

# RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)  
autor(a), o texto completo desta tese  
será disponibilizado somente a partir  
de 21/02/2021.



# **Meta-análise Integrativa Secretoma-Proteoma para Identificação de Potenciais Biomarcadores de Adenocarcinoma Ductal Pancreático**

**GRASIELI DE OLIVEIRA**

*Bióloga*

Tese de doutorado apresentado ao  
Programa de Pós-Graduação em  
Biologia Geral e Aplicada, Área de  
concentração *BIOLOGIA CELULAR  
ESTRUTURAL E FUNCIONAL*.  
Instituto de Biociências, Campus de  
Botucatu, UNESP.

***Orientador: Robson Francisco Carvalho***

## TESE DE DOUTORADO

# Meta-análise Integrativa Secretoma-Proteoma para Identificação de Potenciais Biomarcadores de Adenocarcinoma Ductal Pancreático

### **Aluna:**

Me. Grasieli de Oliveira

Doutoranda do Curso de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada – IB

### **Orientador:**

*Robson Francisco Carvalho*

Prof. Assistente Doutor - Departamento de Morfologia

### **Pesquisadores Associados:**

Dra. Maeli Dal Pai-Silva

Profa. Titular - Departamento de Morfologia

Me. Paula Paccielli Freire

Doutoranda do Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Genética)

Me. Sarah Santiloni Cury

Doutoranda do Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Genética)

Me. Jakeline Oliveira

Doutoranda do Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Genética)

Diogo Moraes

Mestrando do Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Genética)

**Instituição:** Instituto de Biociências – IB

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCN. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.  
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP  
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Oliveira, Grasieli de.

Meta-análise integrativa secretoma-proteoma para  
identificação de potenciais biomarcadores de  
adenocarcinoma ductal pancreático / Grasieli de Oliveira.  
- Botucatu, 2020

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista  
"Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de  
Botucatu

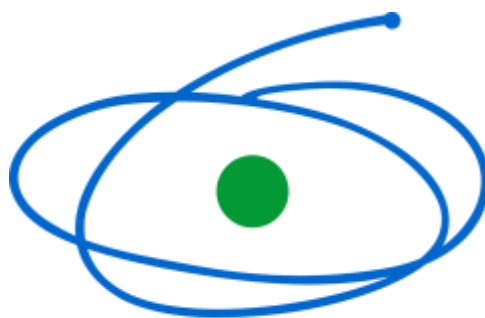
Orientador: Robson Francisco Carvalho  
Capes: 20100000

1. Pâncreas - Câncer. 2. Bioinformática. 3. Secretoma.  
4. Espectrometria de massas. 5. Biomarcador.  
6. Meta-análise.

Palavras-chave: Bioinformática; Biomarcadores  
prognósticos; Espectrometria de massas; PAAD.

## Auxílios financeiros

CAPES – Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior



C A P E S



## Dedicatória

Dedico esse trabalho ao meu noivo e companheiro *JOSÉ CAVALCANTE*, meu parceiro, amigo, confidente, meu grande incentivador e alicerce durante essa caminhada. Alguém que me segurou, entendeu e acalentou. Alguém que admiro e respeito muito. Você foi minha base, meu porto seguro, meu motivo para continuar. Antes de qualquer um acreditou que eu podia ir além do que eu mesmo podia suportar. É minha fonte de inspiração, de superação. Obrigada por tudo que fez e faz por mim.

## Agradecimentos

Caminhar pela vida não é nada fácil, para esse ato tão cheio de detalhes, obstáculos e conquistas precisamos da ajuda de algo extremamente poderoso, Deus. Obrigada meu Deus por me mover, velar e orientar! Obrigada por tudo que Fez e Faz por mim!

Agradeço ao meu companheiro, amigo, amor, noivo, José Cavalcante Souza Vieira. Mais um presente de Deus na minha vida, que desde que apareceu só me ensinou, me tornou mais forte, mais segura e mais feliz. Obrigada José por ter sido meu alicerce, meu exemplo, meu motivo de querer sempre sorrir mais, meu refúgio, meu porto seguro. Não tenho como descrever a imensa gratidão que tenho por toda sua compreensão e companheirismo, serei sempre grata por toda força e atenção que me dá. Sinto-me serena com sua presença, você me dá paz na alma.

À minha família Maria Bela, Flávia, Leandro, Renata, Júlia, Neirima, José Cavalcante e Maria Vieira. Pessoas que estiveram comigo por toda essa caminhada, que fizeram minha estrada mais bela e leve. Obrigada família, sem vocês nada tem sentido.

Ao meu orientador, por todo ensinamento, dedicação, solidariedade, amizade e respeito. Por ter apostado em mim, acreditado no meu potencial e permitido que eu pudesse viver essa grande oportunidade. Ser humano que aprendi a admirar e a respeitar muito. Não foi por acaso que Deus te escolheu para me orientar, agradeço muito à Ele por isso.

Aos companheiros de laboratório, Paula, Sarah, Rafaela, Bruno, Diogo, Jakeline muito obrigada pela companhia maravilhosa, pelas habilidades e paciência que cada um tem, pela prontidão em ajudar, em sempre contribuir para o crescimento do grupo, por serem essas pessoas tão especiais nos dias de trabalho, vocês sempre são exemplos. Não consigo escrever toda a admiração que sinto por cada um, tenho orgulho demais de vocês.

Ao grupo LBME (Laboratório de Músculo Estriado), pessoas excepcionais, com aptidões magníficas que ajudam a tornar esse grupo tão forte e tão especial.

Aos grandes mentores desse laboratório Robson Francisco Carvalho e Maeli Dal-Pai-Silva, pela oportunidade de aprender, pela dedicação em ensinar e pela vontade

de transpor todas as dificuldades e nos elevar ao mais alto nível. Grandes mestres que tive e nunca esquecerei.

À minha banca de qualificação e defesa de tese de doutorado Luis Fernando Barbisan, Patrícia Pintor dos Reis, Luiz Antônio Justulin Júnior, Alice Cristina Rodrigues pelas sugestões e contribuições nesse trabalho.

Obrigada a todos os professores do Departamento de morfologia e UNESP/Botucatu em geral por estarem dispostos a me ajudar no que precisei. A professora Fernanda Mani pela oportunidade de estágio docência e aos professores que me deram aulas durante o mestrado. Obrigada!

A CAPES pela concessão de bolsa. Sem essa ajuda financeira eu não seria capaz de realizar meus estudos.





## Homenagem ao Orientador

Quando sentei para escrever essa homenagem fui buscar nos arquivos o que tinha escrito no mestrado e verificar se algo havia mudado e a resposta é: nada mudou, ou melhor, melhorou. Então repito e enfatizo: **Robson Francisco Carvalho**, um nome entre tantos, um professor entre muitos, mas um mestre único. Não sei como expressar toda a gratidão que guardo comigo, não sei como demonstrar em palavras toda admiração que tenho pelo seu profissionalismo e modo particular de tratar as pessoas. Sua forma de considerar as limitações, trajetória de cada um, a capacidade de enxergar o ser humano como é e de respeitá-lo. Esse seu jeito sutil e sábio de levar seus alunos às melhores conquistas, deixando claro o quanto somos capazes e o quão longe podemos chegar. Vimos nossas conquistas se tornarem suas e vice e versa, vimos sua dedicação e empenho para que todos evoluíssem com serenidade e tranquilidade, vimos em cada dia seu empenho em sempre nos proporcionar o melhor, vimos seu esforço em dar o melhor de si. Obrigada por ser este orientador extraordinário, incrivelmente gentil e solidário. Muito obrigada mesmo!!!



## Epígrafes

Tenho fé. Nada é maior que meu Senhor.

*Grasieli de Oliveira*

Mudam-se os tempos, mudam-se as vontades, mudam-se o ser, muda-se a confiança;  
Todo mundo é composto de mudança, tomando sempre novas qualidades.

*Luís de Camões*

Quando você acha que sabe todas as perguntas, vem a vida e muda todas as repostas.

*Bob Marley*

## Resumo

Adenocarcinoma ductal do pâncreas (PDAC) é extremamente agressivo, possui prognóstico desfavorável e não existem biomarcadores satisfatório para a doença ou identificação de indivíduos com alto risco de morbidade e mortalidade. A complexidade celular e molecular do câncer de pâncreas leva a inconsistências nas validações clínicas de muitas proteínas que foram avaliadas como biomarcadores prognósticos da doença. O secretoma tumoral desempenha um papel crucial na proliferação e metástase de células PDAC, bem como na resistência a tratamentos terapêuticos, que juntos contribuem para um pior resultado clínico. Assim, a enorme quantidade de dados proteômicos do câncer de pâncreas que foram gerados a partir de diferentes tipos de amostras e técnicas de espectrometria de massa pode ser integrada para a seleção de proteínas secretadas compartilhadas relevantes para o diagnóstico e prognóstico da doença. O objetivo do presente estudo foi realizar uma meta-análise combinando dados do proteoma do câncer de pâncreas e secretome publicamente para identificar novos potenciais biomarcadores de doenças. Realizamos uma meta-análise integrando dados de espectrometria de massa obtidos de duas revisões sistemáticas da literatura sobre câncer de pâncreas, que selecionaram independentemente 20 estudos do secretoma e 35 do proteoma. Em seguida, realizamos análises de predição de proteínas secretadas usando sete ferramentas ou bancos de dados “*in silico*”, que identificaram 39 proteínas compartilhadas entre o secretoma e os dados do proteoma. Notavelmente, a expressão de 31 genes dessas proteínas foi aumentada em amostras de adenocarcinoma do pâncreas do The Cancer Genome Atlas (TCGA) quando comparadas às amostras de controle do TCGA e The Genotype-Tissue Expression (GTEx). O valor prognóstico dessas 39 proteínas secretadas para prever o resultado da sobrevida foi confirmado usando dados de expressão gênica de quatro conjuntos de dados do PDAC (conjunto de validação). A expressão gênica dessas proteínas secretadas também foi capaz de distinguir pacientes de alta e baixa sobrevida em nove tipos de tumores adicionais do TCGA, demonstrando que a desregulação dessas proteínas secretadas também pode contribuir para o prognóstico em vários tipos de câncer. Finalmente, comparamos o valor prognóstico das proteínas secretadas identificadas em vários estudos de biomarcadores do PDAC. Essa análise revelou que nossa assinatura genética teve um desempenho semelhante ou melhor do que as assinaturas encontradas em estudos anteriores. Em conclusão, o proteoma e o secretome de tumores e células pancreáticas compartilham 39 proteínas secretadas, e o perfil de expressão gênica do tumor dessas proteínas em pacientes com PDAC está associado a pior sobrevida global.

**Palavras-chave:** PAAD, Espectrometria de massas, Bioinformática, Biomarcadores prognósticos.

## Abstract

Pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) is extremely aggressive, has an unfavorable prognosis and there are no satisfactory biomarkers for the disease or identification of individuals at high risk of morbidity and mortality. The cellular and molecular complexity of pancreatic cancer leads to inconsistencies in clinical validations of many proteins that have been evaluated as prognostic biomarkers of the disease. Tumor secretome plays a crucial role in PDAC cell proliferation and metastasis, as well as in resistance to therapeutic treatments, which together contribute to a worse clinical outcome. Thus, the massive amount of proteomic data from pancreatic cancer that have been generated from different studies can be integrated into the selection of shared secreted proteins relevant to the prognosis of the disease. The aim of the present study was to perform a meta-analysis combining pancreatic cancer proteome and secretome publicly data to identify new potential disease biomarkers. We performed a meta-analysis integrating mass spectrometry data obtained from two systematic reviews of the pancreatic cancer literature, which independently selected 20 studies of the secretome and 35 of the proteome. Next, we performed prediction analyses of secreted proteins using seven “in silico” tools or databases, which identified 39 proteins shared between the secretome and the proteome data. Notably, the expression of 31 genes of these proteins was upregulated in pancreatic adenocarcinoma samples from The Cancer Genome Atlas (TCGA) when compared to control samples from TCGA and The Genotype-Tissue Expression (GTEx). The prognostic value of these 39 secreted proteins for predicting survival outcome was confirmed using gene expression data from four PAAD datasets (validation set). The gene expression of these secreted proteins was also capable of distinguishing high- and low-survival patients in nine additional tumor types from TCGA, demonstrating that the deregulation of these secreted proteins may also contribute to the prognosis in multiple cancers types. Finally, we compared the prognostic value of the identified secreted proteins within various PDAC biomarkers studies. This analysis revealed that our genetic signature performed similarly or better than the signatures found in previous studies. In conclusion, the proteome and secretome from pancreatic tumors and cells share 39 secreted proteins, and tumor gene expression profile of these proteins in patients with PDAC is associated with worse overall survival.

Keywords: PAAD, mass spectrometry, bioinformatics, prognostic biomarkers.

## Sumário

1	Introdução – Revisão da literatura .....	14
1.1	Câncer .....	14
1.2	Câncer pancreático.....	16
1.3	Secretoma do câncer .....	24
1.3.1	Biomarcadores .....	28
1.4	Investigação <i>in silico</i> de biomarcadores de câncer .....	32
1.4.1	Meta-análise.....	32
2	Caracterização do problema .....	35
3	Hipótese.....	36
4	Objetivos .....	36
4.1	Objetivo geral.....	36
4.2	Objetivos específicos .....	36
5	Métodos.....	37
5.1	Integração de meta-análises do secretoma e do proteoma para identificação de proteínas do câncer pancreático .....	37
5.1.1	Meta-análise do secretoma de câncer pancreático.....	37
5.1.2	Meta-análise do proteoma de adenocarcinoma ductal pancreático .....	45
5.2	Extração dos dados das meta-análises .....	46
5.3	Identificação de proteínas secretadas.....	47
5.4	Construção de rede de interação proteína-proteína e análise de ontologia.....	47
5.5	Perfil de expressão gênica diferencial de transcritos traduzidos em proteínas secretadas no adenocarcinoma ductal pancreático.....	48
5.6	Análises Banco de dados SurvExpress .....	49
6	Resultados .....	50
6.1	Integração de Meta-análise do Secretoma e Proteoma de câncer pancreático.	50
6.2	Rede de interação proteína-proteína e análise de ontologia.....	56
6.3	Expressão gênica diferencial de transcritos traduzidos em proteínas secretadas no adenocarcinoma ductal pancreático .....	58
6.4	Perfil de expressão de genes do secretoma correlaciona-se fortemente com perfil do proteoma-secretoma em PDAC.....	60
6.5	Expressão gênica de 39 proteínas do secretoma podem prever a sobrevivência de pacientes com PDAC .....	61

6.6	A expressão de genes secretoma prediz resultados de câncer em diferentes estudos de câncer .....	63
6.7	Comparação com assinaturas gênicas prognósticas de PDAC .....	65
6.8	Validação <i>in silico</i> das proteínas secretadas .....	66
7	Discussão.....	68
8	Material suplementar.....	76
9	Referências .....	94
10	Anexo I .....	112
10.1	Manuscrito publicado.....	112

## **1 Introdução – Revisão da literatura**

### **1.1 Câncer**

A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que cerca de 10 milhões de pessoas morrerão por ano em decorrência do câncer, representando um importante problema de saúde mundial<sup>1</sup>. Segundo dados do GLOBOCAN, o principal banco de dados que fornece estimativas de incidência e mortalidade em 185 países para 36 tipos de câncer, 18,1 milhões de novos casos de câncer ocorreram em 2018, com 9,6 milhões de mortes ([www.uicc.org/new-global-cancer-data-globocan-2018](http://www.uicc.org/new-global-cancer-data-globocan-2018))<sup>2</sup>. Em todo o mundo, a taxa de incidência do câncer tem aumentado e já constitui a segunda principal causa de morte, após as doenças cardiovasculares<sup>3</sup>. As razões para esse crescimento são complexas, mas fatores como envelhecimento, tabagismo, urbanização e poluição associada, hábitos alimentares, maior tempo de vida reprodutiva, aumento da riqueza associada ao acesso à melhores serviços médicos e de expectativa de vida, são considerados os principais responsáveis por esse fenômeno<sup>4</sup>.

O câncer é resultado de uma série de alterações que ocorrem em células normais, que adquirem traços tumorigênicos, e em última instância, tornam-se malignas<sup>5,6</sup>. Essas alterações são geralmente eventos somáticos, embora mutações germinativas também possam predispor uma pessoa a um câncer hereditário<sup>6,7</sup>. Uma única alteração genética raramente é suficiente para o desenvolvimento de um tumor maligno<sup>6</sup>. A maioria das evidências apontam que o processo de carcinogênese envolve várias etapas de alterações sequenciais em diversos oncogenes, genes supressores tumorais, ou genes de microRNAs<sup>6</sup>. Essas alterações são responsáveis pelas características chaves do câncer que envolvem sua iniciação, crescimento, manutenção e disseminação<sup>8</sup>. As células tumorais possuem a capacidade de sustentar a sinalização proliferativa, evitar supressores

de crescimento, ativar invasão e metástase, possibilitar a imortalidade replicativa, induzir a angiogênese e resistir a morte celular<sup>5,8</sup>. Além dessas características, outras adicionais podem estar envolvidas na etiologia do câncer. Dentre essas, destacam-se sua capacidade de: modificar ou reprogramar o metabolismo celular para apoiar de forma mais eficaz a proliferação neoplásica; evitar o reconhecimento e destruição de suas células pelo sistema imunológico, em particular pela ação dos linfócitos T e B, macrófagos e células *natural killer*; e ainda, a inflamação - que pode contribuir para múltiplas características do câncer através do fornecimento de moléculas bioativas ao microambiente tumoral (como revisado por Hanahan, D. & Weinberg, R. A.<sup>5</sup>). Esse conjunto de moléculas inclui fatores de crescimento - que sustentam a sinalização proliferativa, fatores de sobrevivência - que limitam a morte celular, fatores pró-angiogênicos, e enzimas modificadoras da matriz extracelular - que facilitam a angiogênese, invasão e metástase (como revisado por Hanahan, D. & Weinberg, R. A.<sup>5</sup>). (Figura de halmarkers) ilustrar

Os tumores são mais do que massas insulares de proliferação de células cancerígenas. Eles são tecidos complexos compostos de vários tipos de células (estromal, endotelial, imune) que participam de interações heterotípicas entre si<sup>5</sup>. Células normais recrutadas, que formam o estroma associado ao tumor, agem como participantes ativos na tumorigênese, em vez de meros espectadores passivos; como tal, células estromais desempenham papel crucial na iniciação, progressão e metástase do tumor<sup>5,9</sup>. Dessa forma, a biologia dos tumores não pode mais ser entendida simplesmente pela enumeração das características das células cancerosas, mas deve abranger as contribuições do microambiente tumoral para a tumorigênese<sup>5</sup>. O tumor é uma estrutura semelhante a um órgão que resulta da coevolução de células malignas e seu ambiente direto e, após transformação e progressão para malignidade, as células tumorais não permanecem inertes, mas continuam mudando e adaptando-se ao seu ambiente local e



sistêmico, proliferando e formando metástases<sup>10</sup>. A comunicação do tumor com seu microambiente é um fator-chave em muitos processos importantes para o câncer; a alteração no estroma circundante e no sistema imunológico tem sido considerada condição primordial que contribui com a plasticidade de células tumorais<sup>11-13</sup>. Essas interações no microambiente tumoral são resultantes em grande parte da secreção de proteínas responsáveis pela comunicação cruzada entre as células normais e cancerosas, e a compreensão dessa linguagem pode aumentar nosso conhecimento sobre os mecanismos moleculares da neoplasia e, assim, contribuir para estratégias ideais para o tratamento dos diversos tipos de malignidade<sup>13</sup>.

Alguns tipos de câncer, por apresentarem uma complexidade e agressividade maior, tornam-se verdadeiros desafios. O Adenocarcinoma ductal pancreático (PDAC) é um desses desafios, as terapias atualmente disponíveis são minimamente eficazes no tratamento dessa doença. Enfrentá-lo tem sido um grande desafio para as comunidades científicas e médicas, em parte devido à sua intensa resistência terapêutica<sup>14</sup>.

## **1.2 Câncer pancreático**

O pâncreas é uma glândula de aproximadamente 15 cm e cerca de 100g, situada na cavidade abdominal, atrás do estômago e entre o duodeno e o baço. Anatomicamente é dividido em: cabeça, colo, corpo e cauda. Possui duas funções distintas: endócrina - responsável por produção de hormônios como insulina e glucagon (que auxiliam no controle do nível de glicemia no sangue), e função exócrina - responsável pela produção de pré-enzimas e enzimas envolvidas na digestão de alimentos<sup>15</sup>. Aproximadamente, 95% dos cânceres pancreáticos tem origem na porção exócrina, podem surgir a partir do epitélio ductal, células acinares ou do tecido conjuntivo<sup>16</sup>. O câncer pancreático mais frequente é o adenocarcinoma ductal, representa 80% a 90% dos tipos histológicos, e é

comumente referido como câncer de pâncreas<sup>16-18</sup>. Os tumores na parte endócrina do pâncreas são mais raros, com incidência menor que 5%, e são referidos de maneira mais definida, como tumores neuroendócrino do pâncreas<sup>19</sup>.

O câncer de pâncreas é um dos cânceres humanos mais agressivos e letais dentre todas as neoplasias malignas sólidas e, no ano de 2030, estima-se que poderá ser a segunda principal causa de morte por câncer no mundo, atualmente é a sétima<sup>20-22</sup>. Nos Estados Unidos, estima-se que até 2020, o câncer de pâncreas seja a segunda doença maligna mais mortal no país<sup>17</sup>. Na Europa, representa o quarto câncer mais fatal em homens após câncer de pulmão, colorretal e próstata; do mesmo modo, é considerado o quarto câncer mais fatal em mulheres após câncer de mama, colorretal e pulmonar<sup>23</sup>. No Brasil, é responsável por cerca de 2% de todos os tipos de câncer detectados, e por 4% do total de mortes por câncer, exceto pele não melanoma<sup>21</sup>. Entre 2005 e 2012, a incidência do câncer de pâncreas quase dobrou no Brasil; um total de 36.332 novos casos de câncer de pâncreas foi registrado, particularmente entre pacientes com mais de 70 anos, sendo mais frequente no sexo masculino<sup>21</sup>.

O câncer pancreático geralmente não apresenta sintomas em seus estádios iniciais, isso explica porque a maioria dos pacientes apresentam metástases no momento do diagnóstico<sup>24</sup>. Pacientes em estádios iniciais geralmente apresentam sintomas inespecíficos como anorexia, fraqueza, fadiga, dor abdominal ou lombar, diarreia, perda de peso e, às vezes, até depressão; a hiperglicemia ou diabetes de início recente (um a três anos de diagnóstico) foi reconhecida como um possível prognóstico do PDAC oculto<sup>25</sup>. Os primeiros sintomas resultam de efeitos causados pela localização da massa tumoral no pâncreas, que podem se manifestar como uma função endócrina ou exócrina alterada ou interrompida<sup>16</sup>. Em pacientes com massa na cabeça ou colo/pescoço do pâncreas, a icterícia ocorre em 75% dos casos, e é causada frequentemente por obstrução da via biliar

comum; pacientes que apresentam lesões no corpo ou cauda do pâncreas frequentemente manifestam dor abdominal, dor lombar, diabetes ou náuseas<sup>24</sup>. Os tumores localizados no corpo do pâncreas acabam sendo diagnosticados em estádios mais avançados do que os tumores localizados na cabeça, pois podem não desenvolver sintomas relacionados à obstrução do ducto biliar comum e/ou do ducto pancreático<sup>26</sup>. A obstrução do ducto pancreático é frequentemente associada à pancreatite aguda e esteatorréia devido a insuficiência pancreática exócrina<sup>27</sup>. Outro sintoma muito importante nos pacientes com esse tipo de câncer é perda de peso que ocorre em até 80% dos casos, condição de extrema relevância, pois os pacientes que apresentam perda de peso - decorrente de uma síndrome denominada caquexia - possuem piores respostas aos tratamentos<sup>28-30</sup>. A generalidade desses sintomas torna o diagnóstico precoce do câncer pancreático muito difícil, pois podem ser confundidos com outros distúrbios gastrointestinais<sup>31</sup>. Além disso, cerca de 90% dos casos de câncer de pâncreas são complicados por metástases à distância<sup>17,32</sup>.

A situação complica ainda mais em estádios avançados, onde a quimioterapia, a radioterapia e terapias combinatórias são amplamente ineficazes<sup>33</sup>. Cerca de 20% dos pacientes diagnosticados são candidatos à remoção cirúrgica completa no momento do diagnóstico, e mesmo após esse tratamento, a maioria apresenta recidiva, e morrem em menos de um ano<sup>34</sup>. Menos de 5% dos pacientes com câncer de pâncreas sobrevivem até cinco anos após o diagnóstico<sup>33,35</sup>. A falta de progresso clínico, em comparação com outros tipos de câncer, é atribuível à incapacidade de desenvolver novas e efetivas terapias; o tratamento padrão ainda consiste em quimioterapia convencional, ou seja não mudou na última década<sup>26</sup>. Não há métodos de rastreamento clinicamente validados para o câncer de pâncreas em estágio curativo, e a cirurgia continua sendo a única opção para a cura<sup>36</sup>.

O histórico familiar de câncer pancreático em parentes próximos representa apenas 5% a 10% de todos os casos de câncer de pâncreas<sup>26</sup>. A mutação no *BRCA2* é provavelmente a carga hereditária mais comum no câncer pancreático, no entanto, outras síndromes hereditárias como pancreatite, câncer colorretal, câncer de mama e ovário, ataxia telangiectasia, síndrome de Peutz-Jeghers e melanoma múltiplo estão ligados a esse tipo de câncer<sup>16,17,37</sup>. Vários fatores de risco estão envolvidos na propensão do desenvolvimento do câncer de pâncreas; além de fatores hereditários, há fatores como idade, tabagismo, dieta rica em carne vermelha e gordura, ingestão de álcool, níveis baixos de folato no soro, obesidade, diabetes mellitus tipo 1 e 2, pancreatite crônica, doenças autoimunes e exposição à agrotóxicos<sup>16,17,38-40</sup>. O PDAC é mais diagnosticado na população idosa, pois resulta de defeitos genéticos adquiridos ao longo de muitos anos<sup>32</sup>. A idade média de início é de 70 anos, e 75% dos pacientes são diagnosticados entre 55 e 84 anos de idade<sup>26</sup>.

Aproximadamente 80% dos carcinomas pancreáticos devem-se à mutações esporádicas, e aproximadamente 10%, é devido à herança de mutações germinativas<sup>16</sup>. Os genes mutados no câncer de pâncreas incluem *KRAS*, *CDKN2A*, *TP53*, *SMAD4/DPC4*, *BRCA2*, *ATM*, *STK11*, *PRSS1/PRSS2*, *SPINK1*, *PALB2*. Mutações nesses genes são ainda acompanhados por substanciais alterações genômicas e transcriptômicas que facilitam a desregulação do ciclo celular, sobrevivência celular, invasão e metástases, e estão associados a diferentes graus de aumento do risco de desenvolvimento do câncer pancreático<sup>16,41-43</sup>. Quase 100% dos cânceres pancreáticos apresentam mutações no oncogene *KRAS*; essa condição o torna o gene mais caracterizado nesse tipo de câncer<sup>44</sup>. Múltiplas vias de sinalização são ativadas por esse oncogene, incluindo a via BRAF/MAP-K, a qual afeta a proliferação celular, PI3K/mTOR que promove o crescimento e sobrevivência celular (como revisado por

Yabar *et al.*<sup>26</sup>). O oncogene *KRAS* é considerado uma mutação de iniciação do PDAC e, portanto, pode ser encontrado mutado nos estádios iniciais da doença<sup>36</sup>. Conseqüentemente, sua expressão no pâncreas impulsiona o início da doença em vários modelos de camundongos<sup>45</sup>. Tumores do tipo selvagem para *KRAS* envolvem alterações em outros fatores oncogênicos, incluindo mutações em *GNAS*, *BRAF*, *CTNBI* e em outros genes da via RAS<sup>46</sup>.

Estudos patológicos e genéticos revelam que PDAC se desenvolve ao longo de muitos anos e segue uma sequência de progressão de adenoma para carcinoma<sup>17</sup>. As primeiras lesões ductais geralmente não apresentam alterações genéticas<sup>47</sup>. A atipia histológica progride ao longo do tempo através de estádios de 1 a 3 da neoplasia intraepitelial pancreática (PAIN), que são lesões mucinosas papilares microscópicas (<5 mm), que levam ao carcinoma invasivo<sup>26</sup>. Na cronologia da tumorigênese, a ativação do *KRAS* é a primeira alteração genética detectada na série de progressão, ocorrendo em cerca de 30% das lesões PAIN1 que mostram os primeiros estádios de distúrbio histológico<sup>47,48</sup>. Em seguida, ocorre a perda de p16 no estágio PanIN-2 e, no estágio PanIN-3, ocorre inativação de *TP53*, *SMAD4* e *BRCA2*<sup>49</sup>. As alterações temporais na atividade da telomerase e no comprimento dos telômeros são inferidas, e precisam de mais investigações nos estágios de PAIN (como revisado por Bardeesy & DePinho<sup>47</sup>). Análises moleculares de lesões precursoras pancreáticas e PDAC determinaram que esses processos ocorrem em 10 a 20 anos<sup>50</sup>.

Atualmente, não existem ferramentas de triagem eficientes disponíveis que possam ser recomendadas para uma população de alto risco. Sob suspeita de câncer de pâncreas, recomenda-se tomografia computadorizada, ultrassom endoscópico - que permite a detecção de pequenas lesões, podendo ser ou não associado à biópsia com agulha fina - e ressonância magnética<sup>51,52</sup>. Esses exames auxiliam na detecção e

estabelecimento do tamanho da massa tumoral, envolvimento vascular e de linfonodos; esses critérios ajudam no estadiamento dos pacientes<sup>52</sup>. A 8ª versão do sistema de estadiamento do câncer de pâncreas do *American Joint Committee on Cancer* (AJCC) estabelece que o estágio T é determinado com base no tamanho do tumor (T1: diâmetro máximo do tumor  $\leq 2$  cm, T2: diâmetro máximo do tumor  $> 2$  cm e  $\leq 4$  cm, T3: diâmetro máximo do tumor  $> 4$  cm e T4: tumor primário envolvendo o tronco celíaco ou a artéria mesentérica superior); o estágio N foi categorizado de acordo com o número de linfonodos metastáticos (N0: não há metástase linfonodal regional, N1: metástase em 1 a 3 linfonodos regionais, e N2: metástase em  $\geq 4$  linfonodos regionais); o estágio M caracterizado pela presença ou não de metástase à distância (M0: não há metástase à distância, M1: há de metástase à distância)<sup>53,54</sup>. O objetivo do estadiamento é separar os pacientes em grupo de doença localizada ressecável, localizada irresssecável e avançada metastática, afim de submeter o paciente aos tratamentos mais adequados<sup>26,55</sup>. Assim, o tratamento de pacientes com PDAC é baseado na extensão da doença. Pacientes com doenças locais são avaliados para ressecção e submetidos à terapia cirúrgica se forem considerados aptos para pancreatectomia; o tumor é considerado ressecável com base em estudos de imagens disponíveis<sup>55</sup>. Os pacientes com doença localmente avançada geralmente recebem quimioterapia e, às vezes, quimiorradiação, como abordagem de tratamento neoadjuvante, com o objetivo de diminuir o tamanho do tumor e aumentar as chances de ressecção futura em uma minoria de casos (10%), pois a ressecção representa a única chance de cura<sup>26</sup>. Apesar das investigações nesse tipo de câncer, o progresso alcançado foi na administração de drogas combinadas que conferem uma pequena vantagem de sobrevivência em relação à terapia com agente único, terapia alvo e imunoterapia, que representam um custo altíssimo para a maioria da população<sup>17,56,57</sup>. Em comparação com os tratamentos de outros tipos de câncer, o de pâncreas teve pouco

avanço nos últimos anos, a falta de progresso clínico é atribuível à incapacidade de desenvolver novas e eficazes terapias <sup>17</sup>.

Um problema permanente na terapia do câncer pancreático é a doença metastática, pois representa um obstáculo para o tratamento, e continua a ser a principal causa de mortalidade<sup>58,59</sup>. Como a metástase se desenvolve é ainda bastante desconhecida, na medida em que pouco se sabe sobre como as células malignas se destacam do local do tumor primário e crescem em órgãos distantes<sup>60</sup>. Células tumorais desenvolvem metástase para órgãos específicos com uma seletividade predeterminada; as células tumorais "sementes" residem exclusivamente em órgãos que são propícios à sua sobrevivência e crescimento <sup>58,61,62</sup>. O câncer pancreático, por exemplo, costuma apresentar metástase frequentemente no fígado, peritônio e pulmão<sup>58</sup>. Mesmo antes do início da disseminação das células tumorais pancreáticas, fatores solúveis, vesículas extracelulares e exossomos secretados pelo tumor primário, e possivelmente até mesmo lesões pré-malignas, ajudam a moldar um nicho pré-metastático (PMNs) de suporte no tecido, fornecendo locais de ancoragem vascular para células tumorais circulantes, aumentando a permeabilidade vascular, remodelando a matriz extracelular e recrutando células inflamatórias imunossupressoras<sup>58</sup>.

Todas as características celulares e moleculares relacionadas ao desenvolvimento do câncer de pâncreas podem ser utilizadas para a identificação de biomarcadores diagnósticos, prognósticos e preditivos da doença, bem como para biomarcadores que possam dar indícios precoces das alterações nos estádios iniciais da doença. Embora mais de 2000 estudos de biomarcadores no câncer de pâncreas tenham sido publicados<sup>63</sup>, implicando mais de 2000 genes e proteínas diferentes envolvidas em diversos processos associados à doença, apenas um biomarcador em exames de sangue é reconhecido pela *Food and Drug Administration* (FDA, EUA) na identificação do câncer

de pâncreas, o CA 19-9 (*Serum carbohydrate antigen 19-9*), no entanto, não é utilizado por profissionais de saúde para esse propósito<sup>63-65</sup>.

Muitas técnicas ômicas são utilizadas para investigação de biomarcadores além do CA19-9 e, dentre essas técnicas, a proteômica baseada na espectrometria de massas (MS) está se tornando cada vez mais relevante na prática clínica e tem sido usada na busca de biomarcadores para diversas doenças<sup>66</sup>. Atualmente, as aplicações mais bem estabelecidas da proteômica estão nos campos clínicos e biomédicos; alterações no proteoma dos tecidos ou fluidos corporais, como o soro, podem ser medidas diretamente, e mudanças nos níveis de expressão ou modificações pós-traducionais das proteínas podem ser correlacionadas com a doença ou ação da droga que está sendo testada<sup>67</sup>.

A proteômica é um campo multifacetado e interdisciplinar que estuda a complexidade e a dinâmica de proteínas em sistemas biológicos. Ela combina poderosa separação e tecnologia analítica com informática avançada para entender a função das proteínas em células e tecidos<sup>68</sup>. É evidente que a maior parte da informação funcional sobre os genes reside no proteoma, e as técnicas de proteômica estão sendo intensivamente utilizadas para investigação do proteoma do câncer, como forma de identificar novos fatores envolvidos com a doença, e também com o objetivo de complementar os estudos evidentemente mais extensos de transcriptoma e genoma de tumores<sup>69</sup>. A proteômica também tem sido utilizada como forma de verificar discrepâncias vistas em análises comparativas entre estudos de transcriptoma e proteoma, os quais revelaram que os níveis globais de transcrição gênica refletem de modo insuficiente os dados globais de níveis de proteínas<sup>69</sup>. Além disso, a proteômica no câncer (oncoproteômica) tem o potencial de revolucionar a prática clínica, incluindo o diagnóstico de câncer e a triagem baseado em plataformas proteômicas como complemento à histopatologia, seleção individualizada de combinações terapêuticas que



visam toda a rede de proteínas específicas do câncer, avaliação em tempo real da eficácia terapêutica e toxicidade, e modulação racional da terapia com base nas mudanças na rede de proteínas associadas ao prognóstico e à resistência aos medicamentos, sendo também aplicada à descoberta de novos alvos terapêuticos e ao estudo dos efeitos de drogas<sup>70</sup>.

Como a maioria dos alvos de drogas para o tratamento do câncer são proteínas, a proteômica oferece uma rota para estudar o genoma eficientemente ao nível da proteína<sup>67</sup>. Além disso, a transformação maligna envolve alterações na expressão proteica com subsequente proliferação clonal das células alteradas. Essas alterações podem ser monitoradas ao nível de proteína, tanto qualitativa quanto quantitativamente<sup>71</sup>.

Nos últimos anos, os estudos que se concentram em análises proteômicas de enriquecimento de proteínas secretadas (secretoma) vêm aumentando, pois o secretoma representa uma porção do proteoma que potencialmente contém os biomarcadores mais promissores para o diagnóstico, prognóstico, predição e alvos terapêuticos de doenças<sup>72</sup>. O secretoma do câncer parece desempenhar funções importantes nas principais características dos cânceres, como aumento da proliferação, invasão, metástase, redução da apoptose, invasão imune, angiogênese, alteração do metabolismo energético e o desenvolvimento de resistência contra as terapias<sup>73</sup>. Dessa forma, o secretoma de células tumorais fornece uma fonte valiosa para compreender as proteínas envolvidas no desenvolvimento do tumor, assim como proteínas circulatórias que podem auxiliar no diagnóstico, prognóstico e tratamento da doença<sup>74</sup>.

### **1.3 Secretoma do câncer**

O termo “secretoma” foi introduzido por Tjalsma *et al.*<sup>75</sup> em um estudo genômico das proteínas secretadas em *Bacillus subtilis*; é definido como um rico e complexo conjunto de moléculas bioativas secretadas pelas células vivas para o

compartimento extracelular através de diferentes mecanismos de secreção: via clássica, não clássica e exossômica<sup>13,74</sup>. A via clássica compreende proteínas que possuem em sua estrutura uma sequência sinal na região N-terminal, a qual é reconhecida pelo retículo endoplasmático (RE). No RE, as proteínas são modificadas pós-traducionalmente, sendo posteriormente encaminhadas via vesículas ao Complexo de Golgi, onde passam por novas modificações<sup>76</sup>. Essas proteínas são então transportadas pelo Complexo de Golgi via complexa rede de vesículas, até que se fundem à membrana plasmática, liberando extracelularmente seu conteúdo proteico<sup>76</sup>. A via não clássica é independente da via do RE-Golgi, e ocorre por mecanismos vesiculares e não-vesiculares<sup>77</sup>. A via exossômica compreende o transporte e fusão com a membrana plasmática de vesículas nanométricas (de 50 a 150 nm) denominadas de exossomos, os quais são estruturas especializadas provenientes de endossomos multivesiculares formados pelo sistema endossomal, e são liberados por muitos tipos de células<sup>78,79</sup>. Portanto, o secretoma do câncer inclui proteínas liberadas no microambiente tumoral, seja por vias de secreção clássica ou não clássica, correspondendo a uma importante classe de proteínas que podem atuar local e sistemicamente, participando de vários processos fisiológicos, como defesa imunológica, coagulação sanguínea, remodelamento da matriz extracelular e sinalização celular<sup>74,80</sup>. O secretoma do câncer inclui todas as proteínas que podem ser identificadas no fluido intersticial da massa tumoral *in vivo*, porém também tem sido utilizado para caracterizar o conjunto de proteínas identificadas com espectrometria de massa em estudos *in vitro* de linhagem celular do câncer, em meios condicionados (CM)<sup>81</sup>.

No entanto, as proteínas secretadas por células de câncer sozinhas compreendem apenas um subconjunto de todas as proteínas do microambiente tumoral<sup>81</sup>. Os tumores primários não são compostos apenas de células cancerígenas, mas também de uma ampla e variável diversidade de células estromais, que são recrutadas como colaboradoras

ativas, que facilitam o desenvolvimento e progressão da malignidade<sup>81</sup>. A abundância, organização histológica e as características fenotípicas dos tipos celulares, assim como a composição da matriz extracelular e das moléculas de sinalização secretadas por células normais e cancerígenas alteram-se durante a progressão, permitindo assim o crescimento primário, invasivo e metastático das células tumorais<sup>82-84</sup>. Dessas interações heterotípicas, uma grande variedade de proteínas, incluindo fatores de crescimento, enzimas como proteases, quimiocinas e citocinas são constantemente liberadas de todas as células do microambiente tumoral, e atuam em um sistema autócrino ou parácrino, resultando na aquisição de um meio favorável para a progressão da malignidade<sup>81</sup>. A alteração do secretoma do câncer e do microambiente tumoral tem sido reconhecida como um dos principais fatores que influenciam a biologia dos tumores<sup>73</sup>. O microambiente tumoral é responsável pela manutenção do tumor, composto por células não cancerígenas que incluem fibroblastos, células imunes e células que compõem os vasos sanguíneos, além das moléculas produzidas por todas as células presentes no tumor, que coletivamente atuam em seu crescimento e progressão<sup>84</sup>. A secreção de exossomos enriquecidos em biomoléculas funcionais, por exemplo, não apenas permite que as células cancerígenas do pâncreas modelem a atividade de células adjacentes no microambiente tumoral, mas também permite que elas explorem células distantes, a fim de otimizar as condições para futura semeadura metastática<sup>58</sup>.

A importância do envolvimento de moléculas secretadas em mecanismos tumorais como metástase é mostrada em estudos como o de Costa-Silva *et. al.*<sup>85</sup>, eles viram que exossomos derivados do PDAC induzem a formação de nicho pré-metastático no fígado de camundongos. Esse mecanismo se deve em grande parte pela presença de MIF (*Macrophage Migration Inhibitory Factor*) em exossomos que são absorvidos pelas células de Kupffer, que secretam TGF- $\beta$  e conseqüentemente induzem o aumento da

produção de fibronectina pelas células de Ito (também denominadas células estreladas hepáticas)<sup>85</sup>. Esse microambiente fibrótico aumenta o recrutamento de células derivadas da medula óssea (macrófagos e granulócitos) que se ligam a sítios hepáticos enriquecidos com a fibronectina, induzindo à formação de nicho pré-metastático no fígado<sup>85</sup>. Quando esses autores avaliaram a expressão de MIF em pacientes com câncer pancreático, observaram que sua expressão foi marcadamente mais alta em exossomos de pacientes em estágio I, os quais posteriormente desenvolveram metástase. Os autores ainda sugerem que o MIF presente em exossomos estimule a metástase no fígado, e pode ser utilizado como um marcador prognóstico para o desenvolvimento de metástase hepática. Já o estudo de Melo *et. al.*<sup>86</sup> demonstrou que a expressão de GPC1 (*Glipican-1*) em exossomos de pacientes com câncer de pâncreas foi capaz de distinguir indivíduos saudáveis e pacientes com doença pancreática benigna dos pacientes com câncer de pâncreas em estágio inicial e tardio, com especificidade e sensibilidade absoluta. O GPC1, um proteoglicano de superfície celular, é especificamente enriquecido em exossomos derivados de células de câncer<sup>87-89</sup>. Dessa forma, a GPC1 presente em exossomos pode servir como potencial diagnóstico não-invasivo e ferramenta de triagem para detectar estágios iniciais do câncer de pâncreas, facilitando assim a possibilidade de terapia cirúrgica curativa<sup>86</sup>.

Outros fatores secretados também possuem papéis importantes já descritos para o progresso câncer de pâncreas, tais como a secreção por tumores sólidos de VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor A*) e PIGF (*Phosphatidylinositol Glycan Anchor Biosynthesis Class F*), os quais agem na remodelação vascular<sup>90</sup>; exossomos também foram identificados como mediadores-chave entre as células cancerígenas do pâncreas e a vascularização circundante, provocando respostas pró-angiogênicas<sup>91</sup>.

O *KRAS* mutante também pode ser transferido via exossomos e aumenta o crescimento tridimensional de células do cólon receptoras do tipo selvagem<sup>92</sup>. Além disso, os exossomos derivados do melanoma metastático são capazes de induzir fenótipo metastático em células receptoras de melanoma não-metastático<sup>93</sup>. Exossomos derivados de células cancerígenas contém moléculas bioativas que podem induzir disfunção de células receptoras, contribuir para silenciar respostas imunes antitumorais<sup>94</sup>. Esses exossomos podem alterar diretamente a função de células imunes, ou indiretamente modificar fenótipos estromais de células não-imunes, assim como, atuar na formação de nichos pré-metastáticos; os exossomos interagem com várias células do microambiente para conferir alterações vantajosas ao tumor tais como progressão tumoral, metástase e resistência a medicamentos<sup>90,94-96</sup>. Esses achados fornecem informações interessantes sobre como as células tumorais podem se comunicar e promover a progressão do tumor através da transferência de proteínas oncogênicas<sup>90</sup>. Portanto, a análise do secretoma do câncer representa uma fonte extremamente ampla para o entendimento da biologia tumoral, bem como representa uma ferramenta crucial para descobrir novos e eficazes biomarcadores para o diagnóstico e prognóstico precoce do câncer<sup>73</sup>.

### **1.3.1 Biomarcadores**

Um marcador biológico (biomarcador) é uma característica objetivamente mensurada e avaliada como um indicador de processo biológico normal, processos patogênicos, ou de respostas farmacológicas a uma intervenção terapêutica<sup>97</sup>. Na área da saúde existe uma diversidade de biomarcadores conhecidos: fisiológicos, bioquímicos, histológicos e anatômicos<sup>98</sup>. Podem ser células específicas, DNA e RNA livres de células, peptídeos, proteínas, enzimas, metabólitos e hormônios<sup>99</sup>. Entre esses, os mais relevantes são os biomarcadores bioquímicos, por causa da relativa facilidade em obtenção a partir de fluidos corporais<sup>100</sup>. A natureza dinâmica do sistema

circulatório e seus constituintes reflete diversos estados fisiológicos ou patológicos, e a facilidade com que o sangue pode ser coletado faz com que seja uma escolha lógica para aplicações de biomarcadores<sup>99</sup>.

Os biomarcadores podem ser classificados em quatro tipos: diagnóstico, prognóstico, preditivo e terapêutico. Um biomarcador diagnóstico permite a detecção precoce do câncer de forma não invasiva e, assim, a prevenção secundária da doença. O biomarcador preditivo permite prever a resposta do paciente a uma terapia direcionada e, assim, definir subpopulações de pacientes que provavelmente se beneficiarão de uma terapia específica. Um biomarcador prognóstico é uma característica clínica ou biológica que fornece informações sobre o curso provável da doença; fornece informações sobre o provável desfecho da doença. Um biomarcador terapêutico é geralmente uma proteína que pode ser usada como alvo para uma terapia (revisado por Shaw, A. *et al*, 2015; Carlomagno, N. *et al.*, 2017<sup>101,102</sup>).

Nos últimos anos, houve um intenso investimento na quantidade de recursos comprometidos com a pesquisa de biomarcadores, principalmente no câncer, motivada em grande parte pelos sucessos em diferentes tipos de tumores. Atualmente, existem vários exemplos de biomarcadores usados rotineiramente em cânceres não pancreáticos que selecionam pacientes para certas terapias e conduzem estratégia de tratamento<sup>63</sup>. Biomarcadores moleculares estabelecidos, como receptor de estrogênio, receptor de progesterona e fator de crescimento epidérmico humano 2, são rotineiramente usados na clínica para estratificar os pacientes com câncer de mama para previsões prognósticos, para selecionar tratamentos e incluir pacientes em ensaios clínicos<sup>103</sup>. Um marcador tumoral é definido como “uma molécula natural” que pode ser medida no soro, plasma ou em outros fluidos corporais, extratos de tecidos ou tecidos embebidos em parafina,

com o objetivo de identificar a presença do câncer, avaliar o prognóstico ou monitorar o paciente, ou estimar resposta à terapia com o objetivo geral de melhorar a estratégia clínica para tratamento do paciente<sup>104</sup>. Um biomarcador ideal permitiria um diagnóstico fácil quando um câncer ainda está em estágio inicial, antes de se multiplicar para outros órgãos, classificar tumores para que o paciente possa receber a terapia mais apropriada, além de monitorar a progressão, regressão e recorrência da doença<sup>99,104</sup>.

Atualmente, teoricamente apenas um biomarcador em exames de sangue é reconhecido pela FDA na identificação do câncer de pâncreas, o CA 19-9<sup>63,64</sup>. Esse antígeno é considerado o “melhor” exame de soro disponível, entretanto, na prática a especificidade desse marcador é questionável, uma vez que também é elevada em condições não neoplásicas, como pancreatite aguda e crônica, hepatite e obstrução biliar<sup>105,106</sup>, não constituindo um exame rotineiramente usado pelos profissionais de saúde especializados. A sensibilidade diagnóstica do CA 19-9 é ainda mais comprometida pelo fato de que pacientes com certos tipos sanguíneos não expressam o antígeno<sup>74</sup>. Estudos demonstraram que os níveis séricos do antígeno está aumentado no soro de cerca de 80% de pacientes com câncer de pâncreas avançado, e níveis maiores que 500 UI/ml no soro pré-operatório indica claramente um pior prognóstico após a cirurgia<sup>16,107</sup>. O CA 19-9 tem um valor significativo como um marcador para medir a progressão da doença no paciente, e potencialmente, orientar as decisões de tratamento<sup>16</sup>. No entanto, atualmente esse biomarcador é utilizado em combinação com outros marcadores como o CEA (*Carcinoembryonic antigen*) e o CA125 (*Cancer antigen 125* com o objetivo de aumentar a especificidade do diagnóstico do câncer de pâncreas<sup>17</sup>. Embora a literatura apresente inúmeros possíveis biomarcadores, apenas o CA 19-9 “supri” os requisitos da FDA, os quais ainda não são satisfatórios. Portanto, existe a necessidade de identificação de melhores abordagens na identificação de biomarcadores que atendam às necessidades de

diagnóstico e prognóstico do câncer de pâncreas, pois a detecção de PDAC em estágio inicial e, portanto, potencialmente ressecável, pode aumentar a taxa de sobrevivência de 5 anos em até 40%<sup>108</sup>.

Apesar das grandes limitações, muitas outras moléculas apresentam bons resultados como biomarcadores candidatos para a detecção precoce do PDAC. Por exemplo, o GPC1, como descrito anteriormente, é capaz de distinguir pacientes com PDAC em estágio inicial e tardio de indivíduos saudáveis e pacientes com lesões pancreáticas benignas com sensibilidade e especificidade de 100%<sup>86</sup>. REG4, um membro da família *REG* (*Regenerating islet-derived*), pode distinguir entre pacientes com câncer de pâncreas e indivíduos saudáveis; sua concentração no soro tem potencial para uso como marcador sérico de triagem para cânceres pancreáticos, incluindo cânceres em estágio inicial<sup>109-111</sup>. O SPINK1 (*Serine protease inhibitor Kazal-type 1*), produzido principalmente nas células acinares do pâncreas exócrino, encontra-se com seus níveis tumorais aumentados na maioria dos pacientes com câncer de pâncreas e, quando comparando a vários biomarcadores de soro e urina, mostrou ser um bom biomarcador para o diagnóstico de câncer pancreático<sup>112,113</sup>. No entanto, a aplicação clínica da SPINK1 para o diagnóstico de câncer de pâncreas é limitada porque as concentrações também aumentam na maioria dos pacientes com pancreatite e doença biliar<sup>114</sup>. O DKK1 (*Dickkopf-1*) faz parte da família de proteínas secretadas DKK; seus níveis séricos encontram-se aumentados no soro de pacientes com PADC, e constitui um promissor biomarcador específico de câncer com o potencial de aumentar as taxas de sobrevivência de pacientes com esse tumor, pois pode melhorar a detecção da doença em estágio inicial e o monitoramento da progressão em comparação com os padrões ouro atuais de biomarcadores. Além disso, estudos recentes sugerem que o DKK1 pode ser um excelente alvo para a imunoterapia do câncer<sup>115</sup>.



Outros biomarcadores que são utilizados no câncer, como microRNAs, DNA tumoral circulante, células tumorais circulantes que podem ser integrados com dados proteicos a fim de expandir informações sobre moléculas envolvidas no câncer. Desta forma, numerosas proteínas de baixa abundância, associadas com esses biomarcadores, podem ser analisadas por abordagens baseadas em tecnologias de espectrometria de massas e auxiliar na identificação de moléculas envolvidas no câncer<sup>131</sup>. Apesar do avanço alcançado até agora em ciência e tecnologia, a quantidade de moléculas biomarcadoras descobertas envolvidas em processos tumorais pancreáticos não resultou em melhora da sobrevida para os pacientes, e poucas moléculas apresentam potencial como um marcador preferencial e específico para o câncer de pâncreas<sup>104,132</sup>. Consequentemente, especialistas em todo o mundo tentam preencher as lacunas em diversos estudos colaborativos, reuniões, conferências e grupos de trabalho, a fim de encontrar um teste confiável para a detecção precoce do câncer de pâncreas<sup>132</sup>. Como resultado, uma quantidade extraordinária de pesquisas está sendo realizada para identificar um marcador de tumor preciso, ou um painel de marcadores que possam auxiliar na detecção ou controle do câncer de pâncreas. Uma estratégia que vem sendo extensivamente utilizada na análise dessa quantidade de conjuntos de dados é a meta-análise, este método tem se tornado uma forma habitual de sintetizar evidências e resumir os resultados de estudos individuais gerando resultados extremamente relevantes.

#### **1.4 Investigação *in silico* de biomarcadores de câncer**

##### **1.4.1 Meta-análise**

Meta-análise é a análise estatística de um conjunto de resultados de estudos individuais, sobre uma mesma questão de pesquisa, com o propósito de integrar os resultados; ou seja, consiste em agregar os resultados de múltiplos estudos para obter resultados robustos e reprodutíveis<sup>133</sup>. A necessidade da meta-análise da pesquisa é clara,

pois a literatura sobre infinitos tópicos está crescendo a um ritmo impressionante <sup>133</sup>. Dessa forma, técnicas de revisão sistemática tradicional e a meta-análise tentam resolver inconsistências e incertezas na literatura como, por exemplo, ensaios clínicos sobre a eficácia de um tratamento e até mesmo estratégias para lidar com a quantidade de dados adquirida com novas técnicas para processamento e análise de dados<sup>134,135</sup>. Através da meta-análise podemos aumentar o poder estatístico para obter uma estimativa mais precisa dos diferentes resultados encontrados, e assim avaliar a heterogeneidade da estimativa geral. Além disso, a meta-análise é relativamente barata, pois faz uso dos dados disponíveis publicamente<sup>136</sup>.

Uma meta-análise é um subconjunto da revisão sistemática e segue passos de realização com o objetivo de minimizar o viés, fornecendo, assim, descobertas mais confiáveis, a partir das quais conclusões podem ser tiradas<sup>137</sup>. Para ajudar os autores nesse contexto, a declaração PRISMA (*Preferred Reporting Items for Systematic Reviews e Meta-Analyzes*) foi desenvolvida e consiste em uma lista de verificação de 27 itens e um diagrama de fluxo em quatro fases para a divulgação de dados resultantes de revisões sistemáticas e meta-análise<sup>138</sup>. A lista de verificação inclui itens considerados essenciais para relatórios transparentes de uma revisão sistemática; no entanto, a lista de verificação PRISMA não é um instrumento de avaliação de qualidade de uma revisão sistemática<sup>139</sup>. Basicamente, os passos para realização de uma revisão sistemática e meta-análise consistem em definir claramente uma questão de pesquisa que se encaixa nos critérios de elegibilidade pré-especificados. Em seguida, realiza-se a pesquisa literária sobre o tópico da questão com auxílio de termos de busca (palavras-chave), em pelo menos um banco de dados eletrônico, utilizando uma metodologia que seja explícita e reproduzível; após essa busca, seleciona-se os estudos encontrados mediante critérios claros de inclusão e exclusão previamente estabelecidos, os quais devem ser claramente justificados e

indicados; em seguida, os dados dos estudos selecionados são extraídos e avaliados quanto à heterogeneidade entre os estudos; os dados são analisados e os resultados obtidos são relatados<sup>138-140</sup>. Uma meta-análise sólida é caracterizada por uma pesquisa bibliográfica completa e disciplinada, e uma definição clara das hipóteses a serem investigadas fornece a estrutura para tal investigação<sup>137</sup>.

Na transcriptômica de microarranjos de DNA e Sequenciamento de RNA, a disponibilidade de bancos de dados públicos desses experimentos em larga escala como o *ArrayExpress* e o *Gene Expression Omnibus* (GEO)<sup>141</sup>, encorajou o desenvolvimento de métodos de meta-análise<sup>142</sup>. Baetke *et al.*<sup>143</sup>, por exemplo, utilizou meta-análise para analisar vários conjuntos de dados genômicos que identificaram vias de sinalização e processos celulares que desempenham um papel importante no desenvolvimento do câncer de próstata. Outro estudo utilizou meta-análise de dados de transcriptoma de três repositórios de dados (GEO, *ArrayExpress* e *GLIOMASdb*) e identificou *FREM2* (*FRAS1-related extracellular matrix protein 2*) e *SPRY1* (*Protein sprouty homolog 1*) como novos candidatos a marcadores de glioblastoma<sup>144</sup>. Estratégia semelhante também foi utilizada para o estudo em pacientes com PDAC, utilizando conjuntos de dados de expressão gênica disponíveis publicamente, por meta-análise, na busca de assinaturas gênicas prognósticas<sup>145</sup>. Esse estudo identificou uma assinatura de 36 genes capaz de distinguir pacientes com PDAC com pior ou melhor prognóstico, independente do grupo de pacientes e da plataforma de microarrays<sup>145</sup>. Recentemente, uma meta-análise identificou reguladores-chaves da progressão do câncer de pâncreas integrando informações de RNAs mensageiros, microRNAs e perfil de metilação do DNA<sup>146</sup>.

No entanto, abordagens analíticas aplicadas à análise de microarray apresentam limitações, as quais podem ser superadas com a utilização de ferramentas baseadas na web que foram desenvolvidas para facilitar a exploração de grandes coleções de dados de

estudos transcriptômicos, o que auxilia na abordagem da técnica de meta-análise <sup>147-149</sup>. A meta-análise é utilizada com sucesso em uma variedade de aplicações, incluindo oncogenômica, uso de drogas, diagnóstico de doença, mapeamento de tecido e assinaturas de expressão gênica em condições específicas<sup>147</sup>. Esse método representa uma estratégia satisfatória na seleção de dados e identificação de novas conclusões e/ou descobertas. Decidimos, assim, utilizar a meta-análise para selecionar estudos do secretoma-proteoma do câncer de pâncreas com o objetivo de identificar biomarcadores que possam auxiliar no prognóstico desse tipo de câncer.

## 9 Referências

1. Gupta, D. & Lis, C. G. Pretreatment serum albumin as a predictor of cancer survival: a systematic review of the epidemiological literature. *Nutr. J.* **9**, 69 (2010).
2. Ferlay, J. *et al.* Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods. *Int. J. Cancer* (2018). doi:10.1002/ijc.31937
3. World Health Organization. (2017). Available at: <https://www.who.int>. (Accessed: 14th August 2019)
4. Thun, M. J., DeLancey, J. O., Center, M. M., Jemal, A. & Ward, E. M. The global burden of cancer: priorities for prevention. *Carcinogenesis* **31**, 100–10 (2010).
5. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* **144**, 646–674 (2011).
6. Croce, C. M. Oncogenes and Cancer. *N. Engl. J. Med.* **358**, 502–511 (2008).
7. Ngeow, J. & Eng, C. Precision medicine in heritable cancer: When somatic tumour testing and germline mutations meet. *npj Genomic Med.* **1**, 2015–2017 (2016).
8. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. The Hallmarks of Cancer. *Cell* **100**, 57–70 (2000).
9. Valkenburg, K. C., de Groot, A. E. & Pienta, K. J. Targeting the tumour stroma to improve cancer therapy. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **15**, 366–381 (2018).
10. Meurette, O. & Mehlen, P. Notch Signaling in the Tumor Microenvironment. *Cancer Cell* (2018). doi:10.1016/J.CCELL.2018.07.009
11. Whiteside, T. L. The tumor microenvironment and its role in promoting tumor growth. *Oncogene* **27**, 5904–12 (2008).
12. Wang, M. *et al.* Role of tumor microenvironment in tumorigenesis. *J. Cancer* **8**, 761–773 (2017).
13. Makridakis, M. & Vlahou, A. Secretome proteomics for discovery of cancer biomarkers. *J. Proteomics* **73**, 2291–305 (2010).
14. Sousa, C. M. & Kimmelman, A. C. The complex landscape of pancreatic cancer metabolism. *Carcinogenesis* **35**, 1441–50 (2014).
15. Githens, S. Differentiation and development of the pancreas in animals. *The Pancreas: Biology, Pathobiology and Disease* 22–56 (1993).
16. Ducreux, M. *et al.* Cancer of the pancreas: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann. Oncol.* **26**, v56–v68 (2015).
17. Kamisawa, T., Wood, L. D., Itoi, T. & Takaori, K. Pancreatic cancer. *Lancet* **388**, 73–85 (2016).
18. Kleeff, J. *et al.* Pancreatic cancer. *Nat. Rev. Dis. Prim.* **2**, (2016).

19. Takano, A. *et al.* Genetic basis of a common tumor origin in the development of pancreatic mixed acinar-neuroendocrine-ductal carcinoma: A case report. *Oncol. Lett.* **14**, 4428–4432 (2017).
20. Jemal, A. *et al.* Cancer Statistics, 2009. *CA. Cancer J. Clin.* **59**, 225–249 (2009).
21. Perrotta de Souza, L. M., Moreira, J. P. L., Fogaça, H. S., Luiz, R. R. & de Souza, H. S. Pancreatic Cancer Incidence and Lethality Rates in Brazil. *Pancreas* **46**, 1 (2017).
22. Bray, F. *et al.* Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA. Cancer J. Clin.* **68**, 394–424 (2018).
23. Malvezzi, M., Bertuccio, P., Levi, F., La Vecchia, C. & Negri, E. European cancer mortality predictions for the year 2014. *Ann. Oncol.* **25**, 1650–1656 (2014).
24. Keane, M. G., Horsfall, L., Rait, G. & Pereira, S. P. A case-control study comparing the incidence of early symptoms in pancreatic and biliary tract cancer. *BMJ Open* **4**, e005720 (2014).
25. Pokorny, A. M. J., Chin, V. T., Nagrial, A. M., Yip, D. & Chantrill, L. A. Metastatic pancreatic ductal adenocarcinoma: diagnosis and treatment with a view to the future. *Intern. Med. J.* **48**, 637–644 (2018).
26. Yabar, C. S. & Winter, J. M. Pancreatic Cancer. *Gastroenterol. Clin. North Am.* **45**, 429–445 (2016).
27. Pham, A. & Forsmark, C. Chronic pancreatitis: review and update of etiology, risk factors, and management. *F1000Research* **7**, 607 (2018).
28. Gärtner, S. *et al.* Nutrition in Pancreatic Cancer: A Review. *Gastrointest. Tumors* **2**, 195–202 (2016).
29. Baracos, V. E., Martin, L., Korc, M., Guttridge, D. C. & Fearon, K. C. H. Cancer-associated cachexia. *Nat. Rev. Dis. Prim.* **4**, 17105 (2018).
30. Tan, C. R. *et al.* Pancreatic cancer cachexia: A review of mechanisms and therapeutics. *Front. Physiol.* **5 MAR**, 1–14 (2014).
31. Kamisawa, T., Wood, L. D., Itoi, T. & Takaori, K. Pancreatic cancer Seminar. *Lancet* **388**, 73–85 (2016).
32. Yachida, S. *et al.* Distant metastasis occurs late during the genetic evolution of pancreatic cancer. *Nature* **467**, 1114–1117 (2010).
33. Makawita, S. *et al.* Integrated Proteomic Profiling of Cell Line Conditioned Media and Pancreatic Juice for the Identification of Pancreatic Cancer Biomarkers. *Mol. Cell. Proteomics* **10**, M111.008599 (2011).
34. Lewis, R. *et al.* A contemporary analysis of survival for resected pancreatic ductal adenocarcinoma. *HPB (Oxford)*. **15**, 49–60 (2013).
35. Zhang, M. *et al.* Three new pancreatic cancer susceptibility signals identified on chromosomes 1q32.1, 5p15.33 and 8q24.21. *Oncotarget* **7**, 66328–66343 (2016).

36. Makohon-Moore, A. & Iacobuzio-Donahue, C. A. Pancreatic cancer biology and genetics from an evolutionary perspective. *Nat. Rev. Cancer* **16**, 553–565 (2016).
37. Klein, A. P., Hruban, R. H., Brune, K. A., Petersen, G. M. & Goggins, M. Familial pancreatic cancer. *Cancer J.* **7**, 266–73
38. Andreotti, G. *et al.* Agricultural pesticide use and pancreatic cancer risk in the Agricultural Health Study Cohort. *Int. J. Cancer* **124**, 2495–2500 (2009).
39. Maisonneuve, P. & Lowenfels, A. B. Risk factors for pancreatic cancer: a summary review of meta-analytical studies. *Int. J. Epidemiol.* **44**, 186–198 (2015).
40. Larsson, S. C. & Wolk, A. Red and processed meat consumption and risk of pancreatic cancer: meta-analysis of prospective studies. *Br. J. Cancer* **106**, 603–607 (2012).
41. Yeo, T. P. Demographics, epidemiology, and inheritance of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Semin. Oncol.* **42**, 8–18 (2015).
42. Maitra, A. & Hruban, R. H. Pancreatic cancer. *Annu. Rev. Pathol.* **3**, 157–88 (2008).
43. Jones, S. *et al.* Core signaling pathways in human pancreatic cancers revealed by global genomic analyses. *Science* **321**, 1801–6 (2008).
44. Cascinu, S., Falconi, M., Valentini, V. & Jelic, S. Pancreatic cancer: ESMO clinical practice guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann. Oncol.* **21**, 55–58 (2010).
45. Hingorani, S. R. *et al.* Trp53R172H and KrasG12D cooperate to promote chromosomal instability and widely metastatic pancreatic ductal adenocarcinoma in mice. *Cancer Cell* **7**, 469–483 (2005).
46. Raphael, B. J. *et al.* Integrated Genomic Characterization of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Cancer Cell* **32**, 185-203.e13 (2017).
47. Bardeesy, N. & DePinho, R. A. Pancreatic cancer biology and genetics. *Nat. Rev. Cancer* **2**, 897–909 (2002).
48. Klimstra, D. S. & Longnecker, D. S. K-ras mutations in pancreatic ductal proliferative lesions. *Am. J. Pathol.* **145**, 1547–50 (1994).
49. Güngör, C., Hofmann, B. T., Wolters-Eisfeld, G. & Bockhorn, M. Pancreatic cancer. *Br. J. Pharmacol.* **171**, 849–858 (2014).
50. Yachida, S. *et al.* Distant metastasis occurs late during the genetic evolution of pancreatic cancer. *Nature* **467**, 1114–1117 (2010).
51. Verna, E. C. *et al.* Pancreatic cancer screening in a prospective cohort of high-risk patients: a comprehensive strategy of imaging and genetics. *Clin. Cancer Res.* **16**, 5028–37 (2010).
52. Du, T. *et al.* The diagnosis and staging of pancreatic cancer: A comparison of endoscopic ultrasound and computed tomography with pancreas protocol. *Am. J. Surg.* **215**, 472–475 (2018).

53. Greene, F. L. *et al.* *AJCC Cancer Staging Manual*. (NY: Springer, 2017).
54. Chong, J. U., Kim, S. H., Hwang, H. K., Kang, C. M. & Lee, W. J. Yonsei criteria: a clinical reflection of stage I left-sided pancreatic cancer. *Oncotarget* **8**, 110830–110836 (2017).
55. Wayne, J. D. Localized Adenocarcinoma of the Pancreas: The Rationale for Preoperative Chemoradiation. *Oncologist* **7**, 34–45 (2004).
56. Bailly, C. Irinotecan: 25 years of cancer treatment. *Pharmacol. Res.* **148**, 104398 (2019).
57. Henriksen, A., Dyhl-Polk, A., Chen, I. & Nielsen, D. Checkpoint inhibitors in pancreatic cancer. *Cancer Treat. Rev.* **78**, 17–30 (2019).
58. Houg, D. S. & Bijlsma, M. F. The hepatic pre-metastatic niche in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Mol. Cancer* **17**, 95 (2018).
59. Keleg, S., Büchler, P., Ludwig, R., Büchler, M. W. & Friess, H. Invasion and metastasis in pancreatic cancer. *Mol. Cancer* **2**, 14 (2003).
60. Eccles, S. A. & Welch, D. R. Metastasis: recent discoveries and novel treatment strategies. *Lancet* **369**, 1742–1757 (2007).
61. Paget, S. The distribution of secondary growths in cancer of the breast. *Cancer Metastasis Rev.* **8**, 98–101 (1989).
62. Fidler, I. J. The pathogenesis of cancer metastasis: the ‘seed and soil’ hypothesis revisited. *Nat. Rev. Cancer* **3**, 453–458 (2003).
63. Fong, Z. V. & Winter, J. M. Biomarkers in Pancreatic Cancer. *Cancer J.* **18**, 530–538 (2012).
64. Koprowski, H., Herlyn, M., Steplewski, Z. & Sears, H. F. Specific antigen in serum of patients with colon carcinoma. *Science* **212**, 53–5 (1981).
65. Harsha, H. C. *et al.* A compendium of potential biomarkers of pancreatic cancer. *PLoS Med.* **6**, 2–7 (2009).
66. Greco, V. *et al.* Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical proteomics. *Expert Rev. Proteomics* 14789450.2018.1505510 (2018). doi:10.1080/14789450.2018.1505510
67. Blackstock, W. P. *et al.* Proteomics: quantitative and physical mapping of cellular proteins. *Trends Biotechnol.* **17**, 121–7 (1999).
68. Wilkins, MR, Appel, RD, Williams, KL, Hochstrasser, D. *Proteome research*. (Springer, 2014).
69. Bateman, N. W. & Conrads, T. P. Recent Advances and Opportunities in Proteomic Analyses of Tumor Heterogeneity. *J. Pathol.* (2018). doi:10.1002/path.5036
70. Cho, W. C. S. Contribution of oncoproteomics to cancer biomarker discovery. *Mol. Cancer* **6**, 1–13 (2007).
71. Cho, W. C. Contribution of oncoproteomics to cancer biomarker discovery. *Mol.*



- Cancer* **6**, 25 (2007).
72. Grønberg, M. *et al.* Biomarker Discovery from Pancreatic Cancer Secretome Using a Differential Proteomic Approach. *Mol. Cell. Proteomics* **5**, 157–171 (2006).
  73. Donadelli, M. The cancer secretome and secreted biomarkers. *Semin. Cell Dev. Biol.* **78**, 1–2 (2018).
  74. Pavlou, M. P. & Diamandis, E. P. The cancer cell secretome: A good source for discovering biomarkers? *J. Proteomics* **73**, 1896–1906 (2010).
  75. Tjalsma, H., Bolhuis, A., Jongbloed, J. D. H., Bron, S. & van Dijk, J. M. Signal Peptide-Dependent Protein Transport in *Bacillus subtilis*: a Genome-Based Survey of the Secretome. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **64**, 515–547 (2000).
  76. Lee, M. C. S., Miller, E. A., Goldberg, J., Orci, L. & Schekman, R. BI-DIRECTIONAL PROTEIN TRANSPORT BETWEEN THE ER AND GOLGI. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **20**, 87–123 (2004).
  77. Cleves, A. E. Protein transports: the nonclassical ins and outs. *Curr. Biol.* **7**, R318-20 (1997).
  78. Simons, M. & Raposo, G. Exosomes - vesicular carriers for intercellular communication. *Curr. Opin. Cell Biol.* **21**, 575–581 (2009).
  79. Février, B. & Raposo, G. Exosomes: Endosomal-derived vesicles shipping extracellular messages. *Curr. Opin. Cell Biol.* **16**, 415–421 (2004).
  80. Karagiannis, G. S., Pavlou, M. P. & Diamandis, E. P. Cancer secretomics reveal pathophysiological pathways in cancer molecular oncology. *Mol. Oncol.* **4**, 496–510 (2010).
  81. Karagiannis, G. S., Pavlou, M. P. & Diamandis, E. P. Cancer secretomics reveal pathophysiological pathways in cancer molecular oncology. *Mol. Oncol.* **4**, 496–510 (2010).
  82. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* **144**, 646–674 (2011).
  83. Liu, P. *et al.* Quantitative secretomic analysis of pancreatic cancer cells in serum-containing conditioned medium. *Sci. Rep.* **6**, 37606 (2016).
  84. Socovich, A. M. & Naba, A. The cancer matrisome: from comprehensive characterization to biomarker discovery. *Semin. Cell Dev. Biol.* (2018). doi:10.1016/j.semcdb.2018.06.005
  85. Costa-Silva, B. *et al.* Pancreatic cancer exosomes initiate pre-metastatic niche formation in the liver. *Nat. Cell Biol.* **17**, 816–826 (2015).
  86. Melo, S. a. *et al.* Glypican-1 identifies cancer exosomes and detects early pancreatic cancer. *Nature* **523**, 177–182 (2015).
  87. Su, G. *et al.* Glypican-1 is frequently overexpressed in human gliomas and enhances FGF-2 signaling in glioma cells. *Am. J. Pathol.* **168**, 2014–26 (2006).
  88. Kleeff, J. *et al.* The cell-surface heparan sulfate proteoglycan glypican-1

- regulates growth factor action in pancreatic carcinoma cells and is overexpressed in human pancreatic cancer. *J. Clin. Invest.* **102**, 1662–1673 (1998).
89. Matsuda, K. *et al.* Glypican-1 is overexpressed in human breast cancer and modulates the mitogenic effects of multiple heparin-binding growth factors in breast cancer cells. *Cancer Res.* **61**, 5562–9 (2001).
  90. Lobb, R. J., Lima, L. G. & Möller, A. Exosomes: Key mediators of metastasis and pre-metastatic niche formation. *Semin. Cell Dev. Biol.* **67**, 3–10 (2017).
  91. Kucharczyk, P. *et al.* Exosomes reflect the hypoxic status of glioma cells and mediate hypoxia-dependent activation of vascular cells during tumor development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **110**, 7312–7 (2013).
  92. Demory Beckler, M. *et al.* Proteomic analysis of exosomes from mutant KRAS colon cancer cells identifies intercellular transfer of mutant KRAS. *Mol. Cell. Proteomics* **12**, 343–55 (2013).
  93. Xiao, D. *et al.* Melanoma cell-derived exosomes promote epithelial-mesenchymal transition in primary melanocytes through paracrine/autocrine signaling in the tumor microenvironment. *Cancer Lett.* **376**, 318–27 (2016).
  94. Zhang, X. *et al.* Exosomes in cancer: small particle, big player. *J. Hematol. Oncol.* **8**, 83 (2015).
  95. Gupta, M. K. *et al.* Secretome analysis of Glioblastoma cell line - HNGC-2. *Mol. Biosyst.* **9**, 1390–1400 (2013).
  96. Brinton, L. T., Sloane, H. S., Kester, M. & Kelly, K. A. Formation and role of exosomes in cancer. *Cell. Mol. Life Sci.* **72**, 659–71 (2015).
  97. Atkinson, A. J. *et al.* Biomarkers and surrogate endpoints: Preferred definitions and conceptual framework. *Clin. Pharmacol. Ther.* **69**, 89–95 (2001).
  98. Lim, M. L., Jungebluth, P. & Macchiarini, P. *Regenerative Medicine for Diseases of the Respiratory System. Translational Regenerative Medicine* (Elsevier Inc., 2014). doi:10.1016/B978-0-12-410396-2.00032-3
  99. Hanash, S. M., Pitteri, S. J. & Faca, V. M. Mining the plasma proteome for cancer biomarkers. *Nature* **452**, 571–579 (2008).
  100. Mishra, A. & Verma, M. Cancer biomarkers: Are we ready for the prime time? *Cancers (Basel)*. **2**, 190–208 (2010).
  101. Shaw, A., Bradley, M. D., Elyan, S. & Kurian, K. M. Tumour biomarkers: diagnostic, prognostic, and predictive: *BMJ* **351**, h3449 (2015).
  102. Carlomagno, N. *et al.* Diagnostic, Predictive, Prognostic, and Therapeutic Molecular Biomarkers in Third Millennium: A Breakthrough in Gastric Cancer. *Biomed Res. Int.* **2017**, 7869802 (2017).
  103. Prat, A. *et al.* Clinical implications of the intrinsic molecular subtypes of breast cancer. *Breast* **24**, S26–S35 (2015).
  104. Ballehaninna, U. K. & Chamberlain, R. S. Biomarkers for pancreatic cancer: promising new markers and options beyond CA 19-9. *Tumor Biol.* **34**, 3279–3292 (2013).

105. Leung, T.-K., Lee, C.-M., Wang, F.-C., Chen, H.-C. & Wang, H.-J. Difficulty with diagnosis of malignant pancreatic neoplasms coexisting with chronic pancreatitis. *World J. Gastroenterol.* **11**, 5075–8 (2005).
106. Singh, S., Tang, S., Sreenarasimhaiah, J., Lara, L. F. & Siddiqui, A. The Clinical Utility and Limitations of Serum Carbohydrate Antigen (CA19-9) as a Diagnostic Tool for Pancreatic Cancer and Cholangiocarcinoma. *Dig. Dis. Sci.* **56**, 2491–2496 (2011).
107. Glenn, J., Steinberg, W. M., Kurtzman, S. H., Steinberg, S. M. & Sindelar, W. F. Evaluation of the utility of a radioimmunoassay for serum CA 19-9 levels in patients before and after treatment of carcinoma of the pancreas. *J. Clin. Oncol.* **6**, 462–468 (1988).
108. Sitek, B. *et al.* Analysis of the Pancreatic Tumor Progression by a Quantitative Proteomic Approach and Immunohistochemical Validation research articles. *J. Proteome Res.* 1647–1656 (2009).
109. Takehara, A. *et al.* Novel tumor marker REG4 detected in serum of patients with resectable pancreatic cancer and feasibility for antibody therapy targeting REG4. *Cancer Sci.* **97**, 1191–1197 (2006).
110. Takayama, R. *et al.* Serum tumor antigen REG4 as a diagnostic biomarker in pancreatic ductal adenocarcinoma. *J. Gastroenterol.* **45**, 52–59 (2010).
111. Eguchi, H. *et al.* Serum REG4 Level Is a Predictive Biomarker for the Response to Preoperative Chemoradiotherapy in Patients With Pancreatic Cancer. *Pancreas* **38**, 791–798 (2009).
112. Hedström, J., Haglund, C., Leinonen, J., Nordling, S. & Stenman, U. H. Trypsinogen-1, -2 and tumour-associated trypsin-inhibitor in bile and biliary tract tissues from patients with biliary tract diseases and pancreatic carcinomas. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* **61**, 111–8 (2001).
113. Taccone, W., Mazzon, W. & Belli, M. Evaluation of TATI and other markers in solid tumors. *Scand. J. Clin. Lab. Invest. Suppl.* **207**, 25–32 (1991).
114. Haglund, C. *et al.* Tumour-associated trypsin inhibitor, TATI, in patients with pancreatic cancer, pancreatitis and benign biliary diseases. *Br. J. Cancer* **54**, 297–303 (1986).
115. Igbini, E., Guo, F., Jiang, S.-W., Kelley, C. & Li, J. Dkk1 involvement and its potential as a biomarker in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Clin. Chim. Acta* **488**, 226–234 (2019).
116. Wang, J. *et al.* MicroRNAs in Plasma of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Patients as Novel Blood-Based Biomarkers of Disease. *Cancer Prev. Res.* **2**, 807–813 (2009).
117. Liu, R. *et al.* Serum MicroRNA Expression Profile as a Biomarker in the Diagnosis and Prognosis of Pancreatic Cancer. *Clin. Chem.* **58**, 610–618 (2012).
118. Link, A., Becker, V., Goel, A., Wex, T. & Malfertheiner, P. Feasibility of Fecal MicroRNAs as Novel Biomarkers for Pancreatic Cancer. *PLoS One* **7**, e42933 (2012).

119. Madhavan, B. *et al.* Combined evaluation of a panel of protein and miRNA serum-exosome biomarkers for pancreatic cancer diagnosis increases sensitivity and specificity. *Int. J. Cancer* **136**, 2616–2627 (2015).
120. Que, R., Ding, G., Chen, J. & Cao, L. Analysis of serum exosomal microRNAs and clinicopathologic features of patients with pancreatic adenocarcinoma. *World J. Surg. Oncol.* **11**, 219 (2013).
121. Zhang, X. *et al.* Circulating biomarkers for early diagnosis of pancreatic cancer: facts and hopes. *Am. J. Cancer Res.* **8**, 332–353 (2018).
122. Palmirotta, R. *et al.* Liquid biopsy of cancer: a multimodal diagnostic tool in clinical oncology. *Ther. Adv. Med. Oncol.* **10**, 1758835918794630 (2018).
123. Krebs, M. G. *et al.* Molecular analysis of circulating tumour cells—biology and biomarkers. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **11**, 129–144 (2014).
124. Zhao, R. *et al.* Expression and clinical relevance of epithelial and mesenchymal markers in circulating tumor cells from colorectal cancer. *Oncotarget* **8**, 9293–9302 (2017).
125. Beije, N. *et al.* Prognostic Impact of HER2 and ER Status of Circulating Tumor Cells in Metastatic Breast Cancer Patients with a HER2-Negative Primary Tumor. *Neoplasia* **18**, 647–653 (2016).
126. Iwanicki-Caron, I. *et al.* Usefulness of Circulating Tumor Cell Detection in Pancreatic Adenocarcinoma Diagnosis. *Am. J. Gastroenterol.* **108**, 152–155 (2013).
127. Cristofanilli, M. *et al.* Circulating Tumor Cells, Disease Progression, and Survival in Metastatic Breast Cancer. *N. Engl. J. Med.* **351**, 781–791 (2004).
128. Chimonidou, M. *et al.* DNA Methylation of Tumor Suppressor and Metastasis Suppressor Genes in Circulating Tumor Cells. *Clin. Chem.* **57**, 1169–1177 (2011).
129. Castells, A. *et al.* K- ras Mutations in DNA Extracted From the Plasma of Patients With Pancreatic Carcinoma: Diagnostic Utility and Prognostic Significance. *J. Clin. Oncol.* **17**, 578–578 (1999).
130. Koproiski, M. S. *et al.* Somatic mutation screening: identification of individuals harboring K-ras mutations with the use of plasma DNA. *J. Natl. Cancer Inst.* **92**, 918–23 (2000).
131. Hsiao, Y. C., Chu, L. J., Chen, J. T., Yeh, T. Sen & Yu, J. S. Proteomic profiling of the cancer cell secretome: informing clinical research. *Expert Rev. Proteomics* **14**, 737–756 (2017).
132. Herreros-Villanueva, M. & Bujanda, L. Non-invasive biomarkers in pancreatic cancer diagnosis: what we need versus what we have. *Ann. Transl. Med.* **4**, 134 (2016).
133. Zangiacoimi Martinez, E. META-ANALYSIS OF RANDOMIZED CONTROLLED TRIALS: QUANTITATIVE ASPECTS.
134. Waldron, L. & Riester, M. Meta-Analysis in Gene Expression Studies. in (eds.

- Mathé, E. & Davis, S.) **1418**, 161–176 (Springer New York, 2016).
135. Domon, B. & Aebersold, R. Challenges and Opportunities in Proteomics Data Analysis. *Mol. Cell. Proteomics* **5**, 1921–1926 (2006).
  136. Ramasamy, A., Mondry, A., Holmes, C. C. & Altman, D. G. Key issues in conducting a meta-analysis of gene expression microarray datasets. *PLoS Med.* **5**, 1320–1332 (2008).
  137. Haidich, A. B. Meta-analysis in medical research. *Hippokratia* **14**, 29–37 (2010).
  138. Liberati, A. *et al.* The PRISMA statement for reporting systematic reviews and meta-analyses of studies that evaluate health care interventions: explanation and elaboration. *Ann. Intern. Med.* **151**, W65-94 (2009).
  139. Moher, D., Liberati, A., Tetzlaff, J. & Altman, D. G. Preferred reporting items for systematic reviews and meta-analyses: The PRISMA statement. *Int. J. Surg.* **8**, 336–341 (2010).
  140. Sousa, M. R. de & Ribeiro, A. L. P. Revisão sistemática e meta-análise de estudos de diagnóstico e prognóstico: um tutorial. *Arq. Bras. Cardiol.* **92**, 241–251 (2009).
  141. Parkinson, H. *et al.* ArrayExpress - A public database of microarray experiments and gene expression profiles. *Nucleic Acids Res.* **35**, 747–750 (2007).
  142. Parkinson, H. *et al.* ArrayExpress update--from an archive of functional genomics experiments to the atlas of gene expression. *Nucleic Acids Res.* **37**, D868-72 (2009).
  143. Baetke, S. C., Adriaens, M. E., Seigneuric, R., Evelo, C. T. & Eijssen, L. M. T. Molecular Pathways Involved in Prostate Carcinogenesis: Insights from Public Microarray Datasets. *PLoS One* **7**, e49831 (2012).
  144. Vidak, M. *et al.* Meta-Analysis and Experimental Validation Identified *FREM2* and *SPRY1* as New Glioblastoma Marker Candidates. *Int. J. Mol. Sci.* **19**, 1369 (2018).
  145. Haider, S. *et al.* A multi-gene signature predicts outcome in patients with pancreatic ductal adenocarcinoma. *Genome Med.* **6**, 105 (2014).
  146. Rajamani, D. & Bhasin, M. K. Identification of key regulators of pancreatic cancer progression through multidimensional systems-level analysis. *Genome Med.* **8**, 1–20 (2016).
  147. Vinga, S. Global Meta-Analysis of Transcriptomics Studies. **9**, (2014).
  148. Rhodes, D. R. *et al.* Oncomine 3.0: Genes, Pathways, and Networks in a Collection of 18,000 Cancer Gene Expression Profiles. *Neoplasia* **9**, 166–180 (2007).
  149. Kupersmidt, I. *et al.* Ontology-based meta-analysis of global collections of high-throughput public data. *PLoS One* **5**, (2010).
  150. Gadaleta, E. *et al.* A global insight into a cancer transcriptional space using pancreatic data: Importance, findings and flaws. *Nucleic Acids Res.* **39**, 7900–7907 (2011).

151. Collisson, E. A., Bailey, P., Chang, D. K. & Biankin, A. V. Molecular subtypes of pancreatic cancer. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* (2019). doi:10.1038/s41575-019-0109-y
152. Petersen, T. N., Brunak, S., von Heijne, G. & Nielsen, H. SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nat. Methods* **8**, 785–6 (2011).
153. Bendtsen, J. D., Jensen, L. J., Blom, N., Von Heijne, G. & Brunak, S. Feature-based prediction of non-classical and leaderless protein secretion. *Protein Eng. Des. Sel.* **17**, 349–56 (2004).
154. Kalra, H. *et al.* Vesiclepedia: A Compendium for Extracellular Vesicles with Continuous Community Annotation. *PLoS Biol.* **10**, e1001450 (2012).
155. Mathivanan, S., Fahner, C. J., Reid, G. E. & Simpson, R. J. ExoCarta 2012: database of exosomal proteins, RNA and lipids. *Nucleic Acids Res.* **40**, D1241–4 (2012).
156. Emanuelsson, O., Nielsen, H., Brunak, S. & von Heijne, G. Predicting Subcellular Localization of Proteins Based on their N-terminal Amino Acid Sequence. *J. Mol. Biol.* **300**, 1005–1016 (2000).
157. Krogh, A., Larsson, B., von Heijne, G. & Sonnhammer, E. L. . Predicting transmembrane protein topology with a hidden markov model: application to complete genomes. *J. Mol. Biol.* **305**, 567–580 (2001).
158. Nanjappa, V. *et al.* Plasma Proteome Database as a resource for proteomics research: 2014 update. *Nucleic Acids Res.* **42**, D959–65 (2014).
159. Szklarczyk, D. *et al.* The STRING database in 2017: quality-controlled protein-protein association networks, made broadly accessible. *Nucleic Acids Res.* **45**, D362–D368 (2017).
160. Tomczak, K., Czerwińska, P. & Wiznerowicz, M. The Cancer Genome Atlas (TCGA ): an immeasurable source of knowledge. (2014). doi:10.5114/wo.2014.47136
161. Lonsdale, J. *et al.* The Genotype-Tissue Expression (GTEx) project. *Nat. Genet.* **45**, 580–585 (2013).
162. Vivian, J. *et al.* Toil enables reproducible, open source, big biomedical data analyses. *Nat. Biotechnol.* **35**, 314–316 (2017).
163. Tang, Z. *et al.* GEPIA: a web server for cancer and normal gene expression profiling and interactive analyses. *Nucleic Acids Res.* **45**, W98–W102 (2017).
164. Uhlen, M. *et al.* Towards a knowledge-based Human Protein Atlas. *Nat. Biotechnol.* **28**, 1248–1250 (2010).
165. Metsalu, T. & Vilo, J. ClustVis: a web tool for visualizing clustering of multivariate data using Principal Component Analysis and heatmap. *Nucleic Acids Res.* **43**, W566–70 (2015).
166. Aguirre-Gamboa, R. *et al.* SurvExpress: an online biomarker validation tool and database for cancer gene expression data using survival analysis. *PLoS One* **8**,

- e74250 (2013).
167. Stratford, J. K. *et al.* A Six-Gene Signature Predicts Survival of Patients with Localized Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *PLoS Med.* **7**, e1000307 (2010).
  168. Zhang, G. *et al.* Integration of metabolomics and transcriptomics revealed a fatty acid network exerting growth inhibitory effects in human pancreatic cancer. *Clin. Cancer Res.* **19**, 4983–93 (2013).
  169. Ristorcelli, E. *et al.* Human tumor nanoparticles induce apoptosis of pancreatic cancer cells. *FASEB J.* **22**, 3358–3369 (2008).
  170. Costa-Silva, B. *et al.* Pancreatic cancer exosomes initiate pre-metastatic niche formation in the liver. *Nat Cell Biol* **17**, 816–826 (2015).
  171. Hyo, S. L., Jeong, J. & Lee, K. J. Characterization of vesicles secreted from insulinoma NIT-1 cells. *J. Proteome Res.* **8**, 2851–2862 (2009).
  172. Que, R., Lin, C., Ding, G.-P., Wu, Z.-R. & Cao, L.-P. Increasing the immune activity of exosomes: the effect of miRNA-depleted exosome proteins on activating dendritic cell/cytokine-induced killer cells against pancreatic cancer. *J. Zhejiang Univ. B* **17**, 352–360 (2016).
  173. Walsh, N. *et al.* Aldehyde dehydrogenase 1A1 and gelsolin identified as novel invasion-modulating factors in conditioned medium of pancreatic cancer cells. *J. Proteomics* **71**, 561–571 (2008).
  174. McKinney, K. Q. *et al.* Discovery of putative pancreatic cancer biomarkers using subcellular proteomics. *J. Proteomics* **74**, 79–88 (2011).
  175. Srirajaskanthan, R. *et al.* Identification of Mac-2-binding protein as a putative marker of neuroendocrine tumors from the analysis of cell line secretomes. *Mol. Cell. Proteomics* **9**, 656–66 (2010).
  176. Baron, B., Kitagawa, T., Nakamura, K. & Kuramitsu, Y. Isolation of a growth factor stress-induced pancreatic cancer sub-population: Insight into changes due to micro-environment. *Cancer Genomics and Proteomics* **12**, 49–55 (2015).
  177. Zhang, H. *et al.* Profiling the potential biomarkers for cell differentiation of pancreatic cancer using iTRAQ and 2-D LC-MS/MS. *Proteomics. Clin. Appl.* **3**, 862–71 (2009).
  178. Xiao, J., Lee, W., Zhao, Y., Cao, R. & Go, V. Profiling Pancreatic Cancer–Secreted Proteome Using <sup>15</sup>N Amino Acids and Serum-Free Media. *Pancreas* **39**, 1–13 (2010).
  179. Yu, K. H. *et al.* Stable isotope dilution multidimensional liquid chromatography-tandem mass spectrometry for pancreatic cancer serum biomarker discovery. *J. Proteome Res.* **8**, 1565–76 (2009).
  180. Sitek, B. *et al.* Application of fluorescence difference gel electrophoresis saturation labelling for the analysis of microdissected precursor lesions of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Proteomics* **5**, 2665–2679 (2005).
  181. Qi, T. *et al.* Comparative proteomic analysis for the detection of biomarkers in pancreatic ductal adenocarcinomas. *J. Clin. Pathol.* **61**, 49–58 (2008).

182. Turtoi, A. *et al.* Identification of Novel Accessible Proteins Bearing Diagnostic and Therapeutic Potential in Human Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *J. Proteome Res.* **10**, 4302–4313 (2011).
183. Satoh, M. *et al.* Immune-complex level of cofilin-1 in sera is associated with cancer progression and poor prognosis in pancreatic cancer. *Cancer Sci.* **108**, 795–803 (2017).
184. Lin, C. *et al.* ITRAQ-based quantitative proteomics reveals apolipoprotein A-I and transferrin as potential serum markers in CA19-9 negative pancreatic ductal adenocarcinoma. *Medicine* **95**, e4527 (2016).
185. Kosanam, H. *et al.* Laminin, gamma 2 (LAMC2): A Promising New Putative Pancreatic Cancer Biomarker Identified by Proteomic Analysis of Pancreatic Adenocarcinoma Tissues. *Mol. Cell. Proteomics* **12**, 2820–2832 (2013).
186. Mayerle, J. *et al.* Metabolic biomarker signature to differentiate pancreatic ductal adenocarcinoma from chronic pancreatitis. *Gut* 1–10 (2017). doi:10.1136/gutjnl-2016-312432
187. Takadate, T. *et al.* Novel prognostic protein markers of resectable pancreatic cancer identified by coupled shotgun and targeted proteomics using formalin-fixed paraffin-embedded tissues. *Int. J. Cancer* **132**, 1368–1382 (2013).
188. Hwang, T.-L., Liang, Y., Chien, K.-Y. & Yu, J.-S. Overexpression and elevated serum levels of phosphoglycerate kinase 1 in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Proteomics* **6**, 2259–72 (2006).
189. Grønberg, M. *et al.* Biomarker Discovery from Pancreatic Cancer Secretome Using a Differential Proteomic Approach. *Mol. Cell. Proteomics* **5**, 157–171 (2006).
190. Kuwae, Y., Kakehashi, A., Wakasa, K. & Wei, M. Paraneoplastic Ma Antigen – Like 1 as a Potential Prognostic. 106–115 (2014).
191. Tian, R. *et al.* Proteome analysis of human pancreatic ductal adenocarcinoma tissue using two-dimensional gel electrophoresis and tandem mass spectrometry for identification of disease-related proteins. *Dig. Dis. Sci.* **53**, 65–72 (2008).
192. Cui, Y. *et al.* Proteomic analysis of pancreatic ductal adenocarcinoma compared with normal adjacent pancreatic tissue and pancreatic benign cystadenoma. *Pancreatology* **9**, 89–98 (2009).
193. Chung, J. C., Oh, M. J., Choi, S. H. & Bae, C. D. Proteomic analysis to identify biomarker proteins in pancreatic ductal adenocarcinoma. *ANZ J. Surg.* **78**, 245–251 (2008).
194. Cui, Y. *et al.* Proteomic and tissue array profiling identifies elevated hypoxia-regulated proteins in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer Invest.* **27**, 747–55 (2009).
195. Iuga, C. *et al.* Proteomic identification of potential prognostic biomarkers in resectable pancreatic ductal adenocarcinoma. *Proteomics* **14**, 945–955 (2014).
196. Britton, D. *et al.* Quantification of pancreatic cancer proteome and phosphorylome: Indicates molecular events likely contributing to cancer and



- activity of drug targets. *PLoS One* **9**, (2014).
197. Pan, S. *et al.* Quantitative Glycoproteomics Analysis Reveals Changes in N-Glycosylation Level Associated with Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *J. Proteome Res.* **13**, 1293–1306 (2014).
  198. Kawahara, T. *et al.* Quantitative proteomic profiling identifies DPYSL3 as pancreatic ductal adenocarcinoma-associated molecule that regulates cell adhesion and migration by stabilization of focal adhesion complex. *PLoS One* **8**, 1–12 (2013).
  199. Chen, R. *et al.* Stromal galectin-1 expression is associated with long-term survival in resectable pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer Biol. Ther.* **13**, 899–907 (2012).
  200. Schiarea, S. *et al.* Secretome analysis of multiple pancreatic cancer cell lines reveals perturbations of key functional networks. *J. Proteome Res.* **9**, 4376–4392 (2010).
  201. Kojima, K. *et al.* Validation of a robust proteomic analysis carried out on formalin-fixed paraffin-embedded tissues of the pancreas obtained from mouse and human. *Proteomics* **12**, 3393–3402 (2012).
  202. Zhang, G. *et al.* Integration of metabolomics and transcriptomics revealed a fatty acid network exerting growth inhibitory effects in human pancreatic cancer. *Clin. Cancer Res.* **19**, 4983–4993 (2013).
  203. Weeks, M. E. *et al.* Analysis of the urine proteome in patients with pancreatic ductal adenocarcinoma. *Proteomics. Clin. Appl.* **2**, 1047–1057 (2008).
  204. Chen, J., Anderson, M., Misek, D. E., Simeone, D. M. & Lubman, D. M. Characterization of apolipoprotein and apolipoprotein precursors in pancreatic cancer serum samples via two-dimensional liquid chromatography and mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **1162**, 117–25 (2007).
  205. Jenkinson, C. *et al.* Decreased serum thrombospondin-1 levels in pancreatic cancer patients up to 24 months prior to clinical diagnosis: Association with diabetes mellitus. *Clinical Cancer Research* **22**, 1734–1743 (2016).
  206. Hocker, J. R. *et al.* Discriminating patients with early-stage pancreatic cancer or chronic pancreatitis using serum electrospray mass profiling. *Cancer Lett.* **359**, 314–24 (2015).
  207. Guo, X. *et al.* Dysbindin as a novel biomarker for pancreatic ductal adenocarcinoma identified by proteomic profiling. *Int. J. cancer* **139**, 1821–9 (2016).
  208. Chen, J. *et al.* Identification and verification of transthyretin as a potential biomarker for pancreatic ductal adenocarcinoma. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **139**, 1117–1127 (2013).
  209. Sogawa, K. *et al.* Identification of a novel serum biomarker for pancreatic cancer, C4b-binding protein  $\alpha$ -chain (C4BPA) by quantitative proteomic analysis using tandem mass tags. *Br. J. Cancer* **115**, 949–956 (2016).
  210. Radon, T. P. *et al.* Identification of a three-biomarker panel in urine for early

- detection of pancreatic adenocarcinoma. *Clin. Cancer Res.* **21**, 3512–3521 (2015).
211. Brandi, J. *et al.* Secretome protein signature of human pancreatic cancer stem-like cells. *J. Proteomics* **136**, 1–12 (2016).
  212. Lee, M. J. *et al.* Identification of Human Complement Factor B as a Novel Biomarker Candidate for Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *J. Proteome Res.* **13**, 4878–4888 (2014).
  213. Chen, K. T. *et al.* Potential Prognostic Biomarkers of Pancreatic Cancer. *Pancreas* **43**, 22–27 (2014).
  214. Chen, J. *et al.* Profiling the potential tumor markers of pancreatic ductal adenocarcinoma using 2D-DIGE and MALDI-TOF-MS: Up-regulation of Complement C3 and alpha-2-HS-glycoprotein. *Pancreatology* **13**, 290–297 (2013).
  215. Tian, M. *et al.* Proteomic analysis identifies MMP-9, DJ-1 and A1BG as overexpressed proteins in pancreatic juice from pancreatic ductal adenocarcinoma patients. *BMC Cancer* **8**, 241 (2008).
  216. Tomaino, B. *et al.* Autoantibody signature in human ductal pancreatic adenocarcinoma. *J. Proteome Res.* **10**, 4025–4031 (2007).
  217. Klein-Scory, S. *et al.* New insights in the composition of extracellular vesicles from pancreatic cancer cells: implications for biomarkers and functions. *Proteome Sci.* **12**, 50 (2014).
  218. Chang, Y. T. *et al.* Secretome-based identification of ULBP2 as a novel serum marker for pancreatic cancer detection. *PLoS One* **6**, (2011).
  219. Wehr, A. Y., Hwang, W. T., Blair, I. A. & Yu, K. H. Relative quantification of serum proteins from pancreatic ductal adenocarcinoma patients by stable isotope dilution liquid chromatography-mass spectrometry. *J Proteome Res* **11**, 1749–1758 (2012).
  220. Adamczyk, K. A. *et al.* Characterization of soluble and exosomal forms of the EGFR released from pancreatic cancer cells. *Life Sci.* **89**, 304–312 (2011).
  221. Lowenfels, A. B. *et al.* Hereditary Pancreatitis and the Risk of Pancreatic Cancer. *JNCI J. Natl. Cancer Inst.* **89**, 442–446 (1997).
  222. Collisson, E. A. *et al.* Subtypes of pancreatic ductal adenocarcinoma and their differing responses to therapy. *Nat. Med.* **17**, 500–503 (2011).
  223. Weiss, F. U. Pancreatic cancer risk in hereditary pancreatitis. *Front. Physiol.* **5**, 70 (2014).
  224. Marti, A. *et al.* SurvExpress : An Online Biomarker Validation Tool and Database for Cancer Gene Expression Data Using Survival Analysis. **8**, 1–9 (2013).
  225. Zhang, G. *et al.* DPEP1 Inhibits Tumor Cell Invasiveness, Enhances Chemosensitivity and Predicts Clinical Outcome in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *PLoS One* **7**, e31507 (2012).

226. Donahue, T. R. *et al.* Integrative Survival-Based Molecular Profiling of Human Pancreatic Cancer. *Clin. Cancer Res.* **18**, 1352–1363 (2012).
227. Biankin, A. V. *et al.* Pancreatic cancer genomes reveal aberrations in axon guidance pathway genes. *Nature* **491**, 399–405 (2012).
228. Chen, D. T. *et al.* Prognostic fifteen-gene signature for early stage pancreatic ductal adenocarcinoma. *PLoS One* **10**, 1–17 (2015).
229. Birnbaum, D. J. *et al.* A 25-gene classifier predicts overall survival in resectable pancreatic cancer. *BMC Med.* **15**, 1–14 (2017).
230. Raman, P., Maddipati, R., Lim, K. H. & Tozeren, A. Pancreatic cancer survival analysis defines a signature that predicts outcome. *PLoS One* **13**, e0201751 (2018).
231. Garbis, S., Lubec, G. & Fountoulakis, M. Limitations of current proteomics technologies. *J. Chromatogr. A* **1077**, 1–18 (2005).
232. Reymond, M. A. & Schlegel, W. Proteomics in cancer. *Adv. Clin. Chem.* **44**, 103–42 (2007).
233. Lim, L. C. & Lim, Y. M. Proteome Heterogeneity in Colorectal Cancer. *Proteomics* **18**, 1700169 (2018).
234. Anderson, L. & Seilhamer, J. A comparison of selected mRNA and protein abundances in human liver. *Electrophoresis* **18**, 533–537 (1997).
235. Gygi, S. P., Rochon, Y., Franza, B. R. & Aebersold, R. Correlation between Protein and mRNA Abundance in Yeast. *Mol. Cell. Biol.* **19**, 1720–1730 (1999).
236. Konigsbrugge, O. *et al.* Association Between Decreased Serum Albumin With Risk of Venous Thromboembolism and Mortality in Cancer Patients. *Oncologist* **21**, 252–257 (2016).
237. Deng, Q. L. *et al.* Development and Validation of a Nomogram for Predicting Survival in Patients with Advanced Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Sci. Rep.* **7**, 1–8 (2017).
238. Menapace, L. A., Peterson, D. R., Berry, A., Sousou, T. & Khorana, A. A. Symptomatic and incidental thromboembolism are both associated with mortality in pancreatic cancer. *Thromb. Haemost.* **106**, 371–378 (2011).
239. Kondo, S. *et al.* Incidence and risk factors for venous thromboembolism in patients with pretreated advanced pancreatic carcinoma. *Oncotarget* **9**, 16883–16890 (2018).
240. Follia, L. *et al.* Integrative Analysis of Novel Metabolic Subtypes in Pancreatic Cancer Fosters New Prognostic Biomarkers. *Front. Oncol.* **9**, 1–12 (2019).
241. Chen, T. *et al.* Clinical significance and prognostic value of Triosephosphate isomerase expression in gastric cancer. *Medicine (Baltimore)*. **96**, e6865 (2017).
242. Song, Y. *et al.* Alpha-enolase as a potential cancer prognostic marker promotes cell growth, migration, and invasion in glioma. *Mol. Cancer* **13**, 1–12 (2014).
243. Hsiao, K. C. *et al.* Surface  $\alpha$ -Enolase Promotes Extracellular Matrix Degradation

- and Tumor Metastasis and Represents a New Therapeutic Target. *PLoS One* **8**, 1–15 (2013).
244. Principe, M. *et al.* Targeting of surface alpha-enolase inhibits the invasiveness of pancreatic cancer cells. *Oncotarget* **6**, 11098–11113 (2015).
  245. Principe, M. *et al.* Alpha-enolase (ENO1) controls alpha v/beta 3 integrin expression and regulates pancreatic cancer adhesion, invasion, and metastasis. *J. Hematol. Oncol.* **10**, 16 (2017).
  246. Miles, L. A. *et al.* Role of cell-surface lysines in plasminogen binding to cells: identification of alpha-enolase as a candidate plasminogen receptor. *Biochemistry* **30**, 1682–91 (1991).
  247. López-Alemán, R. *et al.* Inhibition of cell surface mediated plasminogen activation by a monoclonal antibody against  $\alpha$ -Enolase. *Am. J. Hematol.* **72**, 234–242 (2003).
  248. Legler, D. F., Johnson-Léger, C., Wiedle, G., Bron, C. & Imhof, B. A. The  $\alpha$ v $\beta$ 3 integrin as a tumor homing ligand for lymphocytes. *Eur. J. Immunol.* **34**, 1608–1616 (2004).
  249. Liu, Zhaofei, wang, fan, chen, xiaoyuan. Integrin Avb3-Targeted Cancer Therapy. *Drug Dev Res* **69**, 329–339 (2010).
  250. Yin, H., Wang, L. & Liu, H.-L. ENO1 Overexpression in Pancreatic Cancer Patients and Its Clinical and Diagnostic Significance. *Gastroenterol. Res. Pract.* **2018**, 1–7 (2018).
  251. Ziegler, Y. S., Moresco, J. J., Yates, J. R. & Nardulli, A. M. Integration of Breast Cancer Secretomes with Clinical Data Elucidates Potential Serum Markers for Disease Detection, Diagnosis, and Prognosis. *PLoS One* **11**, e0158296 (2016).
  252. Tsai, S.-T. *et al.* ENO1, a potential prognostic head and neck cancer marker, promotes transformation partly via chemokine CCL20 induction. *Eur. J. Cancer* **46**, 1712–1723 (2010).
  253. Liberti, M. V, Locasale, J. W., Biology, C. & Biology, C. Review- The Warburg Effect : How Does it Benefit Cancer Cells ? *Trends Biochem. Sci.* **41**, 211–218 (2017).
  254. Zhu, W. *et al.* The molecular mechanism and clinical significance of LDHA in HER2-mediated progression of gastric cancer. *Am. J. Transl. Res.* **10**, 2055–2067 (2018).
  255. Rong, Y. *et al.* Lactate dehydrogenase A is overexpressed in pancreatic cancer and promotes the growth of pancreatic cancer cells. *Tumor Biol.* **34**, 1523–1530 (2013).
  256. Liu, Y. *et al.* Nuclear lactate dehydrogenase A senses ROS to produce  $\alpha$ -hydroxybutyrate for HPV-induced cervical tumor growth. *Nat. Commun.* **9**, (2018).
  257. Yu, S. L. *et al.* Serum lactate dehydrogenase predicts prognosis and correlates with systemic inflammatory response in patients with advanced pancreatic cancer after gemcitabine-based chemotherapy. *Sci. Rep.* **7**, 1–9 (2017).

258. Feng, Y. *et al.* Lactate dehydrogenase A: A key player in carcinogenesis and potential target in cancer therapy. *Cancer Med.* **7**, 6124–6136 (2018).
259. Yu, X. & Li, S. Non-metabolic functions of glycolytic enzymes in tumorigenesis. *Oncogene* **36**, 2629–2636 (2017).
260. Steeg, P. S. *et al.* Evidence for a Novel Gene Associated With Low Tumor Metastatic Potential. *J Natl cancer Inst.* **80**, 200–204 (1988).
261. Ohshio, G. *et al.* Immunohistochemical expression of nm23 gene product, nucleotide diphosphate kinase, in pancreatic neoplasms. *Int. J. Gastrointest. Cancer* **22**, 59–66 (2008).
262. Nakamori, S. *et al.* Clinicopathological features and prognostic significance of nucleoside diphosphate kinase/nm23 gene product in human pancreatic exocrine neoplasms. *Int. J. Pancreatol.* **14**, 125–133 (1993).
263. Takadate, T. *et al.* NM23/nucleoside diphosphate kinase-A as a potent prognostic marker in invasive pancreatic ductal carcinoma identified by proteomic analysis of laser micro-dissected formalin-fixed paraffin-embedded tissue. *Clin. Proteomics* **9**, 1 (2012).
264. Liu, L. *et al.* Prognostic value and clinicopathologic significance of nm23 in various cancers: A systematic review and meta-analysis. *Int. J. Surg.* **60**, 257–265 (2018).
265. Royds, J. A. *et al.* Nm23 ‘anti-metastatic’ gene product expression in colorectal carcinoma. *J. Pathol.* **172**, 261–266 (1994).
266. Orozco, C. A. *et al.* Targeting galectin-1 inhibits pancreatic cancer progression by modulating tumor–stroma crosstalk. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **115**, E3769–E3778 (2018).
267. Zhang, P. F. *et al.* Galectin-1 induces hepatocellular carcinoma EMT and sorafenib resistance by activating FAK/PI3K/AKT signaling. *Cell Death Dis.* **7**, e2201 (2016).
268. Van Woensel, M. *et al.* Sensitization of glioblastoma tumor micro-environment to chemo- and immunotherapy by Galectin-1 intranasal knock-down strategy. *Sci. Rep.* **7**, 1–14 (2017).
269. Yeh, C.-C. *et al.* Integrated Stable Isotope Labeling by Amino Acids in Cell Culture (SILAC) and Isobaric Tags for Relative and Absolute Quantitation (iTRAQ) Quantitative Proteomic Analysis Identifies Galectin-1 as a Potential Biomarker for Predicting Sorafenib Resistance i. *Mol. Cell. Proteomics* **14**, 1527–1545 (2015).
270. Su, Y. C. *et al.* Galectin-1-induced autophagy facilitates cisplatin resistance of hepatocellular carcinoma. *PLoS One* **11**, 1–14 (2016).
271. Chung, L. Y. *et al.* Galectin-1 promotes lung cancer progression and chemoresistance by upregulating p38 MAPK, ERK, and cyclooxygenase-2. *Clin. Cancer Res.* **18**, 4037–4047 (2012).
272. Zhang, P. *et al.* Galectin-1 overexpression promotes progression and chemoresistance to cisplatin in epithelial ovarian cancer. *Cell Death Dis.* **5**, 1–8

- (2014).
273. Mathieu, V. *et al.* Galectin-1 knockdown increases sensitivity to temozolomide in a B16F10 mouse metastatic melanoma model. *J. Invest. Dermatol.* **127**, 2399–2410 (2007).
  274. Lykken, J. M. *et al.* Galectin-1 drives lymphoma CD20 immunotherapy resistance: Validation of a preclinical system to identify resistance mechanisms. *Blood* **127**, 1886–1895 (2016).
  275. Cui, G. *et al.* Galectin-3 knockdown increases gefitinib sensitivity to the inhibition of EGFR endocytosis in gefitinib-insensitive esophageal squamous cancer cells. *Med. Oncol.* **32**, 1–8 (2015).
  276. Mirandola, L. *et al.* Galectin-3 inhibition suppresses drug resistance, motility, invasion and angiogenic potential in ovarian cancer. *Gynecol. Oncol.* **135**, 573–579 (2014).
  277. Streetly, M. J. *et al.* GCS-100, a novel galectin-3 antagonist, modulates MCL-1, NOXA, and cell cycle to induce myeloma cell death. *Blood* **115**, 3939–3948 (2010).
  278. Mazurek, N. *et al.* Cell-surface galectin-3 confers resistance to TRAIL by impeding trafficking of death receptors in metastatic colon adenocarcinoma cells. *Cell Death Differ.* **19**, 523–533 (2012).
  279. Kyu, J. C. *et al.* Overexpressed cyclophilin A in cancer cells renders resistance to hypoxia- and cisplatin-induced cell death. *Cancer Res.* **67**, 3654–3662 (2007).
  280. Zhu, X. *et al.* ENO1 promotes tumor proliferation and cell adhesion mediated drug resistance (CAM-DR) in Non-Hodgkin’s Lymphomas. *Exp. Cell Res.* **335**, 216–223 (2015).
  281. Maiso, P. *et al.* Metabolic Signature Identifies Novel Targets for Drug Resistance in Multiple Myeloma. *Cancer Res.* **75**, 2071–2082 (2015).
  282. Zeng, H. Z. *et al.* Proteomic analysis identified DJ-1 as a cisplatin resistant marker in non-small cell lung cancer. *Int. J. Mol. Sci.* **12**, 3489–3499 (2011).
  283. Sagulenko, V. *et al.* Cathepsin D protects human neuroblastoma cells from doxorubicin-induced cell death. *Carcinogenesis* **29**, 1869–1877 (2008).
  284. Bai, D., Ueno, L. & Vogt, P. Akt-mediated regulation of NFκB for the oncogenicity of PI3K and Akt. *Int. J. Cancer* **125**, 2863–2870 (2009).
  285. Fresno Vara, J. Á. *et al.* PI3K/Akt signalling pathway and cancer. *Cancer Treat. Rev.* **30**, 193–204 (2004).
  286. Robinson, J. L., Feizi, A., Uhlén, M. & Nielsen, J. A Systematic Investigation of the Malignant Functions and Diagnostic Potential of the Cancer Secretome. *Cell Rep.* 2622–2635 (2019). doi:10.1016/j.celrep.2019.02.025
  287. Maurer, H. C. *et al.* Experimental microdissection enables functional harmonisation of pancreatic cancer subtypes. *Gut* 1–10 (2019). doi:10.1136/gutjnl-2018-317706