Universidade de São Paulo
Instituto de Química de São Carlos

Guilherme Muniz Miziara

**Extração de proteínas a partir de tecido fixado em
formaldeído e embebido em parafina para análise
proteômica**

São Carlos
2014

GUILHERME MUNIZ MIZIARA

Extração de proteínas a partir de tecido fixado em formaldeído e embebido em parafina para análise proteômica

Dissertação apresentada ao Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Química Analítica e Inorgânica

Orientador: Prof. Dr. Emanuel Carrilho

Exemplar Revisado

O exemplar original encontra-se em acervo reservado na Biblioteca do IQSC-USP

São Carlos

2014

Dedico este trabalho, com amor e carinho, aos meus pais, minha querida irmã e à minha noiva, que sempre me apoiaram e contribuíram para minhas conquistas.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais pelo amor incondicional, apoio e ensinamentos, que me proporcionaram felicidade plena ao longo de toda minha vida.

À minha noiva Manuela pela paciência, colaboração, amor e por estar sempre ao meu lado.

Ao Prof. Dr. Emanuel pela confiança, paciência e ensinamentos ao longo desses anos.

Aos colegas do BioMicS por toda ajuda e aprendizado colaborativo.

À Julia e à Regiane, por todo o desenvolvimento conjunto do trabalho, com boa vontade e paciência.

Ao Hospital de Câncer de Barretos e à Nature Lab por ceder as amostras estudadas neste trabalho e compartilhar conhecimentos.

Ao Prof. Dr. Vitor Faça e ao Adriano Aquino pelos ensinamentos e boa vontade.

Ao Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Bioanalítica – INCT Bio – pelo suporte financeiro e estrutura ao Grupo BioMicS.

Ao IQSC pela estrutura física e intelectual necessárias para elaboração desta dissertação.

Ao CNPq pelo apoio financeiro.

RESUMO

O câncer colorretal (CCR) é a segunda causa de mortes relacionadas ao câncer, com aproximadamente 500.000 mortes por ano em países desenvolvidos. Os pacientes com doença localmente avançada ou metastática possuem um prognóstico ruim e, desta forma, a detecção precoce é necessária para reduzir a alta mortalidade associada à essa doença. Ainda, os métodos de rastreamento utilizados no momento apresentam boa exatidão, porém são de alto custo, consomem muito tempo e são incômodos para os pacientes. A colonoscopia é o método mais comumente utilizado para a detecção de CCR. Entretanto, apresentam duas limitações importantes: i) necessidade da luz intestinal estar limpa, sem resíduos fecais, o que só é conseguido após um preparo rigoroso, com dieta e laxativos, nos dias que antecedem a realização do exame, e, ii) é examinador-dependente, ou seja, dependem da experiência do profissional em localizar as alterações anatômicas, e ainda da habilidade em selecionar o melhor local para a realização da biópsia. Portanto, o desenvolvimento de um método rápido e sensível para o diagnóstico do câncer colorretal é extremamente importante.

A proposta desta dissertação foi desenvolver um método eficaz para o preparo dos tecidos parafinizados e extração de proteínas para experimentos em eletroforese bidimensional (2DE). Tecidos fixados em formaldeído e embebidos em parafina (FFPE) apresentam como vantagens a preservação da qualidade morfológica, abundância e facilidade de armazenamento, o que permite estudos futuros e recorrentes. Entretanto, para análises proteômicas, a recuperação do material protéico é ineficiente. Após o desenvolvimento do método, no qual foi explorado e variado a composição do solvente de desparafinização, a composição do tampão de extração de proteínas e as condições de tempo e temperatura de extração, o método foi aplicado na análise proteômica de tecido tumoral. A partir deste estudo, 156 proteínas foram obtidas de tecidos parafinizados, sendo possível identificar por espectrometria de massas, permitindo agora estudos posteriores para identificação de possíveis biomarcadores relacionados ao CCR.

ABSTRACT

Colorectal cancer (CRC) is the second cause of cancer-related death, with approximately 500,000 deaths per year in developed countries. Patients with locally advanced or metastatic disease have a poor prognosis and, thus, early detection is needed to reduce the high mortality associated with this disease. Yet, the screening methods used currently have good accuracy, but are expensive, time consuming, and are uncomfortable for patients. Colonoscopy is the most commonly used method for the detection of CRC. However, it presents two major limitations: i) the need to be clean intestinal lumen without fecal waste, which is achieved only after rigorous preparation with laxatives and diet during the days before the exam, and ii) it is examiner-dependent, i.e., depends on the professional's experience in locating anatomical changes, and even the ability to select the best site for biopsy. Therefore, the development of a rapid and sensitive method for the diagnosis of colorectal cancer is extremely important. The purpose of this dissertation was to develop an effective method for the preparation of tissues and protein extraction experiments for two-dimensional electrophoresis (2DE). Tissues fixed in formaldehyde and embedded in paraffin (FFPE) have the advantage of preserving the morphological quality, abundance and storage facility, which allows for further studies. However, for proteomic analysis, the recovery of protein material is inefficient. After the development of the extraction method, which explored and varied the composition of the solvent for deparaffinization of the tissue, the buffer for extraction of the proteins, and the conditions of time and temperature of extraction. After this study, the method was applied to the analysis of biopsies and 156 proteins were obtained from paraffinized tissues, what allowed the identification by mass spectrometry, leading to further studies to identify potential biomarkers related to CCR.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Esquema representando as etapas que serão realizadas para o estudo proteômico de tecidos FFPE.	23
Figura 2 - Bloco de tecido FFPE	36
Figura 3 - Avaliação dos tampões de extração utilizados, sob aquecimento, quanto a qualidade dos géis SDS-PAGE obtidos.	40
Figura 4 - Avaliação dos tampões de extração utilizados, sob aplicação de ultrassom, quanto a qualidade dos géis SDS-PAGE obtidos.	41
Figura 5 - Avaliação da metodologia baseada em ultrassom para tecidos frescos.....	42
Figura 6 - Imagens para elucidar os resultados dos géis 2-DE obtidos de amostras FFPE	45
Figura 7- Géis submetidos a digestão e análise de espectroscopia de massas. Somente os géis assinalados foram utilizados, onde o conjunto de cada cor representa uma quadruplicata. Verificar legenda para detalhes.	46
Figura 8 - Diagrama de Euler: comparação das listas de proteínas identificadas – confronto de resultados entre as metodologias desenvolvidas para tecidos FFPE vs. tecidos Frescos	65
Figura 9 - Diagrama de Euler: comparação das listas de proteínas identificadas – confronto de resultados entre as metodologias desenvolvidas com aquecimento vs. ultrassom	67

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Tipos de câncer mais incidentes na população brasileira - estimativa para 2014. ...	14
Tabela 2 - Resumo dos resultados obtidos pela variação das diversas formas de tratamento pré-extração para os tecidos FFPE, apresentando como indicadores as concentração proteicas obtidas e, de forma ilustrativa, a qualidade dos géis obtidos.	37
Tabela 3 - Concentrações dos extratos de proteínas das extrações aplicadas às separações SDS-PAGE representadas nos géis anteriores.	43
Tabela 4 - Lista das proteínas extraídas e identificadas de tecido FFPE. Tampão de extração: (Tris 20 mM pH 8,8, SDS 2 %, DTT 200 mM). Aquecimento: 100 °C por 20 min e 80 °C por duas horas).....	48
Tabela 5 - Lista das proteínas extraídas e identificadas de tecido FFPE. Tampão de extração: (Tris 20 mM pH 8,8, CHAPS 4 %, DTT 200 mM). Aquecimento: 100 °C por 20 min e 80 °C por duas horas).....	52
Tabela 6 - Lista das proteínas extraídas e identificadas de tecido fresco. Tampão de extração: (Tris 20 mM pH 8,8, SDS 2 %, DTT 200 mM). Aquecimento: 100 °C por 20 min e 80 °C por duas horas).....	53
Tabela 7 - Lista das proteínas extraídas e identificadas de tecido fresco. Tampão de extração: (Tris 20 mM pH 8,8, CHAPS 4 %, DTT 200 mM). Sonicação: 14 pulsos, amplitude de 10% , 10 s <i>ON</i> , 45 s <i>OFF</i>	61

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	11
1.1. Extração de proteínas de tecidos fixados em formaldeído e embebidos em parafina (FFPE)	11
1.2. Análise proteômica por 2-D PAGE-MS	12
1.3. Câncer Colorretal (CCR)	13
2. OBJETIVOS	22
2.1. Gerais.....	22
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	24
3.1. Amostras biológicas	24
3.1.1. Amostras de carne suína FFPE.....	24
3.1.2. Amostras de tecido de CCR FFPE e de CCR frescas	24
3.2. Desparafinização e reidratação das amostras FFPE	25
3.3. Extração de proteínas.....	25
3.3.1. Extração de proteínas por aquecimento em tampão dodecil sulfato de sódio (SDS)....	25
3.3.2. Extração de proteínas com aplicação de ultra-som e em tampão SDS.....	26
3.3.3. Extração de proteínas por aquecimento outros detergentes.....	26
3.3.4. Extração de proteínas com o kit comercial Qproteome FFPE Tissue (Qiagen)	27
3.4. Precipitação das proteínas para remoção de interferentes	27
3.4.1. Precipitação das proteínas com acetona	28
3.4.2. Precipitação das proteínas com TCA/acetona	28
3.4.3. Precipitação das proteínas com etanol.....	28
3.5. Quantificação das proteínas.....	29
3.6. SDS-PAGE - Análise proteômica qualitativa e separação das proteínas para aplicação em LC/MS	30
3.6.1. Preparo do gel de separação 12,5% (m/v)	30
3.6.2. Preparo do gel de empilhamento 4,5% (m/v)	30
3.6.3. Migração eletroforética.....	31
3.7. Análise proteômica qualitativa por eletroforese bidimensional	31
3.7.1 Focalização Isoelétrica (1ª Dimensão)	31
3.7.2 SDS-PAGE (2ª dimensão)	32
3.8. Coloração das proteínas em gel.....	33
3.9. Digestões enzimáticas <i>in gel</i> para análise de peptídeos em MS.....	33

3.10. Identificação das proteínas por Espectrometria de massas.....	34
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	36
4.1. Desparafinização dos tecidos FFPE	36
4.2. Otimização e padronização da extração de proteínas	38
4.2.1. Extração de proteínas com aquecimento e por ultrassom.....	39
4.2.2. Avaliação das metodologias por quantificação proteica e compatibilidade SDS-PAGE	40
4.2.3. Avaliação da compatibilidade das metodologias com a 2-DE	44
4.3. Identificação das proteínas por espectrometria de massas	44
5. Conclusão	69
6. BIBLIOGRAFIA	70

1. INTRODUÇÃO

1.1. Extração de proteínas de tecidos fixados em formaldeído e embebidos em parafina (FFPE)

Para o estudo de novos biomarcadores, a utilização de tecidos fixados em formaldeído e embebidos em parafina (FFPE, *Formalin-Fixed Paraffin-Embedded*) representa um recurso de valor imensurável, uma vez que, tecidos de biopsias vêm sendo preservados desta forma em todo mundo para estudo histológico de patologias há mais de cem anos (BERG et al., 2010). O tratamento com formol e parafina não somente preserva a morfologia do tecido como também resulta em amostras de alta estabilidade, as quais podem ser mantidas indefinidamente em temperatura ambiente. As alterações bioquímicas começam a ocorrer em poucos minutos após iniciado o quadro de anóxia. Portanto, o tempo de pré-fixação deve ser reduzido a segundos para minimizar a degradação de RNA e proteínas, especialmente nos tecidos com altos níveis de RNases e proteases, como pâncreas, a vesícula biliar, pele e intestino. O tempo de fixação, bem como o fixador utilizado, influenciam na preservação de macromoléculas, como o DNA, RNA e proteínas; o que torna este processo de suma importância para a obtenção dos resultados a partir das técnicas de imunoistoquímica e biologia molecular (SCORSATO, 2010). O resultado é um enorme banco de tecidos e, por consequência, um rico banco de dados disponível para pesquisa, os quais acompanham informações valiosas, como diagnóstico, tratamento e histórico pós-tratamento.

O estudo proteômico desses tecidos, juntamente com as informações que os acompanham, pode revelar uma gama de importantes biomarcadores que estão diretamente relacionados com o diagnóstico da doença, o prognóstico e no auxílio da tomada de decisão quanto ao tratamento. Entretanto, o estudo proteômico de tecidos FFPE representa um grande desafio, uma vez que a fixação com formaldeído resulta em *crosslinking* intra e intermolecular, responsável pela sua grande capacidade de preservação, mas que, ao mesmo

tempo, limita a eficiência na extração de proteínas e gera resultados ambíguos na identificação por espectrometria de massas.

O formaldeído reage com grupos amino dos aminoácidos básicos, como a lisina, asparagina, arginina, histidina e glutamina, levando a formação de adutos de metilol altamente reativos (XU et al., 2008), o que favorece a condensação de grupos metilol com amidas ou outros grupos, resultando em pontes de metileno que fazem ligações cruzadas com cadeias polipeptídicas (*cross-link*). No caso de aminas primárias, o grupo metilol formado é parcialmente desidratado resultando na formação de "bases de Schiff" instáveis que podem fazer ligações cruzadas com resíduos de glutamina asparagina, triptofano, histidina, arginina, lisina, cisteína e tirosina (FOX et al., 1985; PUCHTLER; MELOAN, 1985).

Duas estratégias principais têm sido utilizadas para contornar essas dificuldades e, assim, acessar o grande número de informações presentes nesse tipo de matriz. Uma delas baseia-se na digestão proteolítica e na caracterização da complexa mistura peptídica resultante com de equipamentos sofisticados, como espectrometria de massas de alta resolução ou cromatografia bidimensional acoplada a espectrômetros de massas em tandem. A outra abordagem baseia-se na reversão dos *crosslinks* através de um tratamento adequado da amostra e assim recuperando as proteínas para seu estado inicial, o que possibilita a utilização de plataformas analíticas mais comumente disponíveis, como a eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida (2-D PAGE) (ADDIS et al., 2009a) (ADDIS et al., 2009b).

1.2. Análise proteômica por 2-D PAGE-MS

O método de separação de proteínas em gel bidimensional (2DE) é baseado em uma combinação ortogonal de duas propriedades: o estado de cargas e a massa molecular. Na primeira dimensão, as proteínas são separadas pela sua capacidade de protonação, por meio de seu ponto isoeletrico (pI) e, na segunda dimensão, pelo seu tamanho, por meio da massa

molecular relativa (Mr) (BISCH, P. M, 2004). A identificação de proteínas diferencialmente expressas evidenciadas na 2DE é realizada pela técnica de espectrometria de massas (MS), técnica analítica que caracteriza moléculas pela mensuração das massas de seus íons. Algumas de suas aplicações são: identificação rápida de componentes de uma mistura complexa de proteínas, sequenciamento de proteínas e ácidos nucleicos, análise de modificações pós-traducionais ou substituições e monitoramento da troca hidrogênio-deutério para obter informação sobre a conformação estática e dinâmica das proteínas (LESK, 2005).

A proteômica é uma abordagem interessante, uma vez que, ela pode avaliar modificações pós-traducionais, interações proteína-proteína (interactôma), bem como processos funcionais e dinâmicos dentro da célula. Por meio da 2DE, acompanhada de análise por espectrometria de massas, já é possível a distinção entre um paciente saudável e um diagnosticado com câncer. Entretanto, com as tecnologias disponíveis é possível obter uma medicina mais precisa e personalizada com melhora de sobrevida dos pacientes. Transformações de células malignas envolvem alterações na expressão de proteínas com subsequente proliferação clonal das células alteradas. Essas alterações podem ser monitoradas a nível de proteínas, ambas quali e quantitativamente. A presença de certas proteínas (perfil exclusivo ou assinatura molecular) relacionadas ao câncer fornece informação valiosa que pode ser considerada para um diagnóstico e prognóstico mais efetivo e predição das respostas à terapia (CHO, 2007).

1.3. Câncer Colorretal (CCR)

As neoplasias malignas são responsáveis por mais de um sexto das mortes registradas no país, sendo a segunda maior causa de óbitos com causa conhecida desde 2003, notificadas em 2007 no Sistema de Informações sobre Mortalidade. Segundo as estimativas para 2014,

Tabela 1, a ocorrência será de quase 580.000 casos novos de câncer, sendo mais de 300.000 para o sexo masculino e mais de 274.000 para o feminino. Estima-se que o câncer de pele do tipo não melanoma (114.000 casos novos) será o mais incidente na população brasileira, seguido pelos tumores de próstata (68.800), mama feminina (57.000), cólon e reto (28.000), pulmão (28.000), estômago (21.000) e colo do útero (18.000).

Tabela 1 - Tipos de câncer mais incidentes na população brasileira - estimativa para 2014.

Localização Primária da Neoplasia Maligna	Estimativa dos Casos Novos							
	Homens				Mulheres			
	Estado		Capitais		Estado		Capitais	
	Casos	Taxa Bruta	Casos	Taxa Bruta	Casos	Taxa Bruta	Casos	Taxa Bruta
Próstata	68.800	70,42	17.540	82,93	-	-	-	-
Mama Feminina	-	-	-	-	57.120	56,09	19.170	80,67
Colo do Útero	-	-	-	-	15.590	15,33	4.530	19,20
Traqueia, Brônquio e Pulmão	16.400	16,79	4.000	18,93	10.930	10,75	3.080	13,06
Cólon e Reto	15.070	15,44	4.860	22,91	17.530	17,24	5.650	23,82
Estômago	12.870	13,19	2.770	13,07	7.520	7,41	2.010	8,44
Cavidade Oral	11.280	11,54	2.220	10,40	4.010	3,92	1.050	4,32
Laringe	6.870	7,03	1.460	6,99	770	0,75	370	1,26
Bexiga	6.750	6,89	1.910	8,91	2.190	2,15	730	2,97
Esôfago	8.010	8,18	1.460	6,76	2.770	2,70	540	0,00
Ovário	-	-	-	-	5.680	5,58	2.270	9,62
Linfoma de Hodgkin	1.300	1,28	410	5,72	880	0,83	420	8,64
Linfoma não Hodgkin	4.940	5,04	1.490	6,87	4.850	4,77	1.680	7,06
Glândula Tireoide	1.150	1,15	470	1,76	8.050	7,91	2.160	9,08
Sistema Nervoso Central	4.960	5,07	1.240	5,81	4.130	4,05	1.370	5,81
Leucemias	5.050	5,20	1.250	5,78	4.320	4,24	1.250	5,15
Corpo do Útero	-	-	-	-	5.900	5,79	2.690	11,24
Pele Melanoma	2.960	3,03	950	4,33	2.930	2,85	1.150	4,57
Outras Localizações	37.520	38,40	9.070	42,86	35.350	34,73	8.590	36,49
Subtotal	203.930	208,77	51.100	241,30	190.520	187,13	58.710	248,46
Pele não Melanoma	98.420	100,75	19.650	92,72	83.710	82,24	22.540	95,26
Todas as Neoplasias	302.350	309,53	70.750	334,08	274.230	269,35	81.250	343,85

Fonte: Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (2014)

O câncer colorretal (CCR) é a segunda causa de morte relacionada ao câncer, com aproximadamente 500.000 mortes por ano em países desenvolvidos. Em âmbito nacional, é o quarto tipo mais frequente em homens e o terceiro em mulheres, embora dados mostrem uma tendência crescente da incidência dessa doença na população brasileira. É uma doença tratável e com grandes chances de cura se diagnosticada precocemente (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA, 2014).

A colonoscopia é o método mais comumente utilizado para a detecção de CCR, pois é o único que permite a visualização de todos os segmentos do intestino grosso e também a realização de biópsia, caso seja necessária. Entretanto, apresenta algumas limitações, sendo duas bem relevantes: *i*) necessidade de a luz intestinal estar limpa, sem resíduos fecais, o que só é conseguido após um preparo rigoroso, com dieta e laxativos, nos dias que antecedem a realização do exame; *ii*) é examinador-dependente, ou seja, dependem da experiência do profissional em localizar as alterações anatômicas, e ainda da habilidade em selecionar o melhor local para a realização da biópsia. Portanto, o desenvolvimento de um método rápido e sensível para o diagnóstico do câncer colorretal é extremamente importante.

Outros exames prévios para a averiguação da doença são *i*) a determinação de sangue oculto em fezes, *ii*) a retossigmoidoscopia e *iii*) o enemaopaco. Os exames de rastreamento reduzem a incidência de CCR em cerca de 20% e a mortalidade em cerca de 30% (ATKIN et al., 2010). Entretanto, a incidência de neoplasia nos intervalos entre as avaliações permanece, sendo necessário o desenvolvimento de novas ferramentas para a detecção precoce (IMPERIALE et al., 2008).

O CCR desenvolve-se em um complexo processo de ganhos sequenciais de modificações genéticas que alteram o epitélio da luz intestinal para displasia e, finalmente, para uma neoplasia invasora. Ocorre ganho de função (seja por mutação, seja por hiperexpressão) de oncogênese, e perda de função dos genes supressores tumorais. As múltiplas alterações genéticas determinam o desenvolvimento e progressão tumoral e tem impacto no prognóstico e na resposta aos tratamentos (MARKOWITZ; BERTAGNOLLI, 2009).

As neoplasias limitadas à parede intestinal (estágios I e II) são frequentemente curáveis, mas podem progredir para metástases nos linfonodos (estágio III) ou à distância (estágio IV) (DEVITA et al., 2011). Os pacientes com a doença confinada à parede do intestino apresentam taxas de cura da ordem de 85-90%. Dos pacientes com doença em

estágio III, pelo menos 30% vão apresentar recorrência da doença a despeito de receberem tratamento com cirurgia e quimioterapia. Os pacientes com doença em estágio IV são geralmente incuráveis (JEMAL et al., 2009; GUNDERSON et al., 2010).

A quimioterapia tem diversas funções no tratamento do CCR, e os avanços obtidos nos últimos 20 anos propiciaram ganhos numericamente pequenos, mas importantes, no prognóstico dos pacientes (KOPETZ et al., 2009). Para aqueles com doença em estágio I (doença limitada pela muscular própria do intestino grosso), a cirurgia é o tratamento de escolha, e oferece cura em mais de 90% dos casos. Para os pacientes com doença em estágio II (doença que ultrapassa a muscular própria, mas sem invadir órgãos adjacentes e sem gerar metástases nodais), a cirurgia é curativa na maior parte dos casos, e a quimioterapia é oferecida apenas nos casos em que fatores de mau prognóstico são encontrados (DEVITA et al., 2011). O estudo clínico randomizado QUASAR foi o primeiro estudo que individualmente mostrou benefício da realização de quimioterapia adjuvante para CCR em estágio II. Nesse estudo, o ganho absoluto em cinco anos foi de 3,6% favorecendo o grupo que recebeu quimioterapia ($p < 0,008$) (QUASAR COLLABORATIVE GROUP et al., 2007). Análise combinada de 18 estudos de fase III mostrou um ganho absoluto de 5,4% na sobrevida em 8 anos ($p < 0,026$) (SARGENT et al., 2005). O ganho com quimioterapia adjuvante parece ser numericamente pequeno, e nestas circunstâncias existe provavelmente um subgrupo dos pacientes com CCR em estágio II em que o benefício seja maior, e talvez até um subgrupo que não se beneficie do tratamento adjuvante.

Recentemente, a análise de tecido tumoral de pacientes recrutados para cinco estudos randomizados, que avaliaram a eficácia do tratamento quimioterápico adjuvante com 5-fluorouracila, demonstrou que a presença de regiões microssatélites, em cerca de 10-20% dos pacientes com CCR esporádico, no qual confere resistência às fluoropirimidinas, além de permitir a identificação de um subgrupo que certamente não se beneficia do tratamento pós-

operatório (SARGENT et al., 2010). Outros marcadores parecem ter importância para a estratificação do pacientes em grupos de melhor ou pior prognóstico, a ainda na predição de benefício com determinados quimioterápicos.

1.4 Biomarcadores para diagnóstico, prognóstico e escolha do tratamento

O progresso da proteômica recente tem aberto novos caminhos para a descoberta de biomarcadores relacionados ao câncer. Seus avanços estão contribuindo para o entendimento da fisiopatologia da neoplasia, diagnóstico do câncer e descobertas de drogas anti-câncer, além de suas técnicas serem particularmente úteis para promover o entendimento de mecanismos de fenótipos complexos como o do CCR, pois fornecem informações a nível pós-traducional. Entretanto, devido às várias restrições biológicas e experimentais, métodos proteômicos podem buscar somente um número limitado de proteínas e isoformas presente em células e tecidos. Assim, uma alternativa para contornar essa limitação é a integração de dados proteômicos com genômicos, tal como medidas de expressão por microarranjos. Esta abordagem pode levar a identificação de caminhos e sub-redes moleculares que implicam no CCR. Alguns estudos sugerem que genes relacionados ao câncer tendem a se organizar em sub-redes conectadas de interações de proteínas (interactoma). Desta forma, genes relacionados ao câncer podem co-regular a expressão de outras proteínas e gerar um dano ao metabolismo do indivíduo.

Como um importante indicador biológico de câncer, os biomarcadores representam um alvo molecular poderoso para monitorar o estágio da doença e avaliar a eficácia e a segurança dos novos agentes terapêuticos. Desse modo, o uso de biomarcadores representa uma potencial promessa para a otimização da eficácia dos tratamentos oncológicos, sendo

utilizados como importantes ferramentas para o diagnóstico, prognóstico e no auxílio na tomada de decisão quanto ao tipo de tratamento a ser seguido.

Um marcador de prognóstico refere-se às características do tumor que podem ser usadas para estimar o prognóstico do paciente independente da terapia escolhida (ex., taxa de sobrevivência diferente se marcador é positivo ou negativo). Marcadores de previsão são úteis para definir o tipo mais adequado de terapia, prevendo, por exemplo, qual tipo e combinação de quimioterápicos deve obter melhor resposta quanto ao estado clínico do paciente. Alguns desses marcadores, como o EGFR (receptores de tirosina-quinase) e K-ras, já são utilizados rotineiramente em hospitais como o Hospital de Câncer de Barretos (HCB). Além disso, os biomarcadores podem ter grande impacto na oncologia clínica, especialmente se forem detectados antes dos sintomas clínicos ou se permitirem o monitoramento em tempo real de respostas aos medicamentos. Alguns biomarcadores já foram identificados em tecidos com CCR, embora haja poucos estudos correlacionando-os com os fatores de risco. Dentre esses destacam-se os APC, p53 e K-ras e outros descritos a seguir:

Gene Adenomatous polyposis coli (gene apc): Este gene regula a proliferação e adesão celular, e é comumente conhecido como um gene supressor de tumor que previne a carcinogênese colorretal. Mutações nesse gene estão envolvidas em cerca de 60 a 80% de cânceres colorretais esporádicos. A inativação do gene apc, localizado no cromossomo 5q21, é reconhecido como um evento inicial do processo de carcinogênese colorretal (HABERMANN et al., 2008). Mutações APC são consideradas marcadores de detecção precoce, pois aproximadamente 100% dos indivíduos com estas mutações desenvolverão CCR no futuro (SRIVASTAVA et al., 2001).

Gene K-ras: É o gene mais frequentemente mutado da família RAS, com mutações em aproximadamente 40-50% dos adenomas e carcinomas colorretais (HOWE; GUILLEM, 1997). Devido à alta frequência desta mutação e o aparecimento no início do CCR, este

biomarcador é considerado importante em diagnósticos precoces (SERVOMAA et al., 2000). A proteína K-ras está envolvida na sequência de mutações relacionadas ao CCR. Sendo um elemento da transdução do sinal membrana-núcleo com função de estímulo à proliferação celular (proto-oncogene), sua mutação poderá levar a um estado de estimulação à divisão celular constante, alterando o equilíbrio entre produção e morte celular, e contribuindo para o desenvolvimento da neoplasia (PINHO, 1999; SERVOMAA et al., 2000). Observa-se um aumento no risco de morte e agressividade associado a mutações K-ras (ANDREYEV et al., 1998). Além disso, a presença de mutantes nesse gene pode predizer uma baixa resposta a quimioterapia (CEROTTINI et al., 1998).

Gene p53: Localizado no cromossomo 17, o p53 é considerado um dos mais importantes genes supressores tumorais, com várias funções essenciais como iniciação da apoptose, reparo de DNA e controle do ciclo celular (VOUSDEN, 2000). Apresenta função supressora de tumores através da detecção e correção de mutações genéticas. Estudos contínuos foram realizados em tumores colorretais buscando correlacionar a presença de mutações da proteína p53 com o prognóstico do paciente (KRESSNER et al., 1999, p. 53). A maior parte destes trabalhos sugere que pacientes cujos tumores apresentam mutações da proteína p53 resultam em menores índices de sobrevida, confirmando um valor prognóstico significativo para esta mutação.

Outra linha de estudo importante diz respeito ao papel da proteína p53 na eficácia do tratamento quimioterápico. Confirmando a hipótese de que esta proteína é considerada essencial para a indução da apoptose em células comprometidas pela quimioterapia, diversos trabalhos demonstraram uma redução da quimiossensibilidade em tumores portadores de mutações no gene p53 (PINHO, 1999).

Gene bcl-2: O produto do gene bcl-2 (Bcl-2) é uma proteína de 26 kDa que tem a função de inibir a apoptose. Em pacientes com CCR, a expressão da proteína Bcl-2 demonstrou-se como

um fator prognóstico favorável em algumas populações, como a germânica e a australiana (SRIVASTAVA et al., 2001).

Genes MMR: O conjunto de genes envolvidos é composto por: hMSH2, hMLH1, hMSH3 e hMSH6. Aproximadamente 15% dos CCR's apresentam alteração no reparo do DNA (MMR – *mismatch repair gene*). Mutações nestes genes produzem instabilidade das sequências microssatélites (MSI – *microsatellite instability*) e predisõem os indivíduos ao CCR. Perdas dos MMR elevam (100 a 1000 vezes) a frequências dos pontos de mutação (fenótipo mutante) e mutações de deslocamento no MSI.

Quinases: A família de tirosinas quinases inclui muitos oncogenes conhecidos e receptores de fator de crescimento que têm sido relacionados à patogênese do câncer humano e mostram-se ativos no estágio inicial da tumorigênese do cólon (KITAMURA et al., 1989). As tirosinas quinases exercem o controle do crescimento celular pela fosforilação dos resíduos de tirosina nas proteínas. Outras dessas proteínas também funcionam como receptores da superfície celular, como a HER-2/neu.

Quinases dependentes de ciclinas (CDKs) compreendem uma família de proteínas que pode ser subdividida em dois grupos funcionais majoritários, baseados em sua função no ciclo celular e/ou controle transcricional. Já foram identificadas 13 CDKs humanas (CDK1-CDK13). A CDK2 é o membro melhor caracterizado, funcional e estruturalmente. As CDKs 7, 8, 9, 10 e 11 são importantes reguladores transcricionais. O fator geral de transcrição TFIIF contém a CDK7-ciclina H e o complexo de proteínas associado aos hormônios da tireóide contém a CDK8-ciclina C. A CDK9-ciclina T1 pertence ao fator de alongação da transcrição P-TEFb, conhecidos por fosforilar o CTD da subunidade maior da RNAP II, tão bem quanto os passos subsequentes da expressão gênica. Os complexos da CDK10 se associam com fatores de transcrição Ets, e a CDK11 associa-se com a CDK2, e está envolvida com excisão de RNA, além de também ser um regulador transcricional.

Proteína DCC (Deleted in Colorectal Cancer): Sua função normal está relacionada à comunicação e a fixação entre as células. Estudos sucessivos demonstram que sua desativação por mutação representa um evento tardio no processo de carcinogênese. Dentre todos os marcadores moleculares, a proteína DCC apresenta-se como a de maior potencial para a aplicabilidade clínica uma vez que sua inativação tem sido relacionada a um aumento significativo do potencial metastático tumoral com redução significativa da sobrevida dos pacientes.

O câncer surge do acúmulo de mutações no DNA e as principais alterações ocorridas nos genes que controlam a proliferação celular são os proto-oncogenes e genes supressores tumorais e os genes de reparo de danos no DNA. No caso dos tumores de cólon, apenas 6,6% dos indivíduos apresentaram mutações nos genes APC, K-ras e TP53, sugerindo que alterações alternativas, além das comumente encontradas, podem estar envolvidas na gênese dos tumores do cólon (OJOPI, 2004).

2. OBJETIVOS

2.1. Gerais

Sinais clínicos escassos nos estágios iniciais do CCR e técnicas insuficientes de diagnóstico disponíveis, atualmente, são os fatores mais significantes para explicar a baixa taxa de sobrevivência ao câncer. A descoberta de novos biomarcadores, que possibilitem diagnósticos por técnicas moleculares não invasivas e de forma rotineira, é altamente desejável.

Com o objetivo de viabilizar o estudo de biomarcadores protéicos de tecidos FFPE e, assim, acessar o vasto número de informações contidas nos bancos tumorais, este trabalho visa o desenvolvimento de métodos de desparafinização, extração de proteínas e reversão de *cross-link* entre elas, para uso em conjunto de técnicas comumente disponíveis, como a análise por eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida e espectrometria de massas. As etapas ilustradas na Figura 1 representam os objetivos específicos deste trabalho.

2.2. Específicos

- Otimização das etapas de desparafinização e preparo de amostras dos tecidos com CCR FFPE;
- Testes de extração de proteínas, utilizando diferentes tampões e em diferentes condições;
- Otimização de *Clean-up*;
- Separação das proteínas por eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE);
- Separação das proteínas por 2-DE;
- Identificação das proteínas por espectrometria de massas;

Figura 1. Esquema representando as etapas para o estudo proteômico de tecidos FFPE.

Fonte: Autoria própria.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Amostras biológicas

3.1.1. Amostras de carne suína FFPE

Para a padronização da metodologia, foram utilizadas amostras de tecido suíno, cedidas pela empresa Nature Lab Pesquisas e Análises Ltda, estabelecida na cidade de São Carlos. As amostras foram fornecidas em pares dos mesmos tecidos, sendo uma metade FFPE e a outra fresca, obtendo-se, desse modo, um padrão para a metodologia estudada. As amostras FFPE foram armazenadas em temperatura ambiente, e as frescas a -80°C .

3.1.2. Amostras de tecido de CCR FFPE e de CCR frescas

As amostras utilizadas neste projeto foram obtidas após a assinatura do termo de consentimento pelos pacientes e fornecidas pelo Departamento de Oncologia Clínica, Hospital de Câncer de Barretos (HCB) após aprovação do comitê de ética.

Esses tecidos foram extraídos por intervenção cirúrgica do tumor ou pólipos e as metades de cada uma das amostras foram fixadas em formaldeído e embebidas em parafina – processo padrão para biopsias. Os blocos de amostras resultantes foram estocados por até dois meses, à temperatura ambiente, até que cada tentativa de otimização de metodologia fosse iniciada. As metades remanescentes de cada uma das amostras foram mantidas em nitrogênio líquido por 20 a 30 min e, posteriormente, estocadas a -80°C até o momento de sua utilização. Dessa maneira, obtiveram-se amostras frescas que foram utilizadas como padrão para as amostras FFPE.

3.2. Desparafinização e reidratação das amostras FFPE

Na primeira etapa do processo de desparafinização das amostras FFPE, utilizou-se estilete para a remoção do excesso de parafina do bloco. Para o remanescente, duas abordagens foram testadas, sendo uma a maceração na presença de nitrogênio (N_2) líquido até a obtenção de um pó e a outra pela divisão da amostra em pequenos filetes de aproximadamente 1 mm de espessura.

Para ambas as abordagens, aplicaram-se as mesmas etapas subsequentes, sendo a etapa seguinte o teste de solventes para a remoção da parafina por solubilização. Três solventes foram testados: hexano, octano e xilol. O volume aplicado foi de aproximadamente 1,5 vezes o volume da amostra, sob agitação em vórtex por 2 min em duas abordagens distintas, sendo uma à temperatura ambiente, e a outra aquecidos a 60 °C. Após a agitação, as amostras foram centrifugadas a temperatura ambiente por 10 min e à $12.000 \times g$ e o sobrenadante descartado, repetindo-se três vezes essa etapa para as amostras maceradas. Para as amostras em filetes, o processo foi repetido até que nenhum resíduo de parafina fosse visualmente detectável.

Em seguida, de acordo com o protocolo de Addis et al. (2009), as amostras foram reidratadas em uma série de banhos com etanol de concentração decrescente, de 5 minutos cada, começando com etanol absoluto, passando por etanol 95% e então por etanol 85%. Entre os banhos e ao final do processo, as amostras foram centrifugadas por 5 min, à $12.000 \times g$ e temperatura ambiente. Após a última centrifugação, os sobrenadantes foram descartados e as amostras foram secadas a temperatura ambiente.

3.3. Extração de proteínas

3.3.1. Extração de proteínas por aquecimento em tampão dodecil sulfato de sódio (SDS)

Após a desparafinização, 200 mg do tecido macerado e 200 mg do tecido em filete, seguiram as mesmas etapas subsequentes. Foram ressuspensos em 1500 μ L de tampão de extração contendo Tris 20 mM pH 8,8, SDS 2% (m/v) e Ditioneitol (DTT) 200mM, de acordo com Addis et al., (2009), e agitados para homogeneização. Em seguida, iniciou-se o aquecimento, 20 minutos à 100 °C e 2 horas à 80 °C, com agitação de 680 rpm. Finalizada a extração, as amostras foram centrifugadas à 12.000 $\times$ g por 10 min à 4 °C para a sedimentação e descarte do tecido lisado. Os sobrenadantes que seriam submetidos à eletroforese bidimensional foram submetidos à precipitação para concentração e remoção de interferentes.

3.3.2. Extração de proteínas com aplicação de ultra-som e em tampão SDS

A extração utilizando ultrassom, tipo sonda ou ponteira, seguiu o mesmo protocolo citado em 3.3.1, substituindo-se a etapa de aquecimento pela aplicação de 14 pulsos de ultrassom com amplitude de 10% e duração de 10 segundos, com um intervalo de 45 segundos entre um pulso e outro. Para evitar o aquecimento, todo o processo de sonicação foi realizado em banho de gelo. Finalizada a extração, as amostras foram centrifugadas a 12.000 $\times$ g por 10 min a 4 °C para a sedimentação e descarte do tecido lisado. Os sobrenadantes que passariam por eletroforese bidimensional foram submetidos à precipitação para concentração e remoção de interferentes.

3.3.3. Extração de proteínas por aquecimento outros detergentes

Seguindo os mesmos protocolos anteriores, com aquecimento ou ultrassom, substituiu-se o tampão com SDS por tampões com detergentes zwitterionico como o (3-[(3-

colamidopropil)dimetilamônio]-1propanosulfonato (CHAPS) ou não-iônicos como o Triton. O primeiro contendo 4% (m/v) de CHAPS, 20 mM de TRIS e 200 mM de DTT, e o segundo contendo 4% (m/v) de CHAPS, 1% (v/v) de Triton, 20 mM de TRIS e 200 mM de DTT.

3.3.4. Extração de proteínas com o kit comercial Qproteome FFPE Tissue (Qiagen)

Para efeito comparativo, uma das alternativas comerciais disponíveis - kit Qproteome FFPE Tissue (Qiagen) - foi testada de acordo com o protocolo que acompanha o produto. Para uma massa de 0,03 mg de amostra, desparafinizada previamente de acordo com o protocolo do fabricante, foi adicionado 100 μ L de tampão de extração EXB (Qiagen), agitado em vórtex por 1 min e incubado em gelo por 5 min. Em seguida, a amostra foi novamente agitada em vórtex por 1 min e incubada à 100 °C por 20 min e 80 °C por 2 horas com agitação de 680 rpm. Após a mistura foi mantida em gelo por 1 min e centrifugada por 15 min à $13.000 \times g$ a 4 °C. O sobrenadante contendo as proteínas extraídas foi armazenado a -80 °C.

3.4. Precipitação das proteínas para remoção de interferentes

Na etapa de extração, as amostras foram submetidas à ação de detergentes e agentes redutores, os quais interferem na etapa de focalização isoeletrica – primeira dimensão da separação por eletroforese bidimensional. Para a remoção desses interferentes, foram testados três protocolos de precipitação.

3.4.1. Precipitação das proteínas com acetona

Os extratos de proteínas obtidos foram precipitados com acetona gelada. Para 1 volume de extrato de proteína em tampão de extração, foram adicionados 9 volumes de acetona à $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. A mistura foi agitada em vórtex por 30 segundos e incubada a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ por pelo menos 2 horas, seguindo para centrifugação à $10.000 \times g$ à $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 10 min. O sobrenadante foi removido e o passo descrito acima repetido. O sobrenadante foi descartado, o precipitado foi seco ao ar a temperatura ambiente.

3.4.2. Precipitação das proteínas com TCA/acetona

Os extratos de proteínas obtidos foram precipitados com uma solução 10% (v/v) TCA em acetona. Para 1 volume de extrato de proteína em tampão de extração, foram adicionados 10 volumes da solução de TCA/acetona. A mistura foi agitada em vórtex por 30 segundos e incubada à $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ por pelo menos 2 horas, seguindo para centrifugação à $10.000 \times g$ à $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 10 min. O sobrenadante foi removido, o precipitado lavado com acetona à $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ e centrifugado à $10.000 \times g$ à $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 15 min. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi seco ao ar a temperatura ambiente.

3.4.3. Precipitação das proteínas com etanol

Os extratos de proteínas obtidos foram precipitados com etanol absoluto gelado. Para 1 volume de extrato de proteína em tampão de extração, foram adicionados 9 volumes de etanol gelado. A mistura foi agitada em vórtex por 30 segundos e incubada a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 12 horas. Em seguida, a mistura foi centrifugada à $10.000 \times g$ à $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 10 min. O sobrenadante

foi removido, o precipitado lavado com etanol 90% (v/v) à $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ e centrifugado a $10.000 \times g$ à $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 15 min. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi seco ao ar a temperatura ambiente.

3.5. Quantificação das proteínas

A quantificação das proteínas extraídas foi realizada tanto para as amostras que passaram por precipitação como também para as que seguiram direto, sem precipitação, para a separação em SDS-PAGE. O procedimento seguido para ambos os casos foi o mesmo, exceto pela necessidade da ressuspensão dos precipitados em solução de reidratação contendo 7 M uréia, 2 M tiouréia, 2% (m/v) CHAPS e 10 mg mL^{-1} de DTT. Uma pequena alíquota foi separada para a determinação da concentração de proteínas utilizando-se o 2-D Quant Kit (GE Healthcare).

O kit usa íons de cobre, os quais se ligam de forma específica às proteínas. O cobre não ligado às proteínas reage com um agente colorimétrico e a densidade da coloração resultante é inversamente proporcional a concentração das proteínas na solução. Utilizando-se albumina de soro bovino (BSA) – proteína padrão do kit – construiu-se uma curva analítica, onde a absorbância é inversamente proporcional a concentração das proteínas.

Seguindo a orientação do fabricante, à $20\text{ }\mu\text{L}$ de amostras foram adicionados $500\text{ }\mu\text{L}$ do precipitante que acompanha o kit, agitou-se rapidamente e manteve-se por 3 min à temperatura ambiente. Em seguida, $500\text{ }\mu\text{L}$ do co-precipitante foram adicionados, misturados rapidamente por inversão e os sobrenadantes descartados após a centrifugação à $12.000 \times g$, por 5 min e à temperatura ambiente. Os *pellets* resultantes foram ressuspensos com $100\text{ }\mu\text{L}$ da solução de cobre do kit e $400\text{ }\mu\text{L}$ de água deionizada. Por fim, 1 mL do agente colorimétrico foi adicionado as amostras, as quais seguiram para leitura da absorbância a 480

nm após incubação de 20 min. A etapa de precipitação do kit remove interferentes e torna o método de quantificação compatível com os tampões de extração utilizados nesse trabalho.

3.6. SDS-PAGE - Análise proteômica qualitativa e separação das proteínas para aplicação em LC/MS

3.6.1. Preparo do gel de separação 12,5% (m/v)

O gel de 12,5 % (m/v) foi preparado partindo-se de 4,125 μ L de solução de monômeros de acrilamida 30% (m/v), adicionando 2,5 mL de solução de Tris base 1,5 mM pH 8,8, 100 μ L de SDS 10% (m/v), 3,19 mL de água deionizada, 3,3 μ L de TEMED (Sigma) e 50 μ L de persulfato de amônio 10% (m/v). Após agitação suave, a mistura foi vertida entre as placas de vidro do sistema mini gel "miniVE-Vertical Electrophoresis System" (GE Healthcare) para polimerização a temperatura ambiente.

3.6.2. Preparo do gel de empilhamento 4,5% (m/v)

Após a polimerização do gel de separação, foi preparado o gel de concentração partindo-se de 372 μ L de solução de monômeros de acrilamida 30% (m/v), adicionando 155 μ L de solução de Tris base 2 mM pH 6,8, 25 μ L de SDS 10% (m/v), 1,92 mL de água deionizada, 6,2 μ L de TEMED (Sigma) e 25 μ L de persulfato de amônio 10% (m/v). Após breve agitação suave, essa mistura foi rapidamente vertida sobre o gel de separação e rapidamente o pente fornecido com o equipamento foi usado para a formação das canaletas.

3.6.3. Migração eletroforética

Para a etapa de SDS-PAGE, alíquotas de 5 μL de solução de proteínas foram adicionadas a alíquotas de 10 μL de tampão de amostra (10 % (v/v) glicerol, 5 % (v/v) β -mercaptoetanol, 2,3% (m/v) SDS e 0,0625 M Tris-HCl pH 6,8) e as soluções resultante foram aquecidas à 99 °C por 5 min. Em seguida, as soluções foram aplicadas nas canaletas de gel de empilhamento – já previamente preenchidas com tampão de corrida (200 mM Tris pH 8,8, 1,92 M Glicina, 1% (m/v) SDS) – e submetidas a uma diferença de potencial de até 600 V regulada automaticamente pelo sistema “miniVE-Vertical Electrophoresis System”(GE Healthcare) de tal forma que a corrente atingisse 10 mA por 15 min e 15 mA até o final da análise.

Ao final da análise, os géis foram imediatamente imersos em solução fixadora (40% (v/v) etanol, 10% (v/v) ácido acético em água deionizada) por 30 min, de modo a impedir a difusão das proteínas e assim impedir a diminuição da resolução dos géis.

3.7. Análise proteômica qualitativa por eletroforese bidimensional

3.7.1 Focalização Isoelétrica (1ª Dimensão)

Para a etapa focalização, os pellets obtidos na etapa de precipitação foram ressuspensos em tampão de reidratação (7 M uréia, 2 M tiouréia, 2% (m/v) CHAPS, 0,5% IPG 3-10 não linear, 10 mg mL^{-1} DTT). As fitas de gradiente de pH de 3 a 10 não linear (IPG) foram reidratadas com essa solução por 12 horas a temperatura ambiente, observando-se os volumes máximos e as quantidades máximas de proteínas para cada fita. Para as fitas de 7 cm (*Immobiline DryStrip* pH 3-10NL, 7 cm - GE Healthcare) o volume final foi de 125 μL com até 60 μg de proteínas. Para as fitas de 18 cm (*Immobiline DryStrip* pH 3-10NL, 18 cm - GE

Healthcare), o volume de extrato utilizado para a reidratação foi de 340 μ L contendo no máximo 250 μ g de proteínas.

A focalização das proteínas foi realizada em sistema Ettan IPGphor III (GE Healthcare) à temperatura de 20 °C com corrente máxima restringida a 50 μ A por fita para as fitas de 7 cm. A seguinte condição de corrida foi usada: 100 V por 2 h, 300 V por 1 h, 1000 V por 1 h, 5000 V por 1 h, rampa de 5000 V a 8000 V em 1 h, 8000 V por 2 h; resultando em aproximadamente um acúmulo de 25000 Vh. Após a focalização isoeletrica, as fitas foram utilizadas imediatamente ou estocadas a -80 °C até a utilização.

3.7.2 SDS-PAGE (2ª dimensão)

As fitas contendo as proteínas separadas por ponto isoeletrico passaram por condicionamento em 2,5 mL de solução de equilíbrio (75 mM Tris pH 8,8, 6 M ureia, 30 % (v/v) glicerol, 2% (v/m) SDS e 0,002% (m/v) de azul de bromofenol), em duas etapas à temperatura ambiente e com leve agitação, para a redução e alquilação dos grupos tiol das proteínas. Na primeira, para a redução, as fitas foram imersas em solução de equilíbrio contendo 10 mM de DTT por 15 min. Na segunda, para a alquilação, as fitas foram submetidas à solução de equilíbrio contendo 25 mM de iodoacetamida (IAA) por 15 min.

Após o equilíbrio, as fitas foram transferidas para os cassetes de SDS-PAGE, ficando em contato com os géis de poliacrilamida a 12,5% (m/v) e seladas com agarose 0,5% (m/v) em tampão Tris-glicina (25 mM Tris, 192 mM glicina e 0,1% (m/v) SDS). As corridas foram realizadas utilizando o tampão Tris-glicina a 10 °C, aplicando uma diferença de potencial de até 600 V regulada automaticamente pelo sistema “*miniVE-Vertical Electrophoresis System*” (GE Healthcare) de tal forma que a corrente atingisse 10 mA por gel por 15 min e 15 mA por gel até o final da corrida.

Ao final da corrida, os géis foram imediatamente imersos em solução fixadora (40% (v/v) etanol, 10% (v/v) ácido acético em água deionizada) por 30 min, de modo a impedir a difusão das proteínas e assim impedir a diminuição da resolução dos géis.

3.8. Coloração das proteínas em gel

O procedimento de coloração das proteínas foi o mesmo tanto para a eletroforese uni e bidimensional. Ao final das corridas e após a fixação das proteínas, os géis foram transferidos para uma solução de corante por 30 min contendo *Coomassie Blue G-250* (Sigma) (0,1% (m/v) azul de coomassie, 25% (v/v) etanol, 5% (v/v) ácido acético, água deionizada), corante que apresenta boa reprodutibilidade, ligação quantitativa às proteínas e compatibilidade com espectrometria de massas (WESTERMEIER; R, 2005). Após a coloração, as proteínas foram reveladas pela remoção do corante não ligado a elas, através de diversas lavagens dos géis com solução descorante (10% (v/v) ácido acético, 20% (v/v) etanol) até que somente as bandas estivessem aparentes. Os géis foram digitalizados com *ImageScanner III* (GE Healthcare).

3.9. Digestões enzimáticas *in gel* para análise de peptídeos em MS

As raias contendo as bandas de proteínas foram recortadas com bisturi em 10 seguimentos de igual comprimento, picadas e os pedaços de gel descoloridos com uma solução 50% (v/v) acetonitrila (ACN) / 50% (v/v) água Milli-Q por 15 min por três vezes. O pH foi ajustado com NH_4HCO_3 100 mM, as proteínas foram reduzidas com 10 mM DTT em 100 mM NH_4HCO_3 por 30 min a 56 °C e alquiladas com 50 mM (IAA) em 50 mM NH_4HCO_3 por 20 min no escuro. Após, os pedaços de gel foram lavados com 50% (v/v) ACN em água,

desidratados com ACN e secos em *speedvac* à temperatura ambiente. Os géis secos foram tratados com tripsina grau sequenciamento (Sigma) 0,1 mg/mL em 50 mM NH_4HCO_3 por 45 min em gelo, após os pedaços foram completamente cobertos com 50 mM de NH_4HCO_3 e incubados *overnight* a 37 °C. No dia seguinte, os peptídeos gerados foram eluídos sonicando-se os géis em solução 50 mM de NH_4HCO_3 por 10 min e reservando-se o sobrenadante. Aos géis, foram adicionado 50 mM de NH_4HCO_3 suficiente para cobrir os géis, o processo foi repetido e o sobrenadante adicionado ao primeiro extraído. Após, os géis foram incubados por 15 min em 50% (v/v) ACN/50 mM de NH_4HCO_3 e o sobrenadante combinado com os previamente extraídos. Mais uma etapa de extração foi realizada incubando-se em solução 50% (v/v) ACN/5% (v/v) ácido fórmico e combinando-se o sobrenadante com os demais. Em seguida, a solução contendo os peptídeos eluídos foi concentrada em *speedvac* até um volume final de aproximadamente 3 μL , tomando cuidado para não secar completamente. Por fim, foi adicionado ao concentrado 10 μL de ácido fórmico 0,1% (v/v) e os peptídeos seguiram para *clean up* com *TopTip C18TT2* (Glygen) de acordo com o protocolo do fabricante.

3.10. Identificação das proteínas por Espectrometria de massas

Dez microlitros (10 μL) de cada amostra foram injetados individualmente em sistema de cromatografia líquida capilar (*nanoEasy LC Thermo Fisher Scientific*), utilizando coluna de 10 centímetros EASY-Column (75 μm ID, 3 μm , 120 Å, C18-A2). A cromatografia foi desenvolvida com gradiente linear de 5 a 35% (v/v) de acetonitrila/ácido fórmico 0,1% (v/v) por 45 min a um fluxo de 250 nL/min. O sistema cromatográfico foi acoplado a um espectrômetro de massas de alta resolução do tipo LTQ-Orbitrap Velos (Thermo-Finnigan) para aquisição de dados.

Os espectros foram adquiridos em modo dependente de dados na faixa de m/z de 400 a 1800 e os 10 íons mais abundantes de carga +2 ou +3 de cada espectro MS foram selecionados para fragmentação por CID (dissociação induzida por colisão) e análise MS/MS. Uma janela de exclusão de 45 segundos foi utilizada para eliminar redundância de sequenciamento de peptídeos mais abundantes.

Cada uma das injeções, correspondeu a cada um dos dez seguimentos que compunham uma raia excisada do gel de SDS-PAGE e foram analisadas individualmente no espectrômetro de massas. Em seguida, as informações resultantes de cada um destes seguimentos, foram combinadas em um único conjunto de dados para o processamento referente a totalidade da raia de partida.

Os dados foram processados pelo pacote de processamento de dados proteômicos Labkey server (Rauch et. al., 2006) que fornece automaticamente a lista de proteínas identificadas, a qual foi submetida ao algoritmo Peptide Prophet (Keller et al., 2002) que estima a probabilidade das proteínas listadas estarem presentes na amostra. Como banco de dados, foi utilizado o UniProt (atualização de abril de 2014), confrontados com sequenciamento humano, para identificação dos peptídeos e dos grupos de proteínas. Para uma maior confiabilidade dos resultados, foram desconsideradas as identificações com probabilidade de acerto menor que 90% e as que não apresentaram o mínimo de dois peptídeos únicos por proteína. A enzima usada foi a tripsina e o número de clivagens perdidas considerada foi de apenas uma. A única modificação fixa considerada as proteínas foi a carbamidometilação.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Desparafinização dos tecidos FFPE

A Figura 2 ilustra um bloco de tecido FFPE, resultado do processo de fixação com formaldeído e parafinização das amostras. As amostras, em blocos, apresentam grande quantidade de parafina que necessita ser removida completamente para os processos de eletroforese em gel. Diversos autores como Gräntzdörffer et al., (2010), Addis et al., (2009) e Scorsato (2010) descreveram o uso de solventes como xilol, hexano, octano e outros, como também o uso de aquecimento para uma remoção mais eficiente. Entretanto parece não haver um consenso e os métodos variam de acordo com a preferência do pesquisador.

Figura 2. Bloco de tecido FFPE

Fonte: Autoria própria

A etapa de desparafinização, iniciou-se pela remoção do excesso de parafina com bisturi. Para que o fator amostragem não impactasse de forma expressiva nos resultados, um *pool* de amostras foi preparado a partir de um grupo de amostras as quais foram cortadas em finos filetes de aproximadamente 1 mm de espessura, agitadas de modo que uma dispersão homogênea fosse obtida e então separadas em duas porções de massas iguais. Uma dessas

porções foi macerada em nitrogênio líquido antes da desparafinização e a outra seguiu ainda em filetes para os testes com as principais variáveis: solvente, temperatura e número de banhos. Para que o número de permutações não fosse excessivamente alto, somente um protocolo de extração foi utilizado para esse teste, utilizando aquecimento e tampão a base de SDS. A eficiência dos métodos de desparafinização pôde ser avaliada pela quantificação de proteínas extraídas e pela qualidade dos géis de SDS-PAGE gerados.

Tabela 2. Resumo dos resultados obtidos pela variação das diversas formas de tratamento pré-extração para os tecidos FFPE, apresentando como indicadores as concentração proteicas obtidas e, de forma ilustrativa, a qualidade dos géis obtidos.

		Número de Banhos	Solvente	Concentração ($\mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$)	Desvio Padrão (n=3)	SDS-PAGE
Amostras maceradas	Temperatura Ambiente	3	xilol	3	0,1
		8	xilol	2,9	0,3
		3	hexano	2,6	0,2
		8	hexano	2,3	0,2
		3	octano	2,5	0,3
		8	octano	2,6	0,3
	Aquecimento a 60 C	3	xilol	3,5	0,3
		8	xilol	3,9	0,4
		3	hexano	2,4	0,3
		8	hexano	2,3	0,30
		3	octano	2,5	0,2
		8	octano	2,5	0,2
Amostras em filetes	Temperatura Ambiente	15	xilol	2,1	0,4
		15	hexano	2,4	0,4
		15	octano	2,1	0,4
	Aquecimento a 60 C	8	xilol	2,5	0,4
		8	hexano	2,1	0,4
		8	octano	2,3	0,4

Fonte: Autoria própria

Exceto pelo uso do xilol, nenhuma outra variável apresentou ganho significativo na etapa de pré-extração. As amostras em filete apresentaram resultados similares de concentração, porém resultaram em géis de pior qualidade, além de demandarem uma quantidade muito maior de solvente para a desparafinização quando comparadas aos volumes aplicados às amostras maceradas. Da mesma maneira, o uso de aquecimento resultou em extratos com concentrações similares de proteínas, entretanto seus géis apresentaram maior arraste.

O uso de xilol ou hexano, à temperatura ambiente, mostrou-se como uma opção mais interessante, tanto em relação a concentração proteica extraída quanto pela qualidade dos géis SDS-PAGE gerados. Visando à maximização de proteínas extraídas sem detrimento a qualidade dos géis, elegeu-se as amostras maceradas e desparafinizadas com xilol sem aquecimento para os estudos subsequentes. Após a secagem do solvente e a reidratação em etanol, as amostras foram armazenadas em -80°C ou imediatamente processadas na etapa de extração de proteínas.

4.2. Otimização e padronização da extração de proteínas

Cada matriz é composta por um conjunto de característica de singularidades e com diferentes interferentes, não existindo assim um protocolo que seja geral e adequado a todos os tipos de amostras. Até a data presente, poucos autores relataram sucesso na extração de proteínas de tecidos FFPE que fossem compatíveis com técnicas como eletroforese bidimensional, *western blotting* e microarranjo de proteínas. O principal desafio envolve a reversão dos *crosslinks* entre proteínas - proteínas e entre proteínas - ácidos nucleicos (FOX et al., 1985). Becker et al. (2007) citaram um kit comercial (*Qproteome FFPE Tissue*) usado na extração de proteínas e relataram sucesso com seu uso em *western blotting* e microarrajo de proteínas, identificando e quantificando um importante receptor de tirosina quinase HER2, um

biomarcador associado a resposta ao tratamento à terapia à base de anticorpos. No mesmo ano, Gilbert et al. (2007), relatou a possível reversibilidade dessas ligações através de aquecimento e Addis et al., (2009) relatou sucesso nos resultados de eletroforese bidimensional e espectrometria de massas através da utilização de aquecimento e SDS no processo de extração.

4.2.1. Extração de proteínas com aquecimento e por ultrassom

Nesta etapa, o uso de aquecimento foi comparado com o uso de ultrassom, método comumente utilizado para de lise celular e extração de proteína, com o objetivo de visualizar os resultados em termos de eficiência de extração de proteínas e compatibilidade com os métodos de eletroforese.

O uso de detergentes diferentes também foi comparado. Eles melhoram a solubilização das proteínas evitando interações hidrofóbicas entre elas e assim, perda por agregação e precipitação, além de agirem diretamente na solubilização de proteínas normalmente insolúveis. O SDS é um detergente aniônico e se liga fortemente às proteínas, auxilia na lise celular e, com isso, na extração de proteínas. É o tensoativo mais utilizado devido ao seu potencial em solubilizar proteínas, principalmente à altas temperaturas (HARDER et al., 1999) e apesar de seu uso concomitante com eletroforese bidimensional ter sido relatado com sucesso para tecidos FFPE por Addis et al. (2009), o SDS aderido às proteínas ainda representa um forte interferente na etapa de separação por ponto isoelétrico (primeira dimensão da eletroforese bidimensional). Desse modo, detergentes não iônicos como Triton X-100 ou zwitteriônicos como CHAPS foram investigados visando à substituição do SDS na etapa de extração.

4.2.2. Avaliação das metodologias por quantificação proteica e compatibilidade SDS-PAGE

As metodologias foram avaliadas em relação aos seus componentes extrativos e sob a aplicação de aquecimento ou ultrassom. Para isso, partiu-se de um *pool* de amostra de tecido FFPE desparafinizado de acordo com o método padronizado anteriormente.

As soluções extratoras, foram testadas primeiro sob aquecimento. Os extratos obtidos foram avaliados em relação a concentração de proteínas extraídas conforme descrito na Tabela 3. Em seguida, avaliou-se qualitativamente os géis de SDS-PAGE resultantes desses extratos, Figura 3, focando-se no número de bandas observadas, arraste e concentração aparente.

Figura 3. Avaliação dos tampões de extração utilizados, sob aquecimento, quanto a qualidade dos géis SDS-PAGE obtidos. Canaletas em duplicatas: PB. Padrão de proteínas com baixa massa molecular (kDa), **1.** 4% (m/v) CHAPS, 1% (v/v) Triton, 20 mM TRIS e 200 mM DTT; **2.** 4% (m/v) de CHAPS, 20 mM TRIS e 200 mM DTT; **3.** 2% (m/v) SDS, 20 mM TRIS e 200 mM DTT; **4.** kit Qproteome FFPE Tissue.

Fonte: Autoria própria

Partindo-se do mesmo pool de amostra e de forma análoga, as soluções de extração foram testadas substituindo-se o aquecimento pela aplicação de ultrassom. Os extratos obtidos foram avaliados em relação a concentração de proteínas extraídas conforme descrito na Tabela 3 e a qualidade dos géis de SDS-PAGE conforme a Figura 4.

Figura 4. Avaliação dos tampões de extração utilizados, sob aplicação de ultrassom, quanto a qualidade dos géis SDS-PAGE obtidos. Canaletas: **1.** 2% (m/v) SDS, 20 mM TRIS e 200 mM DTT; **2.** 4% (m/v) CHAPS, 1% (v/v) Triton, 20 mM TRIS e 200 mM DTT; **3.** 4% (m/v) de CHAPS, 20 mM TRIS e 200 mM DTT; **4.** kit Qproteome FFPE Tissue

Fonte: Autoria própria

Com resultados tão discrepantes entre o uso de aquecimento e ultrassom, decidiu-se testar o método baseado em ultrassom de maneira à desvincular o seu insucesso ao seu uso equivocado ou ainda com a sua incompatibilidade com as soluções de extração utilizadas.

Para isso, aplicou-se exatamente a mesma metodologia utilizada, substituindo unicamente o tipo de tecido, de FFPE por fresco. Assim, isolou-se o resultado de outros fatores interferentes e verificou-se a incompatibilidade do método com o tipo de matriz FFPE, de acordo com o observado na Tabela 3 e Figura 5a. Na Figura 5b nota-se a equivalência entre a utilização de aquecimento ou ultrassom para tecidos frescos pela alta similaridade dos perfis das corridas que usaram o mesmo solvente de extração (canaletas 1 e 2 de 5b).

Figura 5. Avaliação da metodologia baseada em ultrassom para tecidos frescos. **A.** canaletas: 1. (2% (m/v) SDS, 20 mM TRIS e 200 mM DTT); 2. (4% (m/v) CHAPS, 1% (v/v) Triton, 20 mM TRIS e 200 mM DTT); 3. (4% (m/v) de CHAPS, 20 mM TRIS e 200 mM DTT). **B.** canaletas: 1 (4% (m/v) CHAPS, 20 mM TRIS e 200 mM DTT) - sonificado; 2. (4% (m/v) de CHAPS, 20 mM TRIS e 200 mM DTT) - com aquecimento; 3. (2% (m/v) SDS, 20 mM TRIS e 200 mM DTT) - com aquecimento.

Fonte: Autoria própria

Tabela 3. Concentrações dos extratos de proteínas das extrações aplicadas às separações SDS-PAGE representadas nos géis das Figuras 3 – 5.

Tampão de Extração			Concentração ($\mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$)
Extração com tampão CHAPS 4% + 1% TRITON	FFPE	Aquecimento	1,98
Extração com tampão CHAPS 4%	FFPE	Aquecimento	2,07
Extração com tampão SDS 2%	FFPE	Aquecimento	3,23
Extração com kit Qproteome	FFPE	Aquecimento	2,18
Extração com tampão SDS 2%	FFEP	Ultrassom	0,7
Extração com tampão CHAPS 4% + 1% TRITON	FFPE	Ultrassom	*
Extração com tampão CHAPS 4%	FFPE	Ultrassom	*
Extração com kit Qproteome	FFPE	Ultrassom	*
Extração com tampão SDS 2%	Tecido Fresco	Ultrassom	1,96
Extração com tampão CHAPS 4% + 1% TRITON	Tecido Fresco	Ultrassom	1,09
Extração com tampão CHAPS 4%	Tecido Fresco	Ultrassom	2,77
Extração com tampão CHAPS 4%	Tecido Fresco	Ultrassom	3,01
Extração com tampão CHAPS 4%	Tecido Fresco	Aquecimento	2,95
Extração com tampão SDS 2%	Tecido Fresco	Aquecimento	3,14

* abaixo do limite de detecção do método utilizado

Fonte: Autoria própria

Observando estes resultados, é possível notar que para os tecidos FFPE, o uso de aquecimento é essencial, e o uso concomitante com tampão contendo SDS apresenta os níveis mais altos de extração proteica. Entretanto, os resultados obtidos com o uso de CHAPS, indicaram-no como um potencial substituto para o SDS nas análises de eletroforese bidimensional para este tipo de tecido. Para os tecidos frescos, o uso de ultrassom em conjunto com tampão CHAPS, resultou em níveis de extração similares ao conseguidos com SDS sob aquecimento, porém com géis de melhor qualidade e tempo de extração significativamente inferior.

4.2.3. Avaliação da compatibilidade das metodologias com a 2-DE

As metodologias que obtiveram os melhores resultados para SDS-PAGE, foram aplicadas à 2-DE. Os mesmos métodos de desparafinização e os mesmos métodos de extração foram repetidos. Diferentes protocolos de precipitação, com o uso de acetona gelada, etanol ou acetona/TCA para a concentração de proteínas e remoção dos interferentes foram testados, assim como diferentes parâmetros para a programação da focalização isoeletrica. O uso de colunas e de diálise também foi abordado, entretanto os resultados obtidos a partir de tecido FFPE não foram satisfatórios. Alguns dos resultados, estão expressos na Figura 6, apenas para elucidar a baixa qualidade dos resultados obtidos.

4.3. Identificação das proteínas por espectrometria de massas

Para a identificação das proteínas por espectrometria de massas, foi preparado dois *pools* de amostras, um de tecido fresco e um de FFPE. É importante salientar que os *pools* preparados apresentavam homogeneidade apenas intra-grupo, pois cada um foi preparado a partir de fontes diferentes apesar de representarem o mesmo tipo neoplasia.

As amostras foram processadas conforme os melhores resultados obtidos em cada etapa desse estudo, e desta forma duas metodologias de extração foram selecionadas e aplicadas nas amostras para a identificação em massas. Todo o procedimento foi feito em quadruplicata, e na última etapa, anterior a injeção, cada seguimento processado foi somado a suas réplicas.

Para ambos os tecidos, iniciou-se o processo com maceração com nitrogênio líquido e para o tecido FFPE incluiu-se a etapa de desparafinização com três lavagens de xilol à temperatura ambiente. Dois tampões de extração foram utilizados, um a base de SDS 2% e outro a base de CHAPS 4% como descrito anteriormente. Em ambos os casos, aquecimento

foi aplicado. O SDS-PAGE foi feito em duas rodadas, cada uma com duas duplicatas, totalizando dois géis e amostras em quadruplicata, conforme a Figura 7.

Figura 6. Imagens para elucidar os resultados dos géis 2-DE obtidos de amostras FFPE .

Com a baixa qualidade dos géis de 2-DE obtidos, optou-se pelo uso do SDS-PAGE como ferramenta de separação proteica prévia a identificação por espectrômetria de massas.

Figura 7. Géis submetidos a digestão e análise de espectrometria de massas. Somente os géis assinalados foram utilizados, onde o conjunto de cada cor representa uma quadruplicata. Vide legenda para detalhes.

Legenda

1 e 8 - Tecido FFPE - extração SDS 2 % + aquecimento

2 e 9 - Tecido FFPE - extração CHAPS 4 % + aquecimento

3 e 10 - Tecido Fresco - extração SDS 2 % + aquecimento (referência)

5 e 12 - Tecido Fresco - extração CHAPS 4 % SONICADO

1 e 8 - Tecido FFPE - extração SDS 2 % + aquecimento

2 e 9 - Tecido FFPE - extração CHAPS 4 % + aquecimento

3 e 10 - Tecido Fresco - extração SDS 2 % + aquecimento (referência)

5 e 11 - Tecido Fresco - extração CHAPS 4 % SONICADO

O estudo visou confrontar as proteínas identificadas de tecidos FFPE com as proteínas identificadas de tecido frescos - referência. Assim as canaletas 1 e 2 receberam as amostras de

interesse e a canaleta 3 a amostra de referência - tecido fresco e extração com SDS 2%. Todas essas amostras foram submetidas a extração por aquecimento.

Uma investigação, em relação ao efeito da aplicação de aquecimento na etapa de extração, foi conduzida paralelamente. Assim, as canaletas assinaladas em marrom, receberam amostras frescas do mesmo *pool* utilizado como referência para as identificações dos tecidos FFPE. Entretanto, o método de extração utilizou 20 mM Tris, 4% CHAPS e 200 mM sob a ação de ultrassom, sendo esta a metodologia que obteve os melhores resultados para esse tipo de tecido e sem aplicação de aquecimento.

Após o término da eletroforese, as raías foram separadas e cuidadosamente cortadas em 10 seguimentos de igual comprimento. Cada seguimento passou pelo processo de digestão de forma individual, e somente foram combinados às suas replicatas na etapa que antecede as injeções.

As proteínas identificadas para os tecidos FFPE foram listadas nas Tabelas 4 e 5. A Tabela 6 apresenta a lista de proteínas extraídas de tecido fresco sob aquecimento e foi considerada como referência para confrontar as demais. De fato, esta foi a extração com o maior número de proteínas identificadas. A Tabela 7 lista as proteínas de tecido fresco sem o uso de aquecimento.

Tabela 4. Lista das proteínas extraídas e identificadas de tecido FFPE. Tampão de extração: (Tris20 mM pH 8,8, SDS 2%, DTT 200 mM). Aquecimento: 100 °C por 20 min e 80 °C por duas horas).

Tecido FFPE --- Δ + SDS				
Acesso	Proteína	Gene	Probabili- dade	Peptídeos Únicos
sp P12111 CO6A3_HUMAN	Collagen alpha-3(VI) chain	COL6A3	1,0000	12
IPI00027350	Peroxiredoxin-2	PRDX2	1,0000	5
sp P01876 IGHA1_HUMAN	Ig alpha-1 chain C region	IGHA1	0,9972	2
sp P01857 IGHG1_HUMAN	Ig gamma-1 chain C region	IGHG1	1,0000	7
sp P01834 IGKC_HUMAN	Ig kappa chain C region	IGKC	1,0000	8
IPI00303476	ATP synthase subunit beta, mitochondrial	ATP5B	1,0000	17
IPI00418471	Vimentin	VIM	1,0000	15
IPI00217465	Histone, H1.2	HIST1H1C	1,0000	7
IPI00216318	14-3-3 protein beta/alpha Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	YWHAH	1,0000	3
IPI00219018		GAPDH	1,0000	9
IPI00012011	Cofilin-1	CFL1	1,0000	5
IPI00009865	Keratin, type I cytoskeletal 10	KRT10	1,0000	28
IPI00479186	Pyruvate kinase PKM	PKM	1,0000	12
IPI00018146	14-3-3 protein theta	YWHAQ	1,0000	3
IPI00021263	14-3-3 protein zeta/delta	YWHAZ	1,0000	5
IPI00473011	Hemoglobin subunit delta	HBD	1,0000	23
IPI00410714	Hemoglobin subunit alpha Phosphatidylethanolamine-binding protein 1	HBA1 e HBA2	1,0000	25
IPI00219446		PEBP1	0,9997	2
IPI00019359	Keratin,type I cytoskeletal 9	KRT9	1,0000	17
IPI00021841	Apolipoprotein A-I	APOA1	1,0000	6
IPI00553177	Alpha-1-antitrypsin	SERPINA1	1,0000	8
IPI00745872	Serum albumin	ALB	1,0000	41
IPI00220327	Keratin type II cytoskeletal 1	KRT1	1,0000	24
sp P35908 K22E_HUMAN	Keratin, type II cytoskeletal 2 epidermal	KRT2	1,0000	21
sp P07437 TBB5_HUMAN	Tubulin beta chain	TUBB	1,0000	18
IPI00027827	Extracellular superoxide dismutase [CU- ZN]	SOD3	1,0000	14
IPI00018352	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase isozyme L1	UCHL1	1,0000	7
IPI00022977	Creatine kinase B-type	CKB	1,0000	10
IPI00186290	Elongation factor 2	EEF2	1,0000	2
IPI00009362	Secretogranin-2	SCG2	1,0000	6
IPI00295386	Carbonyl reductase [NADPH] 1	CBR1	1,0000	12
IPI00217467	Histone H1.4	HIST1H1E	1,0000	7
IPI00549725	Phosphoglycerate mutase 1	PGAM1	1,0000	4
IPI00645078	Ubiquitin-like modifier-activating enzyme 1	UBA1	1,0000	5
IPI00179964	Isoform 1 of polypYRIMIDINE TRACT- BINDING PROTEIN 1	PTBP1	1,0000	5
IPI00942979	Transketolase	TKT	1,0000	6
IPI00025252	Protein disulfide-isomerase A3	PDIA3	1,0000	6
IPI00027223	Isocitrate dehydrogenase [NADP] cytoplasmic	IDH1	1,0000	2
IPI00550363	Transgelin-2	TAGLN2	1,0000	3
IPI00007765	Stress-70 protein, mitochondrial	HSPA9	1,0000	5
IPI00291006	Malate dehydrogenase, mitochondrial	MDH2	1,0000	7
IPI00008433	40S Ribosomal protein S5	RPS5	1,0000	2
IPI00215914	ADP-ribosylation factor 1	ARF1	1,0000	4
IPI00215917	ADP-ribosylation factor 3	ARF3	1,0000	4

IPI00020986	Lumican	LUM	1,0000	5
IPI00479722	Proteasome activator complex subunit 1 Isoform non-muscle of myosin light polypeptide 6	PSME1	1,0000	4
IPI00335168		MYL6	1,0000	3
IPI00000816	14-3-3 protein epsilon	YWHAE	1,0000	5
IPI00848226	Guanine nucleotide-binding protein subunit beta-2-like 1	GNB2L1	1,0000	3
IPI00007750	Tubulin alpha-4A chain	TUBA4A	1,0000	10
sp P80404 GABT_HUMAN	4-aminobutyrate aminotransferase, mitochondrial	ABAT	1,0000	4
sp P98160 PGBM_HUMAN	Basement membrane-specific heparan sulfate proteoglycan core protein	HSPG2	1,0000	2
IPI00029744	Single-stranded DNA-binding protein, mitochondrial	SSBP1	1,0000	2
IPI00257508	Dihydropyrimidinase-related protein 2	DPYSL2	1,0000	7
IPI00003833	Mitochondrial carrier homolog 2	MTCH2 HIST2H2AA4 e	1,0000	2
IPI00216457	Histone H2A type 2-A	HIST2H2AA3	1,0000	5
IPI00339274	Histone H2A type 2-C	HIST2H2AC	1,0000	5
IPI00018278	Histone H2A.V	H2AFV	1,0000	3
IPI00218448	Histone H2A.Z	H2AFZ	1,0000	3
IPI00017726	3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase type- 2	HSD17B10	1,0000	3
IPI00473014	Destrin	DSTN	1,0000	2
IPI00746205	Proteasome activator subunit 2	PSME2	1,0000	2
IPI00300567	Enoyl-CoA delta isomerase 1, mitochondrial	ECI1	0,9999	2
sp P0CG05 LAC2_HUMAN	Ig lambda-2 chain C regions	IGLC2	0,9999	2
sp P0CG06 LAC3_HUMAN	Ig lambda-3 chain C regions	IGLC3	0,9999	2
IPI00013485	40S ribosomal protein S2	RPS2	0,9999	2
IPI00027252	Prohibitin-2	PHB2	0,9999	2
IPI00246975	Glutathione S-transferase Mu 3	GSTM3 CALM1;CALM 2;CALM3	1,0000	3
IPI00075248	Calmodulin		0,9999	4
IPI00291922	Proteasome subunit alpha type-5	PSMA5	0,9999	2
IPI00553138	vesicle-associated membrane protein 2	VAMP2	0,9999	2
IPI00329389	60S Ribosomal protein L6	RPL6	0,9999	2
IPI00219729	Mitochondrial 2-oxoglutarate/malate carrier protein	SLC25A11	0,9999	2
IPI00013508	Alpha-actinin-1	ACTN1	0,9998	3
IPI00013808	Alpha-actinin-4	ACTN4	0,9998	3
IPI00025084	Calpain small subunit 1	CAPNS1	0,9998	2
IPI00646304	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase B	PPIB	0,9998	3
IPI00304409	Calcium-regulated heat stable protein 1	CARHSP1	0,9998	2
IPI00024933	60S ribosomal protein L12	RPL12	0,9997	2
IPI00022429	Alpha-1-acid glycoprotein 1	ORM1	0,9997	2
IPI00298994	Talin-1	TLN1	1,0000	2
IPI00017469	Sepiapterin reductase	SPR	0,9997	3
IPI00006034	Cysteine-rich protein 2	CRIP2	0,9997	2
IPI00937615	Elongation factor 1-gamma	EEF1G	0,9997	2
IPI00010896	Chloride intracellular channel protein 1	CLIC1	0,9996	3
IPI00328415	CDNA FLJ56301, highly similar to NADH- cytochrome B5 reductase	CYB5R3	0,9996	2
IPI00007682	V-type proton ATPase catalytic subunit A	ATP6V1A	0,9996	2
IPI00001639	Importin subunit beta-1	KPNB1	0,9994	3
IPI00216587	40S ribosomal protein S8	RPS8	0,9993	2
IPI00216691	Profilin-1	PFN1	0,9991	2
IPI00002406	Basal cell adhesion molecule	BCAM	0,9989	2
sp P00505 AATM_HUMAN	Aspartate aminotransferase, mitochondrial	GOT2	0,9987	2

IPI00001453	Alpha-internexin	INA	0,9987	2
IPI00784154	60 kDa heat shock protein, mitochondrial	HSPD1	0,9985	2
IPI00942976	Epoxide hydrolase 2	EPHX2	0,9978	3
IPI00020987	Prolargin	PRELP	1,0000	2
IPI00643041	GTP-binding nuclear protein ran	RANP1;RAN	0,9975	2
IPI00026944	Nidogen-1	NID1	0,9974	2
IPI00028888	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D0	HNRNPD	0,9973	2
IPI00641229	IG alpha-2 chain C region	IGHA2	0,9972	2
IPI00000494	60S ribosomal protein L5	RPL5	0,9970	2
IPI00221092	40S ribosomal protein S16	RPS16	0,9969	2
IPI00026230	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H2	HNRNPH2	0,9969	2
IPI00023591	Transcriptional activator protein Pur-alpha	PURA	0,9957	2
IPI00000949	Thiomorpholine-carboxylate dehydrogenase	CRYM	1,0000	10
IPI00298281	Laminin subunit gamma-1	LAMC1	0,9911	2
IPI00217966	Isoform 1 of L-lactate dehydrogenase A chain	LDHA	0,9908	2
IPI00169383	Phosphoglycerate kinase 1	PGK1	0,9904	6
IPI00007960	Isoform 1 of periostin	POSTN	1,0000	3
	Voltage-dependent anion-selective channel protein 2			
IPI00216026		VDAC2	0,9814	2
IPI00218693	Adenine phosphoribosyltransferase	APRT	0,9789	2
	Microtubule-associated protein RP/EB family member 1			
IPI00017596		MAPRE1	0,9755	2
IPI00013079	EMILIN-1	EMILIN1	1,0000	2
IPI00291262	Isoform 1 of clusterin	CLU	0,9645	2
	Platelet-activating factor acetylhydrolase			
IPI00026546	IB subunit beta	PAFAH1B2	0,9612	3
IPI00298971	Vitronectin	VTN	0,9546	2
IPI00017334	Prohibitin	PHB	0,9483	2
IPI00017510	Cytochrome c oxidase subunit 2	MT-CO2	1,0000	2
IPI00220642	14-3-3 protein gamma	YWHAG	1,0000	4
	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial			
IPI00440493		ATP5A1	1,0000	12
IPI00218918	Annexin A1	ANXA1	1,0000	4
IPI00396378	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1	HNRNPA2B1	1,0000	6
	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K			
IPI00216049		HNRNPK	1,0000	7
IPI00219365	Moesin	MSN	1,0000	3
IPI00843975	Ezrin	EZR	1,0000	3
IPI00304171	Core histone macro-H2A.1	H2AFY	1,0000	4
IPI00940148	Rab GDP dissociation inhibitor beta	GDI2	1,0000	5
IPI00010154	Rab GDP dissociation inhibitor alpha	GDI1	1,0000	6
IPI00016342	Ras-related protein Rab-7a	RAB7A	1,0000	2
IPI00473031	Alcohol dehydrogenase 1B	ADH1B	1,0000	7
	Retinal dehydrogenase 1			
IPI00218914		ALDH1A1	1,0000	19
IPI00218414	Carbonic anhydrase 2	CA2	1,0000	2
sp P01023 A2MG_HUMAN	Alpha-2-macroglobulin	A2M	1,0000	4
IPI00783987	Complement C3	C3	1,0000	6
IPI00021405	Prelamin-A/C	LMNA	1,0000	5
sp P02787 TRFE_HUMAN	Serotransferrin	TF	1,0000	8
IPI00022432	Transthyretin	TTR	1,0000	2
	Transitional endoplasmic reticulum atpase			
IPI00022774		VCP	1,0000	3
	Keratin, type II cytoskeletal 6B			
IPI00293665		KRT6B	1,0000	5

IPI00025512	Heat shock protein beta-1	HSPB1	1,0000	12
IPI00006663	Aldehyde dehydrogenase, mitochondrial	ALDH2	1,0000	5
IPI00008530	60S acidic ribosomal protein P0	RPLP0	1,0000	5
IPI00465248	Alpha-enolase	ENO1	1,0000	6
IPI00216171	Gamma-enolase	ENO2	1,0000	4
IPI00237671	Neurofilament light polypeptide	NEFL	1,0000	8
IPI00010796	Protein disulfide-isomerase	P4HB	1,0000	4
IPI00011229	Cathepsin D	CTSD	1,0000	4
IPI00414676	Heat shock protein HSP 90-beta Isoform 1 of heat shock protein HSP 90- alpha	HSP90AB1	1,0000	5
IPI00784295		HSP90AA1	1,0000	6
IPI00329801	Annexin A5	ANXA5	1,0000	5
IPI00219757	Glutathione S-transferase P	GSTP1	1,0000	3
IPI00219219	Galectin-1	LGALS1	1,0000	4
sp P09467 F16P1_HUMAN	Fructose-1,6-bisphosphatase 1	FBP1	1,0000	2
sp P09525 ANXA4_HUMAN	Annexin A4	ANXA4	1,0000	2
IPI00024067	Clathrin heavy chain 1	CLTC	1,0000	5
IPI00291136	Collagen alpha-1(VI) chain	COL6A1	1,0000	5

Tabela 5. Lista das proteínas extraídas e identificadas de tecido FFPE. Tampão de extração: (Tris20 mM pH 8,8, CHAPS 4 %, DTT 200 mM). Aquecimento: 100 °C por 20 min e 80 °C por duas horas).

Tecido FFPE --- Δ + CHAPS				
Acesso	Proteína	Gene	Probabili- dade	Peptídeos Únicos
IPI00216138	Transgelin	TAGLN	0,9619	2
sp P12111 CO6A3_HUMAN	Collagen alpha-3(VI) chain	COL6A3	0,9835	2
IPI00027350	Peroxiredoxin-2	PRDX2	0,9932	2
sp P01876 IGHA1_HUMAN	Ig alpha-1 chain C region	IGHA1	0,9975	2
IPI00827754	Ig gamma-3 chain C region	IGHG3	0,9992	2
sp P01857 IGHG1_HUMAN	Ig gamma-1 chain C region	IGHG1	0,9992	2
sp P01834 IGKC_HUMAN	Ig kappa chain C region	IGKC	0,9997	3
IPI00303476	ATP synthase subunit beta, mitochondrial	ATP5B	0,9998	2
IPI00418471	Vimentin	VIM	0,9998	2
IPI00217465	Histone, H1.2	HIST1H1C	0,9999	2
IPI00216318	14-3-3 protein beta/alpha	YWHAH	0,9999	2
IPI00219018	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	GAPDH	0,9999	3
IPI00012011	Cofilin-1	CFL1	0,9999	4
IPI00009865	Keratin, type I cytoskeletal 10	KRT10	1,0000	30
IPI00479186	Pyruvate kinase PKM	PKM	1,0000	3
IPI00018146	14-3-3 protein theta	YWHAQ	1,0000	4
IPI00021263	14-3-3 protein zeta/delta	YWHAZ	1,0000	3
IPI00473011	Hemoglobin subunit delta	HBD	1,0000	17
IPI00410714	Hemoglobin subunit alpha	HBA1 e HBA2	1,0000	6
IPI00219446	Phosphatidylethanolamine-binding protein 1	PEBP1	1,0000	3
IPI00019359	Keratin, type I cytoskeletal 9	KRT9	1,0000	24
IPI00021841	Apolipoprotein A-I	APOA1	1,0000	3
IPI00553177	Alpha-1-antitrypsin	SERPINA1	1,0000	4
IPI00745872	Serum albumin	ALB	1,0000	19
IPI00220327	Keratin type II cytoskeletal 1	KRT1	1,0000	37
sp P35908 K22E_HUMAN	Keratin, type II cytoskeletal 2 epidermal	KRT2	1,0000	35
sp P07437 TBB5_HUMAN	Tubulin beta chain	TUBB	1,0000	2
IPI00027827	Extracellular superoxide dismutase [CU-ZN]	SOD3	1,0000	7
IPI00018352	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase isozyme L1	UCHL1	1,0000	4
IPI00022977	Creatine kinase B-type	CKB	1,0000	4

Tabela 6. Lista das proteínas extraídas e identificadas de tecido fresco. Tampão de extração: (Tris20 mM pH 8,8, SDS 2%, DTT 200 mM). Aquecimento: 100 °C por 20 min e 80 °C por duas horas).

Tecido Fresco --- Δ + SDS				
Acesso	Proteína	Gene	Probabili- dade	Peptídeos Únicos
IPI00216138	Transgelin	TAGLN	1,0000	4
sp P12111 CO6A3_HUMAN	Collagen alpha-3(VI) chain	COL6A3	1,0000	35
IPI00027350	Peroxiredoxin-2	PRDX2	0,9983	2
sp P01876 IGHA1_HUMAN	Ig alpha-1 chain C region	IGHA1	1,0000	2
IPI00827754	Ig gamma-3 chain C region	IGHG3	1,0000	5
sp P01857 IGHG1_HUMAN	Ig gamma-1 chain C region	IGHG1	1,0000	10
sp P01834 IGKC_HUMAN	Ig kappa chain C region	IGKC	1,0000	4
IPI00303476	ATP synthase subunit beta, mitochondrial	ATP5B	1,0000	12
IPI00418471	Vimentin	VIM	1,0000	16
IPI00217465	Histone, H1.2	HIST1H1C	1,0000	8
IPI00216318	14-3-3 protein beta/alpha	YWHAB	1,0000	3
IPI00219018	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	GAPDH	1,0000	15
IPI00012011	Cofilin-1	CFL1	0,9999	4
IPI00009865	Keratin, type I cytoskeletal 10	KRT10	1,0000	14
IPI00479186	Pyruvate kinase PKM	PKM	1,0000	7
IPI00018146	14-3-3 protein theta	YWHAQ	1,0000	5
IPI00021263	14-3-3 protein zeta/delta	YWHAZ	1,0000	6
IPI00473011	Hemoglobin subunit delta	HBD	1,0000	22
IPI00410714	Hemoglobin subunit alpha	HBA1 e HBA2	1,0000	13
IPI00219446	Phosphatidylethanolamine-binding protein 1	PEBP1	1,0000	8
IPI00019359	Keratin, type I cytoskeletal 9	KRT9	1,0000	8
IPI00021841	Apolipoprotein A-I	APOA1	1,0000	9
IPI00553177	Alpha-1-antitrypsin	SERPINA1	1,0000	11
IPI00745872	Serum albumin	ALB	1,0000	46
IPI00220327	Keratin type II cytoskeletal 1	KRT1	1,0000	14
sp P35908 K22E_HUMAN	Keratin, type II cytoskeletal 2 epidermal	KRT2	1,0000	9
sp P07437 TBB5_HUMAN	Tubulin beta chain	TUBB	1,0000	17
IPI00027827	Extracellular superoxide dismutase [CU-ZN]	SOD3	1,0000	7
IPI00018352	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase isozyme L1	UCHL1	1,0000	5
IPI00022977	Creatine kinase B-type	CKB	1,0000	9
IPI00003348	Guanine nucleotide-binding protein g(i)/g(s)/g(t) subunit beta-2	GNB2	0,9733	3
IPI00003482	2,4-dienoyl-coa reductase, mitochondrial.	DECR1	0,9992	2
IPI00004358	glycogen phosphorylase, brain form	PYGB	0,9999	3
IPI00004560	Isoform 2 of serine/threonine-protein kinase dclk1	DCLK1	1,0000	3
IPI00005614	Isoform long of spectrin beta chain, brain 1	SPTBN1	1,0000	10
IPI00006980	Upf0568 protein c14orf166	C14orf166	1,0000	3
IPI00009342	Ras gtpase-activating-like protein iqgap1	IQGAP1	1,0000	3
IPI00010779	Isoform 1 of tropomyosin alpha-4 chain	TPM4	1,0000	6
IPI00010810	Electron transfer flavoprotein subunit alpha, mitochondrial	ETFA	1,0000	4
IPI00011274	Isoform 1 of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein d-like	HNRPDL	1,0000	2
IPI00011416	Delta(3,5)-delta(2,4)-dienoyl-coa isomerase, mitochondrial	ECH1	1,0000	4
IPI00014424	Elongation factor 1-alpha 2	EEF1A2	1,0000	5
IPI00014439	Dihydropteridine reductas.	QDPR	1,0000	3
IPI00014898	Isoform 1 of plectin-1	PLEC1	1,0000	9

IPI00015148	Ras-related protein RAP-1b	RAP1B	0,9999	2
IPI00016339	Ras-related protein RAB-5c	RAB5C	1,0000	4
IPI00016610	Poly(rc)-binding protein 1	PCBP1	0,9999	2
IPI00018342	Adenylate kinase isoenzyme 1	AK1	1,0000	2
IPI00018534	Histone H2B type 1-L	HIST1H2BL	1,0000	4
IPI00018931	Vacuolar protein sorting-associated protein 35	VPS35	1,0000	2
IPI00019345	Ras-related protein rap-1A	RAP1A	0,9999	2
IPI00020101	Histone H2B type 1-C/E/F/G/I	HIST1H2/C/ E/F/G/I	1,0000	4
IPI00021885	Isoform 1 of fibrinogen alpha chain	FGA	1,0000	2
IPI00021891	Isoform gamma-B of fibrinogen gamma chain	FGG	1,0000	3
IPI00022488	Hemopexin	HPX	1,0000	4
IPI00023048	Isoform 1 of elongation factor 1-delta	EEF1D	1,0000	2
IPI00023673	Galectin-3-binding protein	LGALS3BP	0,9995	3
IPI00024095	Annexin A3	ANXA3	1,0000	5
IPI00024911	Endoplasmic reticulum protein ERP29	ERP29	0,9954	2
IPI00024993	Enoyl-coa hydratase, mitochondrial	ECHS1	1,0000	2
IPI00026185	Isoform 1 of f-actin-capping protein subunit beta	CAPZB	1,0000	4
IPI00026314	Isoform 1 of gelsolin	GSN	1,0000	5
IPI00027444	Leukocyte elastase inhibitor	SERPINB1	1,0000	2
IPI00028091	Actin-related protein 3	ACTR3	1,0000	2
IPI00029997	6-phosphogluconolactonase	PGLS	0,9982	4
IPI00031169	Ras-related protein rab-2a	RAB2A	1,0000	3
IPI00060715	BTB/POZ domain-containing protein KCTD12	KCTD12	0,9991	2
IPI00100980	EH domain-containing protein 2	EHD2	0,9999	4
IPI00152906	histone h2b type 1-d	HIST1H2BD	1,0000	4
IPI00171692	Isoform 1 of abhydrolase domain-containing protein 11	ABHD11	0,9996	2
IPI00176903	Isoform 1 of polymerase i and transcript release factor	PTRF	1,0000	3
IPI00215983	Carbonic anhydrase 1	CA1	1,0000	5
IPI00216308	Voltage-dependent anion-selective channel protein 1	VDAC1	1,0000	3
IPI00216319	14-3-3 protein ETA	YWHAH	1,0000	3
IPI00216694	Plastin-3	PLS3	1,0000	4
IPI00217507	Neurofilament medium polypeptide	NEFM	1,0000	4
IPI00218493	Hypoxanthine-guanine Phosphoribosyltransferase	HPRT1	0,9015	2
IPI00219526	Isoform 1 of phosphoglucomutase-1	PGM1	0,9998	2
IPI00220301	Peroxiredoxin-6	PRDX6	1,0000	4
IPI00220487	Isoform 1 of atp synthase subunit D, mitochondrial	ATP5H	0,9987	2
IPI00220834	ATP-dependent dna helicase 2 subunit 2	XRCC5	1,0000	3
IPI00293564	Hydroxymethylglutaryl-coa lyase, mitochondrial	HMGCL	0,9991	2
IPI00298497	Fibrinogen beta chain	FGB	0,9690	2
IPI00298828	Beta-2-glycoprotein 1	APOH	0,9640	2
IPI00298961	Exportin-1	XPO1	0,9260	2
IPI00299778	Serum paraoxonase/lactonase 3	PON3	0,9687	3
IPI00303133	Histone H2B type 1-H	HIST1H2BH	1,0000	4
IPI00303258	LIM and cysteine-rich domains protein 1	LMCD1	1,0000	2
IPI00307162	Isoform 2 of vinculin	VCL	1,0000	3
IPI00329665	Histone H2B type 2-F	HIST2H2BF	1,0000	4
IPI00333541	Isoform 1 of filamin-A	FLNA	1,0000	22
IPI00412525	RAS-related protein rap-1B-like protein	RAP1B	0,9999	2
IPI00418163	Complement component 4B preproprotein	C4B	0,9999	2
IPI00419833	Histone H2B type 1-K	HIST1H2BK	1,0000	4

IPI00419880	40s ribosomal protein S3A	RPS3A	0,9252	2
IPI00456969	Cytoplasmic dynein 1 heavy chain 1	DYNC1H1	1,0000	4
IPI00465085	Isoform 1 of nicotinate phosphoribosyltransferase	NAPRT1	1,0000	2
IPI00465439	Fructose-bisphosphate aldolase A	ALDOA	1,0000	6
IPI00477495	Histone h2b type F-S	H2BFS	1,0000	4
IPI00554648	Keratin, type II cytoskeletal 8	KRT8	1,0000	6
IPI00554737	Serine/threonine-protein phosphatase 2a 65 kda regulatory subunit aalpha isoform	PPP2R1A	0,9957	2
IPI00554798	Histone H2B type 1-M	HIST1H2BM	1,0000	4
IPI00604620	Nucleolin	NCL	0,9253	2
IPI00607799	Isoform 1 of 3-hydroxybutyrate dehydrogenase type 2	BDH2	1,0000	2
IPI00644712	ATP-dependent dna helicase 2 subunit 1	XRCC6	1,0000	4
IPI00644989	Isoform 1 of protein disulfide-isomerase A6	PDIA6	1,0000	3
IPI00646917	Cleavage and polyadenylation specificity factor subunit 5	NUDT21	0,9367	2
IPI00783982	Coatomer subunit gamma	COPG	1,0000	3
IPI00844215	Isoform 1 of spectrin alpha chain, brain	SPTAN1	1,0000	13
IPI00896419	Isoform 1 of inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain h4	ITIH4	1,0000	2
IPI00903145	Radixin	RDX	1,0000	4
IPI00941747	Calnexin	CANX	1,0000	3
IPI00943000	Isoform 1 of selenium-binding protein 1	SELENBP1	0,9999	4
sp O00159 MYO1C_HUMAN	Unconventional myosin-Ic	MYO1C	0,9995	2
sp O15173 PGRC2_HUMAN	Membrane-associated progesterone receptor component 2	PGRMC2	0,9173	2
sp O75489 NDUS3_HUMAN	NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 3, mitochondrial	NDUFS3	1,0000	4
sp P00738 HPT_HUMAN	Haptoglobin	HP	0,9903	3
sp P01859 IGHG2_HUMAN	Ig gamma-2 chain C region	IGHG2	1,0000	4
sp P02774 VTDB_HUMAN	Vitamin D-binding protein	GC	1,0000	2
sp P02788 TRFL_HUMAN	Lactotransferrin	LTF	1,0000	3
sp P08729 K2C7_HUMAN	Keratin, type II cytoskeletal 7	KRT7	1,0000	4
sp P0C0L4 CO4A_HUMAN	Complement C4-A	C4A	0,9999	2
sp P13796 PLSL_HUMAN	Plastin-2	LCP1	1,0000	5
sp P40925 MDHC_HUMAN	Malate dehydrogenase, cytoplasmic	MDH1	1,0000	4
sp P46821 MAP1B_HUMAN	Microtubule-associated protein 1B	MAP1B	1,0000	4
sp P49411 EFTU_HUMAN	Elongation factor Tu, mitochondrial	TUFM	0,9987	2
sp P49748 ACADV_HUMAN	Very long-chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mitochondrial	ACADVL	0,9994	2
sp P50995 ANX11_HUMAN	Annexin A11	ANXA11	0,9989	2
sp Q01518 CAP1_HUMAN	Adenylyl cyclase-associated protein 1	CAP1	1,0000	2
sp Q3LXA3 DHAK_HUMAN	Bifunctional ATP-dependent dihydroxyacetone kinase/FAD-AMP lyase (cyclizing)	DAK	1,0000	3
sp Q99877 H2B1N_HUMAN	Histone H2B type 1-N	HIST1H2BN	1,0000	4
IPI00000335	Histidine triad nucleotide-binding protein 2, mitochondrial	HINT2	1,0000	2
IPI00003817	RGH GDP-dissociation inhibitor 2	ARHGDIB	0,9962	3
IPI00003949	Ubiquitin-conjugating enzyme e2 n	UBE2N	0,9999	3
IPI00005171	HLA CLASS II histocompatibility antigen, DR alpha chain	HLA-DRA	0,9999	2
IPI00005573	Isoform 1 of 5'(3')-deoxyribonucleotidase, cytosolic type	NT5C	0,9543	2
IPI00005705	Isoform gamma-1 of serine/threonine-protein phosphatase PP1-gamma catalytic subunit	PPP1CC	1,0000	3
IPI00005719	Isoform 1 of RAS-related protein RAB-1a	RAB1A	1,0000	4
IPI00006957	Isoform 1 of dehydrogenase/reductase SDR family member 7	DHRS7	0,9997	2
IPI00007052	Mitochondrial fission 1 protein	FIS1	1,0000	2
IPI00007244	Isoform H17 of myeloperoxidase	MPO	0,9994	2

IPI00007755	RAS-related protein RAB-21	RAB21	0,9999	2
	Fatty acid-binding protein, epidermal	FABP5L9,F ABP5L7,FA BP5L2,FAB P5		
IPI00007797	V-type proton atpase subunit B, brain isoform	ATP6V1B2	1,0000	3
IPI00007812	Serine/threonine-protein phosphatase 2A catalytic subunit alpha isoform.	PPP2CA	0,9988	2
IPI00008380	60S acidic ribosomal protein P1	RPLP1	0,9999	4
IPI00008527	Biglycan	RPLP1	1,0000	3
IPI00010790	40S ribosomal protein S3	BGN	1,0000	4
IPI00011253	3-ketoacyl-coa thiolase, peroxisomal	RPS3	0,9980	3
IPI00012828	40S ribosomal protein S7	ACAA1	1,0000	3
IPI00013415	Maleylacetoacetate isomerase	RPS7	1,0000	3
IPI00013809	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H	GSTZ1	1,0000	2
IPI00013881	Napsin-a	HNRNPH1	0,9998	2
IPI00014055	Isoform 1 of septin-2	NAPSA	0,9511	2
IPI00014177	Isoform 2 of cell division control protein 42 homolog	SEPT2	1,0000	2
IPI00016786	Matrin-3	CDC42	1,0000	3
IPI00017297	RAS-related protein rab-5B	MATR3	1,0000	3
IPI00017344	Isoform 1 of microtubule-associated protein RP/EB family member 3	RAB5B	1,0000	2
IPI00017597	WD repeat-containing protein 61	MAPRE3	0,9997	2
IPI00019269	Isoform 1 of myosin-9	WDR61	0,9998	2
IPI00019502	Myosin-11	MYH9	1,0000	26
IPI00020501	Inositol monophosphatase	MYH11	1,0000	11
IPI00020906	Cytochrome C oxidase subunit 5B, mitochondrial	IMPA1	0,9974	2
IPI00021785	40S ribosomal protein S6	COX5B	0,9999	2
IPI00021840	Isoform 1 of fibronectin.	RPS6	0,9993	2
IPI00022418	ADP/ATP translocase 1	FN1	1,0000	6
IPI00022891	Nascent polypeptide-associated complex subunit alpha	SLC25A4	1,0000	3
IPI00023748	Mitochondrial import receptor subunit TOM22 homolog	NACA	1,0000	3
IPI00024976	Isoform xb of tenascin-X	TOMM22	0,9996	2
IPI00025276	V-type proton atpase subunit g 1	TNXB	0,9724	3
IPI00025285	Isoform 1 of ubiquitin-conjugating enzyme E2 D3	ATP6V1G1	0,9999	3
IPI00026965	Sorcin	UBE2D3	0,9932	2
IPI00027175	Transmembrane EMP24 domain-containing protein 10	SRI	0,9993	2
IPI00028055	Isoform 1 of tenascin.	TMED10	1,0000	2
IPI00031008	Trifunctional enzyme subunit alpha, mitochondrial	TNC	1,0000	3
IPI00031522	Serpin H1	HADHA	1,0000	5
IPI00032140	Isoform 1 of enolase-phosphatase E1	SERPINH1	0,9907	2
IPI00038378	UPF0556 protein C19orf10	ENOPH1	0,9809	2
IPI00056357	Protein mago nashi homolog 2	C19orf10	0,9963	2
IPI00059292	Isoform 1 of ester hydrolase C11orf54	MAGOHB	0,9997	3
IPI00072044	Retinol dehydrogenase 12	C11orf54	0,9999	3
IPI00163384	Isoform 1 of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein M	RDH12	1,0000	3
IPI00171903	Isoform 1 of collagen alpha-1(xiv) chain.	HNRNPM	0,9996	2
IPI00176193	Cold-inducible rna-binding protein	COL14A1	1,0000	7
IPI00180954	Tropomyosin 3 isoform 1	CIRBP	0,9997	2
IPI00183968	40S ribosomal protein S19	TPM3	1,0000	5
IPI00215780	ADP-ribosylation factor 4	RPS19	1,0000	4
IPI00215918	Sorbitol dehydrogenase	ARF4	0,9999	2
IPI00216057	Myoglobin	SORD	0,9785	2
IPI00217493		MB	0,9743	2

IPI00218236	Serine/threonine-protein phosphatase PP1-beta catalytic subunit	PPP1CB	1,0000	3
IPI00219029	Aspartate aminotransferase, cytoplasmic	GOT1	1,0000	2
	Isoform serca2b of sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium atpase2	ATP2A2		
IPI00219078			1,0000	2
IPI00219153	60S ribosomal protein L22	RPL22	1,0000	3
IPI00219156	60s ribosomal protein L30	RPL30	0,9979	2
IPI00219306	Protein mago nashi homolog	MAGOH	0,9997	3
	Erythrocyte band 7 integral membrane protein	STOM		
IPI00219682			1,0000	2
IPI00219913	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 14	USP14	0,9988	2
IPI00221091	40S ribosomal protein S15A	RPS15A	1,0000	2
IPI00221093	40S ribosomal protein S17	RPS17	0,9760	2
IPI00221226	Annexin A6	ANXA6	1,0000	10
IPI00289334	Isoform 1 of filamin-B	FLNB	1,0000	5
IPI00289862	Secernin-1	SCRN1	0,9830	2
IPI00292657	Prostaglandin reductase 1	PTGR1	1,0000	3
	Isoform 1 of protein-glutamine gamma-glutamyltransferase 2	TGM2		
IPI00294578			1,0000	4
IPI00295741	cathepsin B	CTSB	0,9829	2
IPI00296922	Laminin subunit beta-2	LAMB2	1,0000	4
IPI00300562	RAS-related protein RAB-3B	RAB3B	0,9992	2
IPI00303318	Protein FAM49B.	FAM49B	0,9988	2
IPI00304840	Isoform 2C2 of collagen alpha-2(vi) chain.	COL6A2	1,0000	8
IPI00305692	Thioredoxin-like protein 1	TXNL1	0,9998	2
IPI00329573	Isoform 1 of collagen alpha-1(xii) chain	COL12A1	0,9999	4
IPI00332376	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 D2	UBE2D2	0,9932	2
IPI00374975	Probable phosphoglycerate mutase 4	PGAM4	1,0000	3
	Isoform 1 of far upstream element-binding protein 1	FUBP1		
IPI00375441			0,9998	2
	Calcium-binding mitochondrial carrier protein aralar1	SLC25A12	1,0000	3
IPI00386271				
IPI00397526	Isoform 1 of myosin-10	MYH10	1,0000	9
IPI00419585	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A	PPIA	1,0000	10
	Serine/threonine-protein phosphatase 2A Catalytic subunit betaisoform	PPP2CB		
IPI00429689			0,9999	4
IPI00465084	Desmin	DES	1,0000	3
IPI00465361	60S ribosomal protein L13	RPL13	0,9989	2
IPI00549343	Vesicle-associated membrane protein 3	VAMP3	0,9999	2
IPI00550020	Parathymosin	PTMS	0,9994	2
	Isoform 1 of actin-related protein 2/3 complex subunit 5	ARPC5		
IPI00550234			1,0000	2
IPI00550239	Histone H1.0	H1FO	1,0000	2
	Serine/threonine-protein phosphatase PP1-alpha catalytic subunit	PPP1CA		
IPI00550451			1,0000	3
	Isoform 1 of heterochromatin protein 1-binding protein 3	HP1BP3		
IPI00642238			0,9738	2
	Isoform 1 of guanine nucleotide-binding protein g(i), alpha-2 subunit	GNAI2		
IPI00748145			0,9999	2
IPI00749398	Serpin B6	SERPINB6	0,9976	2
IPI00783931	Isoform 1 of collagen alpha-1(xviii) chain	COL18A1	0,9995	2
IPI00827535	Isoform 1 of prothymosin alpha	PTMA	1,0000	3
IPI00879819	Lamin-b2	LMNB2	0,9959	2
IPI00883772	Acid alpha-glucosidase preproprotein	GAA	1,0000	3
IPI00926256	Band 3 anion transport protein	SLC4A1	1,0000	2
	Isoform 1 of peptidyl-glycine alpha-amidating monooxygenase	PAM		
IPI00940221			0,9699	2
	Nadh-ubiquinone oxidoreductase 75 KDA subunit, mitochondrial	NDUFS1		
IPI00940744			1,0000	3
	Isoform 1 of apolipoprotein a-I-binding protein	APOA1BP		
IPI00941988			0,9998	2
sp E9PAV3 NACAM_HUMA	Nascent polypeptide-associated complex	NACA	1,0000	3

N	subunit alpha, muscle-specific form			
sp O15230 LAMA5_HUMAN	Laminin subunit alpha-5	LAMA5	1,0000	5
sp P04843 RPN1_HUMAN	Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase subunit 1	RPN1	0,9921	3
sp P05455 LA_HUMAN	Lupus La protein	SSB	0,9999	2
sp P07942 LAMB1_HUMAN	Laminin subunit beta-1	LAMB1	0,9974	2
sp P08574 CY1_HUMAN	Cytochrome c1, heme protein, mitochondrial	CYC1	1,0000	2
sp P20774 MIME_HUMAN	Mimecan	OGN	1,0000	7
sp P30044 PRDX5_HUMAN	Peroxiredoxin-5, mitochondrial	PRDX5	0,9694	3
sp Q04446 GLGB_HUMAN	1,4-alpha-glucan-branching enzyme	GBE1	0,9726	2
sp Q7Z406 MYH14_HUMAN	Myosin-14	MYH14	1,0000	4
IPI00186290	Elongation factor 2	EEF2	1,0000	4
IPI00009362	Secretogranin-2	SCG2	0,9988	2
IPI00295386	Carbonyl reductase [NADPH] 1	CBR1	1,0000	13
IPI00217467	Histone H1.4	HIST1H1E	1,0000	9
IPI00549725	Phosphoglycerate mutase 1	PGAM1	1,0000	3
IPI00645078	Ubiquitin-like modifier-activating enzyme 1	UBA1	1,0000	7
IPI00179964	Isoform 1 of polypYRIMIDINE TRACT-BINDING PROTEIN 1	PTBP1	1,0000	2
IPI00942979	Transketolase	TKT	1,0000	9
IPI00025252	Protein disulfide-isomerase A3	PDIA3	1,0000	4
IPI00027223	Isocitrate dehydrogenase [NADP] cytoplasmic	IDH1	0,9997	3
IPI00550363	Transgelin-2	TAGLN2	1,0000	7
IPI00007765	Stress-70 protein, mitochondrial	HSPA9	1,0000	6
IPI00291006	Malate dehydrogenase, mitochondrial	MDH2	1,0000	8
IPI00008433	40S Ribosomal protein S5	RPS5	1,0000	2
IPI00215914	ADP-ribosylation factor 1	ARF1	0,9999	3
IPI00215917	ADP-ribosylation factor 3	ARF3	0,9999	3
IPI00020986	Lumican	LUM	1,0000	4
IPI00479722	Proteasome activator complex subunit 1	PSME1	1,0000	6
IPI00335168	Isoform non-muscle of myosin light polypeptide 6	MYL6	1,0000	5
IPI00000816	14-3-3 protein epsilon	YWHAE	1,0000	7
IPI00848226	Guanine nucleotide-binding protein subunit beta-2-like 1	GNB2L1	1,0000	4
IPI00007750	Tubulin alpha-4A chain	TUBA4A	1,0000	10
sp P80404 GABT_HUMAN	4-aminobutyrate aminotransferase, mitochondrial	ABAT	1,0000	5
sp P98160 PGBM_HUMAN	Basement membrane-specific heparan sulfate proteoglycan core protein	HSPG2	1,0000	10
IPI00029744	Single-stranded DNA-binding protein, mitochondrial	SSBP1	1,0000	4
IPI00257508	Dihydropyrimidinase-related protein 2	DPYSL2	1,0000	5
IPI00003833	Mitochondrial carrier homolog 2	MTCH2	1,0000	2
IPI00216457	Histone H2A type 2-A	HIST2H2AA 4 e HIST2H2AA 3	1,0000	9
IPI00339274	Histone H2A type 2-C	HIST2H2AC	1,0000	9
IPI00018278	Histone H2A.V	H2AFV	1,0000	3
IPI00218448	Histone H2A.Z	H2AFZ	1,0000	3
IPI00017726	3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase type-2	HSD17B10	1,0000	5
IPI00473014	Destrin	DSTN	1,0000	3
IPI00746205	Proteasome activator subunit 2	PSME2	1,0000	4
IPI00300567	Enoyl-CoA delta isomerase 1, mitochondrial	ECI1	0,9994	3
sp P0CG05 LAC2_HUMAN	Ig lambda-2 chain C regions	IGLC2	1,0000	3
sp P0CG06 LAC3_HUMAN	Ig lambda-3 chain C regions	IGLC3	1,0000	3
IPI00013485	40S ribosomal protein S2	RPS2	0,9771	2
IPI00027252	Prohibitin-2	PHB2	1,0000	4
IPI00246975	Glutathione S-transferase Mu 3	GSTM3	1,0000	3

IPI00075248	Calmodulin	CALM1;CALM2;CALM3	1,0000	2
IPI00291922	Proteasome subunit alpha type-5	PSMA5	0,9986	2
IPI00553138	vesicle-associated membrane protein 2	VAMP2	0,9999	2
IPI00329389	60S Ribosomal protein L6	RPL6	0,9996	2
IPI00219729	Mitochondrial 2-oxoglutarate/malate carrier protein	SLC25A11	0,9562	2
IPI00013508	Alpha-actinin-1	ACTN1	1,0000	7
IPI00013808	Alpha-actinin-4	ACTN4	1,0000	5
IPI00025084	Calpain small subunit 1	CAPNS1	1,0000	3
IPI00646304	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase B	PIIB	0,9923	2
IPI00304409	Calcium-regulated heat stable protein 1	CARHSP1	0,9996	2
IPI00024933	60S ribosomal protein L12	RPL12	0,9999	2
IPI00022429	Alpha-1-acid glycoprotein 1	ORM1	0,9605	2
IPI00298994	Talin-1	TLN1	1,0000	14
IPI00017469	Sepiapterin reductase	SPR	1,0000	3
IPI00006034	Cysteine-rich protein 2	CRIP2	0,9395	2
IPI00937615	Elongation factor 1-gamma	EEF1G	0,9999	2
IPI00010896	Chloride intracellular channel protein 1	CLIC1	0,9999	3
IPI00328415	CDNA FLJ56301, highly similar to NADH-cytochrome B5 reductase	CYB5R3	0,9995	2
IPI00007682	V-type proton ATPase catalytic subunit A	ATP6V1A	1,0000	4
IPI00001639	Importin subunit beta-1	KPNB1	1,0000	5
IPI00216587	40S ribosomal protein S8	RPS8	0,9456	2
IPI00216691	Profilin-1	PFN1	1,0000	3
IPI00002406	Basal cell adhesion molecule	BCAM	0,9998	3
sp P00505 AATM_HUMAN	Aspartate aminotransferase, mitochondrial	GOT2	1,0000	3
IPI00001453	Alpha-internexin	INA	1,0000	5
IPI00784154	60 kDa heat shock protein, mitochondrial	HSPD1	1,0000	4
IPI00942976	Epoxide hydrolase 2	EPHX2	1,0000	4
IPI00020987	Prolargin	PRELP	1,0000	4
IPI00643041	GTP-binding nuclear protein ran	RANP1;RAN	1,0000	2
IPI00026944	Nidogen-1	NID1	0,9352	2
IPI00028888	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D0	HNRNPD	1,0000	3
IPI00641229	IG alpha-2 chain C region	IGHA2	1,0000	2
IPI00000494	60S ribosomal protein L5	RPL5	1,0000	2
IPI00221092	40S ribosomal protein S16	RPS16	0,9991	3
IPI00026230	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H2	HNRNPH2	0,9998	2
IPI00023591	Transcriptional activator protein Pur-alpha	PURA	0,9219	2
IPI00000949	Thiomorpholine-carboxylate dehydrogenase	CRYM	1,0000	9
IPI00298281	Laminin subunit gamma-1	LAMC1	1,0000	3
IPI00217966	Isoform 1 of L-lactate dehydrogenase A chain	LDHA	1,0000	5
IPI00169383	Phosphoglycerate kinase 1	PGK1	1,0000	7
IPI00007960	Isoform 1 of periostin	POSTN	1,0000	9
IPI00216026	Voltage-dependent anion-selective channel protein 2	VDAC2	1,0000	5
IPI00218693	Adenine phosphoribosyltransferase	APRT	0,9993	2
IPI00017596	Microtubule-associated protein RP/EB family member 1	MAPRE1	0,9501	2
IPI00013079	EMILIN-1	EMILIN1	1,0000	2
IPI00291262	Isoform 1 of clusterin	CLU	1,0000	3
IPI00026546	Platelet-activating factor acetylhydrolase IB subunit beta	PAFAH1B2	0,9999	2
IPI00298971	Vitronectin	VTN	1,0000	2
IPI00017334	Prohibitin	PHB	1,0000	4
IPI00017510	Cytochrome c oxidase subunit 2	MT-CO2	1,0000	2
IPI00220642	14-3-3 protein gamma	YWHAG	1,0000	2

IPI00440493	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial	ATP5A1	1,0000	10
IPI00218918	Annexin A1	ANXA1	1,0000	7
IPI00396378	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1	HNRNPA2B1	1,0000	4
IPI00216049	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K	HNRNPK	1,0000	6
IPI00219365	Moesin	MSN	1,0000	6
IPI00843975	Ezrin	EZR	1,0000	5
IPI00304171	Core histone macro-H2A.1	H2AFY	1,0000	3
IPI00940148	Rab GDP dissociation inhibitor beta	GDI2	1,0000	2
IPI00010154	Rab GDP dissociation inhibitor alpha	GDI1	1,0000	3
IPI00016342	Ras-related protein Rab-7a	RAB7A	1,0000	3
IPI00473031	Alcohol dehydrogenase 1B	ADH1B	1,0000	4
IPI00218914	Retinal dehydrogenase 1	ALDH1A1	1,0000	16
IPI00218414	Carbonic anhydrase 2	CA2	1,0000	3
sp P01023 A2MG_HUMAN	Alpha-2-macroglobulin	A2M	1,0000	7
IPI00783987	Complement C3	C3	1,0000	9
IPI00021405	Prelamin-A/C	LMNA	1,0000	4
sp P02787 TRFE_HUMAN	Serotransferrin	TF	1,0000	13
IPI00022432	Transthyretin	TTR	1,0000	6
IPI00022774	Transitional endoplasmic reticulum atpase	VCP	1,0000	5
IPI00293665	Keratin, type II cytoskeletal 6B	KRT6B	1,0000	3
IPI00025512	Heat shock protein beta-1	HSPB1	1,0000	8
IPI00006663	Aldehyde dehydrogenase, mitochondrial	ALDH2	1,0000	6
IPI00008530	60S acidic ribosomal protein P0	RPLP0	1,0000	4
IPI00465248	Alpha-enolase	ENO1	1,0000	8
IPI00216171	Gamma-enolase	ENO2	1,0000	4
IPI00237671	Neurofilament light polypeptide	NEFL	1,0000	16
IPI00010796	Protein disulfide-isomerase	P4HB	1,0000	5
IPI00011229	Cathepsin D	CTSD	0,9999	4
IPI00414676	Heat shock protein HSP 90-beta	HSP90AB1	1,0000	7
IPI00784295	Isoform 1 of heat shock protein HSP 90-alpha	HSP90AA1	1,0000	3
IPI00329801	Annexin A5	ANXA5	1,0000	5
IPI00219757	Glutathione S-transferase P	GSTP1	1,0000	5
IPI00219219	Galectin-1	LGALS1	1,0000	3
sp P09467 F16P1_HUMAN	Fructose-1,6-bisphosphatase 1	FBP1	1,0000	5
sp P09525 ANXA4_HUMAN	Annexin A4	ANXA4	1,0000	3
IPI00024067	Clathrin heavy chain 1	CLTC	1,0000	10
IPI00291136	Collagen alpha-1(VI) chain	COL6A1	1,0000	9

Tabela 7. Lista das proteínas extraídas e identificadas de tecido fresco. Tampão de extração: (Tris20 mM pH 8,8, CHAPS 4%, DTT 200 mM). Sonicação: 14 pulsos, amplitude de 10% , 10 s *ON*, 45 s *OFF*.

Tecido Fresco --- CHAPS Sonicado				
Acesso	Proteína	Gene	Probabili- dade	Peptídeos Únicos
sp P12111 CO6A3_HUMAN	Collagen alpha-3(VI) chain	COL6A3	1,0000	3
IPI00027350	Peroxiredoxin-2	PRDX2	1,0000	6
sp P01876 IGHA1_HUMAN	Ig alpha-1 chain C region	IGHA1	1,0000	5
IPI00827754	Ig gamma-3 chain C region	IGHG3	0,9768	7
sp P01857 IGHG1_HUMAN	Ig gamma-1 chain C region	IGHG1	1,0000	14
sp P01834 IGKC_HUMAN	Ig kappa chain C region	IGKC	1,0000	8
IPI00303476	ATP synthase subunit beta, mitochondrial	ATP5B	1,0000	13
IPI00219018	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	GAPDH	1,0000	14
IPI00012011	Cofilin-1	CFL1	1,0000	3
IPI00009865	Keratin, type I cytoskeletal 10	KRT10	1,0000	5
IPI00479186	Pyruvate kinase PKM	PKM	1,0000	8
IPI00018146	14-3-3 protein theta	YWHAQ	1,0000	9
IPI00021263	14-3-3 protein zeta/delta	YWHAZ	1,0000	11
IPI00473011	Hemoglobin subunit delta	HBD	1,0000	16
IPI00410714	Hemoglobin subunit alpha	HBA1 e HBA2	1,0000	19
IPI00219446	Phosphatidylethanolamine-binding protein 1	PEBP1	1,0000	3
IPI00019359	Keratin,type I cytoskeletal 9	KRT9	1,0000	3
IPI00021841	Apolipoprotein A-I	APOA1	1,0000	12
IPI00553177	Alpha-1-antitrypsin	SERPINA1	1,0000	11
IPI00745872	Serum albumin	ALB	1,0000	51
IPI00220327	Keratin type II cytoskeletal 1	KRT1	1,0000	8
sp P35908 K22E_HUMAN	Keratin, type II cytoskeletal 2 epidermal	KRT2	1,0000	4
sp P07437 TBB5_HUMAN	Tubulin beta chain	TUBB	1,0000	16
IPI00027827	Extracellular superoxide dismutase [CU-ZN]	SOD3	1,0000	14
IPI00018352	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase isozyme L1	UCHL1	1,0000	12
IPI00022977	Creatine kinase B-type	CKB	1,0000	13
IPI00003348	Guanine nucleotide-binding protein g(i)/g(s)/g(t) subunit beta-2	GNB2	0,9999	2
IPI00003482	2,4-dienoyl-coa reductase, mitochondrial.	DECR1	0,9987	2
IPI00004358	glycogen phosphorylase, brain form	PYGB	1,0000	3
IPI00004560	Isoform 2 of serine/threonine-protein kinase dclk1	DCLK1	0,9998	2
IPI00005614	Isoform long of spectrin beta chain, brain 1	SPTBN1	1,0000	4
IPI00006980	Upf0568 protein c14orf166	C14orf166	1,0000	3
IPI00009342	Ras gtpase-activating-like protein iqgap1	IQGAP1	1,0000	13
IPI00010779	Isoform 1 of tropomyosin alpha-4 chain	TPM4	1,0000	5
IPI00010810	Electron transfer flavoprotein subunit alpha, mitochondrial	ETFA	1,0000	4
IPI00011274	Isoform 1 of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein d-like	HNRPDL	1,0000	5
IPI00011416	Delta(3,5)-delta(2,4)-dienoyl-coa isomerase, mitochondrial	ECH1	1,0000	7
IPI00014424	Elongation factor 1-alpha 2	EEF1A2	1,0000	3
IPI00014439	Dihydropteridine reductas.	QDPR	1,0000	5
IPI00014898	Isoform 1 of plectin-1	PLEC1	1,0000	7
IPI00015148	Ras-related protein RAP-1b	RAP1B	0,9359	2
IPI00016339	Ras-related protein RAB-5c	RAB5C	0,9873	2
IPI00016610	Poly(rc)-binding protein 1	PCBP1	0,9984	2

IPI00018342	Adenylate kinase isoenzyme 1	AK1	1,0000	6
IPI00018534	Histone H2B type 1-L	HIST1H2BL	0,9918	2
IPI00018931	Vacuolar protein sorting-associated protein 35	VPS35	1,0000	3
IPI00019345	Ras-related protein rap-1A	RAP1A	0,9359	2
IPI00020101	Histone H2B type 1-C/E/F/G/I	HIST1H2C/ E/F/G/I	0,9918	2
IPI00021885	Isoform 1 of fibrinogen alpha chain	FGA	0,9512	2
IPI00021891	Isoform gamma-B of fibrinogen gamma chain	FGG	0,9913	2
IPI00022488	Hemopexin	HPX	1,0000	4
IPI00023048	Isoform 1 of elongation factor 1-delta	EEF1D	1,0000	2
IPI00023673	Galectin-3-binding protein	LGALS3BP	0,9996	2
IPI00024095	Annexin A3	ANXA3	1,0000	5
IPI00024911	Endoplasmic reticulum protein ERP29	ERP29	1,0000	4
IPI00024993	Enoyl-coa hydratase, mitochondrial	ECHS1	1,0000	4
IPI00026185	Isoform 1 of f-actin-capping protein subunit beta	CAPZB	1,0000	3
IPI00026314	Isoform 1 of gelsolin	GSN	1,0000	7
IPI00027444	Leukocyte elastase inhibitor	SERPINB1	1,0000	2
IPI00028091	Actin-related protein 3	ACTR3	1,0000	6
IPI00029997	6-phosphogluconolactonase	PGLS	1,0000	5
IPI00031169	Ras-related protein rab-2a	RAB2A	1,0000	3
IPI00060715	BTB/POZ domain-containing protein KCTD12	KCTD12	0,9986	2
IPI00100980	EH domain-containing protein 2	EHD2	1,0000	7
IPI00152906	histone h2b type 1-d	HIST1H2B D	0,9918	2
IPI00171692	Isoform 1 of abhydrolase domain-containing protein 11	ABHD11	0,9982	2
IPI00176903	Isoform 1 of polymerase i and transcript release factor	PTRF	1,0000	4
IPI00215983	Carbonic anhydrase 1	CA1	1,0000	9
IPI00216308	Voltage-dependent anion-selective channel protein 1	VDAC1	1,0000	3
IPI00216319	14-3-3 protein ETA	YWHAH	1,0000	6
IPI00216694	Plastin-3	PLS3	1,0000	3
IPI00217507	Neurofilament medium polypeptide	NEFM	1,0000	3
IPI00218493	Hypoxanthine-guanine Phosphoribosyltransferase	HPRT1	1,0000	2
IPI00219526	Isoform 1 of phosphoglucomutase-1	PGM1	1,0000	2
IPI00220301	Peroxiredoxin-6	PRDX6	1,0000	7
IPI00220487	Isoform 1 of atp synthase subunit D, mitochondrial	ATP5H	0,9845	3
IPI00220834	ATP-dependent dna helicase 2 subunit 2	XRCC5	0,9977	2
IPI00293564	Hydroxymethylglutaryl-coa lyase, mitochondrial	HMGCL	0,9996	2
IPI00298497	Fibrinogen beta chain	FGB	1,0000	5
IPI00298828	Beta-2-glycoprotein 1	APOH	1,0000	3
IPI00298961	Exportin-1	XPO1	1,0000	2
IPI00299778	Serum paraoxonase/lactonase 3	PON3	0,9996	2
IPI00303133	Histone H2B type 1-H	HIST1H2B H	0,9918	2
IPI00303258	LIM and cysteine-rich domains protein 1	LMCD1	0,9978	2
IPI00307162	Isoform 2 of vinculin	VCL	1,0000	9
IPI00329665	Histone H2B type 2-F	HIST2H2BF	0,9918	2
IPI00333541	Isoform 1 of filamin-A	FLNA	1,0000	9
IPI00412525	RAS-related protein rap-1B-like protein	RAP1B	0,9359	2
IPI00418163	Complement component 4B preproprotein	C4B	0,9981	3
IPI00419833	Histone H2B type 1-K	HIST1H2B K	0,9918	2
IPI00419880	40s ribosomal protein S3A	RPS3A	0,9999	2
IPI00456969	Cytoplasmic dynein 1 heavy chain 1	DYNC1H1	1,0000	2

IPI00465085	Isoform 1 of nicotinate phosphoribosyltransferase	NAPRT1	0,9997	4
IPI00465439	Fructose-bisphosphate aldolase A	ALDOA	1,0000	6
IPI00477495	Histone h2b type F-S	H2BFS	0,9918	2
IPI00554648	Keratin, type II cytoskeletal 8	KRT8	1,0000	5
IPI00554737	Serine/threonine-protein phosphatase 2a 65 kda regulatory subunit aalpha isoform	PPP2R1A	1,0000	6
IPI00554798	Histone H2B type 1-M	HIST1H2B M	0,9918	2
IPI00604620	Nucleolin	NCL	1,0000	4
IPI00607799	Isoform 1 of 3-hydroxybutyrate dehydrogenase type 2	BDH2	1,0000	2
IPI00644712	ATP-dependent dna helicase 2 subunit 1	XRCC6	1,0000	4
IPI00644989	Isoform 1 of protein disulfide-isomerase A6	PDIA6	1,0000	5
IPI00646917	Cleavage and polyadenylation specificity factor subunit 5	NUDT21	0,9993	3
IPI00783982	Coatomer subunit gamma	COPG	1,0000	3
IPI00844215	Isoform 1 of spectrin alpha chain, brain	SPTAN1	1,0000	5
IPI00896419	Isoform 1 of inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain h4	ITIH4	0,9999	2
IPI00903145	Radixin	RDX	1,0000	5
IPI00941747	Calnexin	CANX	1,0000	5
IPI00943000	Isoform 1 of selenium-binding protein 1	SELENBP1	1,0000	5
sp O00159 MYO1C_HUMAN	Unconventional myosin-Ic	MYO1C	1,0000	3
sp O15173 PGRC2_HUMAN	Membrane-associated progesterone receptor component 2	PGRMC2	0,9999	2
sp O75489 NDUS3_HUMAN	NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 3, mitochondrial	NDUFS3	1,0000	4
sp P00738 HPT_HUMAN	Haptoglobin	HP	1,0000	5
sp P01859 IGHG2_HUMAN	Ig gamma-2 chain C region	IGHG2	0,9997	5
sp P02774 VTDB_HUMAN	Vitamin D-binding protein	GC	1,0000	6
sp P02788 TRFL_HUMAN	Lactotransferrin	LTF	1,0000	4
sp P08729 K2C7_HUMAN	Keratin, type II cytoskeletal 7	KRT7	1,0000	2
sp P0C0L4 CO4A_HUMAN	Complement C4-A	C4A	0,9981	3
sp P13796 PLSL_HUMAN	Plastin-2	LCP1	1,0000	4
sp P40925 MDHC_HUMAN	Malate dehydrogenase, cytoplasmic	MDH1	1,0000	3
sp P46821 MAP1B_HUMAN	Microtubule-associated protein 1B	MAP1B	0,9998	2
sp P49411 EFTU_HUMAN	Elongation factor Tu, mitochondrial	TUFM	0,9998	3
sp P49748 ACADV_HUMAN	Very long-chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mitochondrial	ACADVL	1,0000	5
sp P50995 ANX11_HUMAN	Annexin A11	ANXA11	1,0000	2
sp Q01518 CAP1_HUMAN	Adenylyl cyclase-associated protein 1	CAP1	1,0000	2
sp Q3LXA3 DHAK_HUMAN	Bifunctional ATP-dependent dihydroxyacetone kinase/FAD-AMP lyase (cyclizing)	DAK	1,0000	3
sp Q99877 H2B1N_HUMAN	Histone H2B type 1-N	HIST1H2B N	0,9918	2
IPI00186290	Elongation factor 2	EEF2	1,0000	7
IPI00295386	Carbonyl reductase [NADPH] 1	CBR1	1,0000	12
IPI00549725	Phosphoglycerate mutase 1	PGAM1	1,0000	6
IPI00645078	Ubiquitin-like modifier-activating enzyme 1	UBA1	1,0000	11
IPI00179964	Isoform 1 of polypYRIMIDINE TRACT-BINDING PROTEIN 1	PTBP1	1,0000	6
IPI00942979	Transketolase	TKT	1,0000	4
IPI00025252	Protein disulfide-isomerase A3	PDIA3	1,0000	9
IPI00027223	Isocitrate dehydrogenase [NADP] cytoplasmic	IDH1	1,0000	5
IPI00007765	Stress-70 protein, mitochondrial	HSPA9	1,0000	9
IPI00291006	Malate dehydrogenase, mitochondrial	MDH2	1,0000	10
IPI00008433	40S Ribosomal protein S5	RPS5	1,0000	3
IPI00020986	Lumican	LUM	1,0000	4
IPI00000816	14-3-3 protein epsilon	YWHAE	1,0000	10

IPI00848226	Guanine nucleotide-binding protein subunit beta-2-like 1	GNB2L1	1,0000	5
IPI00007750	Tubulin alpha-4A chain	TUBA4A	1,0000	12
sp P80404 GABT_HUMAN	4-aminobutyrate aminotransferase, mitochondrial	ABAT	1,0000	8
IPI00257508	Dihydropyrimidinase-related protein 2	DPYSL2	1,0000	18
IPI00017726	3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase type-2	HSD17B10	1,0000	6
IPI00746205	Proteasome activator subunit 2	PSME2	1,0000	10
IPI00300567	Enoyl-CoA delta isomerase 1, mitochondrial	ECI1	1,0000	3
sp P0CG05 LAC2_HUMAN	Ig lambda-2 chain C regions	IGLC2	1,0000	6
sp P0CG06 LAC3_HUMAN	Ig lambda-3 chain C regions	IGLC3	1,0000	6
IPI00013485	40S ribosomal protein S2	RPS2	0,9997	2
IPI00027252	Prohibitin-2	PHB2	1,0000	3
IPI00246975	Glutathione S-transferase Mu 3	GSTM3	1,0000	5
IPI00013508	Alpha-actinin-1	ACTN1	1,0000	9
IPI00013808	Alpha-actinin-4	ACTN4	1,0000	11
IPI00025084	Calpain small subunit 1	CAPNS1	1,0000	4
IPI00022429	Alpha-1-acid glycoprotein 1	ORM1	1,0000	5
IPI00298994	Talin-1	TLN1	1,0000	12
IPI00017469	Sepiapterin reductase	SPR	1,0000	5
IPI00937615	Elongation factor 1-gamma	EEF1G	0,9996	2
IPI00010896	Chloride intracellular channel protein 1	CLIC1	0,9994	2
IPI00328415	CDNA FLJ56301, highly similar to NADH-cytochrome B5 reductase	CYB5R3	1,0000	5
IPI00007682	V-type proton ATPase catalytic subunit A	ATP6V1A	1,0000	2
IPI00001639	Importin subunit beta-1	KPNB1	1,0000	5
IPI00216691	Profilin-1	PFN1	1,0000	4
IPI00002406	Basal cell adhesion molecule	BCAM	1,0000	3
sp P00505 AATM_HUMAN	Aspartate aminotransferase, mitochondrial	GOT2	0,9993	2
IPI00001453	Alpha-internexin	INA	1,0000	2
IPI00028888	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D0	HNRNPD	1,0000	8
IPI00026230	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H2	HNRNPH2	1,0000	3
IPI00023591	Transcriptional activator protein Pur-alpha	PURA	1,0000	2
IPI00000949	Thiomorpholine-carboxylate dehydrogenase	CRYM	1,0000	4
IPI00217966	Isoform 1 of L-lactate dehydrogenase A chain	LDHA	0,9991	3
IPI00169383	Phosphoglycerate kinase 1	PGK1	1,0000	8
IPI00007960	Isoform 1 of periostin	POSTN	0,9998	2
IPI00216026	Voltage-dependent anion-selective channel protein 2	VDAC2	1,0000	4
IPI00218693	Adenine phosphoribosyltransferase	APRT	1,0000	3
IPI00291262	Isoform 1 of clusterin	CLU	1,0000	4
IPI00298971	Vitronectin	VTN	0,9995	3
IPI00220642	14-3-3 protein gamma	YWHAG	1,0000	5
IPI00440493	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial	ATP5A1	1,0000	10
IPI00218918	Annexin A1	ANXA1	1,0000	8
IPI00396378	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1	HNRNPA2B1	1,0000	7
IPI00216049	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K	HNRNPK	1,0000	9
IPI00219365	Moesin	MSN	1,0000	6
IPI00843975	Ezrin	EZR	1,0000	8
IPI00304171	Core histone macro-H2A.1	H2AFY	1,0000	4
IPI00940148	Rab GDP dissociation inhibitor beta	GDI2	1,0000	5
IPI00016342	Ras-related protein Rab-7a	RAB7A	1,0000	3
IPI00473031	Alcohol dehydrogenase 1B	ADH1B	1,0000	5
IPI00218914	Retinal dehydrogenase 1	ALDH1A1	1,0000	21
IPI00218414	Carbonic anhydrase 2	CA2	1,0000	6

IPI00783987	Complement C3	C3	1,0000	15
IPI00021405	Prelamin-A/C	LMNA	1,0000	6
sp P02787 TRFE_HUMAN	Serotransferrin	TF	1,0000	13
IPI00022774	Transitional endoplasmic reticulum atpase	VCP	1,0000	7
IPI00025512	Heat shock protein beta-1	HSPB1	1,0000	6
IPI00006663	Aldehyde dehydrogenase, mitochondrial	ALDH2	1,0000	6
IPI00008530	60S acidic ribosomal protein P0	RPLP0	1,0000	4
IPI00465248	Alpha-enolase	ENO1	1,0000	13
IPI00216171	Gamma-enolase	ENO2	1,0000	8
IPI00237671	Neurofilament light polypeptide	NEFL	1,0000	4
IPI00010796	Protein disulfide-isomerase	P4HB	1,0000	7
IPI00011229	Cathepsin D	CTSD	1,0000	5
IPI00414676	Heat shock protein HSP 90-beta	HSP90AB1	1,0000	12
IPI00329801	Annexin A5	ANXA5	1,0000	8
IPI00219757	Glutathione S-transferase P	GSTP1	1,0000	7
sp P09525 ANXA4_HUMAN	Annexin A4	ANXA4	1,0000	4
IPI00024067	Clathrin heavy chain 1	CLTC	0,9640	3

Para uma maior confiabilidade dos resultados, foram listadas nas Tabelas 4, 5, 6 e 7 somente as identificações com probabilidade de acerto maior que 90% e as que apresentaram no mínimo dois peptídeos únicos. Um total de 156 proteínas foram identificadas a partir de tecido FFPE extraídos com tampão à base de SDS mais aquecimento (Tabela 4), representando 41,7% das 374 proteínas identificadas a partir de tecido fresco (Tabela 6), o qual serviu como referência. Todas as 156 proteínas mencionadas apresentaram correspondência com o grupo utilizado como controle, sugerindo que o processo de fixação com formaldeído não resultou em falsas identificações. A extração com tampão à base de CHAPS e aquecimento resultou em apenas 30 proteínas identificadas (Tabela 5), das quais apenas duas delas não foram identificadas nas extrações baseadas em SDS.

Elucidou-se o efeito da utilização do aquecimento no método de extração comparando-se as proteínas extraídas desta forma com as proteínas extraídas pelo método que utiliza ultrassom, ambos a partir de tecido fresco. O uso do ultrassom resultou na identificação de 208 proteínas, representando 55,6% das 374 proteínas identificadas, onde novamente todas apresentaram correspondência com o grupo maior.

Os resultados descritos acima podem ser observados de forma sucinta e visual por meio dos diagramas de Euler a seguir (Figuras 8 e 9). Neles observa-se a correspondência das proteínas identificadas através das sobreposições dos grupos.

Figura 8. Diagrama de Euler: comparação das listas de proteínas identificadas - confronto de resultados entre as metodologias desenvolvidas para tecidos FFPE vs. tecidos Frescos

Figura 9. Diagrama de Euler: comparação das listas de proteínas identificadas - confronto de resultados entre as metodologias desenvolvidas com aquecimento vs. ultrassom

De acordo com Chaver et. al. (2014, p. 3804), entre as proteínas identificadas, 14 são fortes candidatas a novos biomarcadores para o diagnóstico e prognóstico de CCR:

- *Alpha-1-acid glycoprotein type 1*
- *Alpha-enolase, Cathepsin B*
- *60 kDa heat shock protein, mitochondrial*
- *Tubulin beta chain*
- *Vimentin*
- *Cathepsin D, Apolipoprotein A-I*
- *Peroxiredoxin-2*
- *Collagen alpha-1(VI) chain*
- *Complement C3*
- *Ezrin*
- *Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H2*
- *Phosphoglycerate kinase1*
- *Transthyretin*
- *Pyruvate kinase PKM*

5. Conclusão

Neste estudo, metodologias de desparafinização, extração de proteínas e remoção de interferentes de tecido de CCR FFPE foram comparadas e otimizadas. Empregando o mesmo *pool* de amostras para todas as metodologias testadas, os extratos proteicos obtidos para cada método foram submetidos à separação por SDS-PAGE, sendo as proteínas posteriormente identificadas por espectrometria de massas. As separações por SDS-PAGE, apesar de não apresentarem a mesma resolução conseguida com tecidos frescos, mostraram-se eficientes quando combinadas à espectrometria de massas. Uma limpeza significativa dos analitos foi possível através do gel, uma vez que as proteínas imobilizadas em seu interior foram submetidas a ação e solventes como acetonitrila e água, removendo eficientemente interferentes como sais e detergentes que poderiam suprimir os sinais das análises por espectrometria de massas. Com isso, foi possível a identificação de um número considerável de proteínas extraídas a partir de tecido FFPE quando comparadas as extrações de tecidos frescos, e ainda a detecção de 14 novos candidatos a biomarcadores de CCR citados recentemente na literatura.

Apesar da clara e discutida dificuldade de trabalhar com este tipo de matriz, quando comparada a tecido fresco, os resultados obtidos acabam por encorajar mais pesquisas nesse sentido, visto o grande potencial de informações que talvez possam ser acessadas nos inúmeros bancos de tumores existentes pelo mundo.

6. BIBLIOGRAFIA

- ADDIS, M. F.; TANCA, A.; PAGNOZZI, D.; CROBU, S.; et al. Generation of high-quality protein extracts from formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. **PROTEOMICS**, v. 9, n. 15, p. 3815–3823, 2009.
- ADDIS, M. F.; TANCA, A.; PAGNOZZI, D.; ROCCA, S.; UZZAU, S. 2-D PAGE and MS analysis of proteins from formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. **PROTEOMICS**, v. 9, n. 18, p. 4329–4339, 2009.
- ANDREYEV, H. J.; NORMAN, A. R.; CUNNINGHAM, D.; OATES, J. R.; CLARKE, P. A. Kirsten ras mutations in patients with colorectal cancer: the multicenter “RASCAL” study. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 90, n. 9, p. 675–684, 1998.
- ATKIN, W. S.; EDWARDS, R.; KRALJ-HANS, I.; et al. Once-only flexible sigmoidoscopy screening in prevention of colorectal cancer: a multicentre randomised controlled trial. **Lancet**, v. 375, n. 9726, p. 1624–1633, 2010.
- BECKER, K.-F.; SCHOTT, C.; HIPPEL, S.; et al. Quantitative protein analysis from formalin-fixed tissues: implications for translational clinical research and nanoscale molecular diagnosis. **The Journal of Pathology**, v. 211, n. 3, p. 370–378, 2007.
- BERG, D.; HIPPEL, S.; MALINOWSKY, K.; BÖLLNER, C.; BECKER, K.F. Molecular profiling of signalling pathways in formalin-fixed and paraffin-embedded cancer tissues. **European Journal of Cancer**, v. 46, n. 1, p. 47–55, 2010.
- BISCH, P. M. **Genômica funcional: proteômica**. São Paulo: Atheneu, 2004.
- CEROTTINI, J. P.; CAPLIN, S.; SARAGA, E.; GIVEL, J. C.; BENHATTAR, J. The type of K-ras mutation determines prognosis in colorectal cancer. **American Journal of Surgery**, v. 175, n. 3, p. 198–202, 1998.
- CHAUVER, P.; ESTÉVEZ, O.; CADENA, M. P.; BERROCAL, F. J.; ZORZANO, V. S. Proteomics for discovery of candidate colorectal cancer biomarkers. **WORLD JOURNAL OF GASTROENTEROLOGY**, v. 20, n. 14, p. 3808-3824.
- CHO, W. C. Contribution of oncoproteomics to cancer biomarker discovery. **Molecular Cancer**, v. 6, n. 1, p. 25, 2007.
- DEVITA, V. T.; LAWRENCE, T. S.; ROSENBERG, S. A.; DEPINHO, R. A.; WEINBERG, R. A. **Principles and Practice of Oncology: In: DeVita, Hellman, and Rosenberg’s Cancer**. 9 edition ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2011.
- DNA, E. Q. E. Q. DO. **ANDERSON PAULO SCORSATO**, 2010. Universidade Federal do Paraná.
- FOX, C. H.; JOHNSON, F. B.; WHITING, J.; ROLLER, P. P. Formaldehyde fixation. **J Histochem Cytochem**, v. 33, n. 8, p. 845–853, 1985.
- GILBERT, M. T. P.; HASELKORN, T.; BUNCE, M.; et al. The Isolation of Nucleic Acids from Fixed, Paraffin-Embedded Tissues–Which Methods Are Useful When? **PLoS ONE**, v. 2, n. 6, p. e537, 2007. Acesso em: 11/7/2014.

GRÄNTZDÖRFFER, I.; YUMLU, S.; GIOEVA, Z.; et al. Comparison of different tissue sampling methods for protein extraction from formalin-fixed and paraffin-embedded tissue specimens. **Experimental and Molecular Pathology**, v. 88, n. 1, p. 190–196, 2010.

GUNDERSON, L. L.; JESSUP, J. M.; SARGENT, D. J.; GREENE, F. L.; STEWART, A. K. Revised TN Categorization for Colon Cancer Based on National Survival Outcomes Data. **Journal of Clinical Oncology**, v. 28, n. 2, p. 264–271, 2010.

HABERMANN, J. K.; BADER, F. G.; FRANKE, C.; et al. From the genome to the proteome--biomarkers in colorectal cancer. **Langenbeck's Archives of Surgery / Deutsche Gesellschaft Für Chirurgie**, v. 393, n. 1, p. 93–104, 2008.

HARDER, A.; WILDGRUBER, R.; NAWROCKI, A.; et al. Comparison of yeast cell protein solubilization procedures for two-dimensional electrophoresis. **Electrophoresis**, v. 20, n. 4-5, p. 826–829, 1999.

HOWE, J. R.; GUILLEM, J. G. The genetics of colorectal cancer. **The Surgical Clinics of North America**, v. 77, n. 1, p. 175–195, 1997.

IMPERIALE, T. F.; GLOWINSKI, E. A.; LIN-COOPER, C.; et al. Five-year risk of colorectal neoplasia after negative screening colonoscopy. **The New England Journal of Medicine**, v. 359, n. 12, p. 1218–1224, 2008.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. Estimativa 2014 Incidência de Câncer no Brasil. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2014/tbregioes_consolidado.asp>. Acesso em: 29/5/2014.

JEMAL, A.; SIEGEL, R.; WARD, E.; et al. Cancer statistics, 2009. **CA: a cancer journal for clinicians**, v. 59, n. 4, p. 225–249, 2009.

KITAMURA, D.; KANEKO, H.; MIYAGOE, Y.; ARIYASU, T.; WATANABE, T. Isolation and characterization of a novel human gene expressed specifically in the cells of hematopoietic lineage. **Nucleic Acids Research**, v. 17, n. 22, p. 9367–9379, 1989.

KOPETZ, S.; CHANG, G. J.; OVERMAN, M. J.; et al. Improved Survival in Metastatic Colorectal Cancer Is Associated With Adoption of Hepatic Resection and Improved Chemotherapy. **Journal of Clinical Oncology**, v. 27, n. 22, p. 3677–3683, 2009.

KRESSNER, U.; INGANÄS, M.; BYDING, S.; et al. Prognostic value of p53 genetic changes in colorectal cancer. **Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology**, v. 17, n. 2, p. 593–599, 1999.

LESK, A. M. **Introduction to Bioinformatics**. 2 edition ed. Oxford ; New York: Oxford University Press, 2005.

MARKOWITZ, S. D.; BERTAGNOLLI, M. M. Molecular Origins of Cancer. **The New England journal of medicine**, v. 361, n. 25, p. 2449–2460, 2009.

OJOPI, E. P.; DIAS NETO, E. **Genômica e Oncologia**. In: MIR, L. Genômica. 2nd ed. São Paulo: Atheneu, 2004.

PINHO, M. DE S. L. Marcadores moleculares como fatores prognósticos do câncer colorretal. **Rev. bras. colo-proctol**, v. 19, n. 2, p. 130–2, 1999.

PUCHTLER, H.; MELOAN, S. N. On the chemistry of formaldehyde fixation and its effects on immunohistochemical reactions. **Histochemistry**, v. 82, n. 3, p. 201–204, 1985.

QUASAR COLLABORATIVE GROUP; GRAY, R.; BARNWELL, J.; et al. Adjuvant chemotherapy versus observation in patients with colorectal cancer: a randomised study. **Lancet**, v. 370, n. 9604, p. 2020–2029, 2007.

SARGENT, D. J.; MARSONI, S.; MONGES, G.; et al. Defective mismatch repair as a predictive marker for lack of efficacy of fluorouracil-based adjuvant therapy in colon cancer. **Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology**, v. 28, n. 20, p. 3219–3226, 2010.

SARGENT, D. J.; WIEAND, H. S.; HALLER, D. G.; et al. Disease-free survival versus overall survival as a primary end point for adjuvant colon cancer studies: individual patient data from 20,898 patients on 18 randomized trials. **Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology**, v. 23, n. 34, p. 8664–8670, 2005.

SERVOMAA, K.; KIURU, A.; KOSMA, V. M.; HIRVIKOSKI, P.; RYTÖMAA, T. p53 and K-ras gene mutations in carcinoma of the rectum among Finnish women. **Molecular pathology: MP**, v. 53, n. 1, p. 24–30, 2000.

SCORSATO, Anderson P. **Estudo quantitativo e qualitativo do DNA obtido da medula óssea armazenada em blocos de parafina de pacientes portadores de anemia aplásica**, 2010. Dissertação (Mestrado em Microbiologia, Parasitologia e Patologia) - Departamento de Patologia Básica e Patologia Médica, Universidade Federal do Paraná, Curitiba 2010.

SRIVASTAVA, S.; VERMA, M.; HENSON, D. E. Biomarkers for Early Detection of Colon Cancer. **Clinical Cancer Research**, v. 7, n. 5, p. 1118–1126, 2001.

VOUSDEN, K. H. p53: death star. **Cell**, v. 103, n. 5, p. 691–694, 2000.

WESTERMEIER, R.; R, M. Protein Detection Methods in Proteomics Research. Disponível em: <<http://www.bioscirep.org/bsr/025/bsr0250019.htm>>. Acesso em: 27/7/2014.

XU, H.; YANG, L.; WANG, W.; et al. Antigen Retrieval for Proteomic Characterization of Formalin-Fixed and Paraffin-Embedded Tissues. **Journal of Proteome Research**, v. 7, n. 3, p. 1098–1108, 2008.