sub>3</sub>/CD<sub>3</sub> DO ÍON 54. MÉTODO LC-MS/MS (n=13)(continuação).**

Nº	Paciente 1	Paciente 2	Paciente 3	Paciente 4	Paciente 5	Paciente 6	Paciente 7	Paciente 8	Paciente 9	Paciente 10	Paciente 11	Paciente 12	Paciente 13
36	0,608	0,746	0,820	2,005	0,638	0,531	1,502	0,707	0,573	1,011	0,532	1,045	1,252
37	0,526	0,594	0,763	0,043	0,606	0,732	0,753	0,649	0,586	0,721	0,441	1,458	0,428
38	0,030	0,032	0,025	0,224	0,023	0,035	0,042	0,043	0,034	0,051	0,032	0,863	1,047
39	0,089	0,046	0,105	0,014	0,048	0,114	0,119	0,097	0,067	0,054	0,065	2,050	1,715
40	0,008	0,097	0,003	0,019	0,004	0,005	0,006	0,004	0,015	0,144	0,000	0,234	3,664
41	0,002	0,101	0,001	0,007	0,008	0,004	0,001	0,002	0,004	0,067	0,012	2,528	5,125
42	0,005	0,065	0,000	0,000	0,018	0,000	0,000	0,000	0,000	0,116	0,000	0,667	1,175
43	0,092	0,204	0,000	0,006	0,000	0,093	0,189	0,000	0,092	0,270	0,077	0,304	3,710
44	0,004	0,006	0,005	0,000	0,005	0,008	0,013	0,008	0,010	0,006	0,011	0,143	0,171
45	0,022	0,071	0,006	2,620	0,000	0,018	0,015	0,014	0,025	0,113	0,047	0,367	5,483
46	0,746	0,479	0,770	0,322	0,719	0,942	1,144	0,772	0,809	1,125	0,505	0,990	2,082
47	0,083	0,161	0,118	0,000	0,104	0,123	0,102	0,188	0,190	0,163	0,173	2,873	3,973
48	0,008	0,020	0,000	0,254	0,004	0,005	0,019	0,007	0,005	0,000	0,000	0,000	0,000
49	0,033	0,072	0,059	0,417	0,072	0,211	0,175	0,075	0,072	0,088	0,028	1,018	1,030
50	0,035	0,247	0,107	0,084	0,039	0,083	0,056	0,048	0,146	0,129	0,207	0,342	0,413
51	0,012	0,022	0,020	0,027	0,011	0,031	0,026	0,011	0,025	0,008	0,015	0,185	0,044
52	0,037	0,132	0,019	2,615	0,022	0,017	0,044	0,010	0,067	0,044	0,045	1,502	0,476
53	1,032	0,572	1,057	3,379	0,606	0,615	0,842	0,849	0,560	0,745	0,276	1,800	9,814
54	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
55	0,132	0,351	0,312	0,000	0,284	0,533	0,580	0,355	0,375	0,366	0,231	0,523	0,345
56	0,011	0,019	0,042	0,197	0,033	0,009	0,009	0,009	0,022	0,000	0,017	0,337	0,000
57	0,123	0,131	0,148	0,010	0,134	0,079	0,074	0,126	0,111	0,239	0,076	0,114	1,713
58	0,004	0,020	0,004	0,027	0,003	0,003	0,003	0,003	0,003	0,023	0,002	0,871	0,492
59	0,016	0,018	0,058	3,519	0,036	0,011	0,035	0,030	0,027	0,018	0,013	1,079	0,923
60	0,498	1,214	1,380	0,146	1,067	0,875	1,236	0,812	1,165	0,658	0,987	0,957	1,294
61	0,015	0,034	0,019	0,000	0,008	0,016	0,032	0,018	0,019	0,044	0,039	0,713	2,671
62	0,000	0,000	0,001	0,178	0,001	0,002	0,000	0,001	0,003	0,000	0,001	0,005	0,002
63	0,035	0,054	0,082	0,069	0,075	0,101	0,097	0,060	0,074	0,067	0,000	0,563	0,000
64	0,027	0,021	0,017	0,003	0,011	0,019	0,027	0,008	0,017	0,024	0,025	0,018	0,637
65	0,002	0,005	0,001	0,524	0,000	0,000	0,002	0,003	0,000	0,006	0,003	0,000	1,117
66	0,040	0,143	0,124	4189,799	0,059	0,146	0,155	0,062	0,225	0,084	0,406	0,027	0,439
67	0,138	0,332	0,254	0,575	0,210	0,408	0,415	0,487	0,311	0,292	0,181	2,457	7,577
68	0,194	0,216	0,267	0,158	0,154	0,238	0,132	0,242	0,253	0,328	0,236	0,102	1,267
69	0,026	0,052	0,051	0,023	0,040	0,049	0,033	0,050	0,037	0,061	0,065	0,662	2,836
70	0,006	0,008	0,006	0,000	0,003	0,006	0,008	0,011	0,006	0,018	0,016	0,728	0,633

**APÊNDICE G- RAZÕES IÔNICAS DAS ÁREAS CH<sub>3</sub>/CD<sub>3</sub> DOS 90 SINAIS DE ÍON CORRESPONDENTES A N-GLICANOS IDENTIFICADOS NO SORO DOS PACIENTES COM CÂNCER DE CÓLON, EM RELAÇÃO A ÁREA CH<sub>3</sub>/CD<sub>3</sub> DO ÍON 54. MÉTODO LC-MS/MS (n=13)(continuação).**

Nº	Paciente 1	Paciente 2	Paciente 3	Paciente 4	Paciente 5	Paciente 6	Paciente 7	Paciente 8	Paciente 9	Paciente 10	Paciente 11	Paciente 12	Paciente 13
71	0,008	0,008	0,000	0,243	0,000	0,000	0,035	0,000	0,055	0,001	0,033	0,000	0,530
72	0,046	0,075	0,125	0,407	0,102	0,054	0,122	0,061	0,074	0,044	0,109	0,669	2,119
73	0,021	0,226	0,701	0,001	0,079	0,124	0,612	0,086	0,130	0,014	0,175	0,010	0,047
74	0,005	0,004	0,001	3,887	0,001	0,004	0,002	0,002	0,011	0,005	0,005	0,058	0,814
75	0,984	1,478	1,039	0,128	0,741	0,679	0,725	1,725	1,584	1,806	1,433	0,309	4,257
76	0,014	0,047	0,008	4,767	0,006	0,011	0,008	0,018	0,042	0,073	0,022	0,820	1,829
77	0,169	0,944	1,148	2,804	0,359	1,299	1,248	0,608	1,153	0,575	2,379	0,319	30,602
78	0,452	0,629	0,797	0,217	0,983	0,373	1,382	0,521	0,435	0,179	0,561	1,467	2,746
79	0,079	0,075	0,110	0,643	0,117	0,036	0,103	0,063	0,064	0,031	0,081	0,124	3,277
80	0,029	0,265	0,120	0,011	0,045	0,099	0,090	0,067	0,029	0,070	0,142	0,030	0,165
81	0,002	0,068	0,003	1,208	0,006	0,011	0,006	0,010	0,012	0,080	0,028	0,469	1,518
82	0,035	0,570	0,279	5,728	0,087	0,378	0,099	0,226	0,326	0,219	0,770	0,001	0,020
83	0,110	0,249	0,244	200,542	0,147	0,192	0,252	0,205	0,231	0,189	0,318	0,319	2,772
84	0,147	2,671	0,694	2,697	0,313	1,247	0,589	0,557	1,510	1,223	0,000	0,046	1,277
85	0,146	0,397	0,400	0,138	0,291	0,524	0,626	0,219	0,358	0,048	0,687	0,021	0,503
86	0,014	0,139	0,019	0,098	0,021	0,063	0,000	0,000	0,044	0,048	0,054	0,000	0,348
87	0,002	0,035	0,015	1,813	0,006	0,010	0,024	0,010	0,032	0,005	0,053	0,157	2,772
88	0,089	0,136	0,312	0,000	0,333	0,253	0,709	0,113	0,103	0,033	0,530	0,031	1,223
89	0,000	0,013	0,000	0,103	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,010	0,111	2,574
90	0,006	0,243	0,042	0,016	0,009	0,010	0,024	0,014	0,020	0,014	0,074	0,019	9,281

**APÊNDICE G- RAZÕES IÔNICAS DAS ÁREAS CH<sub>3</sub>/CD<sub>3</sub> DOS 90 SINAIS DE ÍON CORRESPONDENTES A N-GLICANOS IDENTIFICADOS NO SORO DOS CONTROLES SADIOS, EM RELAÇÃO A ÁREA CH<sub>3</sub>/CD<sub>3</sub> DO ÍON 54. MÉTODO LC-MS/MS (n=11).**

Número	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10	C11
	Controle										
1	0,001	0,659	0,004	0,004	0,005	0,003	0,000	0,016	0,002	0,001	0,003
2	0,459	0,067	0,822	0,590	0,000	0,374	0,157	0,216	1,628	0,385	0,000
3	0,014	2,181	0,147	0,006	0,024	0,015	0,003	0,042	0,006	0,010	0,081
4	0,000	1,014	2,298	0,458	0,000	0,269	0,176	0,741	2,887	1,515	1,387
5	0,027	0,495	2,114	0,007	0,411	0,143	0,004	0,035	0,193	0,035	0,035
6	0,139	0,463	0,435	0,168	0,290	0,308	0,078	0,054	0,263	0,275	0,221
7	0,001	1,852	0,478	0,008	0,044	0,026	0,000	0,023	0,063	0,076	0,012
8	0,140	0,276	2,210	0,011	1,056	0,242	0,010	0,069	0,229	0,106	0,034
9	0,020	0,060	0,000	0,000	0,123	0,106	0,008	0,150	0,063	0,014	0,045
10	0,039	1,319	0,009	0,007	0,076	0,006	0,053	0,010	0,014	0,000	0,014
11	0,065	0,115	1,006	0,204	0,470	0,304	0,037	0,376	0,524	0,485	0,262
12	0,009	3,272	0,105	0,008	0,049	0,055	0,006	0,002	0,063	0,064	0,028
13	1,293	2,715	3,038	0,696	3,471	1,035	0,149	1,099	2,466	1,448	1,808
14	0,536	0,700	1,247	0,217	1,126	0,447	0,034	0,016	0,685	1,067	0,907
15	0,173	1,244	0,833	0,087	0,324	0,593	0,026	0,445	0,305	0,149	0,545
16	1,276	0,000	4,205	0,945	6,225	2,822	0,953	0,828	11,829	2,510	1,974
17	0,000	0,000	0,001	0,001	0,000	0,001	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
18	0,330	0,226	1,269	0,316	0,479	0,821	0,049	1,177	0,379	0,245	0,500
19	0,072	2,984	0,162	0,000	0,003	0,000	0,000	0,018	0,000	0,070	0,000
20	0,858	0,036	2,335	0,660	2,115	0,907	0,191	0,929	1,183	1,391	0,935
21	0,038	0,642	0,057	0,090	0,055	0,108	0,005	0,010	0,000	0,000	0,084
22	0,413	3,982	0,751	0,281	0,713	0,625	0,065	1,012	0,139	0,213	0,357
23	0,796	1,154	2,103	0,669	1,713	0,478	0,081	0,665	1,300	1,710	0,882
24	0,365	0,052	1,467	0,407	1,342	0,989	0,045	0,785	0,735	0,364	0,466
25	0,026	0,170	0,099	0,000	0,091	0,000	0,022	0,027	0,050	0,043	0,040
26	0,102	3,282	0,223	0,149	0,150	0,139	0,096	0,062	0,166	0,156	0,138
27	0,497	3,327	2,959	1,041	1,680	1,026	0,312	1,645	2,192	1,619	1,141
28	0,562	0,468	5,964	0,000	3,819	0,000	0,334	1,660	2,566	2,786	2,591
29	0,405	1,018	0,559	0,303	0,730	0,301	0,027	0,182	0,320	0,313	0,291
30	0,048	1,102	1,352	0,343	0,666	0,464	0,073	0,280	0,924	0,607	0,585
31	0,000	11,362	1,180	0,432	0,000	1,108	0,000	0,426	0,629	0,000	1,408
32	1,423	0,116	9,681	4,228	16,347	3,349	0,483	2,632	9,257	6,593	6,938
33	0,161	0,008	0,175	0,324	0,197	0,071	0,099	0,050	0,261	0,255	0,176
34	0,080	0,482	0,120	0,078	0,099	0,060	0,038	0,016	0,073	0,085	0,092
35	0,280	1,378	0,320	0,383	0,343	0,268	0,192	0,147	0,373	0,392	0,334

**APÊNDICE G- RAZÕES IÔNICAS DAS ÁREAS CH<sub>3</sub>/CD<sub>3</sub> DOS 90 SINAIS DE ÍON CORRESPONDENTES A N-GLICANOS IDENTIFICADOS NO SORO DOS CONTROLES SADIOS, EM RELAÇÃO A ÁREA CH<sub>3</sub>/CD<sub>3</sub> DO ÍON 54. MÉTODO LC-MS/MS (n=11) (continuação)**

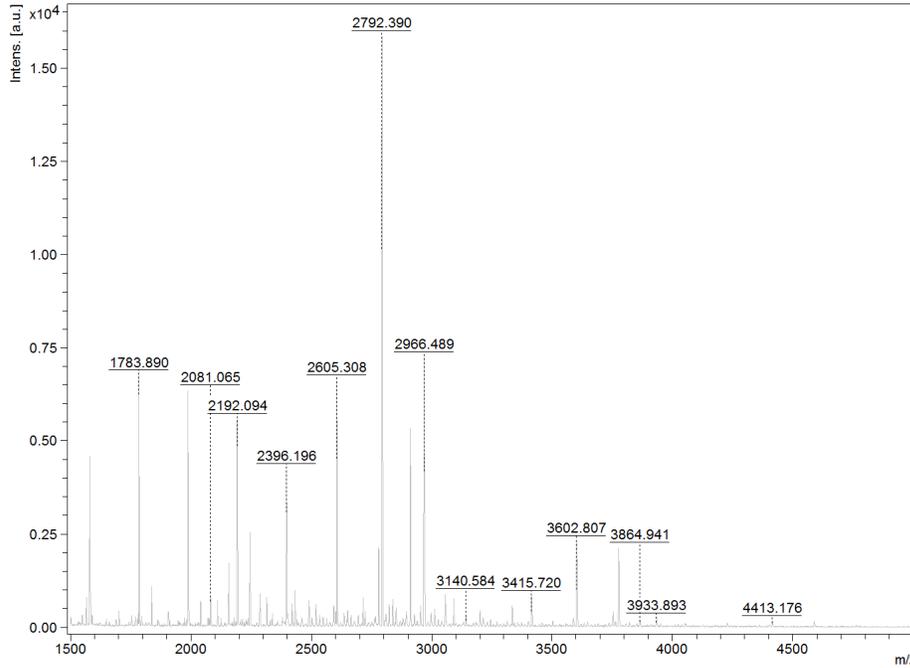
Número	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10	C11
	Controle										
36	1,010	1,854	0,870	0,539	1,240	0,532	0,424	1,087	0,723	1,359	0,329
37	0,867	1,009	0,752	0,376	0,747	0,271	0,824	0,696	1,065	1,292	0,380
38	0,444	5,851	0,937	1,066	0,851	0,899	0,302	0,175	0,816	0,803	0,838
39	0,227	0,384	9,812	0,685	4,012	1,996	0,167	1,115	1,154	0,435	1,795
40	0,000	4,878	1,875	1,347	1,076	1,635	0,197	0,881	0,935	0,425	1,492
41	0,375	0,921	7,154	1,458	3,835	2,942	0,081	1,401	1,754	2,214	3,475
42	0,101	1,117	1,546	0,229	0,732	0,711	0,039	0,390	0,372	0,413	0,462
43	0,737	0,176	5,518	1,918	1,621	4,182	0,246	1,533	1,997	1,410	1,126
44	0,087	1,331	0,227	0,132	0,124	0,279	0,062	0,032	0,147	0,158	0,219
45	2,705	9,391	4,172	5,445	2,653	7,635	0,464	1,653	2,057	1,577	4,039
46	0,733	4,494	2,351	2,253	0,981	1,320	1,338	1,033	3,681	6,195	1,659
47	0,555	0,000	7,664	1,753	2,605	3,346	0,183	1,504	2,502	2,669	4,180
48	0,000	1,251	0,580	0,000	0,000	0,000	0,011	0,050	0,000	0,000	0,000
49	0,105	0,812	1,221	0,576	0,935	0,728	0,071	0,337	0,653	0,613	0,722
50	0,108	0,035	0,678	0,277	0,941	0,160	0,031	0,329	0,189	0,351	0,475
51	0,011	0,870	0,052	0,025	0,012	0,053	0,016	0,012	0,014	0,005	0,001
52	0,031	6,028	0,569	0,000	0,071	0,194	0,033	0,084	0,000	0,375	0,258
53	9,108	0,925	9,943	23,003	9,608	4,534	2,304	7,075	9,144	10,327	10,075
54	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
55	0,063	0,000	1,312	0,328	0,645	0,460	0,060	0,187	0,344	0,474	1,762
56	0,160	0,190	1,428	0,000	0,874	0,000	0,000	0,000	0,447	0,244	0,000
57	0,850	0,111	1,055	1,403	0,542	2,424	0,110	0,416	0,650	0,333	1,522
58	0,048	1,998	0,560	0,296	0,366	0,381	0,052	0,155	0,221	0,177	0,150
59	0,247	0,439	1,088	0,506	0,282	0,241	0,079	0,063	1,142	1,409	1,457
60	0,045	0,713	0,777	0,416	0,508	0,000	0,056	0,142	0,315	0,186	0,522
61	0,098	0,000	2,277	0,471	0,922	0,459	0,015	0,103	0,362	0,710	1,187
62	0,000	0,552	0,004	0,000	0,000	0,000	0,000	0,001	0,001	0,002	0,002
63	0,065	0,106	1,881	0,366	0,742	0,777	0,052	0,335	0,414	0,607	0,926
64	0,106	0,000	0,805	0,499	0,346	0,095	0,046	0,121	0,276	0,058	0,243
65	0,000	2,219	0,851	0,000	0,000	0,000	0,010	0,186	0,170	0,000	0,000
66	0,489	56,167	0,331	0,321	0,111	0,651	0,036	0,473	0,114	0,056	0,070
67	0,349	0,148	3,930	0,849	1,991	1,289	0,135	1,065	1,258	1,482	2,385
68	0,297	1,179	0,646	0,653	0,337	1,197	0,056	0,370	0,284	0,216	0,704
69	0,181	0,148	1,005	0,734	0,767	0,836	0,062	0,601	0,744	0,283	0,633
70	0,074	0,000	0,656	0,098	0,518	0,435	0,016	0,070	0,097	0,181	0,424
71	0,281	0,332	0,111	0,000	0,090	1,286	0,000	0,037	0,016	0,023	0,000

**APÊNDICE G- RAZÕES IÔNICAS DAS ÁREAS CH<sub>3</sub>/CD<sub>3</sub> DOS 90 SINAIS DE ÍON CORRESPONDENTES A N-GLICANOS IDENTIFICADOS NO SORO DOS CONTROLES SADIOS, EM RELAÇÃO A ÁREA CH<sub>3</sub>/CD<sub>3</sub> DO ÍON 54. MÉTODO LC-MS/MS (n=11)(continuação)**

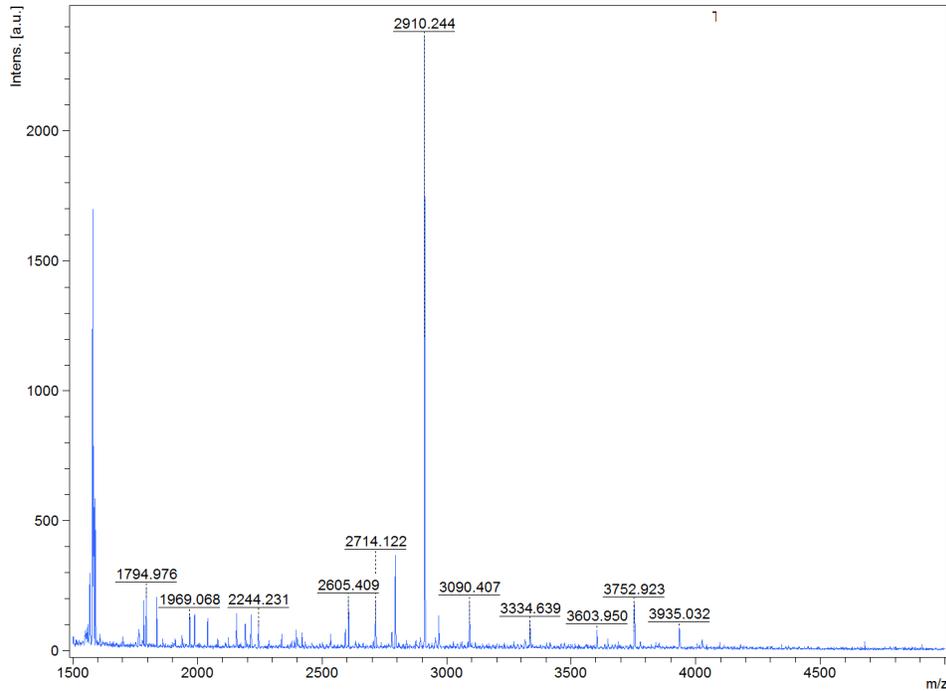
<b>Número</b>	<b>C1</b>	<b>C2</b>	<b>C3</b>	<b>C4</b>	<b>C5</b>	<b>C6</b>	<b>C7</b>	<b>C8</b>	<b>C9</b>	<b>C10</b>	<b>C11</b>
	Controle	Controle									
72	0,162	0,007	1,008	0,543	0,538	1,410	0,036	0,652	0,272	0,000	1,068
73	0,083	0,024	0,063	0,199	0,009	0,218	0,003	0,046	0,029	0,015	0,078
74	0,235	0,177	0,283	0,000	0,187	0,170	0,005	0,016	0,000	0,017	0,336
75	0,811	0,311	0,360	1,748	0,853	0,934	0,214	1,159	0,685	0,696	0,741
76	0,069	0,777	1,004	0,798	0,534	1,217	0,025	0,184	0,273	0,000	0,901
77	6,030	0,407	17,901	27,904	4,938	148,889	0,201	11,405	2,577	1,058	28,627
78	0,136	0,156	1,211	0,516	0,626	0,777	0,035	0,337	0,365	0,390	0,512
79	1,184	0,026	1,140	1,201	0,408	3,338	0,067	0,619	0,257	0,179	1,601
80	0,055	0,257	0,189	0,187	0,110	0,620	0,023	0,140	0,051	0,117	0,276
81	0,190	0,000	0,495	0,223	0,568	1,555	0,008	0,484	0,281	0,033	0,521
82	0,001	0,000	0,000	0,002	0,001	1,793	0,000	0,002	0,001	0,000	0,000
83	0,514	3,000	1,613	1,754	0,651	7,976	0,049	0,872	0,389	0,258	1,907
84	0,571	0,033	0,731	1,369	0,202	0,000	0,070	0,432	0,000	0,000	0,000
85	0,287	0,152	0,619	0,000	0,159	2,376	0,000	0,722	0,000	0,000	0,368
86	1,027	0,185	1,930	1,200	0,000	2,932	0,114	1,058	0,389	0,187	0,854
87	1,797	0,032	0,713	1,864	0,329	1,431	0,110	0,734	0,395	0,375	1,375
88	0,661	0,379	0,500	1,425	0,186	4,167	0,034	0,686	0,103	0,047	0,499
89	1,660	0,051	1,878	1,188	0,490	2,857	0,150	1,453	0,788	0,395	1,494
90	0,920	0,402	2,504	5,707	0,442	17,680	0,013	1,887	0,349	0,088	2,625

**APÊNDICE H- CONJUNTO DOS ESPECTROS DE AQUISIÇÃO DE N-GLICANOS DETECTADOS NO TECIDO TUMORAL E COLÔNICO NORMAL DA CASUÍSTICA (n=13 pacientes), MALDI-TOF-MS.**

**Paciente 1. Masculino, 37 anos, cólon transverso, estadio II, tumor *KRAS* mutado**

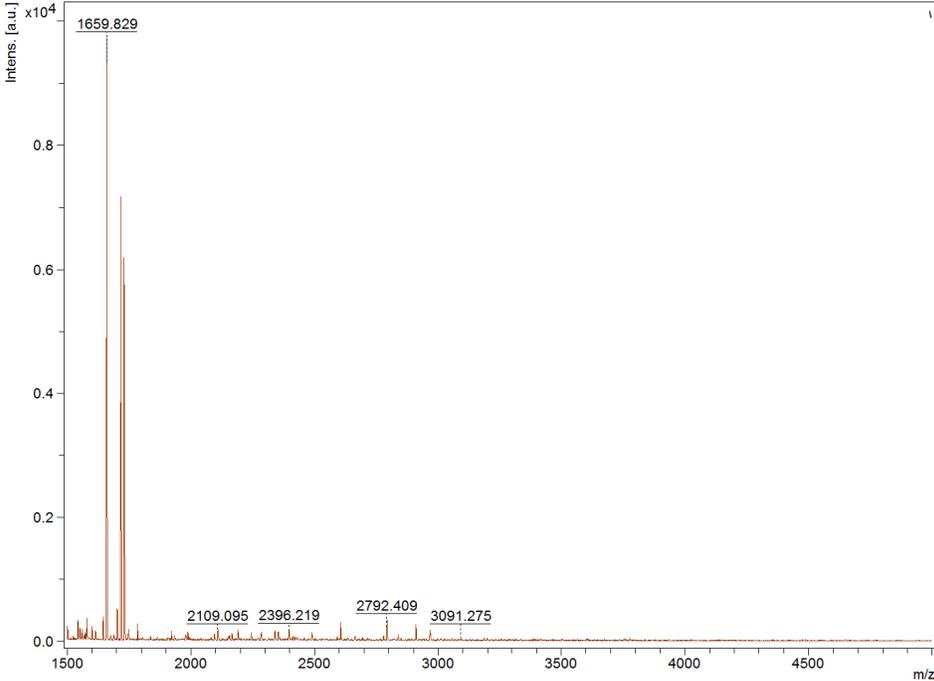


**Paciente 2. Feminino, 36 anos, cólon sigmóide, estadio II, tumor sem mutação**

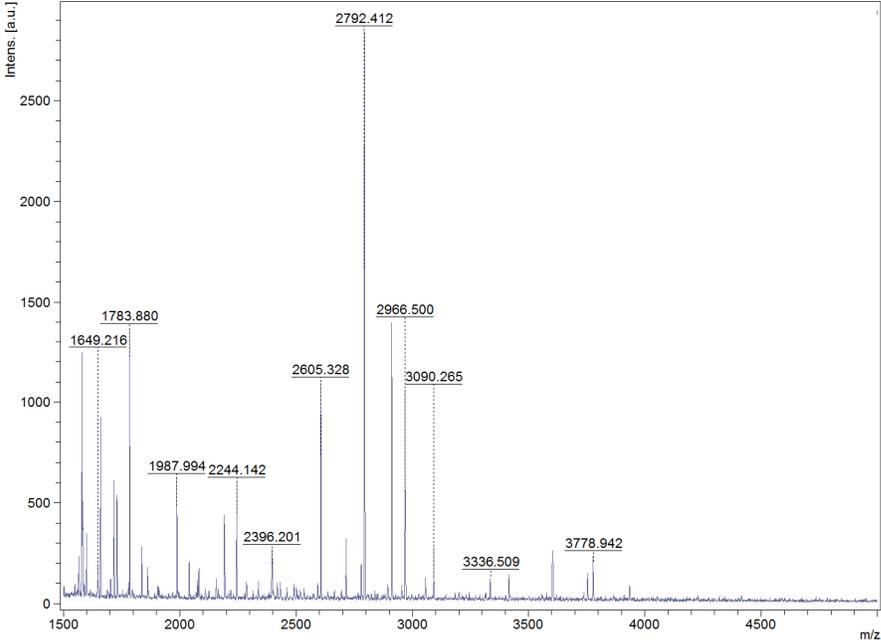


**APÊNDICE H- CONJUNTO DOS ESPECTROS DE AQUISIÇÃO DE N-GLICANOS DETECTADOS NO TECIDO TUMORAL E COLÔNICO NORMAL DA CASUÍSTICA (n=13 pacientes), MALDI-TOF-MS (continuação).**

**Paciente 3. Masculino, 65 anos, ceco, estadio II, tumor *KRAS* mutado**

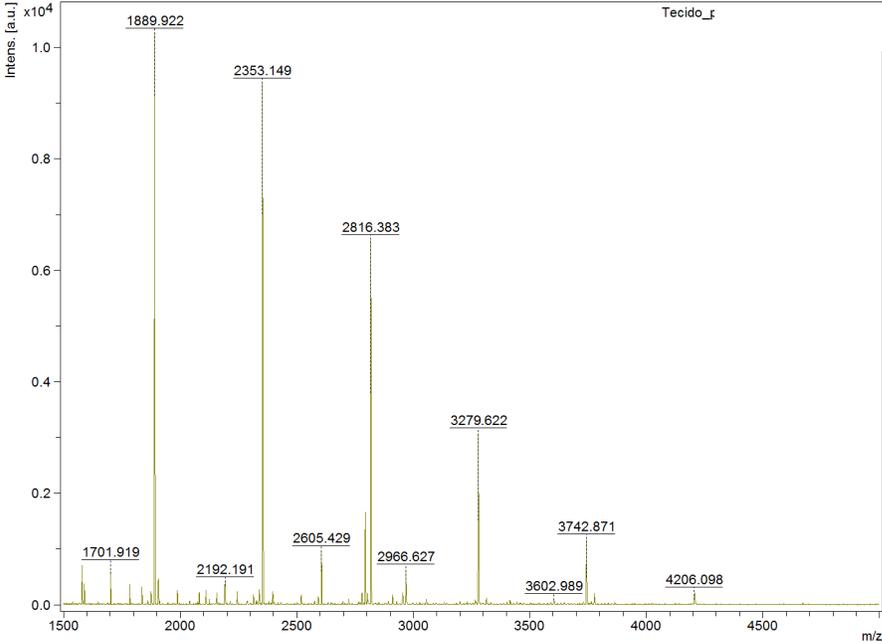


**Paciente 4. Masculino, 55 anos, cólon descendente, estadio III, tumor sem mutação**

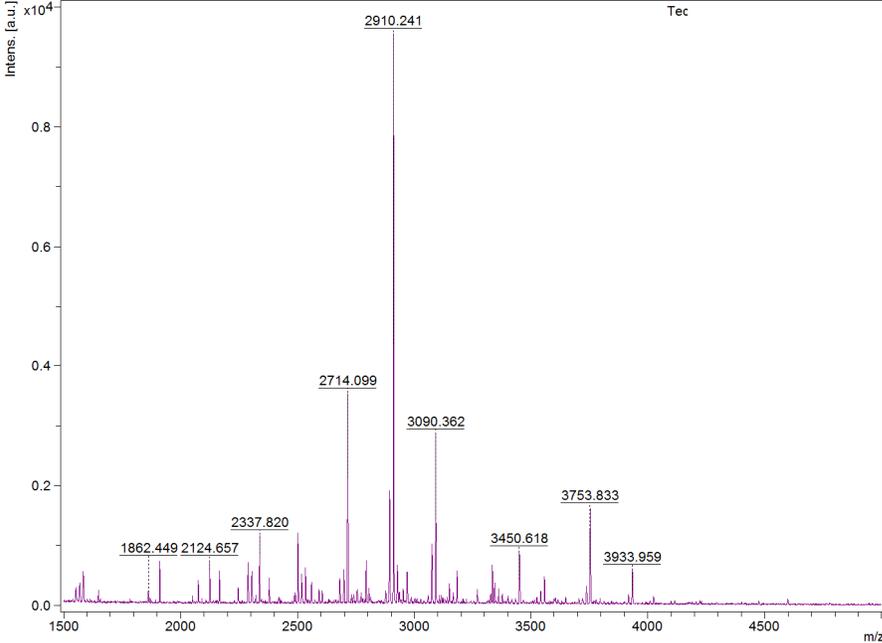


**APÊNDICE H- CONJUNTO DOS ESPECTROS DE AQUISIÇÃO DE N-GLICANOS DETECTADOS NO TECIDO TUMORAL E COLÔNICO NORMAL DA CASUÍSTICA (n=13 pacientes), MALDI-TOF-MS (continuação).**

**Paciente 5. Masculino, 60 anos, cólon sigmóide, estadio II, tumor sem mutação**

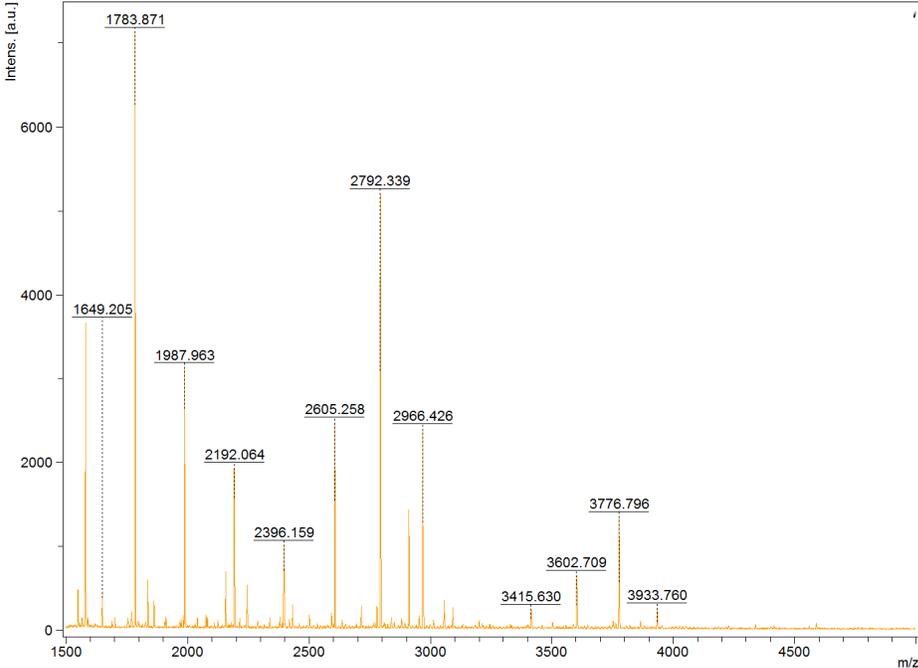


**Paciente 6. Feminino, 56 anos, cólon sigmóide, estadio II, tumor sem mutação**

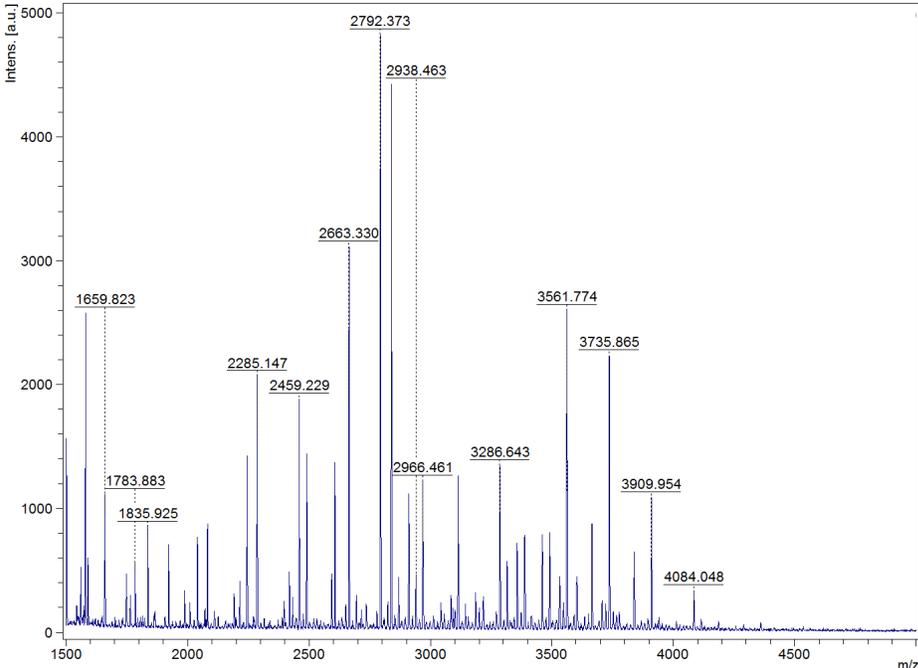


**APÊNDICE H- CONJUNTO DOS ESPECTROS DE AQUISIÇÃO DE N-GLICANOS DETECTADOS NO TECIDO TUMORAL E COLÔNICO NORMAL DA CASUÍSTICA (n=13 pacientes), MALDI-TOF-MS (continuação).**

**Paciente 7. Masculino, 67 anos, cólon ascendente, estadio III, tumor *BRAF* mutado**

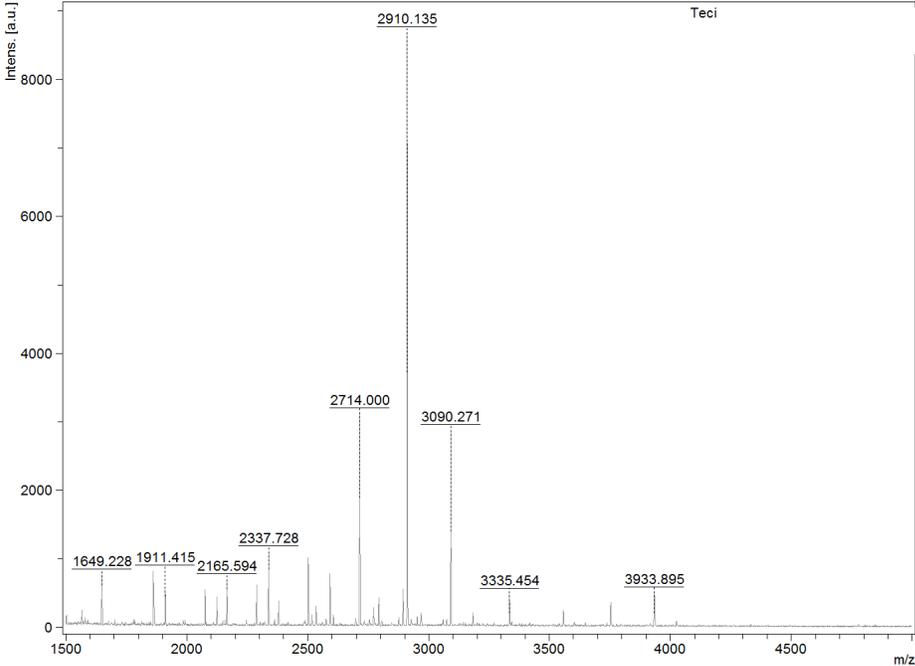


**Paciente 8. Feminino, 64 anos, ceco, estadio III, tumor sem mutação**

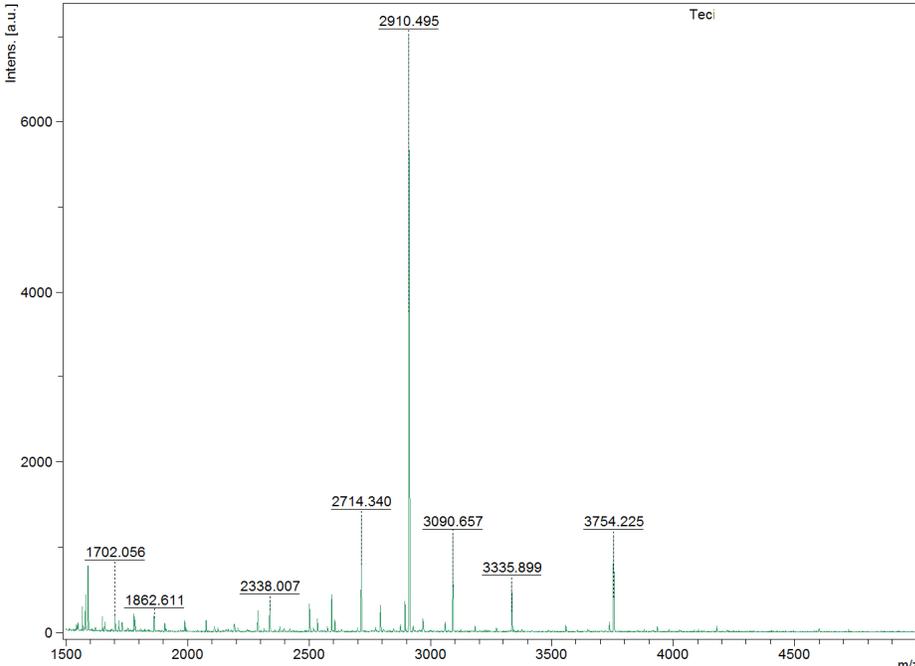


**APÊNDICE H- CONJUNTO DOS ESPECTROS DE AQUISIÇÃO DE N-GLICANOS DETECTADOS NO TECIDO TUMORAL E COLÔNICO NORMAL DA CASUÍSTICA (n=13 pacientes), MALDI-TOF-MS (continuação).**

**Paciente 9. Feminino, 63 anos, ceco, estadio II, tumor sem mutação**

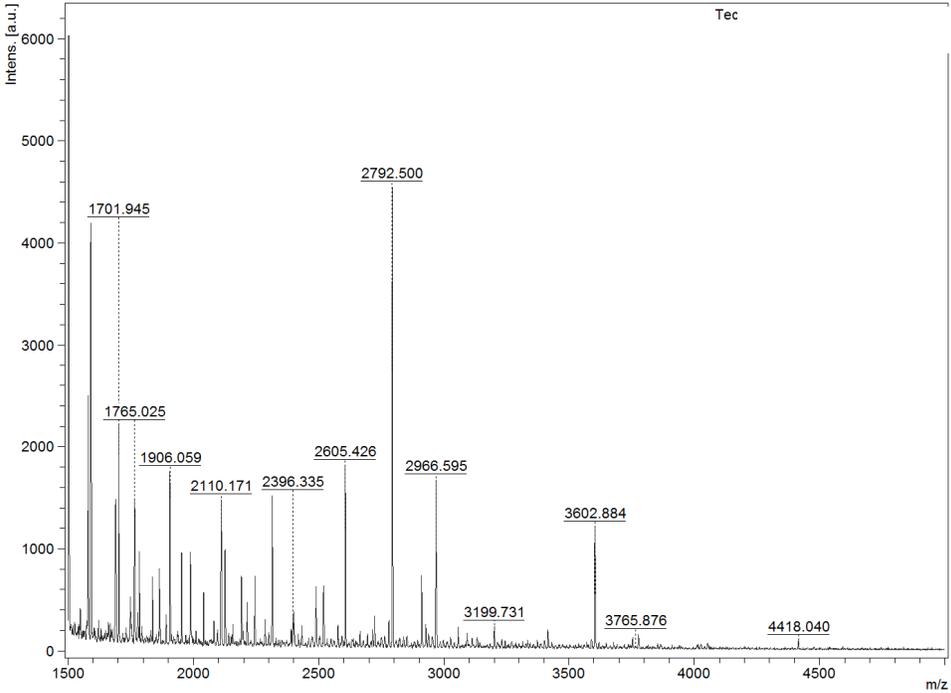


**Paciente 10. Feminino, 54 anos, cólon sigmóide, estadio III, tumor BRAF mutado**

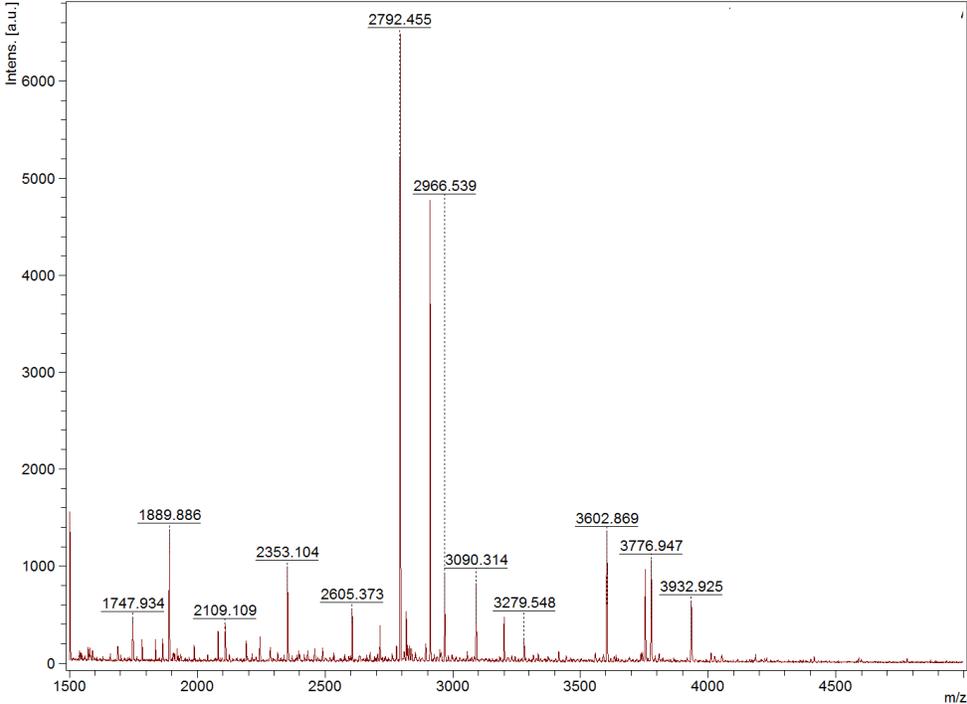


**APÊNDICE H- CONJUNTO DOS ESPECTROS DE AQUISIÇÃO DE N-GLICANOS DETECTADOS NO TECIDO TUMORAL E COLÔNICO NORMAL DA CASUÍSTICA (n=13 pacientes), MALDI-TOF-MS (continuação).**

**Paciente 11. Feminino, 74 anos, cólon sigmóide, estadio III, tumor sem mutação**

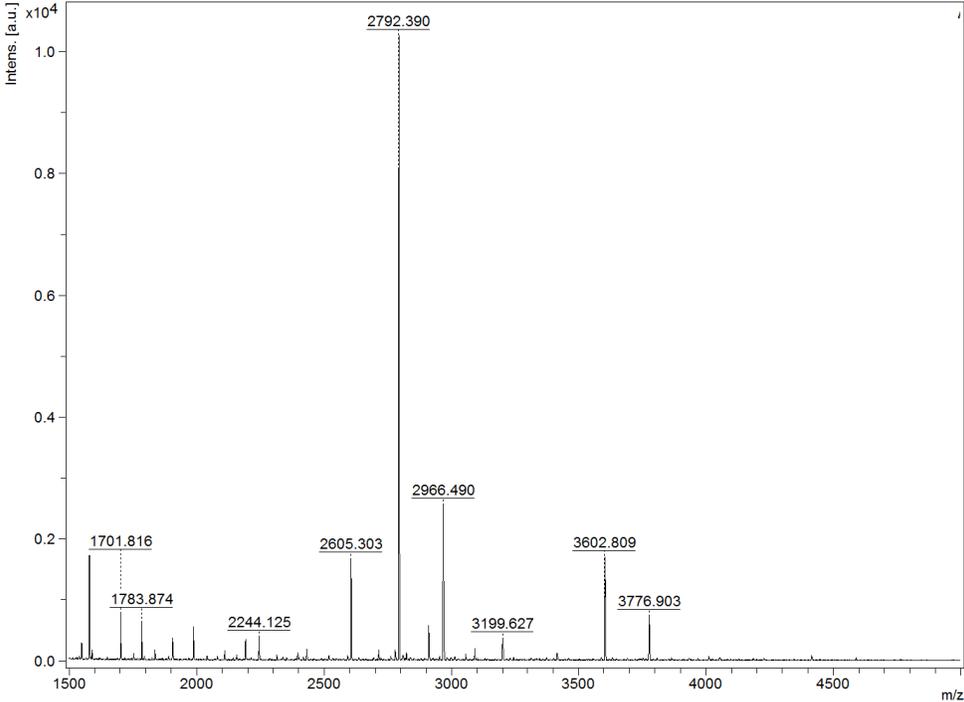


**Paciente 12. Masculino, 64 anos, ceco, estadio III, tumor KRAS mutado**



**APÊNDICE H- CONJUNTO DOS ESPECTROS DE AQUISIÇÃO DE N-GLICANOS DETECTADOS NO TECIDO TUMORAL E COLÔNICO NORMAL DA CASUÍSTICA (n=13 pacientes), MALDI-TOF-MS (continuação).**

**Paciente 13. Feminino, 75 anos, cólon sigmóide, estadio II, tumor *KRAS* mutado**



**APÊNDICE I- VALORES DAS ÁREAS CH<sub>3</sub>/CD<sub>3</sub> DOS 17 SINAIS DE ÍON CORRESPONDENTES A N-GLICANOS DETECTADOS NO TECIDO TUMORAL E NO TECIDO NORMAL DOS PACIENTES COM CÂNCER DE CÓLON, PELO MÉTODO MALDI-TOF-MS (n=13).**

Nº	Paciente 1	Paciente 2	Paciente 3	Paciente 4	Paciente 5	Paciente 6	Paciente 7	Paciente 8	Paciente 9	Paciente 10	Paciente 11	Paciente 12	Paciente 13
6	29,412	62,500	11,000	6,882	15,333	0,348	7,480	20,800	0,204	3,091	14,634	6,500	27,091
10	42,632	7,250	9,667	8,710	3,462	0,295	21,944	4,000	0,061	0,809	7,485	6,000	23,400
13	6,886	4,125	2,500	3,529	4,545	0,036	3,462	18,111	0,092	0,500	12,857	2,063	5,333
17	39,590	10,500	7,600	5,591	5,143	0,071	14,583	3,824	0,078	0,914	12,350	4,800	17,167
20	249,312	0,016	84,055	0,033	0,039	0,240	0,013	0,017	0,057	1,252	1,390	0,641	13,547
26	14,592	3,750	4,500	3,696	5,333	0,018	20,222	0,923	0,054	0,354	9,800	5,143	18,500
28	7,350	1,500	7,750	4,885	1,400	0,066	3,037	11,125	0,062	0,066	7,783	3,500	4,867
29	2,750	1,000	18,000	3,286	0,727	0,140	0,536	33,545	0,099	0,000	14,000	7,000	1,400
32	0,006	0,020	0,222	0,024	0,012	0,045	0,002	0,024	0,003	0,014	0,047	0,297	0,022
35	11,835	2,167	4,167	2,476	5,833	0,024	5,290	3,133	0,030	0,110	3,692	2,000	5,400
36	0,426	31,880	1910,747	0,615	3,013	0,275	0,242	44,284	0,099	0,760	0,093	1,830	0,0156
37	12,828	5,512	13,665	3,329	3,157	0,064	0,233	3,374	0,034	0,122	0,634	0,699	55,263
46	7,604	0,750	5,875	3,338	18,200	0,051	5,759	4,383	0,040	0,074	9,040	1,348	5,614
54	2,413	0,104	0,750	1,366	4,974	0,047	2,858	3,670	0,027	0,023	4,806	0,929	14,099
55	5,438	2,604	17,817	8,255	5,992	0,889	0,530	4,102	0,945	2,549	3,935	3,589	116,070
60	7,828	0,459	5,143	2,860	0,000	0,056	5,315	3,767	0,046	0,088	6,857	0,966	8,789
75	3,153	0,188	0,250	1,069	1,625	0,079	3,350	1,071	0,274	0,023	4,023	1,113	17,100

**APÊNDICE J- VALORES DAS ÁREAS CH<sub>3</sub>/CD<sub>3</sub> DOS 35 SINAIS DE ÍON CORRESPONDENTES A N-GLICANOS, IDENTIFICADOS NO TECIDO TUMORAL E NORMAL DOS PACIENTES COM CÂNCER DE CÓLON, PELO MÉTODO LC-MS/MS (n=13).**

Nº	Paciente 1	Paciente 2	Paciente 3	Paciente 4	Paciente 5	Paciente 6	Paciente 7	Paciente 8	Paciente 9	Paciente 10	Paciente 11	Paciente 12	Paciente 13
1	25,310	2,310	441,615	1,674	0,476	0,080	0,022	81,477	5,112	0,236	0,520	9,232	19,269
2	0,986	2,871	9,141	0,317	3,152	0,008	0,212	2,782	0,323	3,206	1,759	1,317	162,710
3	3,031	58,127	10,674	0,722	5,527	0,000	0,279	1,351	0,412	1,444	1,201	8,144	2136,918
4	39,745	13,613	0,022	1,436	8,733	0,002	0,085	2,282	0,349	0,094	0,019	0,697	138,780
6	0,557	18,574	11,025	2,389	5,952	0,000	0,381	7,852	0,400	1,491	2,054	1,739	4033,322
7	4,396	316,785	41,736	66,855	202,068	0,002	0,221	9,550	0,159	0,822	4,229	1,217	179,848
13	0,837	145,971	31,219	0,048	0,282	0,210	0,281	7,078	0,223	2,887	2,632	0,848	0,550
15	0,001	0,014	0,179	0,008	0,422	0,017	0,250	0,094	0,033	0,008	0,011	0,283	0,019
17	0,057	0,006	0,029	0,016	0,026	0,004	0,026	0,023	0,008	0,113	0,009	0,706	0,074
20	249,312	0,016	84,055	0,033	0,039	0,240	0,012	0,017	0,057	1,252	1,390	0,642	13,547
23	167,476	53,172	31,467	38,231	84,416	0,019	7,417	110,193	1,436	4,607	6,393	5,633	136,412
25	2,800	17,296	16,304	14,370	9,884	0,053	0,721	6,894	0,723	0,918	1,708	1,178	74,765
26	10,625	14,989	7,912	6,702	5,976	0,100	0,734	6,144	0,283	0,954	1,635	0,842	44,516
27	40,701	31,470	11,408	10,341	5,258	0,007	1,641	24,580	0,229	1,374	3,432	4,570	26,694
28	1,564	1,307	3,760	1,772	0,259	0,032	0,249	2,918	0,072	0,125	0,018	0,501	0,141
29	51,491	17,163	46,896	13,545	4,199	0,131	0,446	43,477	0,790	1,840	5,271	0,599	19,553
35	92,226	116,517	86,935	65,257	5,536	1,446	4,448	32,665	0,524	1,148	16,759	1,806	123,432
37	12,828	5,512	13,666	3,329	3,157	0,064	0,233	3,374	0,034	0,122	0,634	0,699	55,263
38	140,696	113,151	59,975	142,749	17,231	0,065	1,976	35,804	0,775	1,699	56,291	17,168	587,412
39	7,591	13,180	20,002	5,998	1,198	0,055	0,517	20,129	0,142	0,144	1,351	0,550	161,194
43	20,099	26,127	21,005	10,269	27,085	0,075	2,272	20,102	0,236	1,040	4,519	0,159	59,210
44	12,647	4,453	12,691	4,819	11,792	0,072	0,707	3,178	0,080	0,049	1,020	6,869	56,643
45	26,123	10,944	25,557	6,743	0,287	0,010	1,340	7,671	0,402	1,056	1,911	10,311	14,292
46	46,274	53,302	25,518	7,135	16,312	0,068	1,093	3,948	0,065	0,225	1,805	1,500	89,747
54	10,090	6,378	5,491	2,116	10,976	0,224	0,459	1,478	0,049	0,097	0,906	1,409	82,326
56	4,913	7,316	8,298	16,254	10,438	1,651	0,437	5,731	1,585	0,806	1,482	5,937	4,852
59	15,448	12,130	43,483	12,634	6,199	2,524	1,758	7,291	0,972	2,319	4,516	1,759	26,012
65	0,387	0,533	0,462	0,345	0,501	0,347	0,206	0,882	0,102	0,105	0,247	2,150	5,605
67	7,488	24,865	6,606	14,674	8,026	0,622	7,785	3,751	0,455	2,540	11,358	1,185	19,282
70	9,619	7,771	5,742	23,825	16,496	0,137	1,404	13,979	0,120	0,719	9,243	3,618	5,505
73	1,356	3,471	5,465	2,947	2,742	0,988	0,795	1,042	0,995	0,319	1,319	0,426	1,303
74	1,829	0,278	1,187	2,457	0,611	0,173	0,874	1,459	0,338	0,158	0,460	0,641	0,623
77	4,401	7,202	11,315	3,348	0,690	0,453	0,720	2,381	0,075	0,100	0,421	33,377	15,330
80	4,632	7,742	8,298	3,695	2,155	0,507	3,696	5,038	0,507	1,078	1,741	1,839	6,157
85	1,573	0,464	0,084	0,731	0,273	1,382	2,162	10,073	1,614	6,997	0,285	2,864	0,652

## ANEXOS

## ANEXO A- TERMO DE APROVAÇÃO PELO COMITÊ DE ÉTICA E PESQUISA DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA.

UNB - FACULDADE DE  
MEDICINA DA UNIVERSIDADE  
DE BRASÍLIA



## PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

## DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** ESTUDO COMPARATIVO DO MICROAMBIENTE TUMORAL POR ESPECTROMETRIA DE MASSA DE ADENOCARCINOMAS COLORRETAIS ESPORÁDICOS, COM E SEM INSTABILIDADE MICROSSATÉLITE

**Pesquisador:** Marcelo de Melo Andrade Coura

**Área Temática:** Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP.);

**Versão:** 3

**CAAE:** 63183716.0.0000.5558

**Instituição Proponente:** Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília - UNB

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

## DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 2.191.496

**Apresentação do Projeto:**

Trata-se de estudo caso-controle vinculado ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, cuja amostra será composta por indivíduos com tumores de cólon e reto, não submetidos a radio ou quimioterapia neoadjuvantes, e das metástases hepáticas quando ressecadas, operados consecutivamente no Hospital Universitário de Brasília e no Hospital Regional de Sobradinho. Serão estudados 100 casos consecutivos, onde casos com instabilidade microssatélite detectados pela análise imunohistoquímica terão seus perfis metabólicos no sangue e no tecido tumoral comparados aos casos com estabilidade microssatélite, pareados por idade, sexo, localização intestinal e estadiamento, em uma estimativa de 15 casos em cada grupo. A análise do sangue e dos fragmentos das peças cirúrgicas será realizada nos laboratórios de anatomia patológica dos respectivos hospitais, não se tratando de novos casos, mas sim dos pacientes operados na rotina do atendimento, sem gerar portanto, custos adicionais. Serão colhidos 1 mL de sangue e 2 fragmentos do tecido colônico normal, 4 fragmentos do tecido tumoral primário e 2 fragmentos das metástases de cada caso. Serão realizadas análises imunohistoquímicas nas peças cirúrgicas e nas metástases, quando houver, para a pesquisa da ausência de expressão das proteínas, produto

**Endereço:** Universidade de Brasília, Campus Universitário Darcy Ribeiro - Faculdade de Medicina  
**Bairro:** Asa Norte **CEP:** 70.910-900  
**UF:** DF **Município:** BRASÍLIA  
**Telefone:** (61)3107-1918 **E-mail:** cepfm@unb.br

## ANEXO A- TERMO DE APROVAÇÃO PELO COMITÊ DE ÉTICA E PESQUISA DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA (continuação).



Continuação do Parecer: 2.191.496

dos genes de reparo do DNA: MLH1, MSH2, MSH6 e PMS2, na identificação dos tumores com instabilidade microsatélite (IMS)<sup>25</sup>. As análises serão realizadas por um patologista independente.

### Objetivo da Pesquisa:

Estudar o microambiente tumoral relativo a expressão de proteínas, peptídeos, glicoproteínas, proteoglicanos e lipídeos do adenocarcinoma colorretal esporádico, por meio da espectrometria de massa de tumores com e sem instabilidade microsatélite (IMS).

### Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos mínimos uma vez que a coleta de material será realizada após retirada do fragmento pelo cirurgião. No TCLE é garantido o anonimato e a guarda do material coletado nos laboratórios de Anatomia Patológica do Hospital Universitário de Brasília (HUB) e no Hospital Regional de Sobradinho (HRS).

Benefícios: possibilidade de aconselhamento genético.

### Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Pesquisa relevante para a área oncológica. Em análise anterior havia sido solicitada a adequação do TCLE e da planilha orçamentária, que foi adequadamente atendida pelo pesquisador.

### Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os termos de apresentação obrigatória estão adequados e corretamente inseridos na plataforma.

### Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

A partir da análise do presente projeto de pesquisa, sou de parecer favorável à sua aprovação.

### Considerações Finais a critério do CEP:

Projeto apreciado na 5ª Reunião Ordinária do CEP-FM-UnB-2017. Após apresentação do parecer do (a) Relator (a), aberta a discussão para os membros do Colegiado. O projeto foi Aprovado.

De acordo com a Resolução 466/12 CNS, itens X.1.- 3.b. e XI.2.d, este Comitê chama a atenção da obrigatoriedade de envio do relatório parcial semestral e final do projeto de pesquisa, contados a partir da data de aprovação do protocolo de pesquisa.

**Endereço:** Universidade de Brasília, Campus Universitário Darcy Ribeiro - Faculdade de Medicina  
**Bairro:** Asa Norte **CEP:** 70.910-900  
**UF:** DF **Município:** BRASÍLIA  
**Telefone:** (61)3107-1918 **E-mail:** capfm@unb.br

**ANEXO A- TERMO DE APROVAÇÃO PELO COMITÊ DE ÉTICA E PESQUISA DA  
FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA (continuação).**

**UNB - FACULDADE DE  
MEDICINA DA UNIVERSIDADE  
DE BRASÍLIA**



Continuação do Parecer: 2.191.496

**Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:**

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_675782.pdf	03/05/2017 10:42:25		Acelto
Orçamento	PlanilhadeOrçamento2.jpg	03/05/2017 10:41:36	Marcelo de Melo Andrade Coura	Acelto
Orçamento	PlanilhadeOrçamento1.jpg	03/05/2017 10:40:24	Marcelo de Melo Andrade Coura	Acelto
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PROJETODEPESQUISADOUTORADO.docx	02/05/2017 22:12:03	Marcelo de Melo Andrade Coura	Acelto
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.doc	02/05/2017 22:10:24	Marcelo de Melo Andrade Coura	Acelto
Declaração de Instituição e Infraestrutura	TERMODECONCORDANCIAHUB.jpg	07/12/2016 21:16:53	Marcelo de Melo Andrade Coura	Acelto
Recurso Anexado pelo Pesquisador	CARTEDEENCAMINHAMENTOJPEg	07/12/2016 21:16:24	Marcelo de Melo Andrade Coura	Acelto
Declaração de Instituição e Infraestrutura	TERMODECONCORDANCIAHRSJPEg	07/12/2016 21:15:16	Marcelo de Melo Andrade Coura	Acelto
Declaração de Pesquisadores	DECLARACAODERESPONSABILIDADEJPEg	07/12/2016 21:14:15	Marcelo de Melo Andrade Coura	Acelto
Outros	CurriculodoSistemadeCurriculosLattesMarcelodeMeloAndradeCoura.pdf	04/10/2016 21:14:22	Marcelo de Melo Andrade Coura	Acelto
Outros	CurriculodoSistemadeCurriculosLattesJoaoBatistadeSouza.pdf	04/10/2016 21:12:54	Marcelo de Melo Andrade Coura	Acelto
Declaração de Pesquisadores	termodeconcordanciapesquisadores.pdf	25/07/2016 21:07:43	Marcelo de Melo Andrade Coura	Acelto
Folha de Rosto	folhaderosto.pdf	25/07/2016 21:05:30	Marcelo de Melo Andrade Coura	Acelto

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

BRASILIA, 28 de Julho de 2017

Assinado por:  
**Florêncio Figueiredo Cavalcanti Neto**  
(Coordenador)

**Endereço:** Universidade de Brasília, Campus Universitário Darcy Ribeiro - Faculdade de Medicina  
**Bairro:** Asa Norte **CEP:** 70.910-900  
**UF:** DF **Município:** BRASÍLIA  
**Telefone:** (61)3107-1918 **E-mail:** cepfm@unb.br

**ANEXO B- LISTA DE REAGENTES, SOLUÇÕES E EQUIPAMENTOS.****REAGENTES**

- 2.5-ácido dihidróxibenzóico (DHB; Sigma-Aldrich)
- 2-mercaptoetanol (Sigma-Aldrich)
- Acetato de sódio (Sigma-Aldrich)
- Acetona (Merck, grau cromatográfico)
- Acetonitrila (J.T.Baker, grau cromatográfico)
- Ácido acético (Dinamica)
- Carbonato de amônio (Sigma-Aldrich)
- Cloridrato de guanidina (Sigma-Aldrich)
- Clorofórmio (J.T.Baker, grau cromatográfico)
- Dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma-Aldrich)
- Ditiotretitol (DTT) (Sigma-Aldrich)
- Enzima PNGase F (Sigma-Aldrich)
- Fosfato de sódio (Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) (Sigma-Aldrich)
- Hidróxido de sódio (NaOH) (Sigma-Aldrich)
- Iodoacetoamida (IAA) (Sigma-Aldrich)
- Iodometano (ICH<sub>3</sub>) (Sigma-Aldrich)
- Iodometano deuterado (ICD<sub>3</sub>) (Sigma-Aldrich)
- Metanol (Merck, grau cromatográfico)
- SDS (3E Company)
- Tripsina (Sigma-Aldrich)

**ANEXO B- LISTA DE REAGENTES, SOLUÇÕES E EQUIPAMENTOS (continuação).****SOLUÇÕES**

- Tampão de redução/alquilação (solução Tris 0,6 M contendo cloridrato de guanidina 6M pH 8,4 (HCl))
- Tampão de redução (tampão de redução/alquilação contendo 500mM de DTT)
- Tampão de alquilação (tampão de redução/alquilação contendo 3M de IAA)
- Tampão sal-fosfato (contendo 35mM de fosfato de sódio, PH 7,6 a 0,85% de NaCl)
- Solução de carbonato de amônio 50mM
- Solução de tripsina 5 µg/µl
- Solução de PNGase F 1U/µl

**EQUIPAMENTOS**

- Colunas Sep-Pak C18 (volume 3 ml)
- Concentrador SpeedVac
- Cromatógrafo líquido RPLC Eksigent UltraLC 110-XL (AB Sciex) acoplado a um espectrômetro de massa TripleTof 5600+ (AB Sciex).
- Espectrômetro de massa MALDI-TOF/TOF, modelo Ultraflex III, Modo refletor (Bruker Daltonics, Billerica, NJ)
- Evaporador à Nitrogênio (N-EVAP)
- Filtros de ultracentrifugação Millipore (Amicon Ultra, 10k)
- Visiprep

## **ANEXO C- PROTOCOLO DE EXTRAÇÃO, DERIVATIZAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE OLIGOSSACARÍDEOS N-LIGADOS.**

Redução, alquilação e deglicosilação das glicoproteínas:

- 1 - Diluir 40  $\mu\text{l}$  da amostra em 200  $\mu\text{l}$  do tampão de redução/alquilação
- 2 - Incubar a 45 °C por 90 minutos
- 3 - Adicionar à amostra 9,6  $\mu\text{l}$  do tampão de redução (preparado na hora de usar)
- 4 - Incubar a 45 °C por 4 horas
- 5 - Adicionar 9,2  $\mu\text{l}$  do tampão de alquilação (preparado na hora de usar e acondicionado ao abrigo da luz)
- 6 - Deixar no escuro de 15 a 17 horas
- 7 - Transferir a amostra para filtro millipore 10k, adicionar 200  $\mu\text{l}$  de solução de carbonato de amônio 50 mM e centrifugar 14.000 g por 15 minutos
- 8 - Lavar a amostra 4 vezes com 400  $\mu\text{l}$  solução de carbonato de amônio 50 mM usando o filtro Millipore 10 K (concentrando volume final para 22  $\mu\text{l}$ ), centrifugando a 14.000 g por 15 minutos, cada etapa da lavagem
- 9 - Transferir a amostra do filtro Millipore 10K para um eppendorf de 2000  $\mu\text{l}$  de fundo chato (colocar o filtro de cabeça para baixo dentro do eppendorf e centrifugar 1.000 g, por 2 minutos)
- 10 - Acrescentar 200  $\mu\text{l}$  da solução de carbonato de amônio 50 mM (recém- preparado) à amostra
- 11 - Dissolver a tripsina na solução de carbonato de amônio 50 mM (recém preparado) na concentração de 5  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  (preparar na hora de usar)
- 12 - Acrescentar 14  $\mu\text{l}$  de tripsina à amostra
- 13 - Incubar a 37 °C por 24 horas sob agitação de 400 rpm
- 14 - Aquecer a solução com a amostra em banho maria a 100 °C por 10 minutos, e secar a amostra no SpeedVac
- 15 - Acrescentar 200  $\mu\text{l}$  da solução de carbonato de amônio 50 mM (recém-preparado) à amostra

## **ANEXO C- PROTOCOLO DE EXTRAÇÃO, DERIVATIZAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE OLIGOSSACARÍDEOS N-LIGADOS (continuação).**

16 - Adicionar à amostra 3 µl da enzima PNGase F (diluída em água deionizada) na concentração de 1U/µl

17 - Incubar em banho maria a 37 °C por 15 a 17 horas

18 - Congelar a amostra em nitrogênio líquido ou a -80 °C e secar a amostra no SpeedVac

### Purificação dos N-glicanos:

1 - Acrescentar 200 µl de ácido acético a 5% à amostra

2 - Condicionar a coluna Sep-Pak C18 com 5 ml de metanol e em seguida com 10 ml de ácido acético 5%

3 - Colocar a amostra na coluna Sep-Pak C18 e eluir em tubos de vidro com 3 ml de ácido acético 5% e, em seguida, com 3 ml de ácido acético 5% em 80% de acetonitrila

4 - Coletar cada fração. N-glicanos são eluídos em ácido acético 5%, a fração eluída em ácido acético 5% em 80% de acetonitrila corresponde à mistura de peptídeos e O-glicopeptídeos que foram armazenados em câmara fria a -20 °C.

5 – Congelar a amostra em nitrogênio líquido ou a -80 °C e secar a amostra no SpeedVac

### Permetilação dos N-glicanos:

1 - Adicionar 500 µl de DMSO à amostra nos tubos de vidro

2 - Macerar NaOH em um gral em quantidade suficiente para usar 25 mg por amostra

3 - Adicionar aproximadamente 25 mg de NaOH macerado em cada amostra

4 - Colocar as amostras no N-EVAP sob fluxo de nitrogênio, adicionar 300 µl de Iodometano (muito volátil e tóxico), deixar a mistura sob fluxo de nitrogênio e, ao retirar as amostras, tampar rapidamente

5 - Misturar vigorosamente no vórtex

6 - Colocar a amostra no banho de ultrassom por 90 minutos em temperatura ambiente

### **ANEXO C- PROTOCOLO DE EXTRAÇÃO, DERIVATIZAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE OLIGOSSACARÍDEOS N-LIGADOS (continuação).**

- 7 - Parar a reação adicionando 1 ml de ácido acético a 5% em banho de gelo, tampar e misturar vigorosamente no vórtex
- 8 - Adicionar 600  $\mu$ l de clorofórmio, misturar vigorosamente em vórtex e deixar a mistura separar em duas fases a 4 °C (banho de gelo)
- 9 - Transferir com pipeta Pasteur de vidro a fase de baixo (clorofórmio) para um novo tubo de vidro
- 10 - Repetir os itens 8 e 9 duas vezes (juntando o clorofórmio no mesmo tubo)
- 11 - Lavar a fase de clorofórmio 8 vezes com o mesmo volume de água deionizada (aproximadamente 1.800  $\mu$ l) a 4 °C (banho de gelo) descartando a fase aquosa (superior)
- 12 - Secar a amostra (fase de clorofórmio) no N-EVAP

#### Purificação dos N-glicanos permetilados:

- 1 - Acrescentar 200  $\mu$ l de metanol à amostra
- 2 - Condicionar a coluna Sep-Pak C18 com 5 ml de metanol e, em seguida, com 10 ml de água deionizada
- 3 - Colocar a amostra na coluna e eluir com 15 ml de água, 2 ml de acetonitrila 10% e 3 ml de acetonitrila a 80%
- 4 - Coletar a fração de acetonitrila 80% em 2 eppendorfs de 1.500  $\mu$ l
- 5 - Congelar a amostra em nitrogênio líquido ou a -80 °C e secar no SpeedVac

## **ANEXO C- PROTOCOLO DE EXTRAÇÃO, DERIVATIZAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE OLIGOSSACARÍDEOS N-LIGADOS (continuação).**

Preparação da amostra para análise no espectrômetro MALDI-TOF/MS:

- 1 - Diluir a amostra com 30  $\mu$ l de acetonitrila a 100%
- 2 - Diluir 5 mg da matriz (ácido 2-dihidroxibenzoico) em 500  $\mu$ l de acetona
- 3 - Misturar v/v a matriz diluída e acetato de sódio diluído em metanol na concentração de 1mM
- 4 - Misturar 1  $\mu$ l de amostra a 3  $\mu$ l de matriz, homogeneizar e transferir 1  $\mu$ l para a placa de espectrômetro, deixar secar a temperatura ambiente
- 5 - Inserir a placa com a amostra seca no espectrômetro e fazer a análise

Preparação da amostra para análise no equipamento ESI-LC-MS:

- 1- Diluir a amostra em 40  $\mu$ l de metanol
- 2- Adicionar 4  $\mu$ l de acetato de sódio diluído em metanol na concentração de 100mM
- 3- Centrifugar e vortexar por 30 segundos
- 4- Extrair 20  $\mu$ l da amostra para os “vials” de análise
- 5- Inserir os “vials” individualmente na bandeja do equipamento