

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 TÉC. 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



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 supor. 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 mundial¹. 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)². Em todo o mundo, a taxa de incidência do câncer tem aumentado e já constitui a segunda principal causa de morte, após as doenças cardiovasculares³. 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 fenômeno⁴.

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^{5,6}. Essas alterações são geralmente eventos somáticos, embora mutações germinativas também possam predispor uma pessoa a um câncer hereditário^{6,7}. Uma única alteração genética raramente é suficiente para o desenvolvimento de um tumor maligno⁶. 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 microRNAs⁶. Essas alterações são responsáveis pelas características-chaves do câncer que envolvem sua iniciação, crescimento, manutenção e disseminação⁸. 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^{5,8}. 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.⁵). 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.⁵). (Figura de hallmarks) 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 si⁵. 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^{5,9}. 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 tumorigênese⁵. 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 metástases¹⁰. 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 tumorais¹¹⁻¹³. 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 malignidade¹³.

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 terapêutica¹⁴.

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 alimentos¹⁵. Aproximadamente, 95% dos cânceres pancreáticos tem origem na porção exócrina, podem surgir a partir do epitélio ductal, células acinares ou do tecido conjuntivo¹⁶. O câncer pancreático mais frequente é o adenocarcinoma ductal, representa 80% a 90% dos tipos histológicos, e é

comumente referido como câncer de pâncreas¹⁶⁻¹⁸. 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 pâncreas¹⁹.

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 sétima²⁰⁻²². Nos Estados Unidos, estima-se que até 2020, o câncer de pâncreas seja a segunda doença maligna mais mortal no país¹⁷. 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 pulmonar²³. 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 melanoma²¹. 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 masculino²¹.

O câncer pancreático geralmente não apresenta sintomas em seus estádios iniciais, isso explica porque a maioria dos pacientes apresentam metástases no momento do diagnóstico²⁴. 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 oculto²⁵. 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 interrompida¹⁶. 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 náuseas²⁴. 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 pancreático²⁶. A obstrução do ducto pancreático é frequentemente associada à pancreatite aguda e esteatorréia devido a insuficiência pancreática exócrina²⁷. 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 tratamentos²⁸⁻³⁰. A generalidade desses sintomas torna o diagnóstico precoce do câncer pancreático muito difícil, pois podem ser confundidos com outros distúrbios gastrointestinais³¹. Além disso, cerca de 90% dos casos de câncer de pâncreas são complicados por metástases à distância^{17,32}.

A situação complica ainda mais em estádios avançados, onde a quimioterapia, a radioterapia e terapias combinatórias são amplamente ineficazes³³. 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 ano³⁴. Menos de 5% dos pacientes com câncer de pâncreas sobrevivem até cinco anos após o diagnóstico^{33,35}. 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 década²⁶. 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 cura³⁶.

O histórico familiar de câncer pancreático em parentes próximos representa apenas 5% a 10% de todos os casos de câncer de pâncreas ²⁶. 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^{16,17,37}. 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 ^{16,17,38-40}. O PDAC é mais diagnosticado na população idosa, pois resulta de defeitos genéticos adquiridos ao longo de muitos anos³². A idade média de início é de 70 anos, e 75% dos pacientes são diagnosticados entre 55 e 84 anos de idade²⁶.

Aproximadamente 80% dos carcinomas pancreáticos devem-se à mutações esporádicas, e aproximadamente 10%, é devido à herança de mutações germinativas¹⁶. 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^{16,41-43}. Quase 100% dos cânceres pancreáticos apresentam mutações no oncogene *KRAS*; essa condição o torna o gene mais caracterizado nesse tipo de câncer ⁴⁴. 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.*²⁶). O oncogene *KRAS* é considerado uma mutação de iniciação do PDAC e, portanto, pode ser encontrado mutado nos estádios iniciais da doença³⁶. Consequentemente, sua expressão no pâncreas impulsiona o início da doença em vários modelos de camundongos⁴⁵. Tumores do tipo selvagem para *KRAS* envolvem alterações em outros fatores oncogênicos, incluindo mutações em *GNAS*, *BRAF*, *CTNNB1* e em outros genes da via RAS⁴⁶.

Estudos patológicos e genéticos revelam que PDAC se desenvolve ao longo de muitos anos e segue uma sequência de progressão de adenoma para carcinoma¹⁷. As primeiras lesões ductais geralmente não apresentam alterações genéticas⁴⁷. A atipia histológica progride ao longo do tempo através de estádios de 1 a 3 da neoplasia intra-epitelial pancreática (PAIN), que são lesões mucinosas papilares microscópicas (<5 mm), que levam ao carcinoma invasivo²⁶. 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^{47,48}. Em seguida, ocorre a perda de p16 no estágio PanIN-2 e, no estágio PanIN-3, ocorre inativação de *TP53*, *SMAD4* e *BRCA2*⁴⁹. 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 & DePinho⁴⁷). Análises moleculares de lesões precursoras pancreáticas e PDAC determinaram que esses processos ocorrem em 10 a 20 anos⁵⁰.

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^{51,52}. Esses exames auxiliam na detecção e

estabelecimento do tamanho da massa tumoral, envolvimento vascular e de linfonodos; esses critérios ajudam no estadiamento dos pacientes⁵². 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 ≤ 2 cm, T2: diâmetro máximo do tumor > 2 cm e ≤ 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 ≥ 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)^{53,54}. O objetivo do estadiamento é separar os pacientes em grupo de doença localizada ressecável, localizada irressecável e avançada metastática, afim de submeter o paciente aos tratamentos mais adequados^{26,55}. 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 disponíveis⁵⁵. 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 cura²⁶. 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^{17,56,57}. 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 ¹⁷.

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^{58,59}. 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 distantes⁶⁰. 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 ^{58,61,62}. O câncer pancreático, por exemplo, costuma apresentar metástase frequentemente no fígado, peritônio e pulmão⁵⁸. 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 imunossupressoras⁵⁸.

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 publicados⁶³, 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 propósito⁶³⁻⁶⁵.

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 doenças⁶⁶. 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 testada⁶⁷.

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 tecidos⁶⁸. 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 tumores⁶⁹. 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 proteínas⁶⁹. 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 drogas⁷⁰.

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 proteína⁶⁷. 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 quantitativamente⁷¹.

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 doenças⁷². 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 terapias⁷³. 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 doença⁷⁴.

1.3 Secretoma do câncer

O termo “secretoma” foi introduzido por Tjalsma *et al.*⁷⁵ 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^{13,74}. 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 modificações⁷⁶. 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 proteico⁷⁶. A via não clássica é independente da via do RE-Golgi, e ocorre por mecanismos vesiculares e não-vesiculares⁷⁷. 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^{78,79}. 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^{74,80}. 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)⁸¹.

No entanto, as proteínas secretadas por células de câncer sozinhas compreendem apenas um subconjunto de todas as proteínas do microambiente tumoral⁸¹. 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 malignidade⁸¹. 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 tumorais⁸²⁻⁸⁴. 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 malignidade⁸¹. A alteração do secretoma do câncer e do microambiente tumoral tem sido reconhecida como um dos principais fatores que influenciam a biologia dos tumores⁷³. 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 progressão⁸⁴. 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 metastática⁵⁸.

A importância do envolvimento de moléculas secretadas em mecanismos tumorais como metástase é mostrada em estudos como o de Costa-Silva *et. al.*⁸⁵, 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- β e conseqüentemente induzem o aumento da

produção de fibronectina pelas células de Ito (também denominadas células estreladas hepáticas)⁸⁵. 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 fígado⁸⁵. 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.*⁸⁶ 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 câncer⁸⁷⁻⁸⁹. 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 curativa⁸⁶.

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 vascular⁹⁰; exossomos também foram identificados como mediadores-chave entre as células cancerígenas do pâncreas e a vascularização circundante, provocando respostas pró-angiogênicas⁹¹.

O *KRAS* mutante também pode ser transferido via exossomos e aumenta o crescimento tridimensional de células do cólon receptoras do tipo selvagem⁹². Além disso, os exossomos derivados do melanoma metastático são capazes de induzir fenótipo metastático em células receptoras de melanoma não-metastático⁹³. Exossomos derivados de células cancerígenas contêm moléculas bioativas que podem induzir disfunção de células receptoras, contribuir para silenciar respostas imunes antitumorais⁹⁴. 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^{90,94-96}. Esses achados fornecem informações interessantes sobre como as células tumorais podem se comunicar e promover a progressão do tumor através da transferência de proteínas oncogênicas⁹⁰. 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 câncer⁷³.

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 terapêutica⁹⁷. Na área da saúde existe uma diversidade de biomarcadores conhecidos: fisiológicos, bioquímicos, histológicos e anatômicos⁹⁸. Podem ser células específicas, DNA e RNA livres de células, peptídeos, proteínas, enzimas, metabólitos e hormônios⁹⁹. Entre esses, os mais relevantes são os biomarcadores bioquímicos, por causa da relativa facilidade em obtenção a partir de fluidos corporais¹⁰⁰. 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 biomarcadores⁹⁹.

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^{101,102}).

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 tratamento⁶³. 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 clínicos¹⁰³. 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 paciente¹⁰⁴. 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^{99,104}.

Atualmente, teoricamente apenas um biomarcador em exames de sangue é reconhecido pela FDA na identificação do câncer de pâncreas, o CA 19-9^{63,64}. 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^{105,106}, 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 antígeno⁷⁴. 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^{16,107}. 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 tratamento¹⁶. 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 pâncreas¹⁷. 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%¹⁰⁸.

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%⁸⁶. 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^{109–111}. 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^{112,113}. 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 biliar¹¹⁴. 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 câncer¹¹⁵.

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 câncer¹³¹. 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^{104,132}. 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 pâncreas¹³². 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 reprodutíveis¹³³. A necessidade da meta-análise da pesquisa é clara,

pois a literatura sobre infinitos tópicos está crescendo a um ritmo impressionante ¹³³. 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^{134,135}. 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 publicamente¹³⁶.

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 tiradas¹³⁷. 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-análise¹³⁸. 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 sistemática¹³⁹. 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^{138–140}. 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 investigação¹³⁷.

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)¹⁴¹, encorajou o desenvolvimento de métodos de meta-análise¹⁴². Baetke *et al.*¹⁴³, 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 glioblastoma¹⁴⁴. 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 prognósticas¹⁴⁵. 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 microarrays¹⁴⁵. Recentemente, uma meta-análise identificou reguladores-chaves da progressão do câncer de pâncreas integrando informações de RNAs mensageiros, microRNAs e perfil de metilação do DNA¹⁴⁶.

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-análise¹⁴⁷⁻¹⁴⁹. 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 específicas¹⁴⁷. 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.

2 Caracterização do problema

O câncer de pâncreas é um dos principais problemas de saúde e a sétima causa mais comum de morte relacionada ao câncer em todo o mundo, com estatísticas de sobrevivência relativamente inalteradas nos últimos anos^{2,22}. Diversos estudos têm se dedicado a elucidar a patogênese dessa doença, resultando na geração e publicação de um volume crescente de dados transcriptômicos e proteômicos. Embora o perfil molecular do câncer de pâncreas esteja em sua infância comparados com outros tipos, não há somente uma escassez de dados do câncer de pâncreas, mas também uma necessidade urgente de análise robusta e rigorosa dos dados existentes para estabelecer os resultados válidos e precisos^{131,150,151}. Dada a quantidade de dados gerados por experimentos de perfil proteico, a seleção de proteínas entre os diversos estudos do proteoma do câncer de pâncreas pode revelar painéis de proteínas com maior poder e robustez de informações sobre a doença. Além disso, uma meta-análise do secretoma baseada em dados proteômicos de linhagens celulares do câncer pancreático corresponde a uma eficiente estratégia que refina as principais proteínas do microambiente tumoral envolvidas no câncer de pâncreas, as quais podem auxiliar na identificação de biomarcadores da doença.

Desta forma, dada a amplitude de estudos que apresentam uma quantidade considerável de biomarcadores proteicos envolvidos em processos para instalação, progressão e manutenção do câncer, decidimos reunir informações de estudos do secretoma-proteoma tumoral pancreático disponíveis publicamente, a fim de identificar biomarcadores prognósticos do adenocarcinoma ductal pancreático. Para tanto, neste estudo, realizamos uma meta-análise integrando estudos proteômicos que avaliaram o proteoma tumoral do PDAC e o secretoma de linhagens celulares de câncer de pâncreas.

3 Hipótese

O perfil proteômico do secretoma de linhagens celulares e de amostras tumorais de adenocarcinoma pancreático obtidos por meio de meta-análise integrativa proteoma-secretoma pode revelar potenciais biomarcadores prognósticos de câncer pancreático.

4 Objetivos

4.1 Objetivo geral

Integrar o perfil proteômico de linhagens celulares e amostras tumorais de adenocarcinoma pancreático obtidos por meta-análise integrativa secretoma-proteoma para identificar potenciais biomarcadores de câncer pancreático.

4.2 Objetivos específicos

- Selecionar artigos científicos com análise proteômica em amostras de câncer pancreático;
- Identificar as proteínas do secretoma de linhagens de células tumorais do câncer pancreático nos artigos elegíveis;

- Identificar as proteínas das amostras tumorais de adenocarcinoma pancreático nos artigos elegíveis;

- Identificar proteínas que podem ser potencialmente utilizadas como biomarcadores do câncer de pâncreas;

- Determinar a relevância prognóstica do perfil de expressão gênica das proteínas secretadas (biomarcadores) na sobrevida de pacientes com PDAC.

5 Métodos

5.1 Integração de meta-análises do secretoma e do proteoma para identificação de proteínas do câncer pancreático

Utilizamos a integração de duas meta-análises para identificação de proteínas como potenciais biomarcadores do câncer pancreático: meta-análise do secretoma do câncer pancreático e meta-análise do proteoma de adenocarcinoma ductal pancreático. Dados de proteínas identificadas nesses estudos, publicados entre os anos 2005 a 2017, foram pesquisados usando o banco de dados eletrônico PubMed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>). O projeto de estudo de cada meta-análise seguiu os estágios da declaração PRISMA ¹³⁸.

5.1.1 Meta-análise do secretoma de câncer pancreático

Para a busca de estudos do secretoma do câncer pancreático utilizamos as seguintes palavras-chave: pancreatic cancer AND secretome, pancreatic cancer AND “cell secretome”, pancreatic cancer AND “cancer secretome”, pancreatic cancer AND “secretome analyzes”, pancreatic cancer AND “secretome proteomic”, pancreatic cancer AND “secretome proteomics”, pancreatic cancer AND “secretome profiling”, pancreatic cancer AND “secretome mass

spectrometry”, pancreatic cancer AND “microvesicles AND proteome“, pancreatic cancer AND “microvesicles AND proteomic“, pancreatic cancer AND “microvesicles AND proteomics“, pancreatic cancer AND “microvesicles AND protein profiling“, pancreatic cancer AND “microvesicles AND mass spectrometry“, pancreatic cancer AND “exosome AND proteome“, pancreatic cancer AND “exosome AND proteomic“, pancreatic cancer AND “exosome AND proteomics“, pancreatic cancer AND “exosome AND protein profiling“, pancreatic cancer AND “exosome AND mass spectrometry“, pancreatic cancer AND apoptotic bodies AND proteome, pancreatic cancer AND apoptotic bodies AND proteomic , pancreatic cancer AND apoptotic bodies AND proteomics , pancreatic cancer AND apoptotic bodies AND protein profiling, pancreatic cancer AND apoptotic bodies AND spectrometry , pancreatic cancer AND extracellular vesicles AND proteome, pancreatic cancer AND extracellular vesicles AND proteomic, pancreatic cancer AND extracellular vesicles AND proteomics, pancreatic cancer AND extracellular vesicles AND protein profiling, pancreatic cancer AND extracellular vesicles AND mass spectrometry, pancreatic cancer AND "secreted proteins" AND proteome, pancreatic cancer AND "secreted proteins" AND proteomic, pancreatic cancer AND "secreted proteins" AND proteomics, pancreatic cancer AND "secreted proteins" AND spectrometry mass, pancreatic cancer AND conditioned medium AND proteome, pancreatic cancer AND conditioned medium AND proteomic, pancreatic cancer AND conditioned medium AND proteomics, pancreatic cancer AND "conditioned medium AND protein profiling", pancreatic cancer AND conditioned medium AND spectrometry mass. pancreatic cancers AND secretome, pancreatic cancers AND “cell secretome”, pancreatic cancers AND “cancer secretome”, pancreatic cancers AND “secretome analyzes”, pancreatic cancers AND “secretome proteomic”, pancreatic cancers AND “secretome proteomic”, pancreatic cancers AND “secretome

proteomics", pancreatic cancers AND "secretome profiling", pancreatic cancers AND
 "secretome mass spectrometry", pancreatic cancers AND "microvesicles AND
 proteome", pancreatic cancers AND "microvesicles AND proteomic", pancreatic cancers
 AND "microvesicles AND proteomics", pancreatic cancers AND "microvesicles AND
 protein profiling", pancreatic cancers AND "microvesicles AND mass spectrometry",
 pancreatic cancers AND "exosome AND proteome", pancreatic cancers AND
 "exosome AND proteomic", pancreatic cancers AND "exosome AND proteomics",
 pancreatic cancers AND "exosome AND protein profiling", pancreatic cancers AND
 "exosome AND mass spectrometry", pancreatic cancers AND apoptotic bodies AND
 proteome, pancreatic cancers AND apoptotic bodies AND proteomic , pancreatic
 cancers AND apoptotic bodies AND proteomics , pancreatic cancers AND apoptotic
 bodies AND protein profiling, pancreatic cancers AND apoptotic bodies AND
 spectrometry, pancreatic cancers AND extracellular vesicles AND proteome, pancreatic
 cancers AND extracellular vesicles AND proteomic, pancreatic cancers AND
 extracellular vesicles AND proteomics, pancreatic cancers AND extracellular vesicles
 AND protein profiling, pancreatic cancers AND extracellular vesicles AND mass
 spectrometry. Pancreatic neoplasm AND secretome, pancreatic neoplasm AND "cell
 secretome", pancreatic neoplasm AND "cancer secretome", pancreatic neoplasm AND
 "secretome analyzes", pancreatic neoplasm AND "secretome proteomic", pancreatic
 neoplasm AND "secretome proteomic", pancreatic neoplasm AND "secretome
 proteomics", pancreatic neoplasm AND "secretome profiling", pancreatic neoplasm
 AND "secretome mass spectrometry", pancreatic neoplasm AND "microvesicles AND
 proteome", pancreatic neoplasm AND "microvesicles AND proteomic", pancreatic
 neoplasm AND "microvesicles AND proteomics", pancreatic neoplasm AND
 "microvesicles AND protein profiling", pancreatic neoplasm AND "microvesicles AND

mass spectrometry“,pancreatic neoplasm AND “exosome AND proteome“,pancreatic
 neoplasm AND “exosome AND proteomic“, pancreatic neoplasm AND “exosome
 AND proteomics“, pancreatic neoplasm AND “exosome AND protein profiling“,
 pancreatic neoplasm AND “exosome AND mass spectrometry“, pancreatic neoplasm
 AND apoptotic bodies AND proteome, pancreatic neoplasm AND apoptotic bodies
 AND proteomic, pancreatic neoplasm AND apoptotic bodies AND proteomics ,
 pancreatic neoplasm AND apoptotic bodies AND protein profiling, pancreatic neoplasm
 AND apoptotic bodies AND spectrometry, pancreatic neoplasm AND extracellular
 vesicles AND proteome, pancreatic neoplasm AND extracellular vesicles AND
 proteomic, pancreatic neoplasm AND extracellular vesicles AND proteomics, pancreatic
 neoplasm AND extracellular vesicles AND protein profiling, pancreatic neoplasm AND
 extracellular vesicles AND mass spectrometry, pancreatic neoplasm AND "secreted
 proteins" AND proteome, pancreatic neoplasm AND "secreted proteins" AND
 proteomic, pancreatic neoplasm AND "secreted proteins" AND proteomics, pancreatic
 neoplasm AND "secreted proteins" AND spectrometry mass, pancreatic neoplasm AND
 conditioned medium AND proteome, pancreatic neoplasm AND conditioned medium
 AND proteomic, pancreatic neoplasm AND conditioned medium AND proteomics,
 pancreatic neoplasm AND "conditioned medium AND protein profiling", pancreatic
 neoplasm AND conditioned medium AND spectrometry mass. pancreatic neoplasms
 AND secretome, pancreatic neoplasms AND “cell secretome”, pancreatic neoplasms
 AND “cancer secretome”, pancreatic neoplasms AND “secretome analyzes”, pancreatic
 neoplasms AND “secretome proteomic”, pancreatic neoplasms AND “secretome
 proteomic”, pancreatic neoplasms AND “secretome proteomics”, pancreatic neoplasms
 AND “secretome profiling”, pancreatic neoplasms AND “secretome mass
 spectrometry”, pancreatic neoplasms AND “microvesicles AND proteome“, pancreatic

neoplasms AND “microvesicles AND proteomic“, pancreatic neoplasms AND “microvesicles AND proteomics“, pancreatic neoplasms AND “microvesicles AND protein profiling“, pancreatic neoplasms AND “microvesicles AND mass spectrometry“, pancreatic neoplasms AND “exosome AND proteome“, pancreatic neoplasms AND “exosome AND proteomic“, pancreatic neoplasms AND “exosome AND proteomics“, pancreatic neoplasms AND “exosome AND protein profiling“, pancreatic neoplasms AND “exosome AND mass spectrometry“, pancreatic neoplasms AND apoptotic bodies AND proteome, pancreatic neoplasms AND apoptotic bodies AND proteomic, pancreatic neoplasms AND apoptotic bodies AND proteomics, pancreatic neoplasms AND apoptotic bodies AND protein profiling, pancreatic neoplasms AND apoptotic bodies AND spectrometry, pancreatic neoplasms AND extracellular vesicles AND proteome, pancreatic neoplasms AND extracellular vesicles AND proteomic, pancreatic neoplasms AND extracellular vesicles AND proteomics, pancreatic neoplasms AND extracellular vesicles AND protein profiling, pancreatic neoplasms AND extracellular vesicles AND mass spectrometry. pancreas cancer AND secretome, pancreas cancer AND “cell secretome“, pancreas cancer AND “cancer secretome“, pancreas cancer AND “secretome analyzes“, pancreas cancer AND “secretome proteomic“, pancreas cancer AND “secretome proteomic“, pancreas cancer AND “secretome proteomics“, pancreas cancer AND “secretome profiling“, pancreas cancer AND “secretome mass spectrometry“, pancreas cancer AND “microvesicles AND proteome“, pancreas cancer AND “microvesicles AND proteomic“, pancreas cancer AND “microvesicles AND proteomics“, pancreas cancer AND “microvesicles AND protein profiling“, pancreas cancer AND “microvesicles AND mass spectrometry“, pancreas cancer AND “exosome AND proteome“, pancreas cancer AND “exosome AND proteomic“, pancreas cancer AND “exosome AND proteomics“, pancreas cancer AND

“exosome AND protein profiling“, pancreas cancer AND “exosome AND mass spectrometry“, pancreas cancer AND apoptotic bodies AND proteome, pancreas cancer AND apoptotic bodies AND proteomic , pancreas cancer AND apoptotic bodies AND proteomics, pancreas cancer AND apoptotic bodies AND protein profiling, pancreas cancer AND apoptotic bodies AND spectrometry, pancreas cancer AND extracellular vesicles AND proteome, pancreas cancer AND extracellular vesicles AND proteomic, pancreas cancer AND extracellular vesicles AND proteomics, pancreas cancer AND extracellular vesicles AND protein profiling, pancreas cancer AND extracellular vesicles AND mass spectrometry, pancreas cancer AND "secreted proteins" AND proteome, pancreas cancer AND "secreted proteins" AND proteomic, pancreas cancer AND "secreted proteins" AND proteomics, pancreas cancer AND "secreted proteins" AND spectrometry mass, pancreas cancer AND conditioned medium AND proteome, pancreas cancer AND conditioned medium AND proteomic, pancreas cancer AND conditioned medium AND proteomics, pancreas cancer AND "conditioned medium AND protein profiling", pancreas cancer AND conditioned medium AND spectrometry mass. pancreatic neoplasms AND secretome, pancreatic neoplasms AND “cell secretome”, pancreatic neoplasms AND “cancer secretome”, pancreatic neoplasms AND “secretome analyzes”, pancreatic neoplasms AND “secretome proteomic”, pancreatic neoplasms AND “secretome proteomic”, pancreatic neoplasms AND “secretome proteomics”, pancreatic neoplasms AND “secretome profiling”, pancreatic neoplasms AND “secretome mass spectrometry”, pancreatic neoplasms AND “microvesicles AND proteome“, pancreatic neoplasms AND “microvesicles AND proteomic“, pancreatic neoplasms AND “microvesicles AND proteomics“, pancreatic neoplasms AND “microvesicles AND protein profiling“, pancreatic neoplasms AND “microvesicles AND mass spectrometry“, pancreatic neoplasms AND “exosome AND proteome“, pancreatic

neoplasms AND “exosome AND proteomic“, pancreatic neoplasms AND “exosome AND proteomics“, pancreatic neoplasms AND “exosome AND protein profiling“, pancreatic neoplasms AND “exosome AND mass spectrometry“, pancreatic neoplasms AND apoptotic bodies AND proteome, pancreatic neoplasms AND apoptotic bodies AND proteomic, pancreatic neoplasms AND apoptotic bodies AND proteomics, pancreatic neoplasms AND apoptotic bodies AND protein profiling, pancreatic neoplasms AND apoptotic bodies AND spectrometry, pancreatic neoplasms AND extracellular vesicles AND proteome, pancreatic neoplasms AND extracellular vesicles AND proteomic, pancreatic neoplasms AND extracellular vesicles AND proteomics, pancreatic neoplasms AND extracellular vesicles AND protein profiling, pancreatic neoplasms AND extracellular vesicles AND mass spectrometry, cancer of the pancreas AND secretome, cancer of the pancreas AND “cell secretome“, cancer of the pancreas AND “cancer secretome“, cancer of the pancreas AND “secretome analyzes“, cancer of the pancreas AND “secretome proteomic“, cancer of the pancreas AND “secretome proteomics“, cancer of the pancreas AND “secretome profiling“, cancer of the pancreas AND “secretome mass spectrometry“, pancreas cancer AND “microvesicles AND proteome“, cancer of the pancreas AND “microvesicles AND proteomic“, cancer of the pancreas AND “microvesicles AND proteomics“, cancer of the pancreas AND “microvesicles AND protein profiling“, cancer of the pancreas AND “microvesicles AND mass spectrometry“, cancer of the pancreas AND “exosome AND proteome“, cancer of the pancreas AND “exosome AND proteomic“, cancer of the pancreas AND “exosome AND proteomics“, cancer of the pancreas AND “exosome AND protein profiling“, cancer of the pancreas AND “exosome AND mass spectrometry“, cancer of the pancreas AND apoptotic bodies AND proteome, cancer of the pancreas AND apoptotic bodies AND proteomic, cancer of the pancreas

AND apoptotic bodies AND proteomics, cancer of the pancreas AND apoptotic bodies
 AND protein profiling, cancer of the pancreas AND apoptotic bodies AND spectrometry,
 cancer of the pancreas AND extracellular vesicles AND proteome, cancer of the pancreas
 AND extracellular vesicles AND proteomic, cancer of the pancreas AND extracellular
 vesicles AND proteomics, cancer of the pancreas AND extracellular vesicles AND
 protein profiling, cancer of the pancreas AND extracellular vesicles AND mass
 spectrometry, cancer of the pancreas AND "secreted proteins" AND proteome, cancer of
 the pancreas AND "secreted proteins" AND proteomic, cancer of the pancreas AND
 "secreted proteins" AND proteomics, cancer of the pancreas AND "secreted proteins"
 AND spectrometry mass, cancer of the pancreas AND conditioned medium AND
 proteome, cancer of the pancreas AND conditioned medium AND proteomic, cancer of
 the pancreas AND conditioned medium AND proteomics, cancer of the pancreas AND
 "conditioned medium AND protein profiling", cancer of the pancreas AND conditioned
 medium AND spectrometry mass. cancer of pancreas AND secretome, cancer of pancreas
 AND "cell secretome", cancer of pancreas AND "cancer secretome", cancer of pancreas
 AND "secretome analyzes", cancer of pancreas AND "secretome proteomic", cancer of
 pancreas AND "secretome proteomic", cancer of pancreas AND "secretome
 proteomics", cancer of pancreas AND "secretome profiling", cancer of pancreas AND
 "secretome mass spectrometry", cancer of pancreas AND "microvesicles AND
 proteome", cancer of pancreas AND "microvesicles AND proteomic", cancer of pancreas
 AND "microvesicles AND proteomics", cancer of pancreas AND "microvesicles AND
 protein profiling", cancer of pancreas AND "microvesicles AND mass spectrometry",
 cancer of pancreas AND "exosome AND proteome", cancer of pancreas AND "exosome
 AND proteomic", cancer of pancreas AND "exosome AND proteomics", cancer of
 pancreas AND "exosome AND protein profiling", cancer of pancreas AND "exosome

AND mass spectrometry“, cancer of pancreas AND apoptotic bodies AND proteome, cancer of pancreas AND apoptotic bodies AND proteomic, cancer of pancreas AND apoptotic bodies AND proteomics, cancer of pancreas AND apoptotic bodies AND protein profiling, cancer of pancreas AND apoptotic bodies AND spectrometry, cancer of pancreas AND extracellular vesicles AND proteome, cancer of pancreas AND extracellular vesicles AND proteomic, cancer of pancreas AND extracellular vesicles AND proteomics, cancer of pancreas AND extracellular vesicles AND protein profiling, cancer of pancreas AND extracellular vesicles AND mass spectrometry. Os critérios para inclusão no estudo dessa meta-análise foram estudos proteômicos em amostras de câncer de pâncreas (tecido tumoral ou sulco pancreático) ou em linhas celulares de câncer de pâncreas, apenas estudos de espectrometria de massa foram considerados e apenas dados com significância ($P < 0,05$) foram incluídos para a análise integrativa. Foram excluídos os estudos que: não satisfizessem os critérios mencionados acima; realizados em câncer não-pancreático, revisões, estudos com tratamentos prévios à análise proteômica, estudos sem análise proteômica, estudos *in silico*, estudos não publicados, e estudos publicados antes de 2005. Como essa análise revelou que a maioria dos estudos envolviam adenocarcinoma pancreático, realizamos a meta-análise do proteoma utilizando apenas esse tipo histológico.

5.1.2 Meta-análise do proteoma de adenocarcinoma ductal pancreático

Com o propósito de investigarmos proteínas de amostras humanas e como o adenocarcinoma ductal pancreático é o tipo histológico de câncer mais comum deste órgão, correspondendo até a 95% dos tipos histológicos frequentemente diagnosticados, limitamos nossas buscas a pacientes com este tipo de câncer. Para pesquisa de estudos do proteoma de adenocarcinoma ductal pancreático em humanos utilizamos as seguintes palavras-chave: “Pancreatic ductal adenocarcinoma” AND proteome, “pancreatic ductal

adenocarcinoma” AND proteomic, “pancreatic ductal adenocarcinoma” AND proteomics, “pancreatic ductal adenocarcinoma” AND “protein profiling”, “pancreatic ductal adenocarcinoma” AND mass spectrometry. Os seguintes critérios foram utilizados para inclusão dos estudos nesta meta-análise: estudos proteômicos em amostras de adenocarcinoma ductal pancreático humano, apenas estudos de espectrometria de massa foram considerados, estudos que incluíram tecidos normais para comparação (caso-controle) e apenas dados com significância ($P < 0,05$) foram incluídos para a análise integrativa. Foram excluídos os estudos que: não satisfizessem os critérios mencionados acima, estudos em cânceres não-adenocarcinoma ductal pancreático, revisões, estudos em modelos experimentais (ratos, camundongos, linhagens celulares), estudos com tratamentos prévios à análise proteômica, estudos sem análise proteômica, estudos sem caso-controle, estudos sem acesso completo, estudos *in silico*, protocolos, estudos não publicados, e estudos publicados antes de 2005.

5.2 Extração dos dados das meta-análises

Os estudos foram independentemente analisados, e os que atendiam aos critérios de inclusão foram selecionados. As seguintes informações foram extraídas de cada estudo: 1) detalhes do estudo: autores, ano de publicação, jornal científico, modelo experimental (linhagens celulares ou amostras humanas), técnica de espectrometria de massas utilizada, estratégias de validação; 2) medidas de resultado: as proteínas identificadas pelos estudos selecionados foram tabeladas para um arquivo do Microsoft Excel, mapeadas para o mesmo símbolo do gene e selecionadas as identificadas simultaneamente em dois ou mais estudos. As proteínas compartilhadas entre as duas meta-análises foram identificadas por diagrama de Venn (<http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/>).

5.3 Identificação de proteínas secretadas

Para confirmarmos se todas as proteínas identificadas em comum nas meta-análises (secretoma e proteoma) são secretadas, suas sequências de aminoácidos (arquivo FASTA) foram obtidas no banco de dados UniProtKB (<https://www.uniprot.org/>). Em seguida, as sequências de aminoácidos ou os símbolos de cada proteína foram utilizados para a predição de proteínas secretadas utilizando as ferramentas online SignalP 4.1, SecretomeP 2.0, TargetP 1.1, TMHMM v. 2.0, Vesiclepedia e Exocarta¹⁵²⁻¹⁵⁷. O servidor SignalP 4.1 selecionou proteínas secretadas por via clássica que possuem o peptídeo sinal e valor D acima de 0,45¹⁵². As proteínas preditas pertencentes à via não clássica de secreção, sem peptídeo sinal, foram selecionadas com auxílio da ferramenta SecretomeP e o ponto de corte utilizado foi o escore da rede neural (NN) > 0.6¹⁵³. Para designar se as proteínas secretadas estavam presentes em frações exossomais, foram utilizados os bancos de dados Vesiclepedia e Exocarta^{154,155}. Após estabelecimento das proteínas secretadas, pelas vias clássica ou não-clássica, ou por exossomos, essas proteínas foram confrontadas nos servidores TargetP, TMHMM e Plasma proteome¹⁵⁶⁻¹⁵⁸, para a exclusão das proteínas mitocondriais ou com hélices transmembranas e preditas conter no plasma, respectivamente.

5.4 Construção de rede de interação proteína-proteína e análise de ontologia

As proteínas identificadas como secretadas foram submetidas ao banco de dados STRING (*Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes*, versão 10.5; <https://string-db.org/>)¹⁵⁹ para a construção de uma rede de interação proteína-proteína e análise da ontologia dos componentes do secretoma do câncer de pâncreas. Para análise da ontologia, consideramos os top 15 termos com menor *False Discovery Rate (FDR)* e, para a construção das redes, foram utilizados os seguintes parâmetros:

1. *Meaning of network edges: confidence.*

2. *Active interaction sources: Experiments, database, co-expression, neighborhood, co-occurrence.*
3. *Minimum required interaction score: high confidence de 0.700.*
4. *Display simplifications: hide disconnected nodes in the network.*

5.5 Perfil de expressão gênica diferencial de transcritos traduzidos em proteínas secretadas no adenocarcinoma ductal pancreático

O perfil de transcrição dos genes que codificam proteínas identificadas em nossa meta-análise como secretadas no PDAC humano foi avaliado em 10 diferentes tipos de cânceres do banco de dados TCGA (*The Cancer Genome Atlas*)¹⁶⁰, e comparados com amostras normais dos bancos de dados TCGA e GTEx (*The Genotype-Tissue Expression*)¹⁶¹ (<http://www.gtexportal.org/>), após serem uniformemente processados e unificados por *Toil Pipeline*¹⁶² com a ferramenta baseada na web GEPIA (*Gene Expression Profiling Analysis*; <http://gepia.cancerpku.cn/>)¹⁶³. Genes diferencialmente expressos (DEGs) entre amostras tumorais e amostras normais foram determinados por ANOVA unidirecional, aplicando-se os pontos de corte estatísticos de $\log_2 \text{fold-change} > 1$ e $q\text{-value} < 0,01$. Esses genes diferencialmente expressos foram posteriormente filtrados para os genes que codificam proteínas preditas como secretadas obtidos do banco de dados HPA (*The Human Protein Atlas*; <https://www.proteinatlas.org/>)¹⁶⁴, para 10 tipos de câncer (*HNSC: Head and Neck squamous cell carcinoma*, *ESCA: Esophageal carcinoma*, *STAD: Stomach adenocarcinoma*, *LIHC: Liver hepatocellular carcinoma*, *LUAD: Lung adenocarcinoma*, *LUSC: Lung squamous cell carcinoma*, *COAD: Colon adenocarcinoma*, *LAML: Acute Myeloid Leukemia*, *BRCA: Breast invasive carcinoma*, *PAAD: Pancreatic adenocarcinoma*) e comparados com o conjunto de proteínas secretadas identificadas pela meta-análise. Os dados de expressão desse conjunto de proteínas foram submetidos para a ferramenta online Clustvis¹⁶⁵ (<https://biit.cs.ut.ee/clustvis/>), a qual permite visualizar o agrupamento de dados multivariados usando a análise de componentes principais (PCA) e *Heatmap*. O conjunto de dados do consórcio GTEx também foi utilizado para verificação do perfil de expressão das proteínas secretadas identificadas por meta-análise em tecidos normais¹⁶¹. Adicionalmente, as proteínas secretadas identificadas com aumento de expressão

transcricional em amostras tumorais do pâncreas pelo GEPIA foram submetidas no banco de dados HPA e investigadas quanto a detecção proteica por imunohistoquímica em amostras tumorais e normais.

5.6 Análises Banco de dados SurvExpress

Em nossa investigação, o banco de dados SurvExpress (<http://bioinformatica.mty.itesm.mx:8080/Biomatec/SurvivaX.jsp>) foi usado para obter dados de sobrevivência para PDAC, utilizando como entrada o conjunto de proteínas secretadas identificadas em nossa meta-análise. O SurvExpress é um banco de dados de expressão gênica e ferramenta de validação de biomarcadores online, com mais de 20 mil amostras e 130 conjuntos de dados disponíveis com informações clínicas. Esses dados podem fornecer uma avaliação de risco e análise de sobrevivência nos vários conjuntos de dados de câncer usando uma lista de genes biomarcadores como entrada¹⁶⁶. Os conjuntos de dados de pacientes com câncer de pâncreas PAAD-TCGA (*Pancreatic Adenocarcinoma/The Cancer Genome Atlas*, <http://firebrowse.org/>), PACA-AU – ICGC (*Pancreatic Cancer – Australia/International Cancer Genomic Consortium*, <https://dcc.icgc.org/>), GSE21501¹⁶⁷, GSE28735¹⁶⁸ e outros 9 tipos de câncer do conjunto de dados TCGA (*HNSC: Head and Neck squamous cell carcinoma, ESCA: Esophageal carcinoma, STAD: Stomach adenocarcinoma, LIHC: Liver hepatocellular carcinoma, LUAD: Lung adenocarcinoma, LUSC: Lung squamous cell carcinoma, COAD: Colon adenocarcinoma, LAML: Acute Myeloid Leukemia, BRCA: Breast invasive carcinoma*), foram utilizados para análise de sobrevida. As diferenças de sobrevivência entre os grupos de risco dos pacientes foram avaliadas usando um modelo de riscos proporcionais de Cox (*hazard ratio*), com um valor de P estimado através de um teste de *log-rank*¹⁶⁶.

6 Resultados

6.1 Integração de Meta-análise do Secretoma e Proteoma de câncer pancreático

De acordo com design de estudo das meta-análises e os critérios de inclusão e exclusão (Fig. 1 A e B), foram selecionados 20 estudos do secretoma e 35 estudos do proteoma, em câncer de pâncreas, que reportavam dados de proteínas obtidos por espectrometria de massas (Tabela 1 e 2)^{33,83,108,169–220}.

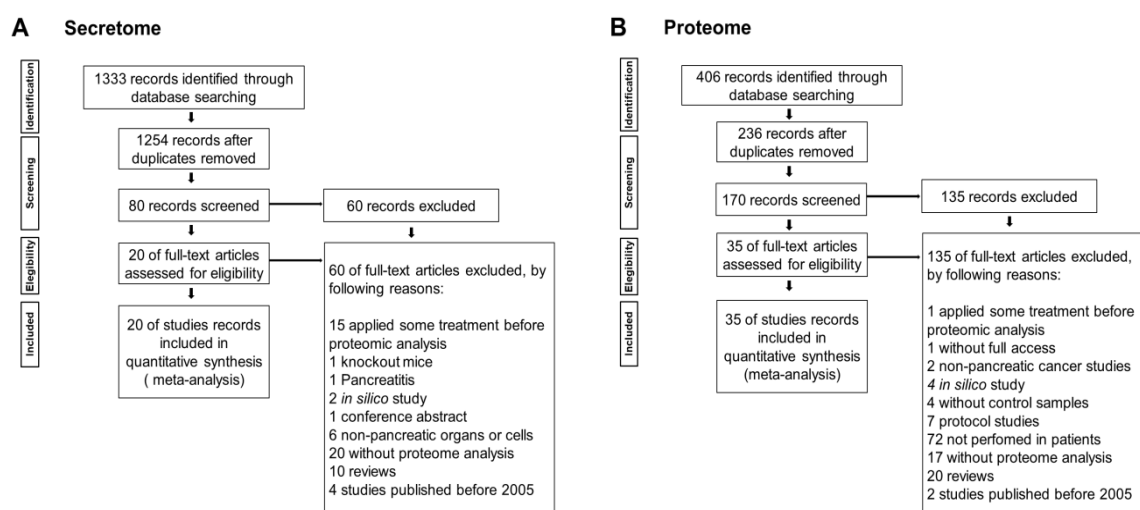


Figura 1. Fluxograma do secretoma (A) e proteoma (B) de meta-análises do câncer pancreático.

Tabela 1. Descrição de estudos proteômicos publicamente disponíveis utilizados na meta-análise do secretoma.

Ref.	Cell line /Tumor Tissue	Labelling	Technique	Validation Method
189	Panc1	Silac	LC-MS/MS	WB, IHC, MA
200	AsPC1, MiaPaCa2, Panc1	Free	LC-MS/MS	-
211	Panc1	iTRAQ	LC-MS/MS	WB, ELISA
217	Paca44, Panc1, BxPc3, MiaPaca2, HPSC, A818-4	Free	LC-MS/MS	-
218	BxPC-3, MIA PaCa-2, Panc1, AsPC-1	Free	LC-MS/MS	WB, IHC, ELISA
219	CAPAN-2, RLT-PSC	Silac	LC-MRM/MS	-
83	PC-1.0, PC-1 (Hamster)	Silac	Nano-HPLC-MS/MS	WB
220	BxPC3, MiaPaca2, Panc1	Free	ESI-MS/MS	WB

169	SOJ-6, BxPC-3, MiaPaCa-2, Panc-1	Free	MALDI-TOF MS	WB
170	PAN02 (Mouse)	Free	MS/MS	ELISA
171	NIT-1	Free	MS/MS	WB
172	Panc-1	Free	LC-MS/MS	-
173	MiaPaCa-2, BxPc-3, Panc-1, AsPc-1	Free	MALDI-TOF MS	WB
174	Adenocarcinoma tissue	Free	LC-MS/MS	WB
175	BON-1, NCI-H727, SHP-77	Free	LC-MS/MS	WB
33	BxPc3, MIA-PaCa2, Panc1, CAPAN1, CFPAC1, SU.86.86, HPDE, PJ	Free	LC-MS/MS	ELISA
176	KLM, PK-59, MIAPaCa2	Free	MS/MS	WB
177	Panc-1, SW1990	iTRAQ	LC-MS/MS	-
178	MIA PaCa-2	labeling	MALDI-TOF MS	WB
179	CAPAN-2	Silac	LC-MS/MS	IHC

Ref.: reference; Rodent cell lines are specified in parentheses; Silac: Stable isotope labeling with amino acids in cell culture; iTRAQ: Isobaric tags for relative and absolute quantitation; LC-MS/MS: Liquid chromatography tandem-mass spectrometry; LC-MRM/MS: Multiplexed liquid chromatography multiple-reaction-monitoring mass spectrometry; Nano-RPLC-MS/MS: Nanoscale liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry; ESI-MS/MS: Electrospray ionization mass spectrometry; MALDI-TOF MS: Laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry; MS/MS: Tandem mass spectrometry, PJ: Pancreatic juice; WB: Western Blot; IHC: Immunohistochemistry MA: Microarrays.

Tabela 2. Descrição dos estudos proteômicos humanos disponíveis publicamente utilizados na meta-análise do proteoma.

<i>Ref.</i>	<i>Sample</i>	<i>Labelling</i>	<i>Technique</i>	<i>Validation Method</i>
108	PTT	CD	nanoLC-ESI-MS/MS	IHC
180	PTT	CD	MALDI-TOF MS, nanoLC-ESI MS/MS	-
181	PTT	Free	MALDI-TOF/TOF MS, MS/MS	IHC
182	PTT	Free	MS/MS	WB
183	PTT	Free	MS/MS	WB, IHC
184	PTT	Free	LC-MS/MS	ELISA
185	PTT	Free	LC-MS/MS	ELISA
186	PTT	Free	MS/MS	-
187	PTT	Free	LC-MS/MS	IHC
188	PTT	Free	MALDI-TOF MS	ELISA
190	PTT	Free	LC-MS/MS	IHC
191	PTT	Free	MALDI-TOF MS	IHC, WB

192	PTT	CD	MALDI-TOF/TOF-MS	WB, IHC
193	PTT	Free	(MALDI-TOF MS)	WB
194	PTT	Free	MALDI-TOF/TOF-MS	-
195	PTT	Free	LC-MS/MS	IHC, WB
196	PTT	Free	LC-MS/MS	-
197	PTT	SI	LC-MS/MS	-
198	PTT	Free	LC-MS/MS	IHC, WB
199	PTT	LP	MS/MS	-
201	PTT	Free	LC-MS(MS) ²	-
202	PTT	Free	UHPLC/MS/MS2	-
203	Urine	CD	MALDI-TOF MS	IB
204	Serum	Free	MALDI-QIT-TOF-MS	
205	Serum	Free	(MRM)	WB
206	Serum	Free	MS/MS	-
207	Blood	Free	MALDI-MS	ELISA
208	Serum	CD	(MALDI-TOF/ TOF-MS	ELISA, WB
209	Serum	IL	LC-MS / MS	-
210	Urine	Free	LC/MS /MS.	-
212	Plasma	Free	LC-MS/MS.	ELISA, WB, IHC, RT-qPCR
213	PDF	Free	GeLC-MS/MS	-
214	Serum	Free	MALDI-TOF-MS	PCR, WB, IHC
215	PJ	Free	MALDI-TOF-MS MS/MS	WB, IHC, ELISA
216	Serum	Free	MALDI-TOF	WB

Ref.: Reference; PDF: Pancreatic duct fluid, PJ: Pancreatic juice; PTT: Pancreatic tumor tissue; SI: Stable Isotopic; IL: Isobaric Label; CD: CyDyes (Fluorescence Cyanine Dyes) ; LC-MS/MS: Liquid chromatography tandem-mass spectrometry; LC-MRM/MS: Multiplexed liquid chromatography multiple-reaction-monitoring mass spectrometry; Nano-RPLC-MS/MS: Nanoscale liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry; ESI-MS/MS: Electrospray ionization mass spectrometry; MALDI-TOF MS: Laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry; MS/MS: Tandem mass spectrometry; MRM: Multiple Reaction Monitoring; IHC: Immunohistochemistry; WB: Western Blot; IB: Immunoblotting.

Os dados proteicos apontados nos estudos incluídos nas quantitativas meta-análises (Secretoma e Proteoma) foram compilados resultando em uma lista de proteínas encontradas no secretoma de câncer de pâncreas e uma lista de proteínas encontradas em amostras de pacientes com adenocarcinoma ductal pancreático. Esses dados identificaram 782 proteínas únicas no secretoma de câncer pancreático e 517 proteínas únicas em amostras tumorais de adenocarcinoma ductal pancreático. Curiosamente, não

identificamos uma proteína presente em todos os estudos do secretoma, ou em todos os estudos do proteoma. Portanto, optamos por selecionar para nosso estudo as proteínas presentes em dois ou mais estudos (Tabela suplementar 1), gerando uma lista de 156 e 132 proteínas dos estudos de secretoma e proteoma, respectivamente (Fig.2 e Tabela suplementar 2 e 3). A intersecção entre as listas de proteínas do secretoma e proteoma revelou 43 proteínas em comum entre as duas estratégias de meta-análise (Fig. 2). Com o objetivo de averiguar se algumas proteínas pertencentes as 43 não seria proveniente de outros mecanismos como a morte celular realizamos análise de predição quanto à natureza de secreção. Entre as 43 proteínas verificadas por SignalP, SecretomeP, Exocarta, Vesiclepedia, TargetP e TMHMM, 3 proteínas (VIM, GAPDH, SOD2) foram preditas contendo sublocalização mitocondrial (TargetP) e uma (TGFB1) predita conter hélices transmembranares (TMHMM). As 4 proteínas foram eliminadas de nossa lista final, resultando em 39 proteínas secretadas e preditas conter no sangue pelo banco de dados Plasma Proteome (Fig.2, Tabela 3 e Tabela suplementar 4 e 5).

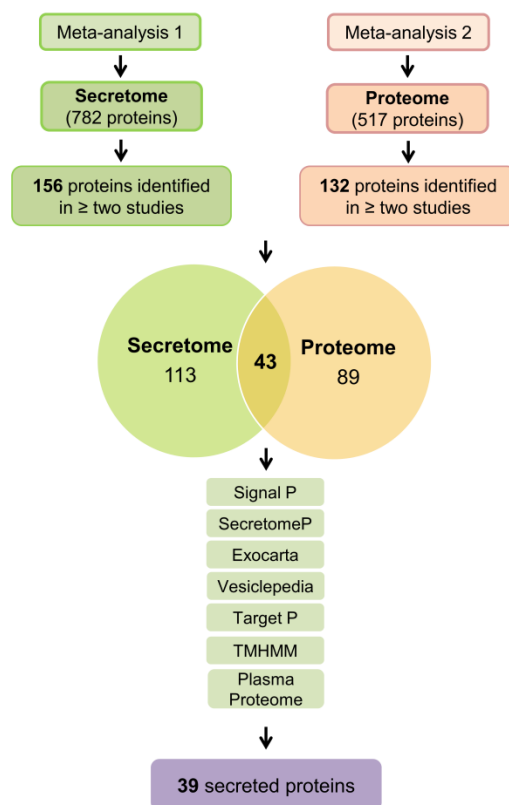


Figura 2. Representação esquemática do fluxo de trabalho para identificar proteínas secretadas em estudos proteômicos de câncer pancreático. Duas meta-análises de estudos proteômicos disponíveis publicamente foram utilizadas para identificação de possíveis proteínas biomarcadoras do câncer de pâncreas: Meta-análise 1 identificou 782 proteínas em estudos do secretoma do câncer de pâncreas e Meta-análise 2 identificou 517 proteínas em estudos do proteoma de adenocarcinoma ductal pancreático. Proteínas presentes em dois ou mais (≥ 2) estudos foram selecionadas; as identificadas em apenas um estudo foram eliminadas. Essa estratégia gerou consequentemente uma lista de 156 proteínas do secretoma (meta-análise 1) e uma lista de 132 proteínas do proteoma (meta-análise 2). A intersecção entre as listas de proteínas do secretoma e proteoma revelou 43 proteínas em comum entre as duas estratégias de meta-análise. As 43 proteínas compartilhadas foram verificadas quanto à natureza de secreção usando os servidores SignalP (via clássica, presença de peptídeo sinal); SecretomeP (via não clássica); Vesiclepedia e Exocarta (exossomos); TargetP (exclusão de proteínas mitocondriais); TMHMM (exclusão de proteínas com hélices transmembranares); Plasma Proteome (presença no sangue). A predição revelou 39 proteínas secretadas.

Tabela 3. Proteínas compartilhadas entre estudos do proteoma e do secretoma do câncer de pâncreas.

<i>Uniprot access</i>	<i>Gene Symbol</i>	<i>Description</i>
ALBU_HUMAN	ALB	Serum albumin
ENOA_HUMAN	ENO1	Alpha-enolase

FINC_HUMAN	FN1	Fibronectin
TRFE_HUMAN	TF	Serotransferrin
LEG1_HUMAN	LGALS1	Galectin-1
APOE_HUMAN	APOE	Apolipoprotein E
CATD_HUMAN	CTSD	Cathepsin D
TPIS_HUMAN	TPI1	Triosephosphate isomerase
GSTP1_HUMAN	GSTP1	Glutathione S-transferase P
PARK7_HUMAN	PARK7	Protein/nucleic acid deglycase DJ-1
TRY1_HUMAN	PRSS1	Trypsin-1
MOES_HUMAN	MSN	Moesin
PGK1_HUMAN	PGK1	Phosphoglycerate kinase 1
ANXA5_HUMAN	ANXA5	Annexin A5
PPIA_HUMAN	PPIA	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A
KPYM_HUMAN	PKM	Pyruvate kinase PKM
EF1A1_HUMAN	EEF1A1	Elongation factor 1-alpha 1
TSP1_HUMAN	THBS1	Thrombospondin-1
GELS_HUMAN	GSN	Gelsolin
LEG3_HUMAN	LGALS3	Galectin-3
TIMP1_HUMAN	TIMP1	Metalloproteinase inhibitor 1
COF1_HUMAN	CFL1	Cofilin-1
FLNA_HUMAN	FLNA	Filamin-A
LG3BP_HUMAN	LGALS3BP	Galectin-3-binding protein
CALR_HUMAN	CALR	Calreticulin
CLIC1_HUMAN	CLIC1	Nuclear chloride ion channel protein
TAGL2_HUMAN	TAGLN2	Transgelin-2
LDHA_HUMAN	LDHA	L-lactate dehydrogenase A chain
NDKA_HUMAN	NME1	Nucleoside diphosphate kinase A
TKT_HUMAN	TKT	Transketolase
1433S_HUMAN	SFN	14-3-3 protein sigma
ALDOA_HUMAN	ALDOA	Fructose-bisphosphate aldolase A
ENOG_HUMAN	ENO2	Gamma-enolase
PGAM1_HUMAN	PGAM1	Phosphoglycerate mutase 1
GDIR1_HUMAN	ARHGDIA	Rho GDP-dissociation inhibitor 1
ACTB_HUMAN	ACTB	Actin, cytoplasmic 1
PDIA1_HUMAN	P4HB	Protein disulfide-isomerase
ACTS_HUMAN	ACTA1	Actin, alpha 1, skeletal muscle
FETUA_HUMAN	AHSG	Alpha-2-HS-glycoprotein

6.2 Rede de interação proteína-proteína e análise de ontologia

Neste estudo, identificamos uma assinatura de 39 proteínas secretadas onde análise do STRING revelou uma rede de interação entre 26 proteínas com 4 clusters evidentes (Fig. 3).

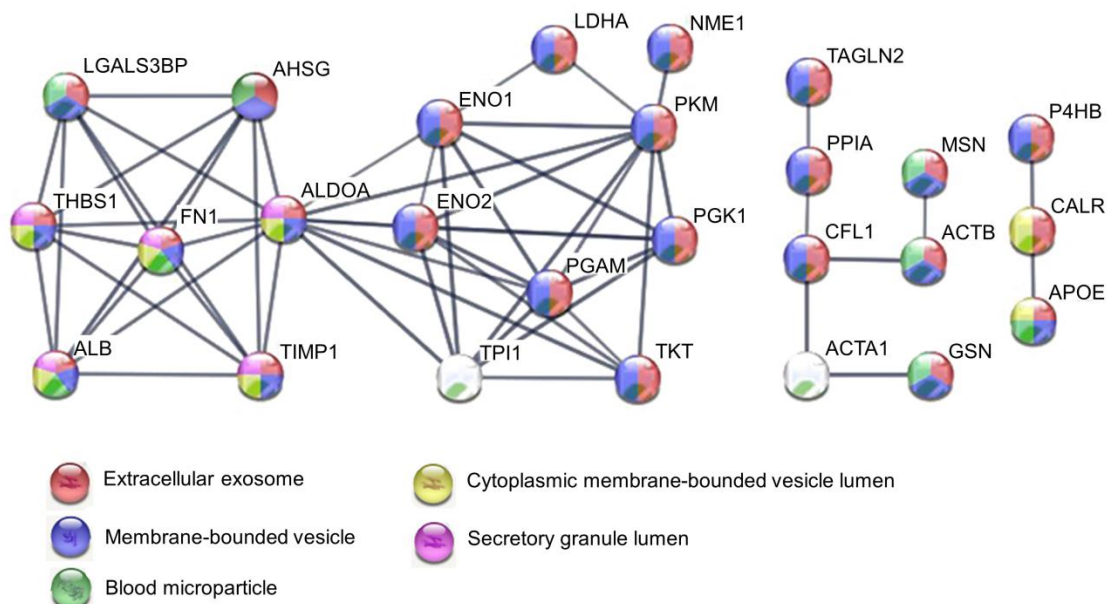


Figura 3. Rede de interação proteína-proteína de 39 proteínas secretadas enriquecidas no câncer pancreático. A análise de STRING (<http://www.string-db.org>) ilustra as numerosas interações possíveis entre as proteínas secretadas com pontuação de confiança mínima de 0,7. Na rede de associação de proteínas resultante, as proteínas são apresentadas como nós conectados por linhas das arestas cuja espessura refletem um índice maior de confiança (maior que 0,7). Os cinco principais termos Gene Ontology (GO) enriquecidos são representados pelos nódulos coloridos abaixo da rede e indicam as proteínas envolvidas em cada termo – red: extracellular exosome; blue: membrane-bounded vesicle; green: blood microparticle; yellow: cytoplasmic membrane-bounded vesicle lumen; purple: secretory granule lumen.

A análise ontológica das 39 proteínas demonstra que podem ser agrupadas em proteínas extracelulares, pois aparecem enriquecidas em exossomos extracelulares, vesículas limitadas por membrana, micropartículas sanguíneas, lúmen de vesícula limitado por membrana citoplasmática e *secretory granule lumen* (Tabela 4).

Tabela 4. Gene Ontology (GO) análise de enriquecimento de proteínas secretadas no câncer pancreático.

Cellular Component (GO)			
<i>Pathway ID</i>	<i>Pathway description</i>	<i>Gene Count</i>	<i>FDR</i>
GO.0070062	Extracellular exosome	35	1.29e-24
GO.0031988	Membrane-bounded vesicle	34	4.57e-20
GO.0005615	Extracellular space	25	1.79e-19
GO.0044421	Extracellular region part	31	3.35e-15
GO.0072562	Blood microparticle	11	1.15e-14
GO.0005576	Extracellular region	31	4.02e-13
GO.0060205	Cytoplasmic membrane-bounded vesicle lumen	8	4.29e-10
GO.0034774	Secretory granule lumen	6	2.35e-07
GO.0005925	Focal adhesion	9	1.88e-06
GO.0031093	Platelet alpha granule lumen	5	2.83e-06
GO.0031091	Platelet alpha granule	5	7.61e-06
GO.0044433	Cytoplasmic vesicle part	9	2.46e-05
GO.0005829	Cytosol	19	3.4e-05
GO.0030141	Secretory granule	7	7.44e-05
Biological Process (GO)			
<i>Pathway ID</i>	<i>Pathway description</i>	<i>Gene Count</i>	<i>FDR</i>
GO.0006165	Nucleoside diphosphate phosphorylation	9	1.99e-11
GO.0006096	Glycolytic process	8	3.4e-11
GO.0002576	Platelet degranulation	9	5.25e-11
GO.0061621	Canonical glycolysis	7	5.25e-11
GO.0019674	NAD metabolic process	8	8.75e-11
GO.0046496	Nicotinamide nucleotide metabolic process	8	1.47e-09
GO.0030168	Platelet activation	10	5.73e-09
GO.0046364	Monosaccharide biosynthetic process	7	5.73e-09
GO.0009611	Response to wounding	14	9.81e-09
GO.0006090	Pyruvate metabolic process	7	1.09e-08
GO.0042981	Regulation of apoptotic process	17	1.51e-08
GO.0042060	Wound healing	13	3.84e-08
GO.0006094	Gluconeogenesis	6	8.46e-08
GO.0016192	Vesicle-mediated transport	15	1.23e-07
GO.0006950	Response to stress	23	1.39e-07
Molecular Function (GO)			
<i>Pathway ID</i>	<i>Pathway description</i>	<i>Gene Count</i>	<i>FDR</i>
GO.0005515	Protein binding	24	0.000171
GO.0019899	Enzyme binding	12	0.00461
GO.0044822	Poly(A) RNA binding	11	0.0069
GO.0003723	RNA binding	12	0.0117
GO.0004634	Phosphopyruvate hydratase activity	2	0.0174

As proteínas secretadas aparecem associadas a processos biológicos em vias como glicólise (ALDOA, ENO1, ENO2, LDHA, PGAM1, PGK1, PKM, TPI1), transporte mediado por vesículas (ACTB, AHSG, ALB, ALDOA, APOE, CALR, CFL1, FN1, GSN, LGALS3BP, NME1, PPIA, TF, THBS1, TIMP1), resposta ao estresse (CTB, AHSG, ALB, ALDOA, ANXA5, APOE, CALR, CFL1, FLNA, FN1, GSN, GSTP1, LDHA, LGALS1, LGALS3, LGALS3BP, P4HB, PARK7, PKM, PPIA, SFN, THBS1, TIMP1) e regulação de processos apoptóticos (ALB, APOE, ARHGDIA, CALR, CFL1, FLNA, GSN, GSTP1, LDHA, LGALS1, LGALS3, NME1, P4HB, PARK7, SFN, THBS1, TIMP1).

6.3 Expressão gênica diferencial de transcritos traduzidos em proteínas secretadas no adenocarcinoma ductal pancreático

A análise do GEPIA revelou que a maioria das proteínas secretadas no adenocarcinoma ductal pancreático (PDAC) apresenta um aumento significativo da expressão dos seus genes. Para verificar os níveis de expressão gênica das proteínas encontradas em nossa meta-análise integrativa utilizamos a ferramenta online GEPIA para examinar o nível de expressão dos genes entre os tecidos normais e adenocarcinoma pancreático. A análise mostrou que, comparados com os normais, 31 genes aumentaram significativamente os níveis de expressão em tecidos de PDAC (Fig. 4). Curiosamente entre os transcritos regulados negativamente encontra-se a *PRSS1*, uma tripsina que tem sido relacionada ao câncer de pâncreas²²¹⁻²²³.

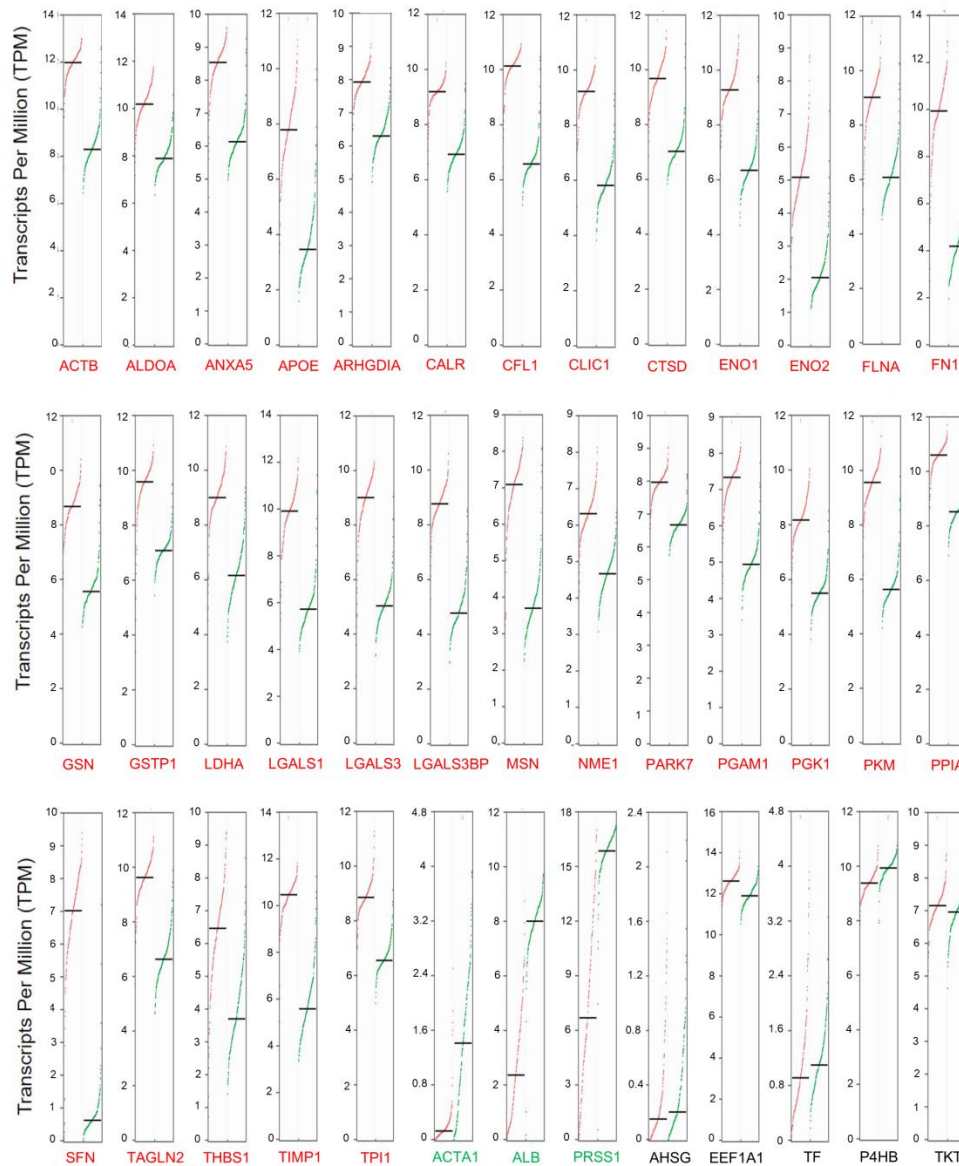


Figure 4. Expressão gênica diferencial de transcritos traduzidos em proteínas secretadas no adenocarcinoma ductal pancreático. Os níveis de expressão diferencial foram calculados usando a ferramenta baseada na web *Gene Expression Profiling Analysis* (GEPIA, <http://gepia.cancerpku.cn/>)¹⁶³. A análise do GEPIA revelou que a maioria das proteínas secretadas no adenocarcinoma pancreático ductal (PDAC) apresentam um aumento significativo da expressão dos seus genes. Os genes foram considerados como regulados positivamente ou negativamente no PDAC (n=179) em relação ao tecido normal (TCGA, n=4; GTEx, n=167) quando os valores absolutos de mudança na expressão (fold-change) foram > 1,0 e o valor de q < 0,01 (ANOVA), mostrados em vermelho e verde, respectivamente.

6.4 Perfil de expressão de genes do secretoma correlaciona-se fortemente com perfil do proteoma-secretoma em PDAC

Um total de 31 genes do secretoma, dos 39 identificados em nossa meta-análise integrativa, estão regulados positivamente no PDAC quando comparado com outros tipos de câncer do TCGA, comparados com amostras normais do TCGA e do GTEx. Inicialmente verificamos o perfil de expressão de nosso conjunto de proteínas em tecidos normais com auxílio do banco de dados GTEx, a intensidade de expressão mostrou que nossas proteínas estão uniformemente expressas nos tecidos verificados (Figura suplementar 1A), no entanto, o gene *PRSS1* (*Trypsin-1*) apresentou níveis de expressão maior no pâncreas normal. Em seguida, avaliamos o perfil de expressão gênica de nosso conjunto de 39 proteínas do secretoma em outros tipos de câncer, utilizando a ferramenta online GEPIA em 10 tipos de câncer (PAAD/PDAC, ESCA, STAD, HNSC, LUAD, LUSC, LIHC, COAD, LAML, BRCA) e seus respectivos tecidos normais. A análise confirmou que, mesmo quando comparado com outros tipos de câncer, nosso conjunto ainda se apresentam mais expressos no PDAC, com 31 genes regulados positivamente (Fig. 5). Os genes *ARHGDIA* e *PARK7* apresentaram aumento de expressão apenas no PDAC. O gene *NME1* apresentou aumento da expressão em 9 tipos de câncer.

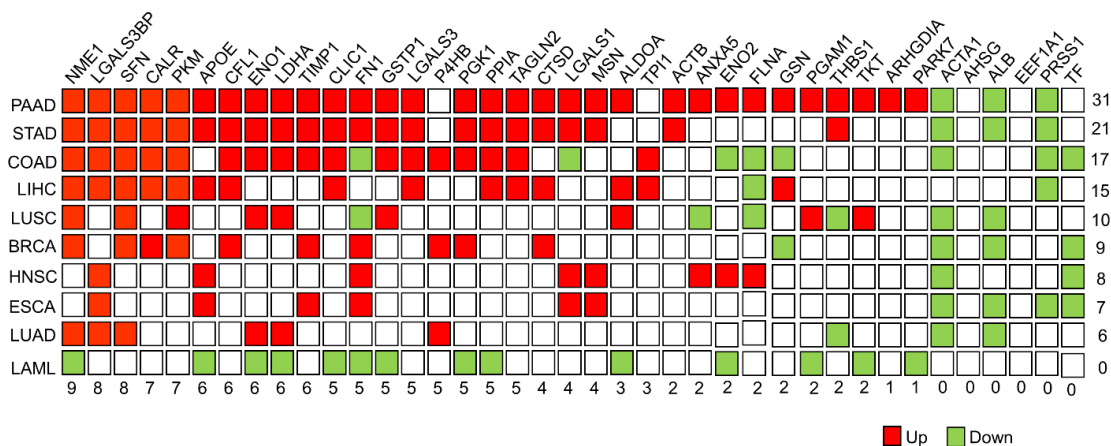


Figura 5. Os perfis de expressão de genes secretoma correlacionam-se fortemente com PDAC. Representação esquemática do padrão de expressão de 39 mRNAs traduzidos em proteínas identificadas como secretadas em diferentes tipos de tumor. Os níveis de expressão diferencial de tecidos tumorais versus dados TCGA e GTEx normais combinados foram calculados utilizando a ferramenta baseada na web Gene Expression Profiling Analysis (GEPIA, <http://gepia.cancerpku.cn/>)¹⁶³. Genes regulados positivamente ou negativamente com valores absolutos de mudança na expressão (fold-change) > 1,0 e valor de $q < 0,01$ (ANOVA) são mostrados em vermelho e verde, respectivamente.

Também avaliamos o perfil de expressão gênica das 39 proteínas secretadas obtido a partir de dados de amostras do TCGA e GTEx (Tabela suplementar 6, 7, 8) e filtrados pela lista de componentes do secretoma predita pelo *Human Protein Atlas* (HPA) (Tabela suplementar 9) para os 10 tipos de câncer. O *Heatmap* dessa análise mostrou que nosso conjunto de proteínas foi mais expresso no PDAC, corroborando com os dados do GEPIA (Figura suplementar 1B). Além disso, análise de Componentes Principais (PCA) mostrou que o perfil de expressão do nosso conjunto proteico foi capaz de separar significativamente grupos com PDAC e LAML (Figura suplementar 2).

6.5 Expressão gênica de 39 proteínas do secretoma podem prever a sobrevivência de pacientes com PDAC

As 39 proteínas secretadas identificadas em nossa meta-análise integrativa predizem pior prognóstico em estudos independentes de pacientes com PDAC. Para avaliar se nosso conjunto de proteínas eram capazes de discriminar sobrevida global de pacientes com PDAC, utilizamos a ferramenta online SurvExpress para análise de sobrevivência em conjuntos de dados independentes de pacientes com PDAC. Os resultados do SurvExpress para nossos biomarcadores propostos revelaram índice de concordância (CI) acima de 0,5. Valores de CI próximos a 0,5 são supostamente "aleatórios", enquanto valores mais altos estão associados a uma melhor previsão. Avaliamos o valor prognóstico das 39 proteínas secretadas e analisamos sua associação

com a sobrevida de pacientes com PDAC (análise de regressão de Cox) em quatro bancos de dados com informações de sobrevida do paciente (TCGA, ICGC, GSE21501, GSE28735). Os 39 transcritos traduzidos em proteínas secretadas avaliados inicialmente no conjunto de dados do TCGA identificaram pacientes com sobrevida significativamente menor (razão de risco ajustada (HR) = 5,36; log-rank p-valor = 1,16-16; índice de concordância (CI) = 74,75; N= 176). Para validar nossas descobertas, a análise de sobrevida foi realizada em outros três independentes conjuntos de dados. Os 39 genes do secretoma foi significativamente associada ao desfecho do paciente nos conjuntos de dados ICGC (HR = 4,42; CI = 72,57 P = 6,661-16, n = 189), GSE21501 (HR = 7,46; CI= 76,68 ; P = 2,144-10; n = 132) e GSE28735 (HR = 11,69; CI= 84,52; P = 2,22-15; n = 90) (Fig. 6). Isso mostra a estabilidade e a robustez de nosso conjunto de proteínas que demonstraram associação significativa com a sobrevida do paciente nos grupos de PDAC usados nessa análise.

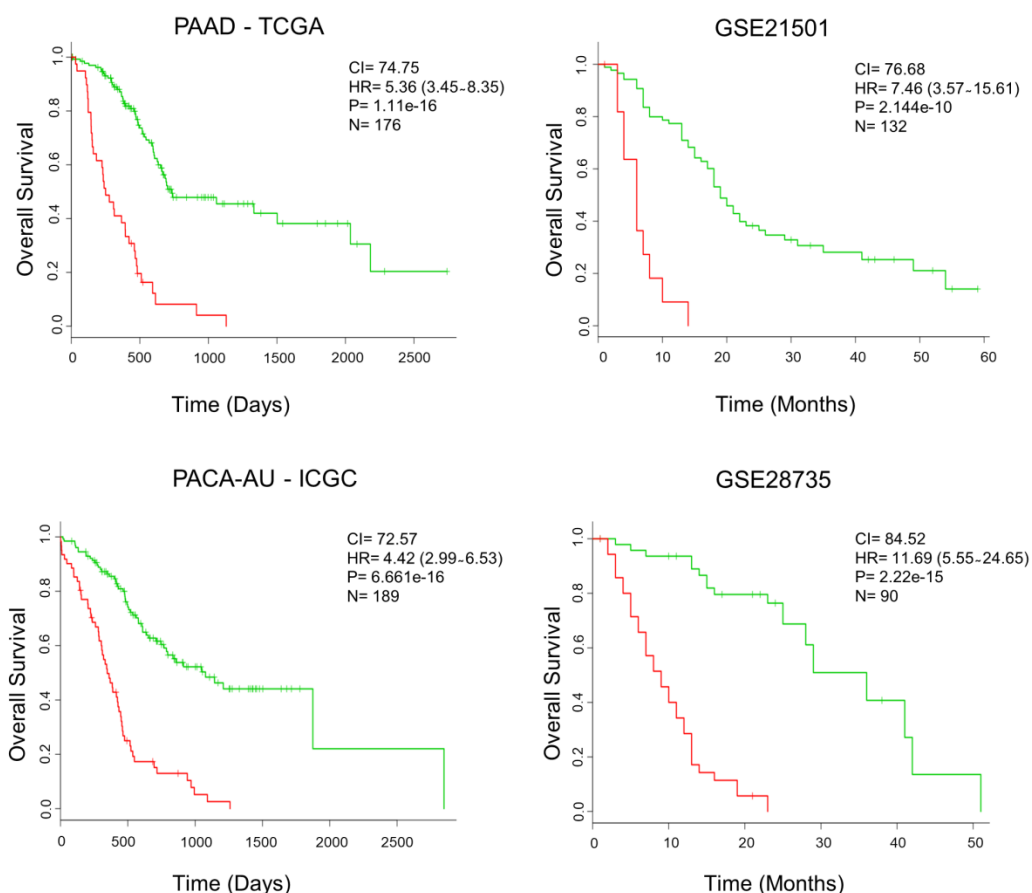


Figura 6. Expressão de genes secretoma prediz resultados de câncer em diferentes estudos de adenocarcinoma ductal pancreático. Análise de sobrevivência, baseada na expressão de 39 mRNAs traduzidos em proteínas identificadas como secretadas em PAAD/PDAC, calculada utilizando-se a plataforma online SurvExpress ²²⁴, em 4 diferentes conjuntos de dados. Os pacientes com câncer foram estratificados em grupos de alto (curva vermelho) e baixo (curva verde) riscos. A razão de risco ajustada (HR) com correspondente intervalo de confiança de 95%, log-rank p-valor (P), e o número de pacientes estratificados com sucesso (N) determinados por análise de regressão univariada de Cox são mostrados em cada curva de sobrevida de Kaplan-Meier. Índice de Concordância (CI).

6.6 A expressão de genes secretoma prediz resultados de câncer em diferentes estudos de câncer

O conjunto de proteínas secretadas prediz pior sobrevida em 9 tipos de câncer, além de PDAC. Como muitos de nossos genes secretoma apareceram aumentados em outros tipos de câncer, decidimos avaliar o valor prognóstico das 39 proteínas secretadas em 9 neoplasias malignas com informações de sobrevida do paciente no conjunto de

dados do TCGA (HNSC, ESCA, STAD, LIHC, LUAD, LUSC, COAD, BRCA, LAML). Os 39 genes do secretoma identificados em nossa meta-análise foram significativamente associada ao desfecho do paciente com HNSC, ESCA, STAD, LIHC, LUAD, LUSC, COAD, BRCA, LAML apresentando valores de HR >3, log-rank p-valor <0,00001 e CI>65, demonstrando que o nosso conjunto de proteínas secretadas possui capacidade eficiente em prever pior prognóstico de pacientes com esses tipos de cânceres (Fig. 07). O *heatmap* para esse conjunto de cânceres, incluindo o PDAC, revela que nosso conjunto de proteínas são enriquecidas em pacientes com pior sobrevida (Figura suplementar 3). Esses dados comprova a estabilidade e a robustez de nosso conjunto de proteínas que demonstraram associação significativa com a sobrevida dos pacientes nos diferentes tipos de canceres usados nessa análise.

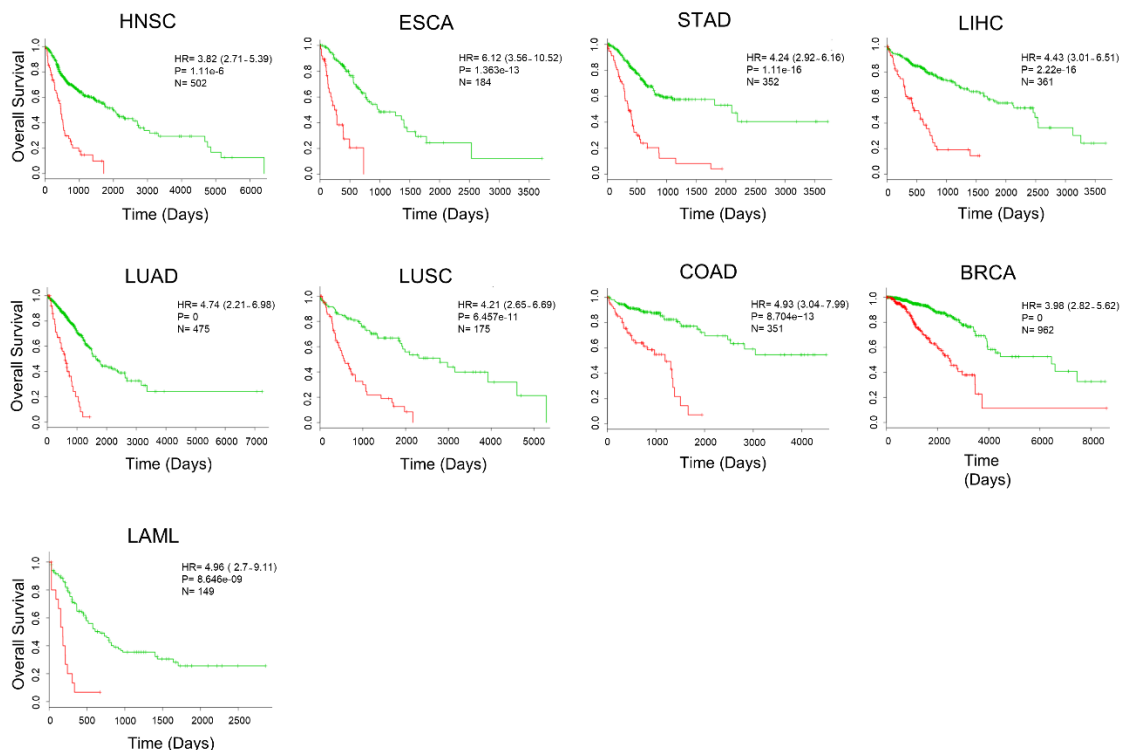


Figura 7. Expressão de genes secretoma prediz resultados de câncer em diferentes estudos de câncer. Análise de sobrevivência, baseada na expressão de 39 mRNAs traduzidos em proteínas identificadas como secretadas em PDAC, calculada utilizando-se a plataforma online SurvExpress²²⁴, em nove diferentes conjuntos de dados. Os

pacientes com câncer foram estratificados em grupos de alto (curva vermelho) e baixo (curva verde) riscos. A razão de risco ajustada (HR) com correspondente intervalo de confiança de 95%, log-rank p-valor (P), e o número de pacientes estratificados com sucesso (N) determinados por análise de regressão univariada de Cox são mostrados em cada curva de sobrevida de Kaplan-Meier.

6.7 Comparação com assinaturas gênicas prognósticas de PDAC

Várias assinaturas gênicas prognósticas para o PDAC foram propostas^{145,167,222,225–230}. Entretanto, ao verificarmos a sobreposição do nosso conjunto de proteínas secretadas com essas assinaturas não encontramos nenhum gene/proteína em comum. Verificamos ainda o desempenho das 9 assinaturas em prever pior sobrevida no SurvExpress. Os resultados mostram que as assinaturas são capazes de separar grupos de risco caracterizados por diferenças na expressão gênica entre eles (dados não mostrados). Dessa forma, para avaliar qual assinatura seria o melhor conjunto de biomarcadores, testamos as 9 assinaturas, nos diferentes conjuntos de dados presentes no SurvExpress e verificamos o valor p da separação do grupo de risco (tamanho dos círculos) e o índice de concordância (cor dos círculos) (Fig. 8). Os resultados mostram que assinatura de Collinsson *et al.*¹⁴⁵ e Donahue *et al.*²²⁶ em comparação com as 39 proteínas secretadas foram ligeiramente melhores, sendo que a assinatura de Donahue diminui seu desempenho em um conjunto de dados. Nossa assinatura ainda apresentou resultado muito semelhante ao de Haider *et al.*,¹⁴⁵. Entretanto, não podemos deixar de enfatizar o fato de que apenas nosso conjunto compreende proteínas que são expressas e secretadas no câncer de pâncreas.

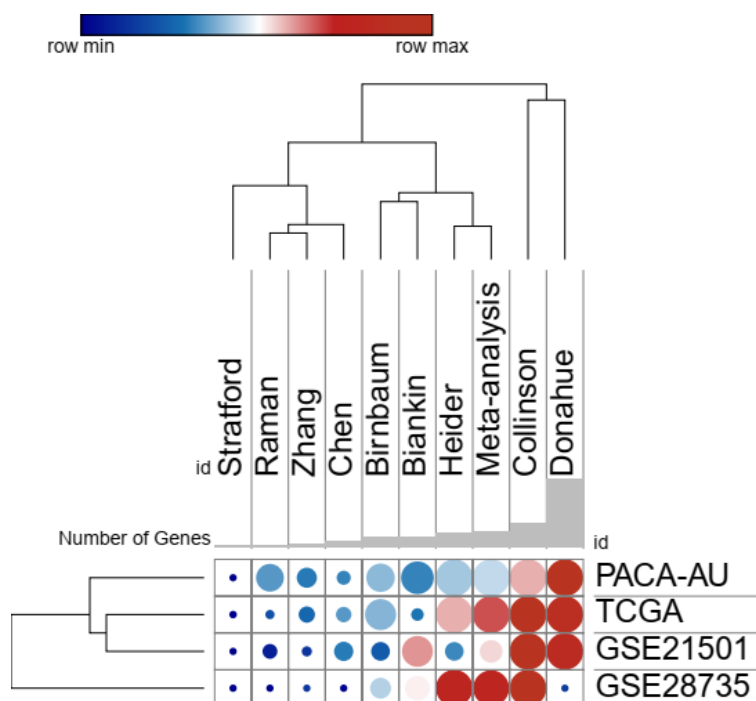


Figura 8. Desempenho de 39 proteínas secretadas como biomarcador em comparação com 9 assinaturas genéticas propostas para o câncer de pâncreas. Um gráfico de dispersão de calor apresentando os resultados das 9 assinaturas gênicas e as 39 proteínas secretadas para câncer de pâncreas em diferentes conjuntos de dados no SurvExpress. A cor dos círculos corresponde ao índice de concordância, enquanto o tamanho do círculo é baseado no valor p da separação do grupo de risco. Linhas e colunas foram agrupados com base na distância euclidiana entre os valores do índice de concordância.

6.8 Validação *in silico* das proteínas secretadas

A coloração imuno-histoquímica para 31 proteínas identificadas com expressão transcricional aumentada em amostras tumorais de PAAD pelo GEPIA foi recuperada do banco de dados HPA. As imagens imuno-histoquímicas foram analisadas e 11 proteínas, como LDHA, PGK1, PKM, SFN, FN1, LGALS1, mostraram imunocoloração média ou alta no tecido do tumor PAAD, enquanto baixas ou não detectadas no tecido pancreático normal, mostrando marcadores potencialmente baseados em biópsia para a triagem de pacientes com DAAP com alto risco (Fig. 9 e Figura Suplementar 4). Além disso, quatro proteínas (TPI1, LGALS3, LGALS3BP, FLNA) apresentaram imunocoloração média em tecido normal e alta em tecido tumoral (Figura Suplementar 4).

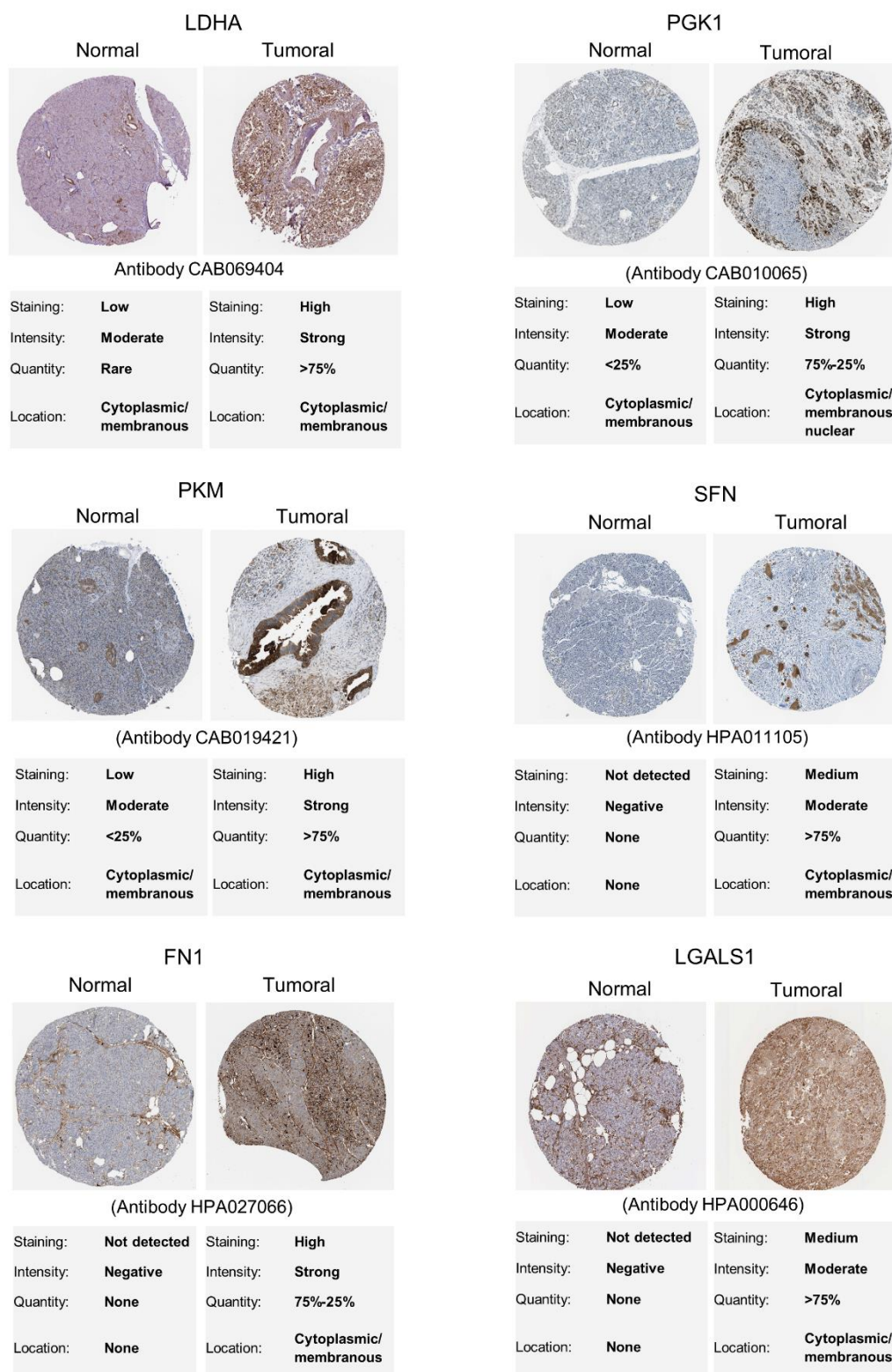


Figura 9. Validação da expressão de proteína secretada em tecidos normais e PDAC usando coloração imuno-histoquímica disponível no banco de dados do *Human Protein Atlas* (<https://www.proteinatlas.org/>). Essas proteínas foram selecionadas com base no aumento significativo da expressão gênica, conforme identificado a ferramenta GEPIA (<http://gepia.cancerpku.cn/>).

7 Discussão

Nos últimos anos, várias pesquisas se concentraram na investigação do secretoma-proteoma do câncer pancreático a fim de identificar mecanismos moleculares e biomarcadores dessa malignidade. Entretanto, a complexidade molecular do câncer de pâncreas e o insucesso da maioria dos biomarcadores propostos aumentam a urgência de efetivas estratégias para identificação de biomarcadores promissores. A heterogeneidade das pesquisas proteômicas do câncer de pâncreas com uso de diferentes amostras, técnicas de fracionamento e de espectrometria de massas geram diferentes conjuntos de dados que necessitam ser integrados e comparados. A presente meta-análise permitiu selecionar proteínas de diferentes conjuntos de dados de estudos proteômicos do câncer de pâncreas. A integração do perfil proteômico das linhagens celulares e tumores do adenocarcinoma pancreático obtido por meta-análise do secretoma-proteoma identificou 39 proteínas secretadas biologicamente relevantes. O perfil de expressão gênica dessas proteínas prevê pior sobrevida global em quatro grupos independentes de pacientes com adenocarcinoma pancreático, demonstrando robustez de resultados em plataformas clínicas. A expressão desregulada destas proteínas previu ainda uma pior sobrevida global em 9 diferentes tipos de tumores a partir dos conjuntos de dados de câncer humano TCGA. Nossa abordagem de meta-análise de diferentes conjuntos de dados proteômicos ofereceu maior poder estatístico para abordar a heterogeneidade biológica do PDAC, bem como a sobrevida global dos pacientes. Essa estratégia permitiu discriminar um painel de proteínas identificadas em estudos proteômicos do PDAC e investigar possíveis biomarcadores prognósticos.

Nossa abordagem também demonstrou a falta de sobreposição entre os estudos selecionados pelas duas estratégias de meta-análise, não encontramos nenhuma proteína

em comum entre todos os estudos do secretoma e entre todos os estudos do proteoma. Isso pode ser devido a diversidade de técnicas proteômicas utilizadas pelos diferentes estudos ou a limitações em análise proteômica relacionadas a preparação e heterogeneidade de amostra, complexidade do proteoma a ser analisado, principalmente em relação aos níveis de expressão proteica e limitações dos métodos analíticos ^{69,231–233}. Aplicamos como estratégia para este problema a seleção de proteínas presente em dois ou mais estudos para aumentar nossa precisão de proteínas envolvidas com câncer de pâncreas, e integramos meta-análise do secretoma e proteoma que permitiu selecionar proteínas tumorais que são secretadas e encontradas circulantes. Quando comparamos nossa lista de proteínas do secretoma com assinaturas gênicas do adenocarcinoma pancreático também não encontramos sobreposição entre esses estudos ^{145,167,222,225–230}. Isso pode ser devido aos níveis globais de transcrição gênica refletirem de modo insuficiente os níveis globais de proteínas ou às limitações relacionadas com as técnicas de proteômica, o que aponta a necessidade de integrar análises transcriptômicas e proteômicas que possam refletir as alterações moleculares do câncer em sua essência. ^{69,131,231,234,235}.

Encontramos um conjunto de proteínas diferencialmente expressas com poder prognóstico e que possuem importância biológica no câncer. A albumina (ALB), por exemplo, encontrada em 10 estudos do proteoma e 3 do secretoma foi identificada como um fator de mal prognóstico em pacientes com câncer ^{236,237}. A ALB sérica é a proteína sanguínea mais abundante nos mamíferos, no entanto, em condições de doença como o PDAC, seu nível reduzido geralmente significa um estágio relativamente avançado da doença ²³⁷. Além disso, a redução dos níveis séricos da ALB aumenta o risco de ocorrência de tromboembolismo venoso, esta condição é a segunda principal causa de mortes em pacientes com câncer de pâncreas ^{236,238,239}. A Triosefosfato Isomerase 1

(TPI1), encontrada em 7 estudos do secretoma e 4 do proteoma, é uma enzima crucial no metabolismo de carboidratos. Análise proteômica de soros de um grupo independente de pacientes com câncer pancreático mostrou a TPI1 como uma das proteínas mais abundantes em pacientes com baixa sobrevida antes e após quimioterapia, e que poderia ser melhor investigada como um marcador prognóstico, uma vez que seu nível é gradualmente aumentado à medida que a doença se agrava ²⁴⁰. O valor prognóstico TPI1 também foi avaliado no câncer gástrico, os pacientes com maior expressão TPI1 apresentaram menor sobrevida global do que aqueles com expressão mais baixa ou negativa ²⁴¹. A alfa-enolase (ENO1), uma proteína também identificada em nossa integrativa meta-análise do câncer pancreático, é uma enzima glicolítica envolvida na síntese do piruvato encontrada no citoplasma, superfície celular e núcleo ²⁴². Além de sua função glicolítica, a ENO1 desempenha um papel crucial na invasão e metástase de células cancerígenas, em parte por também atuar como um receptor de plasminogênio ^{243–247}. Essa função de receptor de plasminogênio da ENO1, aliada a sua alta expressão na superfície celular de células tumorais, facilita a ligação de grandes quantidades de plasminogênio na superfície celular, o que permite ativar a plasmina e aumentar a capacidade das células de PDAC de degradar a matriz extracelular e assim beneficiar os processos de invasão tumoral ²⁴⁴. Além desse mecanismo, ENO1 regula a adesão, invasão e metástase do câncer pancreático por controlar a expressão da integrina alfa v/beta 3 ²⁴⁵. A sinalização da integrina alfa v/beta 3 é conhecida por desempenhar papel fundamental no crescimento do tumor, angiogênese e metástase. Além de ser alvo de experimentos pré-clínicos na prevenção e/ou tratamento de câncer, demonstrando resultados anti-angiogênicos e antitumorais positivos ^{248,249}. No entanto, esses efeitos foram observados para ENO1 de superfície celular, outros estudos devem ser realizados para investigar melhor o papel da ENO1 secretado na biologia tumoral. Entretanto, estudo realizado por

Yin *et al* ²⁵⁰, com coloração de imuno-histoquímica em amostras de tecido tumoral de pacientes com PDAC mostrou que o nível de expressão de ENO1 foi maior no núcleo e no citoplasma e mais fraco na membrana. Este estudo ainda mostrou que a expressão de ENO1 foi significativamente aumentada em tecidos e plasma de pacientes de PDAC, e que a maior concentração plasmática de ENO1 em pacientes está fortemente relacionado com menor sobrevida, resultado que apoia nossos achados. Além do PDAC, ENO1 também foi visto como um potencial biomarcador prognóstico no câncer de mama, cabeça e pescoço e glioma ^{242,251,252}.

Nossa análise de enriquecimento também mostrou alteração na regulação de processos glicolíticos. O aumento da glicólise aeróbica (Efeito Warburg) é observado exclusivamente em cânceres e depende profundamente de enzimas metabólicas desreguladas ²⁵³. Além das enzimas glicolíticas ENO1 e TPI1, a lactato desidrogenase A (LDHA) também foi identificada em nosso estudo e corresponde a uma enzima central na regulação do efeito Warburg; ela catalisa a conversão do piruvato em lactato na etapa final da glicólise aeróbica e está desregulada em vários tipos de câncer ^{254,255}. No câncer gástrico, a LDHA foi regulada positivamente nos tecidos cancerígenos e promoveu migração e invasão em células tumorais ²⁵⁴. Além disso, o LDHA foi relatado para melhorar o crescimento e inibir a apoptose em células tumorais pancreática ²⁵⁵. Mohammad *et al* ²⁵⁶, mostrou que o aumento da expressão da LDHA e PKM2 em amostras de biópsia pancreática de pacientes correlaciona com pior sobrevida comparados com os que tiveram menor expressão. O nível sérico da LDHA também foi avaliado como fator prognósticos no estudo de Yu *et al* ²⁵⁷, essa investigação mostrou que a elevação da concentração sérica da LDH previa pior sobrevida em pacientes com PDAC e estavam associados à resposta inflamatória sistêmica. Curiosamente, estudos que investigaram os níveis de expressão tumoral e sérica da LDHA, viram que alta expressão

no tecido não é completamente consistente com alto níveis séricos, indicando que a expressão de LDHA do tumor e os níveis séricos são dois preditores independentes de tumores ²⁵⁸. No entanto, em nossa análise a LDHA foi identificada em 6 estudos do secretoma e apenas 2 do proteoma, o que sugere que essa enzima pode ser secretada para exercer suas funções em tecidos distantes do foco primário tumoral, exacerbando os mecanismos tumorais. Além de seu papel prognóstico, mais estudos verificando o significado biológico dos níveis séricos da LDHA necessitam ser realizados. Portanto, a alta expressão de enzimas glicolíticas aliadas as suas funções canônicas e não canônicas podem explicar, em parte a agressividade de cânceres, como o de pâncreas, influenciar diferentes desfechos prognósticos e ter papel fundamental na definição de tratamentos personalizados ^{240,259}.

A nucleosídeo difosfato quinase A (NME1/NDPK-A) é um supressor tumoral que em nossas análises foi identificado com expressão aumentada em diferentes conjuntos de dados de PDAC e outros cânceres. O aumento de sua expressão pode estar ligado a mecanismos anticancerígenos, pois exibe função anti-metastática ²⁶⁰. Vários estudos sustentam nossos achados, mostrando que NME1 é altamente expresso em amostras de câncer de pâncreas e prevê pior prognóstico nos pacientes ^{261–263}. No entanto, em controvérsia com nossos resultados, Liu *et al.* ²⁶⁴, avaliou o valor prognóstico da NME1, por meta-análise, e concluíram que a regulação negativa de NME1 foi associada com um mau prognóstico no câncer de mama, esofágico, nasofaringe e linfoma. A regulação negativa e pior prognóstico do NME1 também foi visto no câncer de cólon ²⁶⁵. Maiores investigações para esclarecer a controvérsia entre a expressão de NME1 no câncer necessitam ser realizadas com o objetivo de entender pontualmente a relação da expressão com características clinicopatológicas em tumores malignos.

A capacidade de resistência quimioterápica do câncer de pâncreas é uma das características que o tornam tão agressivo, com prognóstico ruim e insucesso clínico. Dentre nosso conjunto de proteínas encontra-se a Galectin-1 (LGALS1), uma proteína de ligação ao glicano que é altamente expressa no estroma do PDAC e é uma das principais responsáveis pela progressão do câncer de pâncreas ²⁶⁶. O aumento da expressão de LGALS1 em células de cânceres como de pulmão, fígado, ovário, glioblastoma e linfoma foi vista para conferir resistência a drogas como temozolomide, sorafenib, rituximabe e cisplatina ^{267–274}. Além da LGALS1, outras proteínas com expressão aumentada em cânceres como LGALS3, PPIA, ENO1, LDHA, PARK7, CTSD também conferem resistência a quimioterápicos ^{275–283}. Essas proteínas utilizam vias como PI3K/AKT e AKT/NFkB para inibir processos apoptóticos e promover a sobrevivência em células cancerígenas ^{267,271,276,277,284,285}. Nossos resultados sugerem que o aumento da expressão das proteínas secretadas identificadas em nossa integrativa meta-análise provavelmente também estejam envolvidas em processos de resistência a quimioterápicos que contribuem para progressão cancerígena e letalidade do câncer de pâncreas.

Foi interessante notar que diferentes tipos de câncer compartilhavam muitas das proteínas identificadas no secretoma-proteoma do PDAC, indicando que ao menos em parte os tumores compartilham programas para promover a oncogênese e a progressão do câncer. Alguns estudos sugerem que o câncer seja categorizado pelo padrão de expressão de proteínas e não pelo tecido de origem, visto que similaridades na secreção são compartilhados entre tumores originários de diferentes tecidos ^{251,286}. Uma explicação para essas similaridades é proposta no estudo de Robinson *et al* ²⁸⁶, onde mostra um mecanismo potencial pelo qual as células cancerígenas aliviam o estresse secretório, diminuindo a expressão de genes específicos do tecido, facilitando a secreção de proteínas

que promovem a invasão e a proliferação. Essa observação vai de acordo com nossos achados, entre nossas 39 proteínas identificadas apenas uma é específica do pâncreas.

Nossa principal contribuição com essa estratégia consiste na seleção de proteínas identificadas em análises proteômicas do câncer de pâncreas que estratifica pacientes com baixa e alta sobrevida. No entanto, nosso estudo apresenta algumas limitações como a reutilização de dados proteômicos de diferentes estudos, utilização de proteínas presentes apenas no corpo dos estudos, não se estendendo aos dados suplementares e análises *in silico*. Muitas das observações realizadas nesse estudo basearam-se em funções investigadas a nível de expressão celular, o porquê dessas proteínas serem secretadas devem ser melhor estudado, esclarecendo se são secretadas para exercerem as mesmas funções de maneira autócrina ou parácrina, ou se realizam funções diferentes. Maiores investigações são necessárias para identificar as vias moleculares e contribuições das alterações dessas proteínas na patologia clínica do câncer de pâncreas.

É importante ressaltar que a subtipagem molecular do câncer de pâncreas está em sua infância e permanece sem subtipos moleculares clinicamente relevantes ¹⁵¹. Apesar da extensa caracterização genômica, assinaturas gênicas têm fornecido informações prognósticas limitadas para o PDAC ²⁸⁷. No entanto, é somente avaliando a importância clínica dos subtipos candidatos que um perfil molecular relevante pode ser identificado ¹⁵¹. Reunimos um conjunto de proteínas do secretoma e proteoma do câncer de pâncreas, cujo a integração das duas meta-análises revelou 39 proteínas secretadas que prevê menor sobrevida em quatro diferentes conjuntos de dados de PDAC (TCGA, ICGC, GSE21501, GSE28735) e outros tipos de câncer do conjunto de dados TCGA. Identificamos um conjunto de proteínas secretadas que prevê desfecho clínico em pacientes com câncer e

que podem ser potenciais alvos terapêuticos por atuarem em processos de progressão e resistência do câncer.

8 Material suplementar

Figura suplementar 1. Perfil de expressão de 39 genes do secretoma em tecidos normais e tumorais. A) Heatmap dos níveis de expressão dos genes que codificam as 39 proteínas identificadas como secretadas no PDAC, em diversos tipos de tecidos normais GTEx (Genotype-Tissue Expression). Valores de TPM são visualizados por intensidade de cor; azul escuro indica valores de TPM > 1.0e+3 e azul claro indica valores de TPM < 1.0e+3. Seta: pâncreas. B) Heatmap dos níveis de expressão dos genes [log₂ (TPM + 1)] que codificam as 39 proteínas identificadas como secretadas no PDAC, regulados positivamente (vermelho) ou negativamente (azul) em 10 tipos tumorais (TCGA) comparados com os respectivos tecidos normais (TCGA e GTEx). O nível de expressão dos genes codificados em proteínas secretadas mostra um padrão claramente distinto especificamente no adenocarcinoma ductal pancreático (PAAD/PDAC) e na Acute Myeloid Leukemia (LAML). HNSC: Head and Neck squamous cell carcinoma, COAD: Colon adenocarcinoma, LUSC: Lung squamous cell carcinoma, LUAD: Lung adenocarcinoma, BRCA: Breast invasive carcinoma, ESCA: Esophageal carcinoma, STAD: Stomach adenocarcinoma, LIHC: Liver hepatocellular carcinoma.

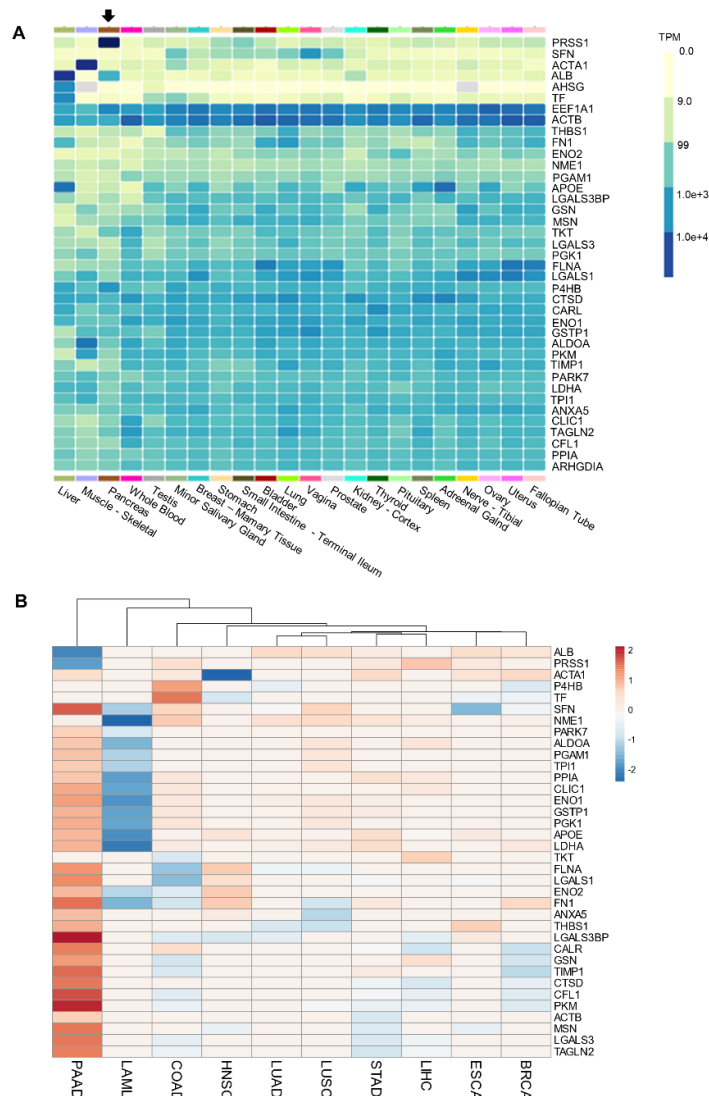


Figura Suplementar 2. Análise de componentes principais (PCA) do conjunto de dados de genes do secretoma. Cada ponto representa uma amostra de câncer plotada contra seus níveis de expressão para os 39 genes do secretoma. A análise mostra grupos separados no gráfico de PCA, indicando diferenças transcricionais entre os diferentes grupos, sendo capaz de separar eficientemente o adenocarcinoma ductal pancreático (PAAD/PDAC) e Acute Myeloid Leukemia (LAML) dos demais tipos de câncer. HNSC: Head and Neck squamous cell carcinoma, COAD: Colon adenocarcinoma, LUSC: Lung squamous cell carcinoma, LUAD: Lung adenocarcinoma, BRCA: Breast invasive carcinoma, ESCA: Esophageal carcinoma, STAD: Stomach adenocarcinoma, LIHC: Liver hepatocellular carcinoma.

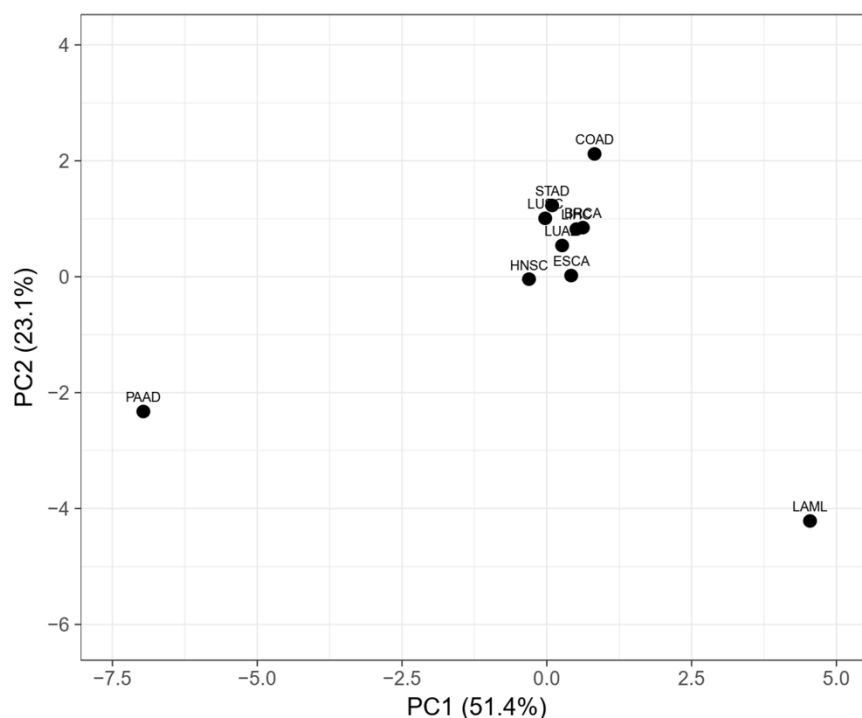


Figura Suplementar 3. O Perfil de expressão de transcritos traduzidos em 39 proteínas secretadas pelo PDAC estratifica os pacientes em grupos de baixo e alto risco. Heatmaps representa a análise de agrupamento não hierárquico da expressão de 39 mRNAs do secretoma gerados no SurvExpress, em 10 conjuntos distintos de dados de câncer do TCGA. Os pacientes com câncer foram estratificados em grupos de alto e baixo risco, indicados abaixo de cada heatmap como barras vermelha e verde, respectivamente. Os grupos de risco foram maximizados com base no Índice Prognóstico avaliado pelos valores de expressão gênica multiplicados pelos coeficientes beta. HNSC: Head and Neck squamous cell carcinoma, ESCA: Esophageal carcinoma, STAD: Stomach adenocarcinoma, LIHC: Liver hepatocellular carcinoma, LUAD: Lung adenocarcinoma, LUSC: Lung squamous cell carcinoma, COAD: Colon adenocarcinoma, LAML: Acute Myeloid Leukemia, BRCA: Breast invasive carcinoma, PAAD: Pancreatic adenocarcinoma.

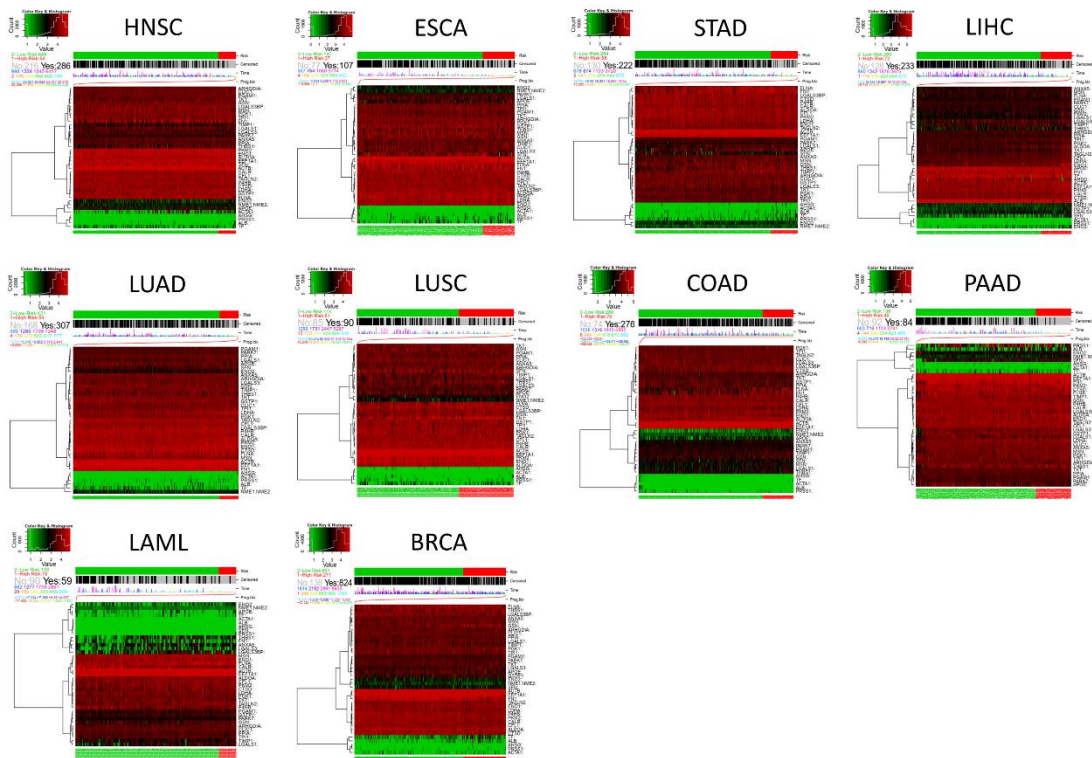
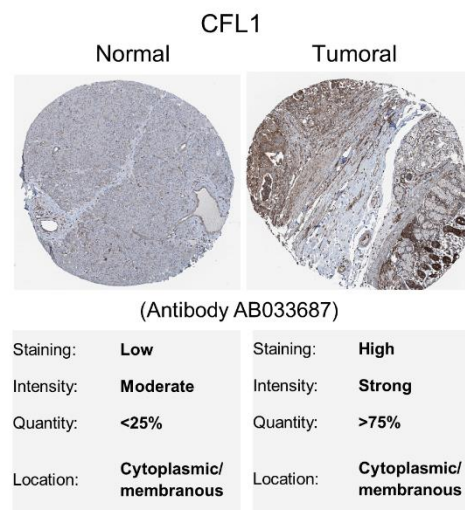
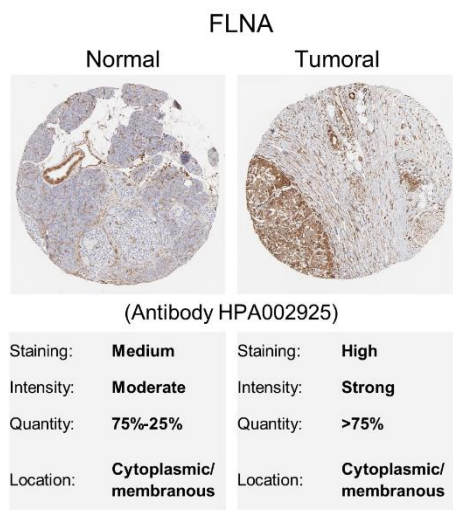
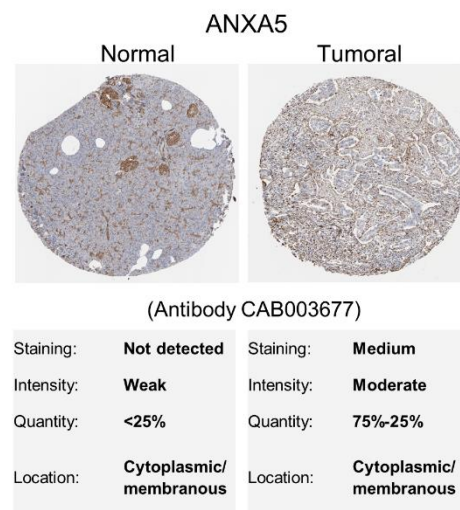
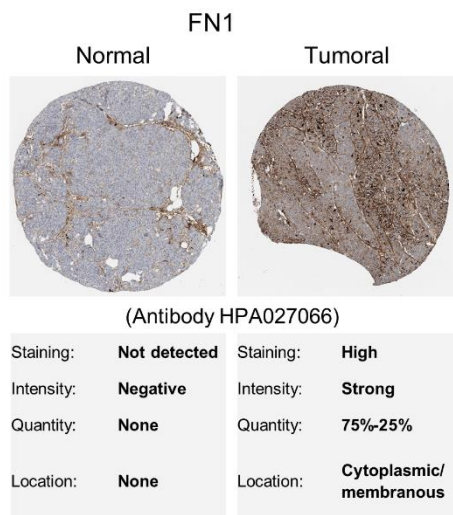
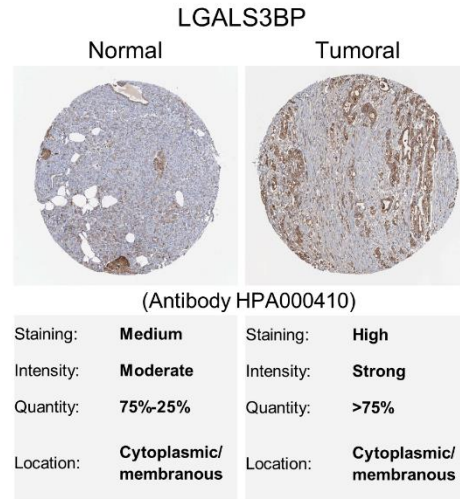
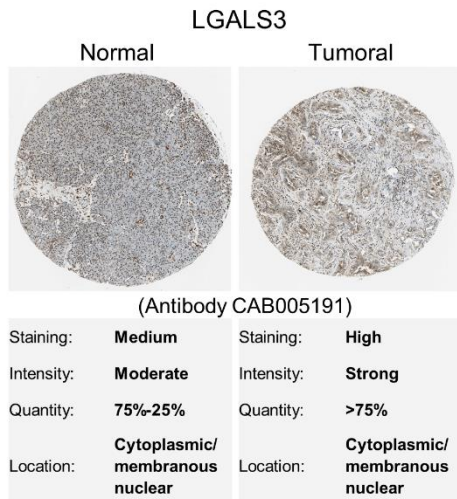
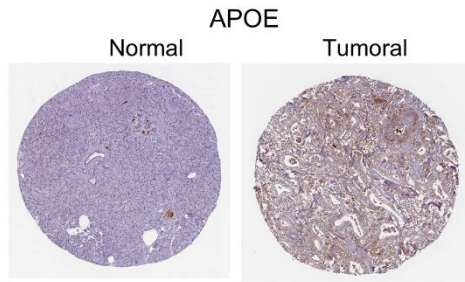


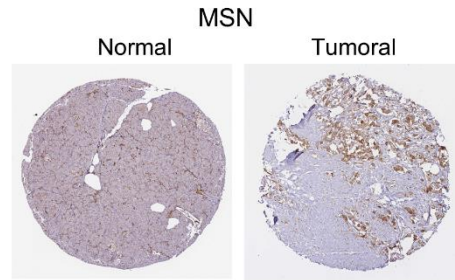
Figura suplementar 4. Validação da expressão de proteína secretada em tecidos normais e PDAC usando coloração imuno-histoquímica disponível no banco de dados do *Human Protein Atlas* (<https://www.proteinatlas.org/>). Essas proteínas foram selecionadas com base no aumento significativo da expressão gênica, conforme identificado usando a ferramenta GEPIA (<http://gepia.cancerpk.cn/>).





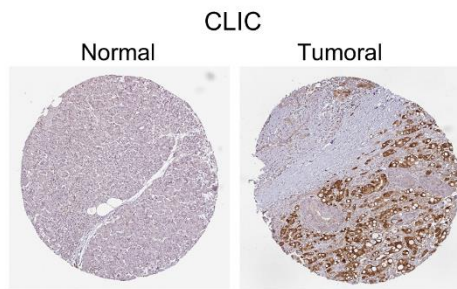
(Antibody CAB008363)

Staining:	Not detected	Staining:	Medium
Intensity:	Negative	Intensity:	Moderate
Quantity:	None	Quantity:	75%-25%
Location:	None	Location:	Cytoplasmic/ membranous



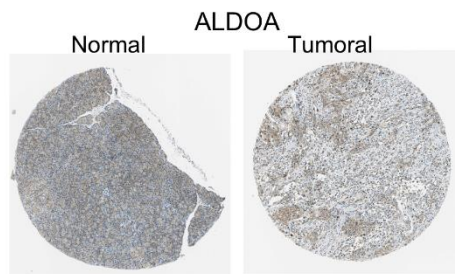
(Antibody CAB047338)

Staining:	Low	Staining:	High
Intensity:	Moderate	Intensity:	Strong
Quantity:	<25%	Quantity:	75%-25%
Location:	Cytoplasmic/ membranous	Location:	Cytoplasmic/ membranous



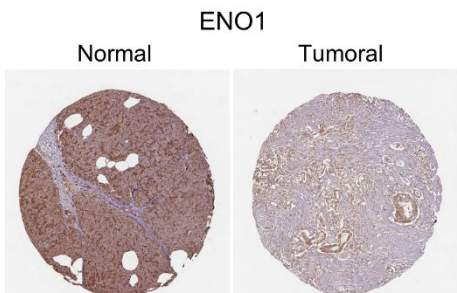
(Antibody CAB040557)

Staining:	Not detected	Staining:	Medium
Intensity:	Negative	Intensity:	Moderate
Quantity:	None	Quantity:	>75%
Location:	None	Location:	Cytoplasmic/ membranous



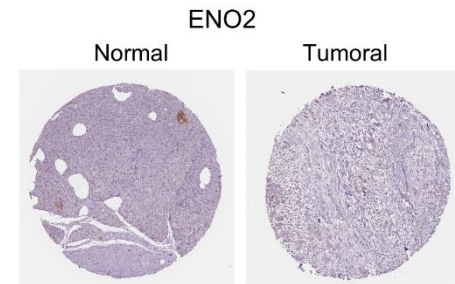
(Antibody CAB006252)

Staining:	High	Staining:	Medium
Intensity:	Strong	Intensity:	Moderate
Quantity:	>75%	Quantity:	>75%
Location:	Cytoplasmic/ membranous	Location:	Cytoplasmic/ membranous



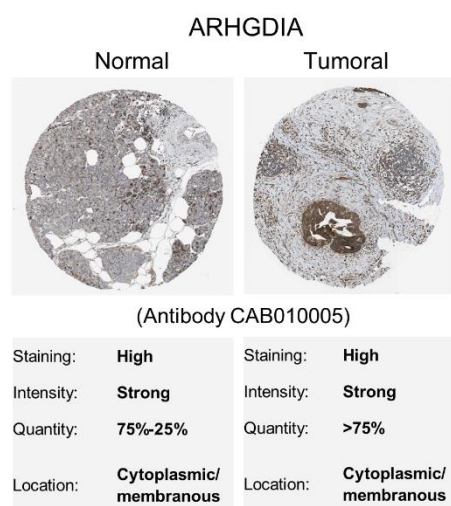
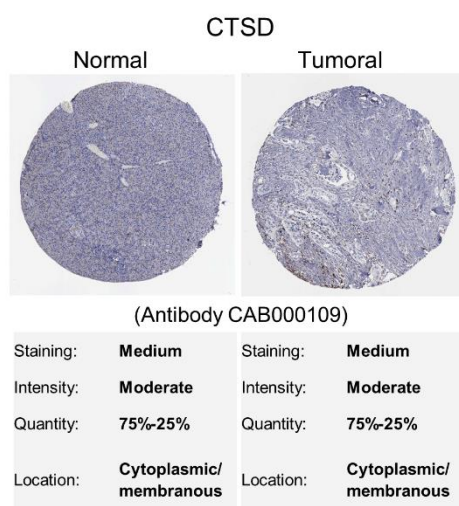
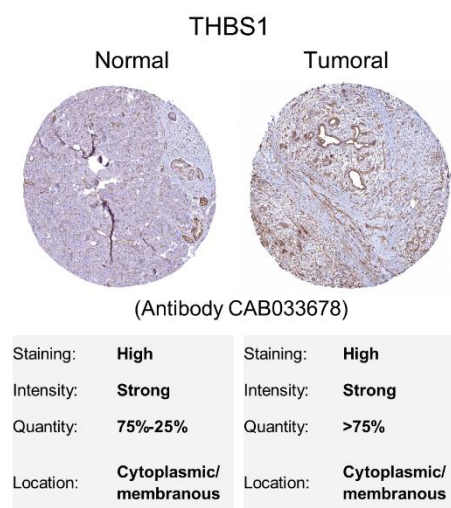
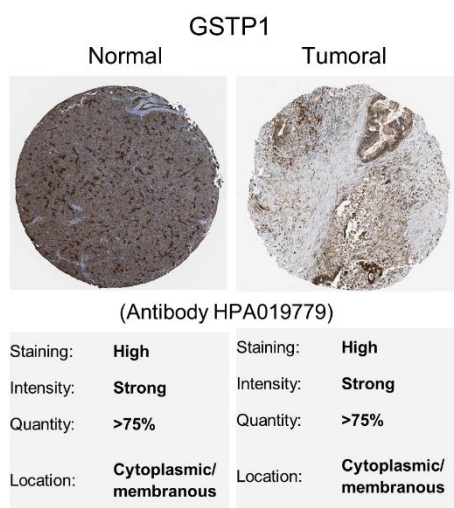
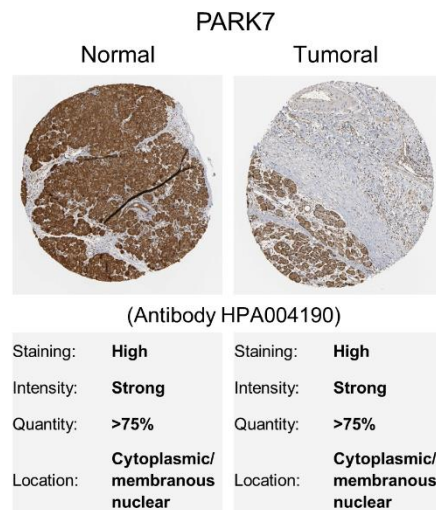
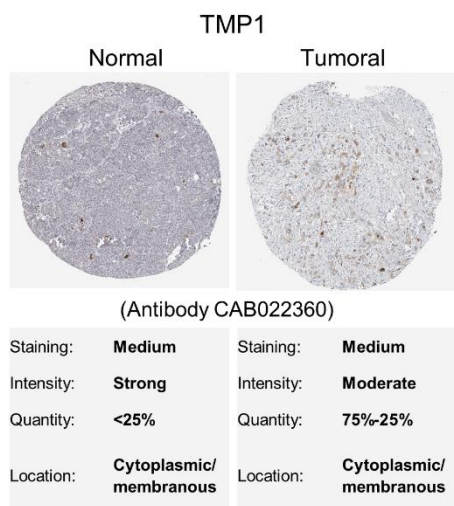
(Antibody CAB069394)

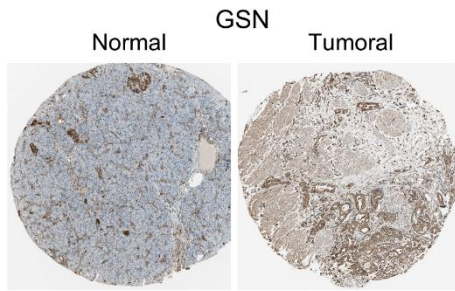
Staining:	High	Staining:	Medium
Intensity:	Strong	Intensity:	Moderate
Quantity:	75%-25%	Quantity:	>75%
Location:	Cytoplasmic/ membranous	Location:	Cytoplasmic/ membranous nuclear



(Antibody CAB073539)

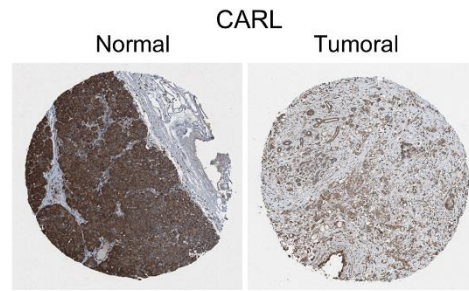
Staining:	Not detected	Staining:	Low
Intensity:	Negative	Intensity:	Weak
Quantity:	None	Quantity:	75%-25%
Location:	None	Location:	Nuclear





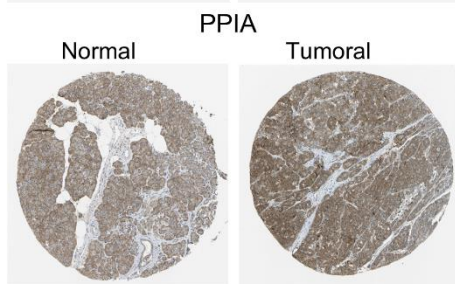
(Antibody CAB010823)

Staining:	Medium	Staining:	Medium
Intensity:	Strong	Intensity:	Moderate
Quantity:	<25%	Quantity:	>75%
Location:	Cytoplasmic/ membranous	Location:	Cytoplasmic/ membranous



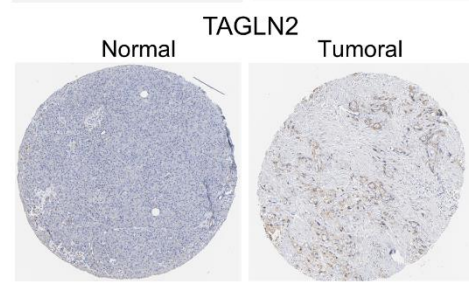
(Antibody CAB019952)

Staining:	High	Staining:	Medium
Intensity:	Strong	Intensity:	Moderate
Quantity:	>75%	Quantity:	>75%
Location:	Cytoplasmic/ membranous	Location:	Cytoplasmic/ membranous



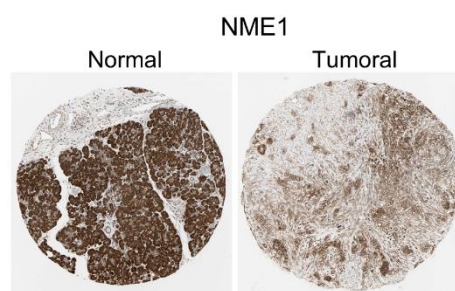
(Antibody CAB004655)

Staining:	Medium	Staining:	Medium
Intensity:	Moderate	Intensity:	Moderate
Quantity:	>75%	Quantity:	>75%
Location:	Cytoplasmic/ Membranous	Location:	Cytoplasmic/ Membranous nuclear



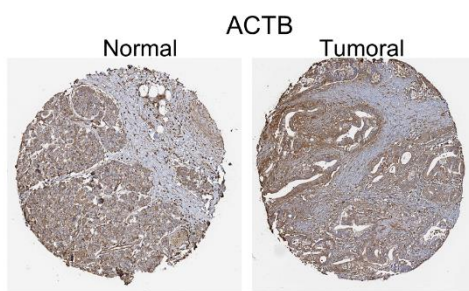
(Antibody HPA001925)

Staining:	Not detected	Staining:	Low
Intensity:	Weak	Intensity:	Weak
Quantity:	75%-25%	Quantity:	>75%
Location:	Cytoplasmic/ membranous	Location:	Cytoplasmic/ membranous



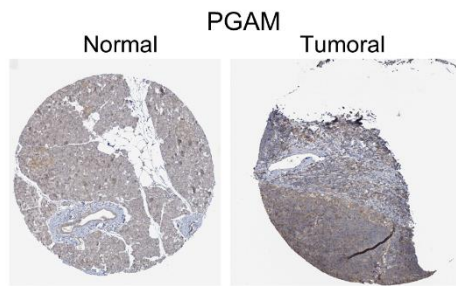
(Antibody HPA008467)

Staining:	High	Staining:	High
Intensity:	Strong	Intensity:	Strong
Quantity:	>75%	Quantity:	>75%
Location:	Cytoplasmic/ membranous	Location:	Cytoplasmic/ membranous nuclear



(Antibody HPA041264)

Staining:	High	Staining:	High
Intensity:	Strong	Intensity:	Strong
Quantity:	75%-25%	Quantity:	>75%
Location:	Cytoplasmic/ membranous	Location:	Cytoplasmic/ membranous



(Antibody HPA042528)

Staining:	Low	Staining:	Medium
Intensity:	Weak	Intensity:	moderate
Quantity:	75%-25%	Quantity:	75%-25%
Location:	Cytoplasmic/ membranous	Location:	Cytoplasmic/ membranous

Tabela suplementar 1. Número total de proteínas identificadas em estudos proteômicos do câncer de pâncreas

	<i>Proteome</i>	<i>Secretome</i>
Total unique proteins	517	782
[in $\geq$ two studies]	[132]	[156]
Number of proteins identified in		
One study	385	626
Two studies	67	101
Three studies	27	35
Four studies	19	11
Five studies	9	5
Six studies	7	3
Seven studies	0	1
Eight studies	2	0
Nine studies	0	0
Ten studies	1	0

Tabela suplementar 2 Proteínas do secretoma (n = 156) identificadas em dois ou mais estudos proteômicos do câncer pancreático

Symbol	Description	Uniprot acess
TPI1	Triosephosphate isomerase	TPIS_HUMAN
ENO1	Alpha Enolase	ENOA_HUMAN
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	G3P_HUMAN
YWHAZ	14-3-3 protein zeta/delta	1433Z_HUMAN
KRT8	Keratin, type II cytoskeletal 8;	K2C8_HUMAN
CTSD	Cathepsin D	CATD_HUMAN
ALDOA	Fructose-bisphosphate aldolase A	ALDOA_HUMAN
PRDX1	Peroxiredoxin-1	PRDX1_HUMAN
ACTN1	Alpha-actinin-1	ACTN1_HUMAN
LDHA	L-lactate dehydrogenase A chain	LDHA_HUMAN
YWHAQ	14-3-3 protein theta	1433T_HUMAN
CLIC1	Chloride intracellular channel protein 1;	CLIC1_HUMAN
ACTA1	Actin, alpha skeletal muscle	ACTS_HUMAN
CST6	Cystatin-M	CYTM_HUMAN
ANXA5	Annexin A5	ANXA5_HUMAN
MYH9	Myosin-9	MYH9_HUMAN
YWHAE	14-3-3 protein epsilon	1433E_HUMAN
PLAU	Urokinase-type plasminogen activator	UROK_HUMAN
CLSTN1	Calsyntenin-1	CSTN1_HUMAN
THBS1	Thrombospondin-1	TSP1_HUMAN
LOXL2	Lysyl oxidase homolog 2	LOXL2_HUMAN
ACTN4	Alpha-actinin-4	ACTN4_HUMAN
HSPG2	Basement membrane-specific heparan sulfate proteoglycan core protein	PGBM_HUMAN
LGALS3BP	Galectin-3-binding protein	LG3BP_HUMAN
VCL	Vinculin	VINC_HUMAN
ITGB1	Integrin beta-1	ITB1_HUMAN
CPE	Carboxypeptidase E	CBPE_HUMAN
PFN1	Profilin-1	PROF1_HUMAN
TIMP1	Metalloproteinase inhibitor 1	TIMP1_HUMAN
SFN	14-3-3 protein sigma	1433S_HUMAN
C3	Complement C3	CO3_HUMAN
ERO1L	ERO1-like protein alpha	ERO1A_HUMAN

LAMB1	Laminin subunit beta-1	LAMB1_HUMAN
GANAB	Neutral alpha-glucosidase AB	GANAB_HUMAN
TGFBI	Transforming growth factor-beta-induced protein ig-h3	BGH3_HUMAN
CP	Ceruloplasmin	CERU_HUMAN
TALDO1	Transaldolase	TALDO_HUMAN
GSTP1	Glutathione S-transferase P	GSTP1_HUMAN
PGAM1	Phosphoglycerate mutase 1	PGAM1_HUMAN
KPNB1	Importin subunit beta-1	IMB1_HUMAN
ALB	Serum albumin	ALBU_HUMAN
COL18A1	Collagen alpha-1(XVIII) chain	COIA1_HUMAN
TAGLN2	Transgelin-2	TAGL2_HUMAN
HSP90AA	Heat shock protein HSP 90-alpha	HS90A_HUMAN
EPHA2	Ephrin type-A receptor 2	EPHA2_HUMAN
EZR/VIL2	Ezrin	EZRI_HUMAN
MSN	Moesin	MOES_HUMAN
YWHAG	14-3-3 protein gamma	1433G_HUMAN
PPIA	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A	PPIA_HUMAN
ACTB	Actin, cytoplasmic 1	ACTB_HUMAN
EEF1A1	Elongation factor 1-alpha 1	EF1A1_HUMAN
GSN	Gelsolin	GELS_HUMAN
MDH1	Malate dehydrogenase, cytoplasmic	MDHC_HUMAN
CAPZA1	F-actin-capping protein subunit alpha-1	CAZA1_HUMAN
PRSS1	Trypsin-1	TRY1_HUMAN
NUCB1	Nucleobindin-1	NUCB1_HUMAN
APOE	Apolipoprotein E	APOE_HUMAN
CD9	CD9 antigen	CD9_HUMAN
CRABP2	Cellular retinoic acid-binding protein 2	RABP2_HUMAN
L1CAM	Neural cell adhesion molecule L1	L1CAM_HUMAN
DNASE2	Deoxyribonuclease-2-alpha	DNS2A_HUMAN
FAM3C	Protein FAM3C	FAM3C_HUMAN
TKT	Transketolase	TKT_HUMAN
PSAT1	Phosphoserine aminotransferase	SERC_HUMAN
TF	Serotransferrin	TRFE_HUMAN
FN1	Fibronectin	FINC_HUMAN
DCD	Dermcidin	DCD_HUMAN
VIM	Vimentin	VIME_HUMAN

LCN1	Lipocalin-1	LCN1_HUMAN
CPA4	Carboxypeptidase A4	CBPA4_HUMAN
SERPINE2	Glia-derived nexin	GDN_HUMAN
SLPI	Antileukoproteinase	SLPI_HUMAN
LYZ	Lysozyme C	LYSC_HUMAN
LTF	Lactotransferrin	TRFL_HUMAN
FUCA1	Tissue alpha-L-fucosidase	FUCO_HUMAN
CST3	Cystatin-C	CYTC_HUMAN
SPARC	SPARC	SPRC_HUMAN
GOT2	Aspartate aminotransferase, mitochondrial	AATM_HUMAN
TPM3	Tropomyosin alpha-3 chain	TPM3_HUMAN
PCBP1	Poly(rC)-binding protein 1	PCBP1_HUMAN
SH3BGRL3	SH3 domain-binding glutamic acid-rich-like protein 3	SH3L3_HUMAN
CEL	Bile salt-activated lipase	CEL_HUMAN
CDH3	Cadherin-3	CADH3_HUMAN
CTNNA1	Catenin alpha-1	CTNA1_HUMAN
CTSH	Pro-cathepsin H	CATH_HUMAN
C1S	Complement C1s subcomponent	C1S_HUMAN
CFB	Complement factor B	CFAB_HUMAN
CNDP2	Cytosolic non-specific dipeptidase	CNDP2_HUMAN
DDT	D-dopachrome decarboxylase	DOPD_HUMAN
DSC3	Desmocollin-3	DSC3_HUMAN
CDH1	Cadherin-1	CADH1_HUMAN
PPT1	Palmitoyl-protein thioesterase 1	PPT1_HUMAN
PLBD2	Phospholipase B-like; Putative phospholipase B-like 2	PLBL2_HUMAN
RCN1	Reticulocalbin-1	RCN1_HUMAN
SERPINB5	Serpin B5	SPB5_HUMAN
HSPA9	Stress-70 protein, mitochondrial	GRP75_HUMAN
SOD2	Superoxide dismutase [Mn], mitochondrial	SODM_HUMAN
TXN	Thioredoxin	THIO_MOUSE
PURB	Transcriptional activator protein Pur-beta	PURB_HUMAN
UCHL1	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase isozyme L1	UCHL1_HUMAN
LGALS3	Galectin-3	LEG3_HUMAN
LGALS1	Galectin-1	LEG1_HUMAN
IGFBP7	Insulin-like growth factor-binding protein 7	IBP7_HUMAN
YARS	Tyrosine--tRNA ligase, cytoplasmic	SYYC_HUMAN
PARK7	Protein/nucleic acid deglycase DJ-1	PARK7_HUMAN

LDHB	L-lactate dehydrogenase B chain	LDHB_HUMAN
CCT2	T-complex protein 1 subunit beta	TCPB_HUMAN
GSTO1	Glutathione S-transferase omega-1	GSTO1_HUMAN
EEF1B2	Elongation factor 1-beta	EF1B_HUMAN
CFL1	Cofilin-1	COF1_HUMAN
HSPA4	Heat shock 70 kDa protein 4	HSP74_HUMAN
AHSG	Alpha-2-HS-glycoprotein	FETUA_HUMAN
TIMP2	Metalloproteinase inhibitor 2	TIMP2_HUMAN
Nucb1	Nucleobindin-1	NUCB1_HUMAN
Anxa11	Annexin A11	ANX11_HUMAN
BSG	Basigin	BASI_HUMAN
DSP	Desmoplakin	DESP_HUMAN
ITGA2	Integrin alpha-2	ITA2_HUMAN
YWHAB	14-3-3 protein beta/alpha	1433B_HUMAN
ULBP2	UL16-binding protein 2	ULBP2_HUMAN
APLP2	Amyloid-like protein 2	APLP2_HUMAN
MMP13	Collagenase 3	MMP13_HUMAN
NCL	Nucleolin	NUCL_HUMAN
LFNG	Beta-1,3-N-acetylglucosaminyltransferase lunatic fringe	LFNG_HUMAN
ARPC2	Actin-related protein 2/3 complex subunit 2	ARPC2_HUMAN
YWHAH	14-3-3 protein eta	1433F_HUMAN
RPSA	40S ribosomal protein AS	RSSA_HUMAN
CALR	Calreticulin	CALR_HUMAN
RPLP0	60S acidic ribosomal protein P0	RLA0_HUMAN
CAPZB	F-actin-capping protein subunit beta	CAPZB_HUMAN
APP	Amyloid-beta A4 protein	A4_HUMAN
ORP150	Hypoxia up-regulated protein 1	HYOU1_HUMA
FLNB	Filamin-B	FLNB_HUMAN
GPI	Glucose-6-phosphate isomerase	G6PI_HUMAN
MIF	Macrophage migration inhibitory factor	MIF_HUMAN
PKM	Pyruvate kinase PKM	KPYM_HUMAN
PGK1	Phosphoglycerate kinase 1	PGK1_HUMAN
PGLS	6-phosphogluconolactonase	6PGL_HUMAN
FLNA	Filamin-A	FLNA_HUMAN
TLN1	Talin-1	TLN1_HUMAN
HSP90B1	Endoplasmin	ENPL_HUMAN

HNRNPK	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K	HNRNPK_HUMAN
PDIA4	Protein disulfide-isomerase A4	PDIA4_HUMAN
P4HB	Protein disulfide-isomerase	PDIA1_HUMAN
PSMB5	Proteasome subunit beta type-5;	PSB5_HUMAN
IQGAP1	Ras GTPase-activating-like protein IQGAP1	IQGA1_HUMAN
ARHGDIA	Rho GDP-dissociation inhibitor 1	GDIR1_HUMAN
PSME1	Proteasome activator complex subunit 1	PSME1_HUMAN
NME1	Nucleoside diphosphate kinase A	NDKA_HUMAN
ITIH2	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H2	ITIH2_HUMAN
ENO2	Gamma-enolase	ENOG_HUMAN
GDF15	Growth/differentiation factor 15	GDF15_HUMAN
UBE2N	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 N	UBE2N_HUMAN
COL6A1	Collagen alpha-1(VI) chain	CO6A1_HUMAN
KRT18	Keratin, type I cytoskeletal 18	K1C18_HUMAN
EPS8L1	Epidermal growth factor receptor kinase substrate 8-like protein 1;	ES8L1_HUMAN

Tabela suplementar 3. Proteínas (n = 132) identificadas em dois ou mais estudos proteômicos do câncer pancreático

Symbol	Description	Uniprot access
ALB	Serum albumin	ALBU_HUMAN
ENO1	Alpha-enolase	ENOA_HUMAN
SERPINA1	Alpha-1-antitrypsin	A1AT_HUMAN
FN1	Fibronectin	FINC_HUMAN
VIM	Vimentin	VIME_HUMAN
TAGLN	Transgelin	TAGL_HUMAN
TPM2	Tropomyosin beta chain	TPM2_HUMAN
TF	Serotransferrin	TRFE_HUMAN
ANXA2	Annexin A2	ANXA2_HUMA
HP	Haptoglobin	HPT_HUMAN
PRELP	Prolargin	PRELP_HUMAN
HSPB1	Heat shock protein beta-1	HSPB1_HUMA
LGALS1	Galectin-1	LEG1_HUMAN
DPYSL3	Dihydropyrimidinase-related protein 3	DPYL3_HUMA
ALDH1A1	Retinal dehydrogenase 1	AL1A1_HUMA
KRT10	Keratin, type I cytoskeletal 10	K1C10_HUMA
REG1A	Lithostathine-1-alpha	REG1A_HUMA

APOE	Apolipoprotein E	APOE_HUMAN
CTRB1	Chymotrypsinogen B	CTRB1_HUMA
HSPA5	Endoplasmic reticulum chaperone BiP	BIP_HUMAN
CTSD	Cathepsin D	CATD_HUMAN
PRX1	Peroxiredoxin PRX1, mitochondrial	PRDX1_HUMA
PDIA3	Protein disulfide-isomerase A3	PDIA3_HUMA
HSPD1	60 kDa heat shock protein, mitochondrial	CH60_HUMAN
PRDX4	Peroxiredoxin-4	PRDX4_HUMA
TPI1	Triosephosphate isomerase	TPIS_HUMAN
APOA1	Apolipoprotein A-I	APOA1_HUMA
S100A9	Protein S100-A9	S10A9_HUMA
GSTP1	Glutathione S-transferase P	GSTP1_HUMA
PARK7	Protein/nucleic acid deglycase DJ-1	PARK7_HUMA
CELA3A	Chymotrypsin-like elastase family member 3A	CEL3A_HUMA
CELA3B	Chymotrypsin-like elastase family member 3B	CEL3B_HUMA
APCS	Serum amyloid P-component	SAMP_HUMAN
PRSS1	Trypsin-1	TRY1_HUMAN
VTN	Vitronectin	VTNC_HUMAN
HPX	Hemopexin	HEMO_HUMAN
EEF1A1	Elongation factor 1-alpha 1	EF1A1_HUMA
POSTN	Periostin	POSTN_HUMA
COL6A3	Collagen alpha-3(VI) chain	CO6A3_HUMA
PNLIPRP1	Inactive pancreatic lipase-related protein 1	LIPR1_HUMA
PRSS2	Trypsin-2	TRY2_HUMAN
MSN	Moesin	MOES_HUMAN
PGK1	Phosphoglycerate kinase 1	PGK1_HUMAN
ANXA5	Annexin A5	ANXA5_HUMA
KRT19	Keratin, type I cytoskeletal 19	K1C19_HUMA
TPM4	Tropomyosin alpha-4 chain	TPM4_HUMAN
TPM1	Tropomyosin alpha-1 chain	TPM1_HUMAN
MVP	Major vault protein	MVP_HUMAN
PPIA	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A	PPIA_HUMAN
GATM	Glycine amidinotransferase, mitochondrial	GATM_HUMAN
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	G3P_HUMAN
CAPG	Macrophage-capping protein	CAPG_HUMAN
HSPA8	Heat shock cognate 71 kDa protein	HSP7C_HUMA
ANXA4	Annexin A4	ANXA4_HUMA

DES	Desmin	DESM_HUMAN
MYL6	Myosin light polypeptide 6	MYL6_HUMAN
PKM	Pyruvate kinase PKM	KPYM_HUMAN
THBS1	Thrombospondin-1	TSP1_HUMAN
APOH	Beta-2-glycoprotein 1	APOH_HUMAN
FGB	Fibrinogen beta chain	FIBB_HUMAN
PRSS3	Trypsin-3	TRY3_HUMAN
CPA2	Carboxypeptidase A2	CBPA2_HUMA
GSN	Gelsolin	GELS_HUMAN
GC	Vitamin D-binding protein	VTDB_HUMAN
F2	Prothrombin	THRB_HUMAN
OGN	Mimecan	MIME_HUMAN
LGALS3	Galectin-3	LEG3_HUMAN
GPX3	Glutathione peroxidase 3	GPX3_HUMAN
S100A10	Protein S100-A10	S10AA_HUMA
TGFB1	Transforming growth factor-beta-induced protein ig-h3	BGH3_HUMAN
CAP1	Adenylyl cyclase-associated protein 1	CAP1_HUMAN
TGM2	Protein-glutamine gamma-glutamyltransferase 2	TGM2_HUMAN
CALD1	Caldesmon	CALD1_HUMA
TIMP1	Metalloproteinase inhibitor 1	TIMP1_HUMA
MFAP4	Microfibril-associated glycoprotein 4	MFAP4_HUMA
TNC	Tenascin	TENA_HUMAN
ANXA1	Annexin A1	ANXA1_HUMA
PD-ECGF	Thymidine phosphorylase	TYPH_HUMAN
CFL1	Cofilin-1	COF1_HUMAN
FTL	Ferritin light chain	FRIL_HUMAN
KRT1	Keratin, type II cytoskeletal 1	K2C1_HUMAN
FLNA	Filamin-A	FLNA_HUMAN
LGALS3BP	Galectin-3-binding protein	LG3BP_HUMA
MDH2	Malate dehydrogenase, mitochondrial	MDHM_HUMAN
SERPINH1	Serpin H1	SERPH_HUMA
VDAC1	Voltage-dependent anion-selective channel protein 1	VDAC1_HUMA
CALR	Calreticulin	CALR_HUMAN
CLIC1	Chloride intracellular channel protein 1	CLIC1_HUMA
ACTBL2	Beta-actin-like protein 2	ACTBL_HUMA
KRT7	Keratin, type II cytoskeletal 7	K2C7_HUMAN
TAGLN2	Transgelin-2	TAGL2_HUMA

BGN	Biglycan	PGS1_HUMAN
COL1A1	Collagen alpha-1(I) chain	CO1A1_HUMA
FBN1	Fibrillin-1	FBN1_HUMAN
LUM	Lumican	LUM_HUMAN
S100A4	Protein S100-A4	S10A4_HUMA
MUC5	Mucin-5AC	MUC5A_HUMAN
ANXA3	Annexin A3	ANXA3_HUMA
LDHA	L-lactate dehydrogenase A chain	LDHA_HUMAN
NME1	Nucleoside diphosphate kinase A	NDKA_HUMAN
TKT	Transketolase	TKT_HUMAN
CPA1	Carboxypeptidase A1	CBPA1_HUMAN
SFN	14-3-3 protein sigma	1433S_HUMA
CLU	Clusterin	CLUS_HUMAN
TUBB2A	Tubulin beta chain; ; Tubulin beta-2A chain	TBB2A_HUMA
CPB1	Carboxypeptidase B	CBPB1_HUMA
ALDOA	Fructose-bisphosphate aldolase A	ALDOA_HUMA
ALDOC	Fructose-bisphosphate aldolase C	ALDOC_HUMA
ENO2	Gamma-enolase	ENOG_HUMAN
GNB1	Guanine nucleotide-binding protein G(I)/G(S)/G(T) subunit beta-1	GBB1_HUMAN
AMY2A	Pancreatic alpha-amylase	AMYP_HUMAN
PNLIP	Pancreatic triacylglycerol lipase	LIPP_HUMAN
PGAM1	Phosphoglycerate mutase 1	PGAM1_HUMA
PPIB	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase B	PPIB_HUMAN
ARHGDIA	Rho GDP-dissociation inhibitor 1	GDIR1_HUMA
PSAP	Prosaposin	SAP_HUMAN
ACTB	Actin, cytoplasmic 1	ACTB_HUMAN
P4HB	Protein disulfide-isomerase	PDIA1_HUMA
PNLIPRP2	Pancreatic lipase-related protein 2	LIPR2_HUMA
ACTA1	Actin, alpha skeletal muscle	ACTS_HUMAN
MRCL3	Myosin regulatory light chain 12A	ML12A_HUMA
ACTG1	Actin, cytoplasmic 2	ACTG_HUMAN
S100A8	Protein S100-A8	S10A8_HUMA
LMCD1	LIM and cysteine-rich domains protein 1	LMCD1_HUMA
SOD2	Superoxide dismutase [Mn], mitochondrial	SODM_HUMAN
FGG	Fibrinogen gamma chain	FIBG_HUMAN
PLEC	Plectin	PLEC_HUMAN

MACF1	Microtubule-actin cross-linking factor 1, isoforms 1/2/3/5	MACF1_HUMAN
PCLO	Protein piccolo	PCLO_HUMAN
ORM1	Alpha-1-acid glycoprotein 1	A1AG1_HUMA
AHSG	Alpha-2-HS-glycoprotein	FETUA_HUMA
KNG1	Kininogen-1	KNG1_HUMAN

Tabela suplementar 4. Proteínas identificadas na meta-análise do secretoma e do proteoma do câncer pancreático.

Tabela suplementar 5. Verificação de natureza de secreção de 43 proteínas

Tabela suplementar 6. Amostras de The Cancer Genome Atlas (TCGA) and The Genotype-Tissue Expression (GTEx) utilizadas para análises de expressão gênica.

Tabela suplementar 7. Genes secretoma regulados positivamente em cada tipo de tumor (TCGA) combinados com os tecidos normais (TCGA e GTEx)

Tabela suplementar 8. Genes secretoma regulados negativamente em cada tipo de tumor (TCGA) combinados com os tecidos normais (TCGA e GTEx)

Tabela suplementar 9. Genes que codificam proteínas preditas como secretadas de acordo com The Human Protein Atlas (<https://www.proteinatlas.org/>)

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. Grønborg, 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. Kucharzewska, 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. Igbinigie, 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. Kopreski, 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. Zangiacomi 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., Seigneure, 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 ¹⁵N 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 α -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 α -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 α -Enolase. *Am. J. Hematol.* **72**, 234–242 (2003).
 248. Legler, D. F., Johnson-Léger, C., Wiedle, G., Bron, C. & Imhof, B. A. The $\alpha\text{v}\beta 3$ 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 α -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.* P13K/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

10 Anexo I

10.1 Manuscrito publicado

Article

An Integrated Meta-Analysis of Secretome and Proteome Identify Potential Biomarkers of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma

Grasieli de Oliveira ¹, Paula Paccielli Freire ¹ , Sarah Santiloni Cury ¹ , Diogo de Moraes ¹,
Jakeline Santos Oliveira ¹ , Maeli Dal-Pai-Silva ¹, Patrícia Pintor do Reis ^{2,3}  and
Robson Francisco Carvalho ^{1,*} 

¹ Department of Structural and Functional Biology, Institute of Biosciences, São Paulo State University (UNESP), Botucatu 18618-689, São Paulo, Brazil; grasieli.oliveira@unesp.br (G.d.O.); paula.freire@unesp.br (P.P.F.); sarahscury@gmail.com (S.S.C.); demoraesdiogo2017@gmail.com (D.d.M.); jakoliveira.jo@gmail.com (J.S.O.); maeli.dal-pai@unesp.br (M.D.-P.-S.)

² Department of Surgery and Orthopedics, Faculty of Medicine, São Paulo State University (UNESP), Botucatu 18618-687, São Paulo, Brazil; patricia.reis@unesp.br

³ Experimental Research Unity, Faculty of Medicine, São Paulo State University, UNESP, Botucatu 18618-970, São Paulo, Brazil

* Correspondence: robson.carvalho@unesp.br; Tel.: +55-14-3880-0473

Received: 7 February 2020; Accepted: 12 March 2020; Published: 18 March 2020



Abstract: Pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) is extremely aggressive, has an unfavorable prognosis, and there are no biomarkers for early detection of the disease or identification of individuals at high risk for morbidity or mortality. The cellular and molecular complexity of PDAC leads to inconsistencies in clinical validations of many proteins that have been evaluated as prognostic biomarkers of the disease. The tumor secretome, a potential source of biomarkers in PDAC, plays a crucial role in cell proliferation and metastasis, as well as in resistance to treatments, which together contribute to a worse clinical outcome. The massive amount of proteomic data from pancreatic cancer that has been generated from previous studies can be integrated and explored to uncover secreted proteins relevant to the diagnosis and prognosis of the disease. The present study aimed to perform an integrated meta-analysis of PDAC proteome and secretome public data to identify potential biomarkers of the disease. Our meta-analysis combined 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 predicted the secreted proteins using seven in silico tools or databases, which identified 39 secreted proteins shared between the secretome and proteome data. Notably, the expression of 31 genes of these secretome-related proteins was upregulated in PDAC 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 in predicting survival outcome was confirmed using gene expression data from four PDAC datasets (validation set). The gene expression of these secreted proteins was able to distinguish high- and low-survival patients in nine additional tumor types from TCGA, demonstrating that 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 in PDAC biomarkers studies from the literature. This analysis revealed that our gene signature performed equally well or better than the signatures from these previous studies. In conclusion, our integrated meta-analysis of PDAC proteome and secretome identified 39 secreted proteins as potential biomarkers, and the tumor gene expression profile of these proteins in patients with PDAC is associated with worse overall survival.

Keywords: PDAC; mass spectrometry; bioinformatics; prognostic biomarkers

1. Introduction

Pancreatic cancer includes both exocrine and endocrine tumors, of which the majority are pancreatic ductal adenocarcinomas (PDACs)—one of the most aggressive and lethal human cancers among solid malignancies [1]. Due to its poor prognosis, with the number of deaths ($n = 432,000$) nearly equivalent to the number of cases ($n = 459,000$), pancreatic cancer is the seventh leading cause of cancer death [2]. Less than 5% of patients survive up to 5 years after diagnosis [3,4]. Because of the asymptomatic nature of the early stages of the disease and the lack of efficient methods for its detection, most patients with pancreatic cancer have locally advanced and inoperable disease at diagnosis [5,6]. Also, about 90% of the PDAC cases are complex due to distant metastases [7,8]. The disease becomes even more complicated in the advanced stages because chemotherapy, radiotherapy, and combined therapies become severely impaired [3,9,10]. Less than 20% of patients are candidates for complete surgical removal, and even after treatment, most relapse and die within a year [11].

The lack of significant progress in clinical treatment compared to other cancer types is attributable to the current inability to develop new and effective therapies; current standard treatments still consist of surgical resection and cytotoxic therapies [12]. Therapeutic options are limited, and the progress in drug development is hindered because most PDACs are highly complex at the cellular, genomic, epigenomic, and metabolic levels [13,14]. Furthermore, the interaction between neoplastic and stromal cells in tumor microenvironment challenges medical treatment [15]. Current alternatives to study the molecular complexity of PDAC lies in the integration of multi-omics profiles and experimental meta-data, which might lead to the identification of new drugs and therapeutic targets, as well as the discovery of biomarkers to improve diagnostic, prognosis, chemotherapy responses, and prediction of tumor recurrence [16].

Several studies have identified gene expression signatures using tumor-derived transcriptome data from PDAC patients, targeting the development of better prognostic tools able to stratify patient survival, relapse, and treatment response [17–24]. Although these gene signatures predict patient survival; the implementation of biomarkers in clinical practice has not yet been possible, in part because many of these signatures were derived from gene expression data that may not accurately reflect changes in plasma proteins [24–26]. Advances in RNA and DNA sequencing technologies that enable large-scale analysis of the molecular characteristics from histopathologically indistinguishable tumors have often shown substantial molecular differences that preclude the guidance of a significant amount of clinical decisions [13]. This PDAC cellular and molecular heterogeneity culminate in an immense dynamic range of protein quantity coupled with a plethora of isoforms that also challenge the discovery of protein-based biomarkers [27].

Protein-based biomarkers have the potential to bring benefits to clinical predictions of the disease [28]. Recent advances in cancer proteomics have paralleled the development of different proteomics approaches and technologies [27], increasing the number of pancreatic cancer-related proteins that have been identified in tissues, body fluids (such as pancreatic juice, plasma, and serum), and in cancer cell lines [29–31]. The action of soluble secreted mediators (secretome) by cancer cells and cells within the tumor microenvironment has been recognized as one of the main factors influencing tumor biology [32]. The secretion of functional biomolecule-enriched exosomes not only allows pancreatic cancer cells to model the activity of adjacent cells in their tumor microenvironment but also enables them to exploit distant cells to optimize conditions for future metastatic seeding [33]. PDAC-derived exosomes expressing the Macrophage Migration Inhibitory Factor (MIF) induce the formation of a pre-metastatic niche in the mouse liver, and therefore this protein can be used as a prognostic marker for the development of liver metastasis [34]. Glypican 1 (GPC1) expression in blood exosomes of pancreatic cancer patients was able to distinguish patients with benign or malign disease with absolute specificity and sensitivity [35]. Therefore, this protein also has a noninvasive diagnosis potential to detect the early stages of PDAC. These findings provide interesting information on how tumor cells can communicate and promote tumor progression through oncogenic protein transfer [36].

Thus, focusing on proteomic analyses of the cancer secretome is an exciting approach once it represents the portion of the proteome expected to harbor promising biomarkers [37].

Proteomics analyses of PDAC have identified a vast amount of cancer-associated proteins [32,38–46], including secreted proteins [47]. Recent evidence supports the concept that protein biomarker signatures, as opposed to individual biomarkers, may ensure the long-sought accuracy in cancer diagnosis [48]. Thus, we used publicly available data to perform an integrative meta-analysis of pancreatic cancer tumor cell secretome and tumor proteome to identify potential biomarkers of the disease. This discovery set allowed us to identify 39 proteins that were confirmed as secreted by prediction analyses using seven in silico tools or databases. We also compared the transcriptomic profiles from PDAC and normal tissue samples using The Cancer Genome Atlas (TCGA) and The Genotype-Tissue Expression (GTEx) data, which revealed that 31 secreted genes are upregulated in PDAC. Next, we determined the prognostic value of the 31 secreted proteins for predicting survival outcome using gene expression data from four PDAC datasets (validation set) and in nine additional tumor types from TCGA. In all these datasets, the potentially secreted proteins were capable of distinguishing better and worse prognosis (overall survival). Finally, we compared the prognostic value of our set with sets of other PDAC biomarkers studies. Our gene signature performed equally well or better than the signatures found in previous studies in terms of its ability to predict prognosis, but it is the only one based on genes that are translated into secreted proteins and, therefore, can be potentially used as plasma or tumor microenvironment biomarkers. In conclusion, the integration of proteome and secretome mass spectrometry data from pancreatic cancer tumors and cells identified 39 secreted proteins, and tumor gene expression profile of these proteins in patients with PDAC is associated with worse overall survival. This list of protein-coding genes in PDAC may serve as potential biomarkers or as targets for new therapeutic approaches of the disease.

2. Results

2.1. Integration of Secretome and Proteome Meta-Analysis Identifies 39 Secreted Proteins in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma

We performed an integrative meta-analysis on pancreatic cancer secretome and proteome data to identify clinically relevant diagnostic and prognostic biomarkers. According to the meta-analysis study design and inclusion and exclusion criteria (Figure 1), 20 secretome studies and 35 proteome studies in pancreatic cancer were selected, which reported protein data obtained by mass spectrometry (Tables 1 and 2) [3,6,29,34,37,41,43,45–47,49–93]. These data identified 782 proteins in pancreatic cancer secretome and 517 proteins in pancreatic ductal adenocarcinoma tumor samples. Interestingly, we did not identify a protein shared by all secretome and proteome studies. Therefore, we chose to select proteins present in two or more studies. This approach allowed us to obtain 156 and 132 proteins in the pancreatic cancer secretome and proteome, respectively (Figure 2 and Tables S1–S4). The intersection between the secretome and proteome protein lists revealed 43 proteins in common between the two meta-analysis strategies (Figure 2). These 43 shared proteins were further verified as secreted using prediction analysis regarding the nature of secretion (Figure 2). These analyses confirmed the selection of proteins that are not be derived from other mechanisms such as cell death. Among the 43 proteins verified by SignalP, SecretomeP, Exocarta, Vesiclepedia, TargetP, and TMHMM, the proteins Vimentin (VIM), Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), and Superoxide dismutase 2 (SOD2) were predicted to contain mitochondrial sublocation (TargetP) and the Transforming growth factor beta induced (TGFB1) protein was predicted to contain transmembrane helices (TMHMM). These four proteins were eliminated, resulting in a final list of 39 proteins predicted as secreted. This set of proteins is also detected in plasma, as confirmed in the Plasma Proteome database (Table 3 and Table S5).

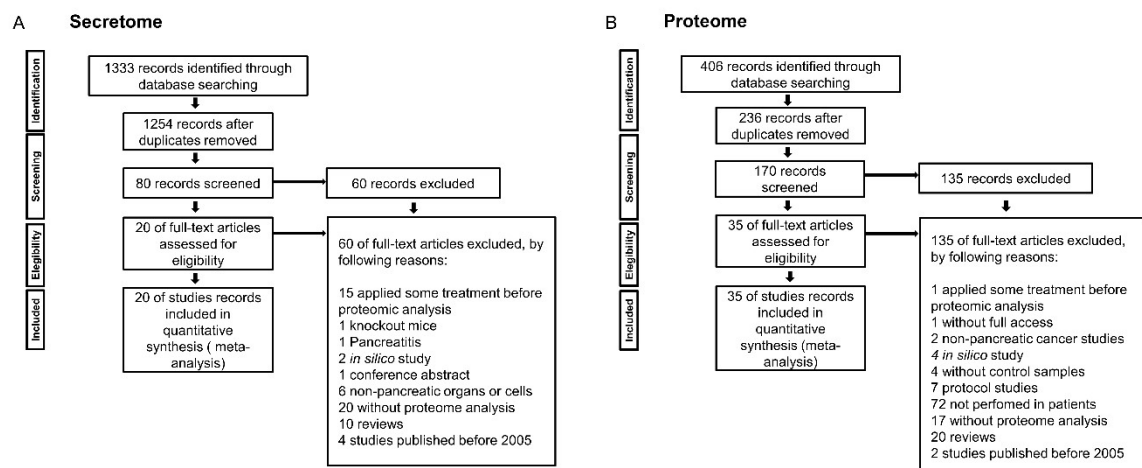


Figure 1. Flowchart of the integrative secretome (A) and proteome (B) meta-analyses in pancreatic cancer.

Table 1. Description of publicly available proteomic studies used in the secretome meta-analysis.

Ref.	Cell Line /Tumor Tissue	Labeling	Technique	Validation Method
[37]	Panc1	Silac	LC-MS/MS	WB, IHC, MA
[43]	AsPC1, MiaPaCa2, Panc1	Free	LC-MS/MS	-
[41]	Panc1	iTRAQ	LC-MS/MS	WB, ELISA
[45]	Paca44, Panc1, BxPc3, MiaPaca2, HPSC, A818-4	Free	LC-MS/MS	-
[46]	BxPC-3, MIA PaCa-2, Panc1, AsPC-1	Free	LC-MS/MS	WB, IHC, ELISA
[93]	CAPAN-2, RLT-PSC	Silac	LC-MRM/MS	-
[47]	PC-1.0, PC-1 (Hamster)	Silac	Nano-RPLC-MS/MS	WB
[49]	BxPC3, MiaPaca2, Panc1	Free	ESI-MS/MS	WB
[50]	SOJ-6, BxPC-3, MiaPaCa-2, Panc-1	Free	MALDI-TOF MS	WB
[34]	PAN02 (Mouse)	Free	MS/MS	ELISA
[51]	NIT-1	Free	MS/MS	WB
[52]	Panc-1	Free	LC-MS/MS	-
[53]	MiaPaCa-2, BxPc-3, Panc-1, AsPc-1	Free	MALDI-TOF MS	WB
[54]	Adenocarcinoma tissue	Free	LC-MS/MS	WB
[55]	BON-1, NCI-H727, SHP-77	Free	LC-MS/MS	WB
[3]	BxPc3, MIA-PaCa2, Panc1, CAPAN1, CFPAC1, SU.86.86, HPDE, PJ	Free	LC-MS/MS	ELISA
[56]	KLM, PK-59, MIAPaCa2	Free	MS/MS	WB
[57]	Panc-1, SW1990	iTRAQ	LC-MS/MS	-
[58]	MIA PaCa-2	labeling	MALDI-TOF MS	WB
[59]	CAPAN-2	Silac	LC-MS/MS	IHC

Ref.: reference; Rodent cell lines are specified in parentheses; Silac: Stable isotope labeling with amino acids in cell culture; iTRAQ: Isobaric tags for relative and absolute quantitation; LC-MS/MS: Liquid chromatography-tandem mass spectrometry; LC-MRM/MS: Multiplexed liquid chromatography multiple-reaction-monitoring mass spectrometry; Nano-RPLC-MS/MS: Nanoscale liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry; ESI-MS/MS: Electrospray ionization mass spectrometry; MALDI-TOF MS: Laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry; MS/MS: Tandem mass spectrometry; PJ: Pancreatic juice; WB: Western Blot; IHC: Immunohistochemistry; MA: Microarrays.

Table 2. Description of publicly available human proteomic studies used in the proteome meta-analysis.

Ref.	Sample	Labeling	Technique	Validation Method
[6]	PTT	CD	nanoLC-ESI-MS/MS	IHC
[60]	PTT	CD	MALDI-TOF MS, nanoLC-ESI MS/MS	-
[61]	PTT	Free	MALDI-TOF/TOF MS, MS/MS	IHC
[62]	PTT	Free	MS/MS	WB
[63]	PTT	Free	MS/MS	WB, IHC
[64]	PTT	Free	LC-MS/MS	ELISA
[65]	PTT	Free	LC-MS/MS	ELISA
[66]	PTT	Free	MS/MS	-
[67]	PTT	Free	LC-MS/MS	IHC
[68]	PTT	Free	MALDI-TOF MS	ELISA
[69]	PTT	Free	LC-MS/MS	IHC
[70]	PTT	Free	MALDI-TOF MS	IHC, WB
[71]	PTT	CD	MALDI-TOF/TOF-MS	WB, IHC
[72]	PTT	Free	MALDI-TOF MS	WB
[73]	PTT	Free	MALDI-TOF/TOF-MS	-
[29]	PTT	Free	LC-MS/MS	IHC, WB
[74]	PTT	Free	LC-MS/MS	-
[75]	PTT	SI	LC-MS/MS	-
[76]	PTT	Free	LC-MS/MS	IHC, WB
[77]	PTT	LP	MS/MS	-
[78]	PTT	Free	LC-MS(MS) ²	-
[79]	PTT	Free	UHPLC/MS/MS ²	-
[80]	Urine	CD	MALDI-TOF MS	IB
[81]	Serum	Free	MALDI-QIT-TOF-MS	
[82]	Serum	Free	(MRM)	WB
[83]	Serum	Free	MS/MS	-
[84]	Blood	Free	MALDI-MS	ELISA
[85]	Serum	CD	MALDI-TOF/ TOF-MS	ELISA, WB
[86]	Serum	IL	LC-MS / MS	-
[87]	Urine	Free	LC/MS /MS	-
[88]	Plasma	Free	LC-MS/MS	ELISA, WB, IHC, RT-qPCR
[89]	PDF	Free	GeLC-MS/MS	-
[90]	Serum	Free	MALDI-TOF MS	PCR, WB, IHC
[91]	PJ	Free	MALDI-TOF MS MS/MS	WB, IHC, ELISA
[92]	Serum	Free	MALDI-TOF	WB

Ref.: Reference; PDF: Pancreatic duct fluid, PJ: Pancreatic juice; PTT: Pancreatic tumor tissue; SI: Stable Isotopic; IL: Isobaric Label; CD: CyDyes (Fluorescence Cyanine Dyes); LC-MS/MS: Liquid chromatography-tandem mass spectrometry; LC-MRM/MS: Multiplexed liquid chromatography multiple-reaction-monitoring mass spectrometry; Nano-RPLC-MS/MS: Nanoscale liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry; ESI-MS/MS: Electrospray ionization mass spectrometry; MALDI-TOF MS: Laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry; MS/MS: Tandem mass spectrometry; MRM: Multiple Reaction Monitoring; IHC: Immunohistochemistry; WB: Western Blot; IB: Immunoblotting.

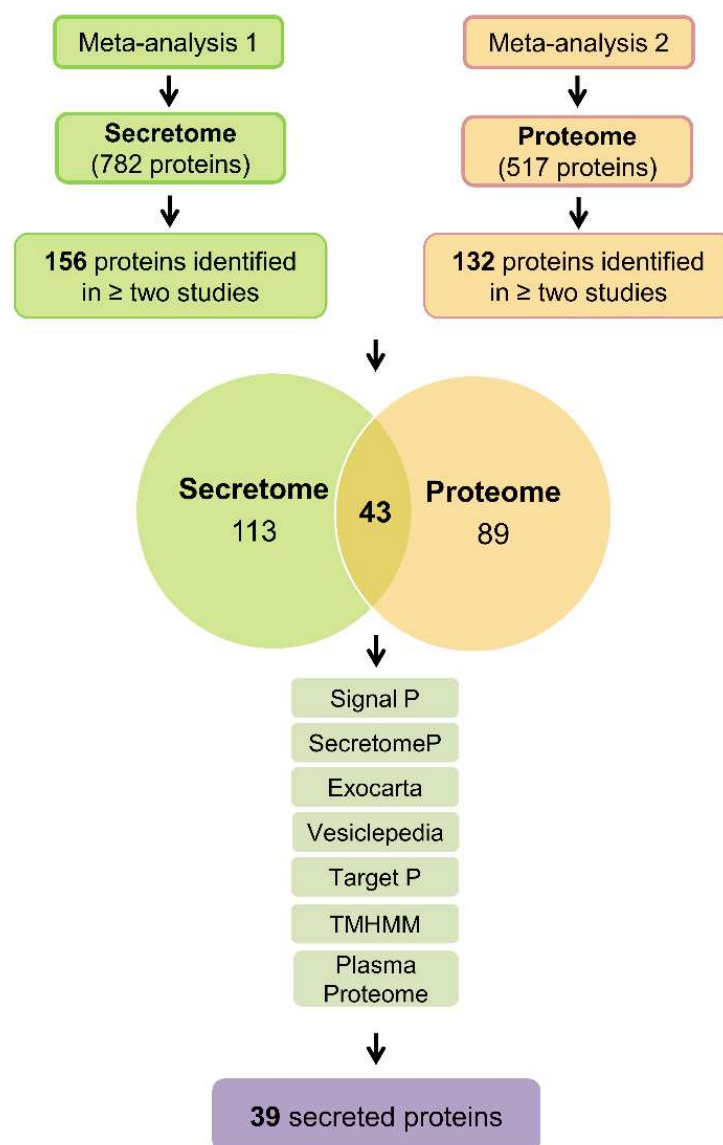


Figure 2. Schematic representation of the workflow used to identify secreted proteins in pancreatic cancer studies. Two meta-analyses of publicly available proteomic studies were used to identify secreted proteins in pancreatic ductal adenocarcinomas: meta-analysis 1 identified 782 proteins in the secretome, and meta-analysis 2 identified 517 proteins in the proteome. Subsequently, the proteins present in two or more studies were selected. This strategy resulted in a final list containing 156 proteins in the secretome (meta-analysis 1) and 132 proteins in the proteome (meta-analysis 2). The intersection between the proteins identified 43 shared proteins between the two meta-analyses. These 43 proteins were further verified as secreted using the algorithms available at Center for Biological Sequencing Analysis (CBS): SignalP [94] (identifies classical secreted proteins, presence of signal peptide); SecretomeP [95] (identifies non-classical secreted proteins); and the databases Vesiclepedia [96] (protein data in secretory vesicles), ExoCarta [97] (protein data in exosomes) and Plasma Proteome [98] (protein data identified in the blood). Proteins were excluded from further analysis if detected by the CBS TargetP [99] (mitochondrial protein) or TMHMM [100] (transmembrane helix protein) algorithms, resulting in a final list of 39 proteins in the pancreatic ductal adenocarcinoma shared by proteome and secretome studies.

Table 3. Proteins shared between pancreatic cancer secretome and proteome studies.

Uniprot Access	Gene Symbol	Description
ALBU_HUMAN	ALB	Serum albumin
ENOA_HUMAN	ENO1	Alpha-enolase
FINC_HUMAN	FN1	Fibronectin
TRFE_HUMAN	TF	Serotransferrin
LEG1_HUMAN	LGALS1	Galectin-1
APOE_HUMAN	APOE	Apolipoprotein E
CATD_HUMAN	CTSD	Cathepsin D
TPIS_HUMAN	TPI1	Triosephosphate isomerase
GSTP1_HUMAN	GSTP1	Glutathione S-transferase P
PARK7_HUMAN	PARK7	Protein/nucleic acid deglycase DJ-1
TRY1_HUMAN	PRSS1	Trypsin-1
MOES_HUMAN	MSN	Moesin
PGK1_HUMAN	PGK1	Phosphoglycerate kinase 1
ANXA5_HUMAN	ANXA5	Annexin A5
PPIA_HUMAN	PPIA	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A
KPYM_HUMAN	PKM	Pyruvate kinase PKM
EF1A1_HUMAN	EEF1A1	Elongation factor 1-alpha 1
TSP1_HUMAN	THBS1	Thrombospondin-1
GELS_HUMAN	GSN	Gelsolin
LEG3_HUMAN	LGALS3	Galectin-3
TIMP1_HUMAN	TIMP1	Metalloproteinase inhibitor 1
COF1_HUMAN	CFL1	Cofilin-1
FLNA_HUMAN	FLNA	Filamin-A
LG3BP_HUMAN	LGALS3BP	Galectin-3-binding protein
CALR_HUMAN	CALR	Calreticulin
CLIC1_HUMAN	CLIC1	Nuclear chloride ion channel protein
TAGL2_HUMAN	TAGLN2	Transgelin-2
LDHA_HUMAN	LDHA	L-lactate dehydrogenase A chain
NDKA_HUMAN	NME1	Nucleoside diphosphate kinase A
TKT_HUMAN	TKT	Transketolase
1433S_HUMAN	SFN	14-3-3 protein sigma
ALDOA_HUMAN	ALDOA	Fructose-bisphosphate aldolase A
ENOG_HUMAN	ENO2	Gamma-enolase
PGAM1_HUMAN	PGAM1	Phosphoglycerate mutase 1
GDIR1_HUMAN	ARHGDIA	Rho GDP-dissociation inhibitor 1
ACTB_HUMAN	ACTB	Actin, cytoplasmic 1
PDIA1_HUMAN	P4HB	Protein disulfide-isomerase
ACTS_HUMAN	ACTA1	Actin, alpha 1, skeletal muscle
FETUA_HUMAN	AHSG	Alpha-2-HS-glycoprotein

2.2. Protein-Protein Interaction (PPI) Network of 39 Secreted Proteins Enriched in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma

The PPI network and gene ontology (GO) of the 39 proteins were generated using the Search Tool for Retrieval of Interacting Genes (STRING) database [101]. Data from this database revealed a complex interaction network between 26 proteins with strong associations represented by thick lines; the disconnected nodes in the network were hidden (Figure 3). Gene Ontology analysis revealed significant protein enrichment in categories of extracellular exosomes, membrane-bound vesicles, extracellular part, and blood microparticles (Figure 3 and Table 4). This analysis also showed involvement in biological processes such as glycolysis, regulation of apoptotic processes, vesicle-mediated transport, and stress response. The enriched molecular function was enzymatic and RNA binding (Table 4). These results further confirm our findings showing that the proteins identified in our integrative pancreatic cancer secretome meta-analysis are secreted and located mainly in extracellular compartments.

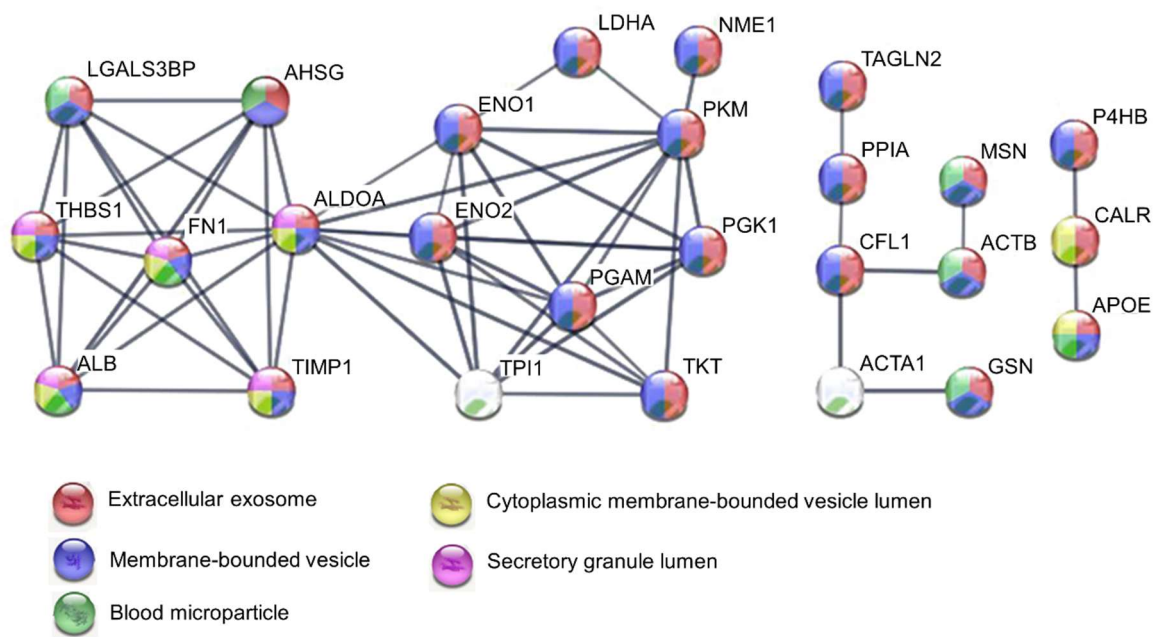


Figure 3. Protein-protein interaction network of 39 secreted proteins enriched in pancreatic ductal adenocarcinoma. Analysis using STRING [101] illustrates potential interactions between secreted proteins with a minimum confidence score of 0.7. Proteins in the interaction network are represented as nodes connected by lines whose thickness reflects a confidence index higher than 0.7. The top five enriched GO terms are represented by the network node colors for each protein: red, extracellular exosome; blue, membrane-bounded vesicle; green, blood microparticle; yellow, cytoplasmic membrane-bounded vesicle lumen; purple, secretory granule lumen.

Table 4. Gene Ontology (GO) enrichment analysis of secreted proteins in pancreatic cancer.

Cellular Component (GO)			
Pathway ID	Pathway Description	Gene Count	FDR
GO.0070062	Extracellular exosome	35	1.29×10^{24}
GO.0031988	Membrane-bounded vesicle	34	4.57×10^{20}
GO.0005615	Extracellular space	25	1.79×10^{19}
GO.0044421	Extracellular region part	31	3.35×10^{15}
GO.0072562	Blood microparticle	11	1.15×10^{14}
GO.0005576	Extracellular region	31	4.02×10^{13}
GO.0060205	Cytoplasmic membrane-bounded vesicle lumen	8	4.29×10^{10}
GO.0034774	Secretory granule lumen	6	2.35×10^7
GO.0005925	Focal adhesion	9	1.88×10^6
GO.0031093	Platelet alpha granule lumen	5	2.83×10^6
GO.0031091	Platelet alpha granule	5	7.61×10^6
GO.0044433	Cytoplasmic vesicle part	9	2.46×10^5
GO.0005829	Cytosol	19	3.4×10^5
GO.0030141	Secretory granule	7	7.44×10^5
Biological Process (GO)			
Pathway ID	Pathway Description	Gene Count	FDR
GO.0006165	Nucleoside diphosphate phosphorylation	9	1.99×10^{11}
GO.0006096	Glycolytic process	8	3.4×10^{11}
GO.0002576	Platelet degranulation	9	5.25×10^{11}
GO.0061621	Canonical glycolysis	7	5.25×10^{11}
GO.0019674	NAD metabolic process	8	8.75×10^{11}
GO.0046496	Nicotinamide nucleotide metabolic process	8	1.47×10^9

Table 4. Cont.

Biological Process (GO)			
Pathway ID	Pathway Description	Gene Count	FDR
GO.0030168	Platelet activation	10	5.73×10^9
GO.0046364	Monosaccharide biosynthetic process	7	5.73×10^9
GO.0009611	Response to wounding	14	9.81×10^9
GO.0006090	Pyruvate metabolic process	7	1.09×10^8
GO.0042981	Regulation of apoptotic process	17	1.51×10^8
GO.0042060	Wound healing	13	3.84×10^8
GO.0006094	Gluconeogenesis	6	8.46×10^8
GO.0016192	Vesicle-mediated transport	15	1.23×10^7
GO.0006950	Response to stress	23	1.39×10^7
Molecular Function (GO)			
Pathway ID	Pathway Description	Gene Count	FDR
GO.0005515	Protein binding	24	0.000171
GO.0019899	Enzyme binding	12	0.00461
GO.0044822	Poly(A) RNA binding	11	0.0069
GO.0003723	RNA binding	12	0.0117
GO.0004634	Phosphopyruvate hydratase activity	2	0.0174

2.3. Secretome-Related Gene Expression is Enriched in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma

The gene expression levels of the secretome proteins identified in our integrative meta-analysis were analyzed using the online Gene Expression web-based Profiling Analysis (GEPIA) tool [102]. This tool allows the comparison of transcriptome profiles from TCGA and GTEx using uniformly processed and unified RNA sequencing data by Toil Pipeline [103]. We obtained gene expression profiles of 4743 tumors comprising 10 cancers (TCGA) and 2737 corresponding normal tissues (TCGA and GTEx) (Table S6). The tumors types: gastric carcinoma (GC), colon adenocarcinoma (COAD), Hepatocellular carcinoma (HCC), Lung squamous cell carcinoma (Lung SCC), Breast carcinoma (BC), Head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC), Esophageal carcinoma (ESCC), Lung adenocarcinoma (Lung AD), and Acute myeloid leukemia (AML) were selected to allow a comparison between some prevalent cancers. The expression profile of the 39 genes encoding secreted proteins was analyzed using the GEPIA tool to identify prognostic biomarkers of pancreatic ductal adenocarcinoma. The analysis revealed that 31 genes are significantly upregulated in PDAC (Log2 fold change > one and q -values cutoff = 0.01) when compared to normal tissues (Figure 4). When we extended the analysis to other TCGA cancers types, the gene expression profile of the 39 secreted-related proteins genes was enriched in PDAC, despite sharing a high number of significantly upregulated genes with other cancers types such as GC, COAD, and HCC (Figure 5, Figure S1A). In this analysis, we can also observe that *ARHGDIA* and *PARK7* are exclusively upregulated in PDAC (Figure S1A). The Euclidean cluster analysis performed on the 39 secretome genes demonstrates that PDAC exhibits a gene expression profile that is clearly distinct from other cancers (Figure 5). This analysis also demonstrated the opposite expression profile for acute myeloid leukemia (AML) (Figure 5). The principal component analysis (PCA) of the expression profiles of the 39 secretome genes in 10 tumor types showed that PDAC and AML are distinguished between cancer types based on the gene expression profile of the 39 secretome proteins and are capable of clearly distinguish PDAC from other cancer types (Figure S2).

We also evaluated the expression profile of the secretome proteins in normal tissues in order to find pancreas-specific proteins deregulated in PDAC. With the help of the GTEx database [104], the expression profiles of the majority of the proteins identified in our study are uniformly expressed across the tissues analyzed (Figure S1B); however, trypsin-1 (*PRSSI*) is upregulated explicitly in normal pancreatic tissue when compared to other normal tissues (Figure S1B). Interestingly, we found that

PRSS1 is negatively expressed in PDAC (Figure 4 and 5), although it has often been related to pancreatic cancer [105,106].

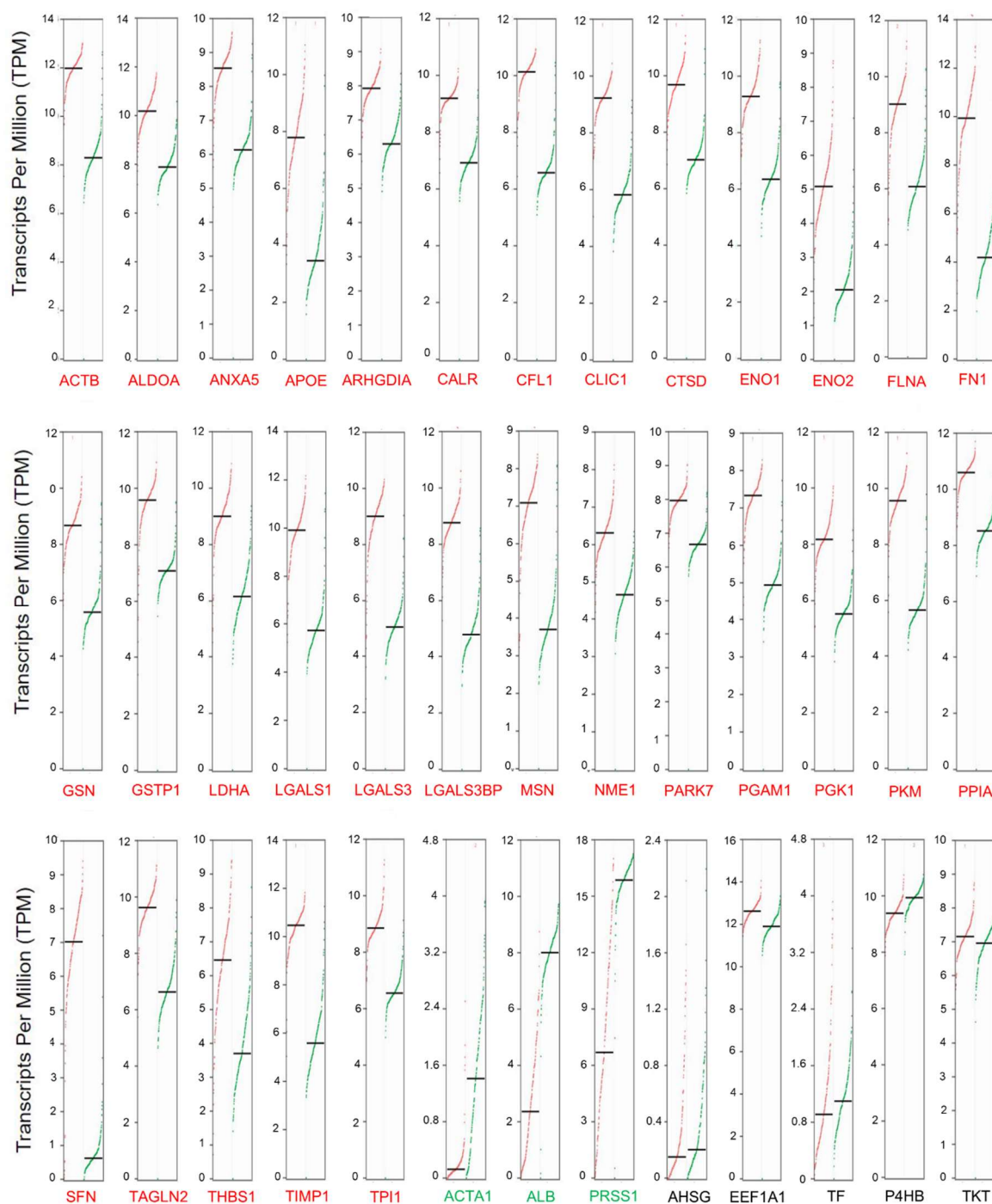


Figure 4. Differential gene expression of transcripts translated into secreted proteins in pancreatic ductal adenocarcinoma. Differential expression levels were calculated using the web-based Gene Expression Profiling Analysis tool (GEPIA) [102]. GEPIA analysis revealed that most of the 39 genes of the proteins identified as secreted are positively regulated in pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC). Genes were considered positively or negatively regulated (written in red and green, respectively) in PDAC ($n = 179$) relative to normal tissue (TCGA, $n = 4$; GTEx, $n = 167$) when absolute values of fold-change were >1.0 and the q -value < 0.01 (ANOVA). Red dots: pancreatic tumor samples; Green dots: normal pancreatic samples.

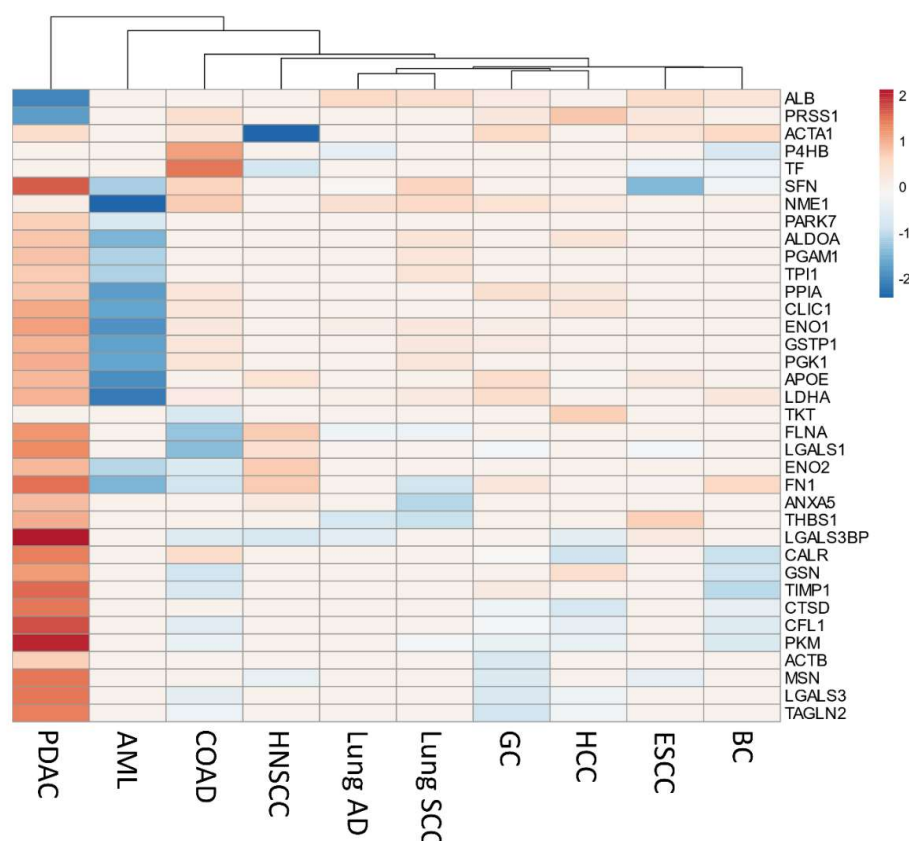


Figure 5. The upregulation of secretome genes is strongly associated with pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC). Heatmap of expression levels of genes [$\log_2$ (TPM + 1)] encoding 39 secreted proteins identified as secreted in PDAC, in 10 different tumor types from TCGA compared to their respective normal tissues. Genes that are specifically upregulated or downregulated genes in each tumor type (absolute values of fold-change > 1.0 and q -value < 0.01; ANOVA) are shown in red and blue, respectively. Both columns (tumor types) and rows (secretome genes) were clustered using Euclidian distance. Three genes (*ARHGDI1*, *AHSG*, and *EEF1A1*) presented missing values in 90%–100% of the tumor types and are not represented in the heatmap (constant rows were removed during data pre-processing). The differential expression levels from tumor tissue versus combined normal TCGA and GTEx data were calculated using the web-based Gene Expression Profiling Analysis tool (GEPIA) [102]. GC: Gastric carcinoma; COAD: Colon adenocarcinoma; HCC: Hepatocellular carcinoma; Lung SCC: Lung squamous cell carcinoma; BC: Breast carcinoma; HNSCC: Head and neck squamous cell carcinoma; ESCC: Esophageal squamous cell carcinoma; Lung AD: Lung adenocarcinoma; AML: Acute myeloid leukemia.

2.4. Secretome-Related Gene Expression Profile of 39 Proteins Predict Shorter Survival in Patients with Pancreatic Ductal Adenocarcinoma

Secretome components from the tumor environment, including proinflammatory cytokines, play a fundamental role in the development of alterations that result in proliferation, metastasis, and resistance to treatments [32,36,44]. Considering that these alterations contribute to the worse prognosis of patients with PDAC, we determine whether the levels of tumor expression of the 39 secretome genes correlate with the patient's prognosis. We used the SurvExpress platform [107], a web-based biomarker validation tool that provides survival analysis and risk assessment of cancer datasets, to assess whether our set of secretome proteins was able to discriminate overall survival in patients with PDAC. SurvExpress generated a prognostic index (risk score) based on gene expression of the 39 secretome proteins and survival data of the patients with PDAC. These patients were divided into two groups, high- and low-risk, maximizing the number of patients in risk groups by employing

an ordered prognostic index optimization algorithm in SurvExpress (Table S7). We evaluated the prognostic value of the gene expression of the 39 secreted proteins and analyzed their association with survival of patients with PDAC (Cox regression analysis) in four different data sets with patient survival information (TCGA, PACA-AU—ICGC, GSE21501, GSE28735). The 39 secretome genes initially analyzed in the TCGA dataset identified patients with significantly shorter survival (hazard ratio (HR) = 5.36; log-rank p -value = 1.16×10^{-16} ; concordance index (CI) = 74.75; n = 176). In order to validate our findings, survival analysis was performed on three additional independent data sets. These 39 secretome genes were also significantly associated with patient's outcome in the ICGC datasets (HR = 4.42; CI = 72.57, p = 6.661×10^{-16} , n = 189), GSE21501 (HR = 7.46; CI = 76.68; p = 2.144×10^{-10} ; n = 132), and GSE28735 (HR = 11.69; CI = 84.52; p = 2.22×10^{-15} ; n = 90) (Figure 6). This analysis also demonstrated increased expression of *LDHA*, *ENO1*, and *PGK1* in the TCGA, PACA-AU—ICGC, and GSE21501 datasets; *NME1* was upregulated in all PDAC datasets (Table S8). Enrichment of secretome genes in PDAC patients with low survival (high-risk group) can be observed in the heatmap generated by cluster gene expression analysis (Figure S3). This shows the robustness of the gene expression signature of our set of secreted proteins, which demonstrated significant association with patient survival in the independent PDAC validation sets.

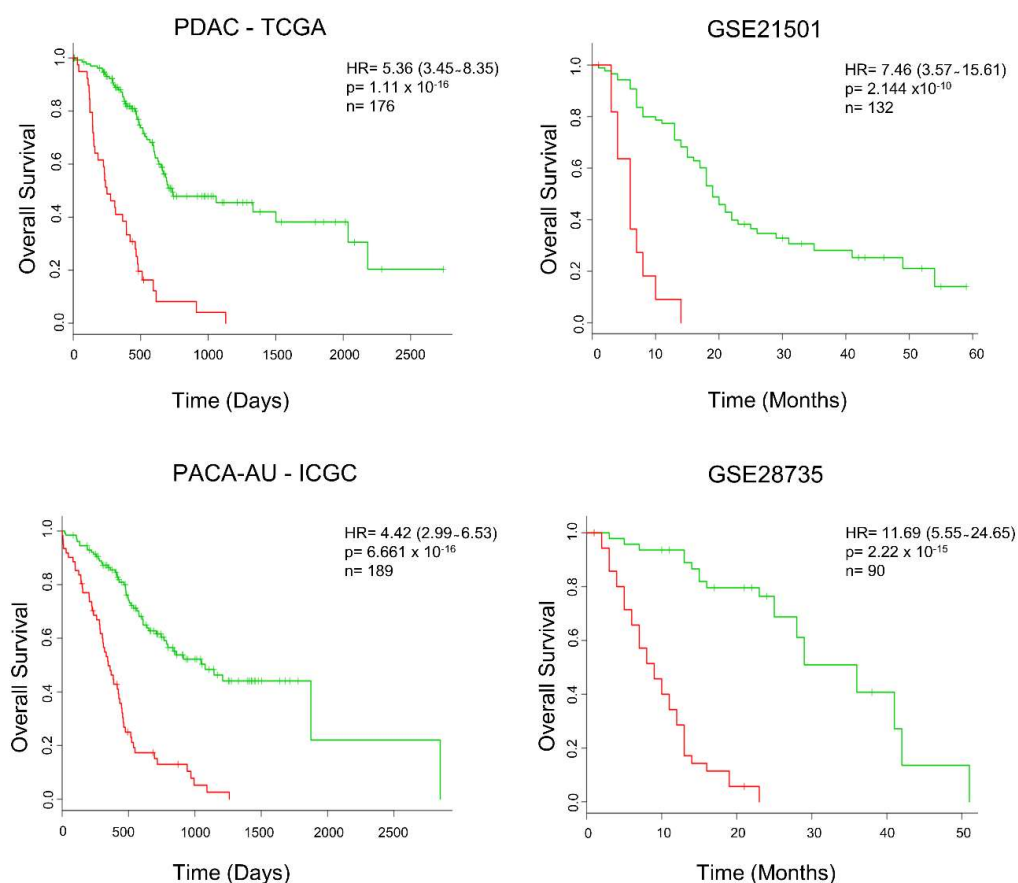


Figure 6. The expression of secretome genes predicts cancer outcomes across four pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) studies. Survival analysis, based on the expression of 39 mRNAs translated into proteins identified as secreted in PDAC, was calculated using the online platform SurvExpress [107], in four additional and independent PDAC datasets. Cancer patients were stratified into high- (red) and low-risk (green) groups. The adjusted risk ratio (HR) with the corresponding 95% confidence interval, log-rank p -value (P), and the number of successfully stratified patients (N) determined by Cox univariate regression analysis is shown in each Kaplan–Meier survival plot. Datasets of PDAC patients: PDAC-TCGA [108], PACA-AU—ICGC [109], GSE21501 [19], and GSE28735 [20,79].

2.5. Secretome Gene Expression Predicts Cancer Outcomes in Different Cancer Studies

Considering that several of our 39 secretome genes are upregulated in other cancer types, we decided to evaluate the prognostic value of the genes in the additional nine different malignancies from TCGA. We found that, in addition to PDAC, our set of 39 genes of secretome-related proteins predicts a worse prognosis in HNSCC, ESCC, GC, HCC, Lung SCC, Lung AD, COAD, BC, and AML (Figure 7 and Table S9). The heatmap for each of these cancer types shows that the expression profile of our set of 39 secretome-related proteins is able to distinguish patients into high- and low-risk groups (Figure S3). The robustness of our 39 secretome genes in stratifying patients with high confidence in risk-groups was confirmed by high hazard ratios in nine TCGA cohorts, showing that changes in the expression of these 39 secretome genes are associated with worse overall survival (Figure 7). Therefore, these results suggest that the set of these 39 secretome genes are predictors of cancer survival outcomes.

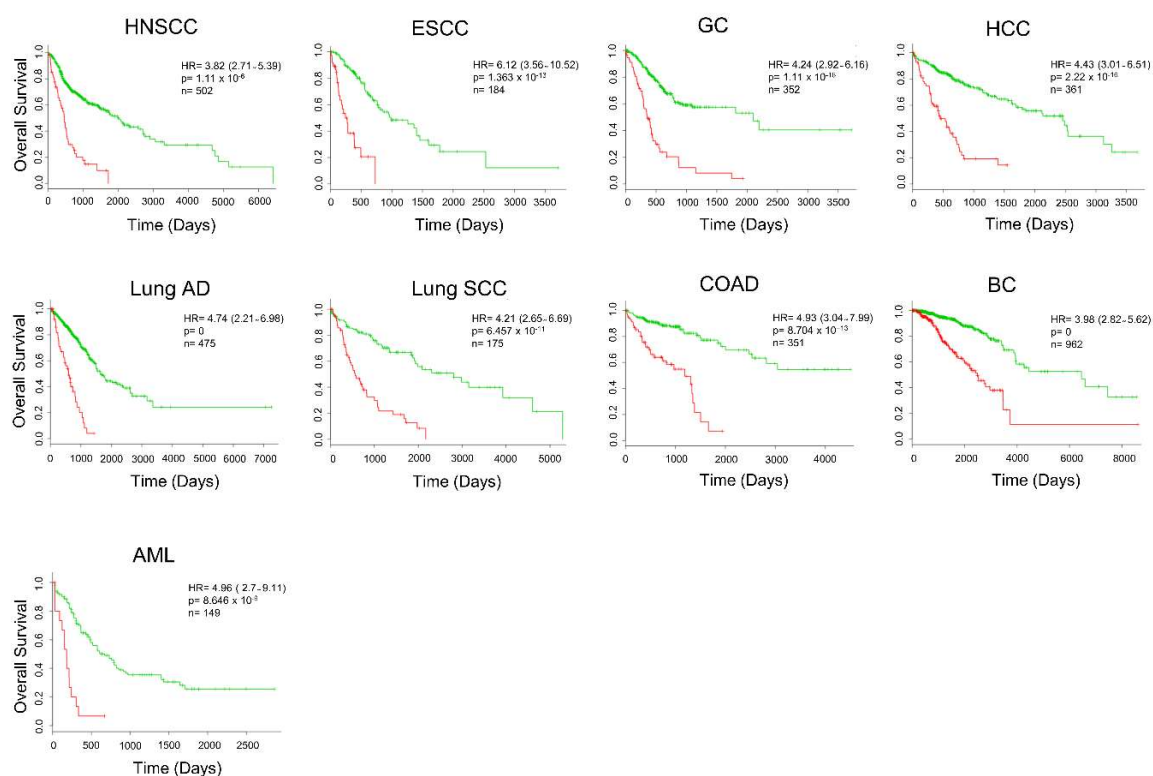


Figure 7. The expression of secretome genes predicts cancer outcomes. Survival analysis based on the expression of 39 transcripts translated into secreted proteins by using the online platform SurvExpress [107] in nine The Cancer Genome Atlas (TCGA) studies. Cancer patients were stratified into high- (red) and low-risk (green) groups. The adjusted risk ratio (HR) with the corresponding 95% confidence interval, log-rank p -value (P), and the number of successfully stratified patients (N) determined by Cox univariate regression analysis is shown in each Kaplan–Meier survival plot. HNSCC: Head and neck squamous cell carcinoma; ESCC: Esophageal squamous cell carcinoma; GC: Gastric carcinoma; HCC: Hepatocellular carcinoma; Lung AD: Lung adenocarcinoma; Lung SCC: Lung squamous cell carcinoma; COAD: Colon adenocarcinoma; BC: Breast carcinoma; AML: Acute myeloid leukemia.

2.6. Comparison with Prognostic Gene Signatures of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma

Several prognostic gene signatures for PDAC have been proposed [17–24,110]. However, we found no gene overlapping with our set of secreted-related genes with these previous signatures from the literature. We also compared the performance of our signature with nine gene expression signatures [17–24,110] in predicting worse survival in PDAC, which was tested in four different PDAC

datasets (TCGA, ICGC, GSE21501, GSE28735) available in the SurvExpress tool. These signatures were able to separate risk-groups based on the gene expression profiles (data are not shown). The signatures proposed by Collisson et al. [23] and Donahue et al. [18] showed slightly better results than the set of secretome-related genes identified in our meta-analysis; however, Donahue's signature, which corresponds to a set of 171 genes, had a lower performance in the dataset GSE28735 (Figure 8). Our signature also had comparable results with Haider et al. [22] (Figure 8). However, it is important to emphasize our dataset comprises proteins that are expressed and secreted in PDAC, constituting a rich source of biomarkers.

2.7. In Silico Validation of Secreted Proteins

Immunohistochemical staining for 31 proteins identified with increased gene expression in PDAC tumoral samples by the GEPIA was retrieved from the HPA database [111]. PDAC immunohistochemical images were analyzed, and six proteins (L-lactate dehydrogenase A chain, LDHA; Phosphoglycerate kinase 1, PGK1; Pyruvate kinase, PKM; 14-3-3 protein sigma, SFN; Fibronectin, FN1; Galectin-1, LGALS1) showed medium or high immunostaining in PDAC tumor tissue, while low or not detected in normal pancreatic tissue, indicating that these proteins are also potentially biopsy-based markers to screening PDAC patients with high-risk (Figure 9 and Figure S4). Additionally, four proteins (Triosephosphate isomerase, TPI1; Galectin-3, LGALS3; Galectin-3-binding protein, LGALS3BP; Filamin-A, FLNA) showed average immunostaining in normal tissue and high in tumor tissue (Figure S4).

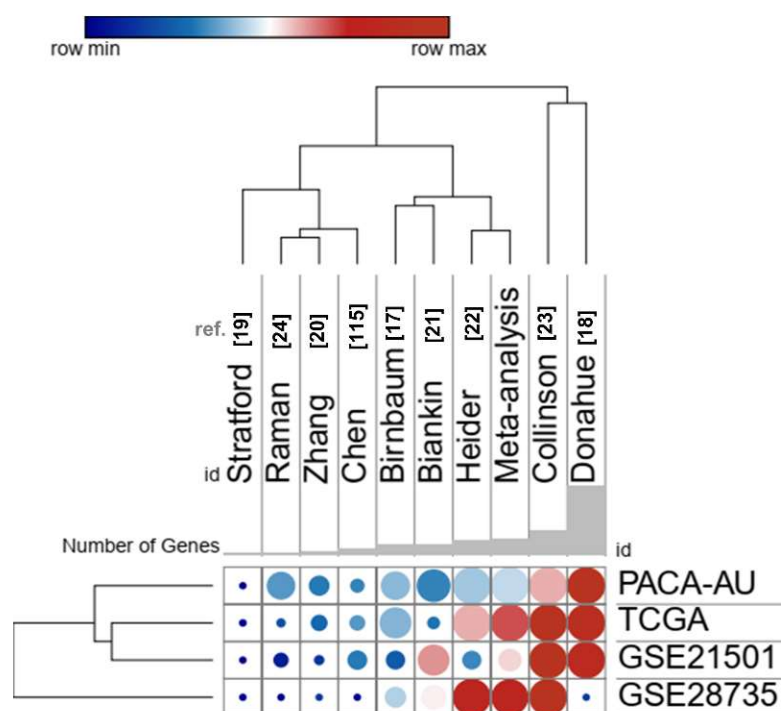


Figure 8. Performance of expression profile from the 39 secretome genes as potential pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) biomarkers compared to nine previously gene signatures proposed for PDAC [17–24,110]. The color of the circles in the heat scatter plot represents the agreement index, while the size of the circle is based on the log-rank p -value of the risk group separation based on the SurvExpress tool. Rows and columns were grouped based on the Euclidean distance between the agreement index values. Datasets of PDAC patients: PDAC-TCGA [108], PACA-AU—ICGC [109], GSE21501 [19], and GSE28735 [20,79].

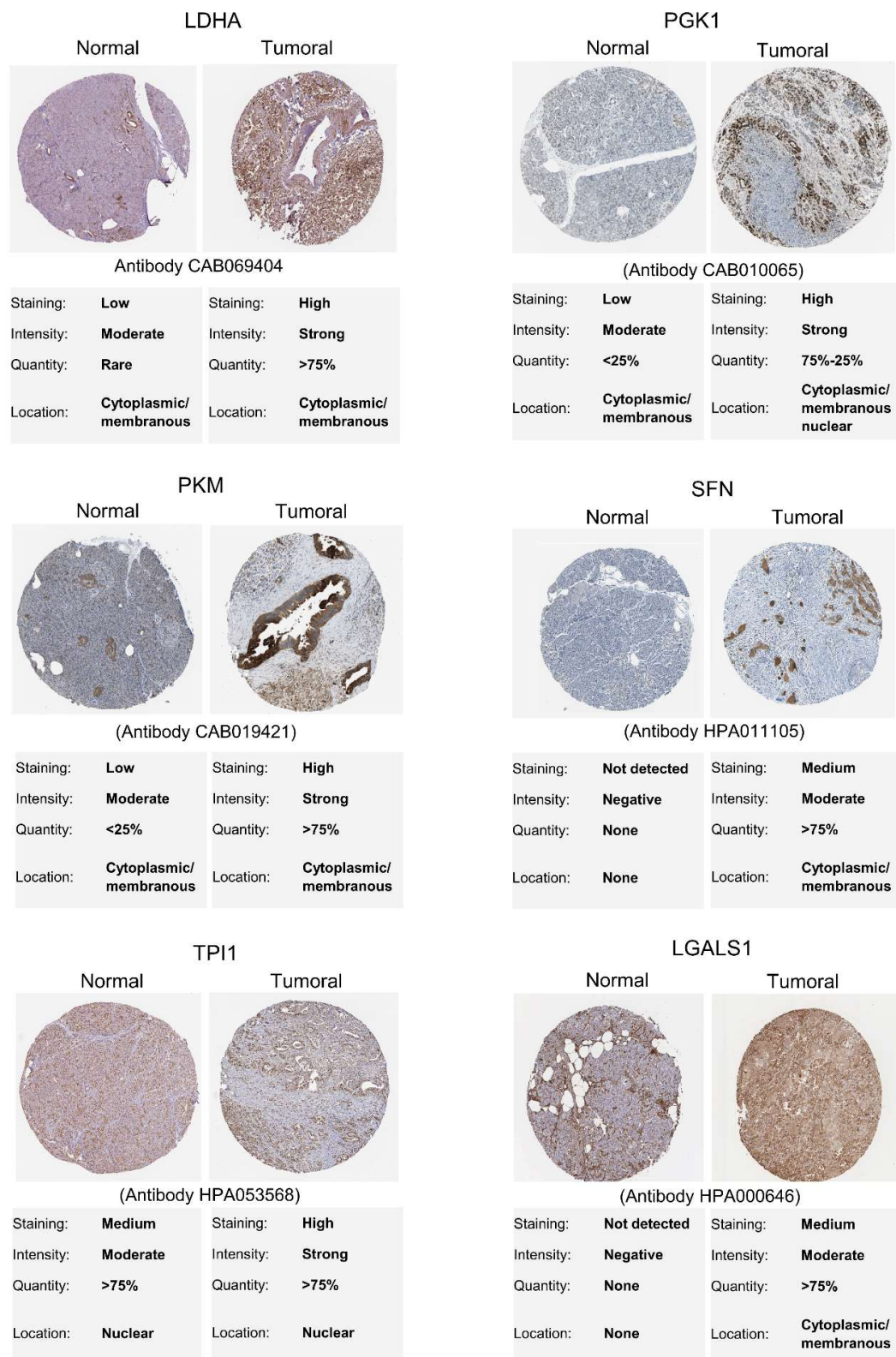


Figure 9. Identification of secreted proteins in normal and pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) tissues using immunohistochemical staining data available at the Human Protein Atlas database [111]. These proteins were selected based on their significant increased gene expression, as identified using the GEPIA tool [102].

3. Discussion

Several studies have focused on the investigation of PDAC secretome-proteome in order to identify molecular mechanisms and biomarkers of this malignancy. However, the molecular complexity of pancreatic cancer and the failure of validation for most proposed biomarkers increase the urgency of effective strategies for identifying promising biomarkers of the disease. The heterogeneity of pancreatic cancer proteomic research using different samples, and fractionation and mass spectrometry techniques generates a rich source of datasets that can be explored, integrated, and compared to identify potential biomarkers of the disease. Here, we integrated the proteomic profiles of pancreatic cancer cell lines and tumors obtained by a meta-analysis of the secretome and proteome. This analysis identified 39 biologically relevant secreted proteins in PDAC. The gene expression profile of these proteins predicted worse overall survival in four independent cohorts of PDAC patients. The expression of these secretome-related genes also predicted worse overall survival in nine additional tumor types from the TCGA. Our meta-analysis approach using different proteomic datasets provided higher statistical power to address the biological heterogeneity of PDAC as well as overall patient survival. This strategy allowed us to identify a panel of proteins in pancreatic cancer proteomic studies, which are potential prognostic biomarkers.

Our approach also demonstrated the lack of overlap between the studies selected by the two meta-analysis strategies. We found no protein shared between all secretome and proteome studies. This discrepancy may be due to the diversity of proteomic techniques used by different studies; or limitations in proteomic analysis related to sample preparation and sample heterogeneity, proteome complexity to be analyzed, especially regarding protein expression levels; and limitations of the analytical methods [112–115]. To overcome these limitations, we selected the proteins presented in two or more studies, aiming to increase the possibility of detecting proteins involved in pancreatic cancer. We also integrated both secretome and proteome meta-analysis to select tumor proteins that are secreted or found in biological fluids. When we compared our list of 39 secretome proteins with PDAC gene signatures from the literature, we found no overlap between these previous studies [17–24,110]. This may be because global gene transcription levels insufficiently reflect global protein levels or due to limitations related to the sensibility of proteomics techniques, which point to the need to integrate transcriptomic and proteomic analyses to identify critical molecular changes of cancer in its essence [112,115–118]. Interestingly, our results show that tumor transcription levels of our set of proteins that are expressed and secreted in pancreatic cancer are useful as potential prognostic biomarkers when compared to previously proposed transcript-based signatures for PDAC.

We found a set of differentially expressed proteins with prognostic power that are biologically important in human cancers. For example, albumin (ALB), which was listed in 10 proteome and three secretome studies, has been identified as a poor prognostic factor in cancer patients [119,120]. Serum ALB is the most abundant blood protein in mammals; however, in diseases such as PDAC, its low level may be associated with an advanced stage of the disease [120]. The lower serum ALB levels can increase the risk of venous thromboembolism, which is the second leading cause of death in pancreatic cancer patients [119,121,122]. Triosephosphate Isomerase 1 (TPI1), found in seven secretome and four proteome studies, is a crucial enzyme in carbohydrate metabolism. Proteomic analysis of sera from pancreatic cancer patients showed TPI1 as one of the most abundant proteins in patients with poor survival before and after chemotherapy and could be further investigated as a prognostic marker as its levels gradually increase as the disease progresses [123]. The prognostic value TPI1 was also evaluated in gastric cancer, where patients with higher TPI1 expression had lower overall survival [124].

We also identified the alpha-enolase (ENO1), a glycolytic enzyme involved in the synthesis of pyruvate found in the cytoplasm, cell surface, and nucleus [125]. In addition to its glycolytic function, ENO1 plays a crucial role in cancer cell invasion and metastasis, in part because it also acts as a plasminogen receptor [126–130]. This ENO1 plasminogen receptor function, coupled with its high expression on the cell surface of tumor cells, facilitates the binding of large amounts of plasminogen on the cell surface, enabling plasmin activation, and enhancing the ability of PDAC cells to degrade

extracellular matrix and, thus, benefiting the tumor invasion [127]. ENO1 also regulates pancreatic cancer adhesion, invasion, and metastasis by controlling the expression of $\alpha v \beta 3$ integrin [128]. The $\alpha v \beta 3$ integrin signaling is known to play a crucial role in tumor growth, angiogenesis, and metastasis. The protein $\alpha v \beta 3$ integrin is the target of preclinical experiments in cancer treatment, demonstrating positive anti-angiogenic and anti-tumor effects [131,132]. These effects have been observed for cell surface ENO1, which has been found as significantly increased in tissues and plasma of PDAC patients with shorter survival [133]. Thus, further studies should be performed to investigate the role of secreted ENO1 in tumor biology. Additionally, ENO1 has also been seen as a potential prognostic biomarker in breast, head and neck cancers, and gliomas [125,134,135].

Our enrichment analysis also showed changes in the regulation of glycolytic processes. Increased aerobic glycolysis (Warburg effect) is observed exclusively in cancers and is highly dependent on unregulated metabolic enzymes [136]. In addition to the glycolytic enzymes ENO1 and TPI1, lactate dehydrogenase A (LDHA) was also identified in our study and corresponds to a central enzyme in regulating the Warburg effect; it catalyzes the conversion of lactate to pyruvate in the final stage of anaerobic glycolysis and is upregulated in various cancers [137,138]. In gastric cancer, LDHA was upregulated in tumor tissues and promoted tumor cell migration and invasion [137]. Moreover, LDHA has been reported to improve growth and inhibit apoptosis in pancreatic tumor cells [138]. Mohammad et al. [139] showed that increased expression of LDHA and PKM2 in pancreatic biopsy specimens from patients correlates with poor survival. Studies investigating the LDH expression levels in tumor and serum found that high tissue expression is not entirely consistent with elevated serum levels, indicating that tumor LDHA expression and serum levels are two independent predictors of the disease [140]. In our analysis, LDHA was identified in six secretome studies and only two from the proteome, suggesting that this enzyme may be secreted to perform its functions in tissues distant from the primary tumor focus, exacerbating the tumor progression. In addition to its prognostic role, further studies verifying the biological significance of serum LDHA levels need to be performed. Therefore, the high expression of glycolytic enzymes combined with their canonical and non-canonical functions may partly explain the aggressiveness of cancers, such as the pancreatic, influencing different prognostic outcomes and playing a pivotal role in defining personalized treatments [123,141].

Nucleoside diphosphate kinase A (NME1/NDPK-A) is a tumor suppressor with increased expression in different PDAC datasets and in other cancers types. The increased expression may be linked to anticancer mechanisms, as it exhibits anti-metastatic function [142]. Several studies support our findings, showing that NME1 is highly expressed in pancreatic cancer samples and predicts worse prognosis in patients [143–145]. Contrary to our results, Liu et al. [146], evaluated the prognostic value of NME1 by meta-analysis and concluded that negative regulation of NM1 was associated with a poor prognosis in breast, esophageal, nasopharyngeal, and lymphoma cancer. Negative regulation and worse prognosis of NME1 was also demonstrated in colon cancer [147]. Further investigations are needed to clarify the controversy between NME1 expression in other cancer types to address the relationship between expression and clinicopathological features.

Pancreatic cancer chemotherapeutic resistance is one of the characteristics that make it so aggressive. Among our protein pool, we found Galectin-1 (LGALS1), a glycan-binding protein that is highly expressed in PDAC stroma, and a significant contributor to pancreatic cancer progression [148]. Increased LGALS1 expression in cancer cells such as lung, liver, ovarian, glioblastoma, and lymphoma has been associated with drug resistance (temozolomide, sorafenib, rituximab, and cisplatin) [149–156]. Proteins with increased expression in cancers identified here, such as Galectin-3 (LGALS3), Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A (PPIA), Alpha-enolase (ENO1), L-lactate dehydrogenase A chain (LDHA), Protein/nucleic acid deglycase DJ-1 (PARK7), and Cathepsin D (CTSD), also confer resistance to chemotherapy [157–165]. These proteins use PI3K/AKT and AKT/NF κ B pathways to inhibit apoptotic processes and promote survival in cancer cells [149,153,158,159,166,167]. Our results suggest that increased expression of secreted proteins identified in our integrative

meta-analysis is also likely to be involved in the chemotherapy resistance processes, which in turn contributes to cancer progression and pancreatic cancer lethality.

Our meta-analysis used proteomic data, while our validation was performed with TCGA transcriptomic data. However, only one-third of the RNA species are significantly correlated with the corresponding proteins in human cells [168]. Thus, it is essential to emphasize that a combination of different factors influences a direct association between protein levels and their coding transcripts. These include the availability of a wide range of resources for protein biosynthesis, as well as temporal and spatial variations resulting from transcriptional and post-transcriptional mechanisms that control gene expression [26,169,170]. Previous integrated multi-platform analysis in PDAC has revealed associations of non-coding RNAs with tumor-specific mRNA subtypes [171]. These authors also showed that the differential regulation of gene expression via DNA methylation and microRNAs (miRNAs) could also distinguish tumor subtypes [171]. Recently, our research group has provided data on the role of miRNAs in the regulation of gene networks, including pathways of the adaptive and innate immune response involved in PDAC [172]. Thus, although transcript levels are not enough to predict protein levels in different conditions, the expression of 31 genes out of the 39 identified in our PDAC proteome-secretome meta-analysis was found upregulated in PDAC samples.

The transcripts and proteins identified in our study have the potential to be used in conjunction with miRNAs to increase the sensitivity and specificity of the PDAC diagnosis. To exemplify this point, the TIMP1 protein—which was identified in our study—has been indicated along with LCN2 as potential serum markers for the early detection of familial pancreatic cancer [173]. However, the combination of both LCN2 and TIMP1 with miR-196b was able to distinguish high-grade lesions and stage I from controls with absolute sensitivity and specificity [174]. Also, in accordance with our data, plasma extracellular vesicle long RNA profiling has identified a diagnostic signature, which includes the *TIMP1* transcript, for the detection of pancreatic cancer [175]. This increased detection of TIMP1 transcript and protein might be partially explained by the effects of miRNAs such as miR-221/222 and miR-21. These miRNAs are overexpressed in pancreatic cancer cells, and, as a result, they promote cellular proliferation, invasion, and chemoresistance by targeting TIMP-2 or inducing the expression of the invasion-related genes matrix metalloproteinase-2 and -9 [176,177].

The additional TCGA cancer types that we analyzed also shared many upregulated genes of the 39 secretome-related proteins, indicating that, at least in part, these tumors may share programs that promote oncogenesis and cancer progression. Some studies suggest that cancer may be categorized by gene and protein expression patterns of the secretome since similarities are observed between tumors originating from different tissues [134,178,179]. An explanation for these similarities is proposed by Robinson et al. [179], which shows a potential mechanism by which cancer cells relieve secretory stress by decreasing tissue-specific gene expression, facilitating the secretion of invasion-promoting proteins and proliferation. Recently, we have demonstrated that tumor types highly associated with cachexia share a high number of upregulated secretome genes [178]. These observations are in accordance with our findings since only *PRSS1* was explicitly expressed in the normal pancreas among the 39 proteins that we identified. However, it is important to note that *ARHGDIA* (Rho GDP-dissociation inhibitor 1) and *PARK7* (Protein/nucleic acid deglycase DJ-1) are specifically upregulated in PDAC, and the increased expression of *ARHGDIA* and *PARK7* can be considered as potential biomarkers of the disease. *ARHGDIA*—a specific regulator of Rho protein exchange reactions crucial for JNK pathway—was previously identified by a bioinformatic pipeline that searched for candidate genes related to pancreatic cancer using protein-protein interactions and a shortest path approach [180]. Also, in accordance with our results, *PARK7* was found to be significantly elevated in PDAC [181], correlated with tumor invasion and worse patients' outcome, and responsible for promoting invasion and metastasis of pancreatic cancer cells [182].

Our main contribution using this strategy consists of the selection of secreted proteins identified in pancreatic cancer proteomic analysis that stratify patients with low and high survival. However, our study has some limitations that should be pointed out, such as the reuse of proteomic data from

studies with different biological samples, different protein fractionation approaches, and different mass spectrometry techniques employed. Another limitation of our investigation was the use of proteins present only in the body of the studies, not extending to supplementary data, which could broaden our range of identified proteins. We also noticed that some proteins identified in our analysis correspond to high abundance proteins in samples, suggesting that less abundant proteins may not have been identified by the proteomic techniques used in the studies retrieved by our meta-analysis. Also, our gene expression and survival analysis were performed *in silico* with the help of databases and bioinformatics tools available online, and experimental validation of the secreted proteins identified in this meta-analysis may help to correlate the results obtained herein with patient's prognosis. Many of the observations made in this study were based on functions investigated at the cellular level, but the molecular mechanisms underlining the secretion of these proteins should be better studied, clarifying whether they are secreted to perform autocrine or paracrine functions, or if they have different functions and modes of action in different tissues. Thus, further research is needed to identify the molecular pathways and contributions of these secreted proteins in the pathophysiology of pancreatic cancer.

Importantly, the molecular subtyping of PDAC is in its infancy and remains without clinically relevant molecular subtypes [13]. Despite the extensive genomic characterization, gene signatures have provided limited prognostic information for the disease [183]. However, it is only by assessing the clinical importance of molecular subtypes that a relevant molecular profile may be identified [13].

4. Materials and Methods

4.1. Integration of Secretome and Proteome Meta-Analysis to Identify Pancreatic Cancer Biomarkers

We integrated two meta-analyses to identify proteins as potential biomarkers of pancreatic cancer: a meta-analysis of pancreatic cancer secretome and meta-analysis of pancreatic ductal adenocarcinoma proteome. We searched protein data identified in these studies, published from 2005 to 2017, through the PubMed Central (PMC) electronic database at the U.S. National Institutes of Health's National Library of Medicine (NIH/NLM). The study design of each meta-analysis followed the stages of the PRISMA statement [184].

4.1.1. Pancreatic Cancer Secretome Meta-Analysis

To search for pancreatic cancer secretome studies, we used the following keywords: pancreatic cancer, pancreatic cancers, pancreatic neoplasm, pancreas cancer, pancreas cancers, cancer of the pancreas, cancer of pancreas and secretome, "cell secretome", "cancer secretome", "secretome analysis", "secretome proteomic", "secretome proteomics", "secretome profiling", "secretome mass spectrometry", "microvesicles and proteome", "microvesicles and proteomic", "microvesicles and proteomics", "microvesicles and protein profiling", "microvesicles and mass spectrometry", "exosome and proteome", "exosome and proteomic", "exosome and proteomics", "exosome and protein profiling", "exosome and mass spectrometry", apoptotic bodies and proteome, apoptotic bodies and proteomic, apoptotic bodies and proteomics, apoptotic bodies and protein profiling, apoptotic bodies and spectrometry, extracellular vesicles and proteome, extracellular vesicles and proteomic, extracellular vesicles and proteomics, extracellular vesicles and protein profiling, extracellular vesicles and mass spectrometry, "secreted proteins" and proteome, "secreted proteins" and proteomic, "secreted proteins" and proteomics, "secreted proteins" and spectrometry mass, conditioned medium and proteome, conditioned medium and proteomic, conditioned medium and proteomics, "conditioned medium and protein profiling", conditioned medium, and spectrometry mass. The criteria for study inclusion in this meta-analysis were: proteomic studies in pancreatic cancer samples (tumor tissue or pancreatic sulcus) or pancreatic cancer cell lines; only mass spectrometry studies were considered, and only data with statistical significance were included for the integrative analysis. Studies were excluded if they did not meet the criteria mentioned above, conducted in non-pancreatic cancer, reviews, studies with treatments prior to proteomic analysis, studies without proteomic analysis,

in silico studies, unpublished studies, and studies published before 2005. As this analysis revealed that most studies involved in PDAC, we performed a meta-analysis of the proteome using only this histological type.

4.1.2. Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Proteome Meta-Analysis

To search for PDAC proteome studies, we used the following keywords: “pancreatic ductal adenocarcinoma” and proteome, “pancreatic ductal adenocarcinoma” and proteomic, “pancreatic ductal adenocarcinoma” and proteomics, “pancreatic ductal adenocarcinoma” and “protein profiling”, and “pancreatic ductal adenocarcinoma” and mass spectrometry. The following criteria were used to include studies in this meta-analysis: proteomic studies in human pancreatic ductal adenocarcinoma samples, only mass spectrometry studies were considered, studies that included normal tissues for comparison (case-control), and only data with statistical significance were included for the integrative analysis. Studies were excluded if they did not meet the criteria mentioned above or were studies on pancreatic ductal non-adenocarcinoma cancers, reviews, studies on experimental models, studies with treatments prior to proteomic analysis, studies without proteomic analysis, studies without case-control, studies without full access, in silico studies, protocols, and studies published before 2005.

4.2. Extraction of Meta-Analysis Data and in Silico Confirmation of Secreted Proteins

The studies were independently analyzed, and those that met the inclusion criteria were selected. The following information was extracted from each study: (1) study details: authors, year of publication, scientific journal, experimental model, mass spectrometry technique used, and validation strategies; (2) outcome measures: the proteins identified by the selected studies were tabulated to a Microsoft Excel file, mapped to the same gene symbol, and those identified simultaneously in two or more studies were selected for the study. The proteins shared between the two meta-analyses were identified by a Venn diagram tool (<http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/>).

To confirm that all proteins commonly identified in the meta-analysis (secretome and proteome) are secreted, their amino acid sequences (FASTA file) were obtained from the UniProtKB database from the UniProt consortium. Next, the amino acid sequences or symbols of each protein were used to predict secreted proteins using the online tools SignalP 4.1, SecretomeP 2.0, TargetP 1.1, TMHMM v. 2.0, Vesiclepedia e Exocarta [94–97,99,100]. The SignalP 4.1 server has selected classically secreted proteins that have the signal peptide and D value above 0.45 [94]. The predicted proteins belonging to the non-classical secretion pathway without signal peptide were selected with the aid of the SecretomeP tool, and the cut-off point used was the neural network score (NN) >0.6 [95]. The Vesiclepedia and Exocarta databases were used to designate secreted proteins in exosomal fractions [96,97]. After secreted proteins were established by either the classical, nonclassical pathways or exosomes, and these proteins were challenged on the TargetP and TMHMM servers [99,100] for the exclusion of mitochondrial or transmembrane helix proteins, respectively.

4.3. Protein-Protein Interaction Network and Gene Ontology Analysis

The proteins identified as secreted were submitted to the STRING database (Search Tool for Retrieval of Interacting Genes, version 10.5; [101] for the construction of a protein-protein interaction network and analysis of ontology of pancreatic cancer secretome components. For the construction of networks, we consider experiments, databases, co-expression, neighborhood, and co-occurrence as sources of active interaction. The minimum interaction score required was 0.700 (high confidence), and nodes disconnected from the network were hidden to simplify the display. The PPI enrichment *p*-value indicates the statistical significance provided by STRING. For ontology analysis, we consider the top 15 terms with the lowest False Discovery Rate (FDR). Access in September 2018.

4.4. Gene Expression Profile in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma

The transcriptional profile of genes encoding proteins identified in our meta-analysis as secreted in human pancreatic cancer was evaluated in 10 different cancers from the TCGA database [108] and compared with normal tissues from the TCGA and GTEx [104] databases after being uniformly processed and unified by Toil Pipeline [103] with the web-based Gene Expression Profiling Analysis tool (GEPIA) [102]. Differentially expressed genes between tumor samples and normal samples were determined by one-way ANOVA, applying the log2 fold-change > 1 and q-value <0.01 statistical cutoffs. These differentially expressed genes were further filtered for genes encoding predicted secreted proteins obtained from the HPA database (The Human Protein Atlas) [111], for 10 cancer types (PDAC, HNSCC, ESCC, GC, HCC, Lung AD, Lung SCC, COAD, AML, and BC) and compared with the set of secreted proteins identified by our meta-analysis. For data visualization, we constructed Heatmaps and performed Principal Component Analysis (PCA) in the ClustVis web tool [185]. Additionally, secreted proteins identified with corresponding increased gene expression in pancreatic tumor samples by GEPIA were submitted to the HPA database aiming at the immunohistochemical analysis of selected proteins in tumor and normal tissues.

4.5. Prognostic Value of Secreted Protein Translated Transcripts in the Predicting Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Outcome

The SurvExpress database [107] was used for survival analysis and risk assessment in four different datasets of PDAC patients (PDAC-TCGA [108], PACA-AU—ICGC [109], GSE21501 [19], GSE28735 [20,79]), and in nine different cancers types from TCGA [108]. This tool allowed the association between the expression of the 39 secreted genes identified in pancreatic cancer with the survival of cancer patients using Cox Proportional Risk Regression, according to risk groups estimated by an optimization algorithm. Morpheus [186] was applied to select the best set of biomarkers from SurvExpress results, using a clustering analysis based on Euclidian distance.

5. Conclusions

Our integrative secretome and proteome meta-analysis in pancreatic cancer identified a set of 39 secreted proteins as potential biomarkers of the disease. The tumor gene expression profile of these 39 proteins predicted shorter survival in four different PDAC datasets (TCGA, ICGC, GSE21501, GSE28735) and nine different cancer types from the TCGA. The differential expression profile of this set of secreted proteins predicted worse overall survival in cancer patients and may also be used as potential therapeutic targets by acting on progression and resistance processes of pancreatic cancer.

Supplementary Materials: The following are available online at <http://www.mdpi.com/2072-6694/12/3/716/s1>, Figure S1: Expression profile of 39 secretome genes in normal and tumor tissues from GTEx (Genotype-Tissue Expression) and TCGA (The Cancer Genome Atlas), respectively, Figure S2: Principal component analysis (PCA) of 39 secretome genes in 10 different tumor types from TCGA compared to their respective normal tissues, Figure S3: The expression profile of 39 secretome genes by PDAC stratifies patients into low- and high-risk groups, Figure S4: Validation of secreted protein expression in normal and pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) tissues using immunohistochemical staining available at the Human Protein Atlas database, Table S1: Total number of proteins identified in proteomic studies of pancreatic cancer, Table S2: Secretome proteins ($n = 156$) identified in two or more pancreatic cancer proteomic studies, Table S3: Proteins ($n = 132$) identified in two or more pancreatic cancer proteomic studies, Table S4: Selected studies and proteins included in the secretome and proteome pancreatic cancer meta-analyses, Table S5: Verification of secretion nature of 43 proteins, Table S6: The Cancer Genome Atlas (TCGA) and The Genotype-Tissue Expression (GTEx) samples used for gene expression analyses, Table S7: Expression of 39 secreted proteins based on samples from four different PDAC tumor data sets predicts poor overall survival, Table S8: Secretome genes with increased expression in high-risk groups from different datasets for PDAC in SurvExpress, Table S9: The expression of 39 secreted proteins based on The Cancer Genome Atlas (TCGA) tumor samples predicts poor overall survival.

Author Contributions: Conceptualization, G.d.O., P.P.R., and R.F.C.; Methodology G.d.O., P.P.F., S.S.C., D.d.M., J.S.O.; Formal analysis, G.d.O. and R.F.C.; Investigation, G.d.O., P.P.F., S.S.C., D.d.M., J.S.O.; Resources, P.P.d.R., M.D.-P.-S., R.F.C.; Data curation, G.d.O., P.P.d.R., M.D.-P.-S., R.F.C.; Writing—original draft preparation, G.d.O., and R.F.C.; Writing—review and editing, all authors; Supervision, R.F.C.; project administration, R.F.C.; Funding acquisition, M.D.-P.-S., and R.F.C. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was supported by the National Council for Scientific and Technological Development, CNPq (Process 311530/2019-2 to RFC) and by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, CAPES, Brasil, Finance Code 001 (scholarship to G.de-O.).

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Rahib, L.; Smith, B.D.; Aizenberg, R.; Rosenzweig, A.B.; Fleshman, J.M.; Matrisian, L.M. Projecting Cancer Incidence and Deaths to 2030: The Unexpected Burden of Thyroid, Liver, and Pancreas Cancers in the United States. *Cancer Res.* **2014**, *74*, 2913–2921. [\[CrossRef\]](#)
2. Bray, F.; Ferlay, J.; Soerjomataram, I.; Siegel, R.L.; Torre, L.A.; Jemal, A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J. Clin.* **2018**, *68*, 394–424. [\[CrossRef\]](#)
3. Makawita, S.; Smith, C.; Batruch, I.; Zheng, Y.; Rückert, F.; Grützmann, R.; Pilarsky, C.; Gallinger, S.; Diamandis, E.P. Integrated Proteomic Profiling of Cell Line Conditioned Media and Pancreatic Juice for the Identification of Pancreatic Cancer Biomarkers. *Mol. Cell. Proteom.* **2011**, *10*, M111.008599. [\[CrossRef\]](#)
4. Zhang, M.; Wang, Z.; Obazee, O.; Jia, J.; Childs, E.J.; Hoskins, J.; Figlioli, G.; Mocci, E.; Collins, I.; Chung, C.C.; et al. Three new pancreatic cancer susceptibility signals identified on chromosomes 1q32.1, 5p15.33 and 8q24.21. *Oncotarget* **2016**, *7*, 66328–66343. [\[CrossRef\]](#)
5. Jemal, A.; Siegel, R.; Ward, E.; Hao, Y.; Xu, J.; Thun, M.J. Cancer Statistics, 2009. *CA Cancer J. Clin.* **2009**, *59*, 225–249. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
6. Sitek, B.; Sipos, B.; Alkatout, I.; Poschmann, G.; Stephan, C.; Schulenburg, T.; Marcus, K.; Lu, J.; Dittert, D.; Baretton, G.; et al. Analysis of the Pancreatic Tumor Progression by a Quantitative Proteomic Approach and Immunohistochemical Validation research articles. *J. Proteome Res.* **2009**, 1647–1656. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
7. Kamisawa, T.; Wood, L.D.; Itoi, T.; Takaori, K. Pancreatic cancer. *Lancet* **2016**, *388*, 73–85. [\[CrossRef\]](#)
8. Yachida, S.; Jones, S.; Bozic, I.; Antal, T.; Leary, R.; Fu, B.; Kamiyama, M.; Hruban, R.H.; Eshleman, J.R.; Nowak, M.A.; et al. Distant metastasis occurs late during the genetic evolution of pancreatic cancer. *Nature* **2010**, *467*, 1114–1117. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
9. Liang, C.; Shi, S.; Meng, Q.; Liang, D.; Ji, S.; Zhang, B.; Qin, Y.; Xu, J.; Ni, Q.; Yu, X. Complex roles of the stroma in the intrinsic resistance to gemcitabine in pancreatic cancer: Where we are and where we are going. *Exp. Mol. Med.* **2017**, *49*, e406. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
10. Chand, S.; O'Hayer, K.; Blanco, F.F.; Winter, J.M.; Brody, J.R. The landscape of pancreatic cancer therapeutic resistance mechanisms. *Int. J. Biol. Sci.* **2016**, *12*, 273–283. [\[CrossRef\]](#)
11. Lewis, R.; Drebin, J.A.; Callery, M.P.; Fraker, D.; Kent, T.S.; Gates, J.; Vollmer, C.M., Jr. A contemporary analysis of survival for resected pancreatic ductal adenocarcinoma. *HPB* **2013**, *15*, 49–60. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
12. Ducreux, M.; Cuhna, A.S.; Caramella, C.; Hollebecque, A.; Burtin, P.; Goéré, D.; Seufferlein, T.; Haustermans, K.; Van Laethem, J.L.; Conroy, T.; et al. Cancer of the pancreas: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann. Oncol.* **2015**, *26*, v56–v68. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
13. Collisson, E.A.; Bailey, P.; Chang, D.K.; Biankin, A.V. Molecular subtypes of pancreatic cancer. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **2019**, *531*, 47–52. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
14. Kern, S.E.; Shi, C.; Hruban, R.H. The complexity of pancreatic ductal cancers and multidimensional strategies for therapeutic targeting. *J. Pathol.* **2011**, *223*, 296–307. [\[CrossRef\]](#)
15. Kleeff, J.; Korc, M.; Apte, M.; La Vecchia, C.; Johnson, C.D.; Biankin, A.V.; Neale, R.E.; Tempero, M.; Tuveson, D.A.; Hruban, R.H.; et al. Pancreatic cancer. *Nat. Rev. Dis. Prim.* **2016**, *2*, 16022. [\[CrossRef\]](#)
16. Fong, Z.V.; Winter, J.M. Biomarkers in Pancreatic Cancer. *Cancer J.* **2012**, *18*, 530–538. [\[CrossRef\]](#)
17. Birnbaum, D.J.; Finetti, P.; Lopresti, A.; Gilabert, M.; Poizat, F.; Raoul, J.L.; Delpero, J.R.; Moutardier, V.; Birnbaum, D.; Mamessier, E.; et al. A 25-gene classifier predicts overall survival in resectable pancreatic cancer. *BMC Med.* **2017**, *15*, 170. [\[CrossRef\]](#)
18. Donahue, T.R.; Tran, L.M.; Hill, R.; Li, Y.; Kovochich, A.; Calvopina, J.H.; Patel, S.G.; Wu, N.; Hindoyan, A.; Farrell, J.J.; et al. Integrative Survival-Based Molecular Profiling of Human Pancreatic Cancer. *Clin. Cancer Res.* **2012**, *18*, 1352–1363. [\[CrossRef\]](#)

19. Stratford, J.K.; Bentrem, D.J.; Anderson, J.M.; Fan, C.; Volmar, K.A.; Marron, J.S.; Routh, E.D.; Caskey, L.S.; Samuel, J.C.; Der, C.J.; et al. A Six-Gene Signature Predicts Survival of Patients with Localized Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *PLoS Med.* **2010**, *7*, e1000307. [[CrossRef](#)]
20. Zhang, G.; Schetter, A.; He, P.; Funamizu, N.; Gaedcke, J.; Ghadimi, B.M.; Ried, T.; Hassan, R.; Yfantis, H.G.; Lee, D.H.; et al. DPEP1 Inhibits Tumor Cell Invasiveness, Enhances Chemosensitivity and Predicts Clinical Outcome in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e31507. [[CrossRef](#)]
21. Biankin, A.V.; Waddell, N.; Kassahn, K.S.; Gingras, M.-C.; Muthuswamy, L.B.; Johns, A.L.; Miller, D.K.; Wilson, P.J.; Patch, A.-M.; Wu, J.; et al. Pancreatic cancer genomes reveal aberrations in axon guidance pathway genes. *Nature* **2012**, *491*, 399–405. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Haider, S.; Wang, J.; Nagano, A.; Desai, A.; Arumugam, P.; Dumartin, L.; Fitzgibbon, J.; Hagemann, T.; Marshall, J.F.; Kocher, H.M.; et al. A multi-gene signature predicts outcome in patients with pancreatic ductal adenocarcinoma. *Genome Med.* **2014**, *6*, 105. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Collisson, E.A.; Sadanandam, A.; Olson, P.; Gibb, W.J.; Truitt, M.; Gu, S.; Cooc, J.; Weinkle, J.; Kim, G.E.; Jakkula, L.; et al. Subtypes of pancreatic ductal adenocarcinoma and their differing responses to therapy. *Nat. Med.* **2011**, *17*, 500–503. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Raman, P.; Maddipati, R.; Lim, K.H.; Tozeren, A. Pancreatic cancer survival analysis defines a signature that predicts outcome. *PLoS ONE* **2018**, *13*, e0201751. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Pradet-Balade, B.; Boulmé, F.; Beug, H.; Müllner, E.W.; Garcia-Sanz, J.A. Translation control: Bridging the gap between genomics and proteomics? *Trends Biochem. Sci.* **2001**, *26*, 225–229. [[CrossRef](#)]
26. Liu, Y.; Beyer, A.; Aebersold, R. On the Dependency of Cellular Protein Levels on mRNA Abundance. *Cell* **2016**, *165*, 535–550. [[CrossRef](#)]
27. Hanash, S.; Taguchi, A. The grand challenge to decipher the cancer proteome. *Nat. Rev. Cancer* **2010**, *10*, 652–660. [[CrossRef](#)]
28. Domon, B.; Aebersold, R. Challenges and Opportunities in Proteomics Data Analysis. *Mol. Cell. Proteom.* **2006**, *5*, 1921–1926. [[CrossRef](#)]
29. Iuga, C.; Seicean, A.; Iancu, C.; Buiga, R.; Sappa, P.K.; Völker, U.; Hammer, E. Proteomic identification of potential prognostic biomarkers in resectable pancreatic ductal adenocarcinoma. *Proteomics* **2014**, *14*, 945–955. [[CrossRef](#)]
30. Jimenez-Luna, C.; Torres, C.; Ortiz, R.; Dieguez, C.; Martinez-Galan, J.; Melguizo, C.; Prados, J.C.; Caba, O. Proteomic biomarkers in body fluids associated with pancreatic cancer. *Oncotarget* **2018**, *9*, 16573–16587. [[CrossRef](#)]
31. Brandi, J.; Manfredi, M.; Speziali, G.; Gosetti, F.; Marengo, E.; Cecconi, D. Proteomic approaches to decipher cancer cell secretome. *Semin. Cell Dev. Biol.* **2018**, *78*, 93–101. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Donadelli, M. The cancer secretome and secreted biomarkers. *Semin. Cell Dev. Biol.* **2018**, *78*, 1–2. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Houg, D.S.; Bijlsma, M.F. The hepatic pre-metastatic niche in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Mol. Cancer* **2018**, *17*, 95. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Costa-Silva, B.; Aiello, N.M.; Ocean, A.J.; Singh, S.; Zhang, H.; Thakur, B.K.; Becker, A.; Hoshino, A.; Mark, M.T.; Molina, H.; et al. Pancreatic cancer exosomes initiate pre-metastatic niche formation in the liver. *Nat. Cell Biol.* **2015**, *17*, 816–826. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Melo, S.; Luecke, L.B.; Kahlert, C.; Fernandez, A.F.; Gammon, S.T.; Kaye, J.; Lebleu, V.S.; Mittendorf, E.A.; Weitz, J.; Rahbari, N.; et al. Glypican-1 identifies cancer exosomes and detects early pancreatic cancer. *Nature* **2015**, *523*, 177–182. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Lobb, R.J.; Lima, L.G.; Möller, A. Exosomes: Key mediators of metastasis and pre-metastatic niche formation. *Semin. Cell Dev. Biol.* **2017**, *67*, 3–10. [[CrossRef](#)]
37. Grønborg, M.; Kristiansen, T.Z.; Iwahori, A.; Chang, R.; Reddy, R.; Sato, N.; Molina, H.; Jensen, O.N.; Hruban, R.H.; Goggins, M.G.; et al. Biomarker Discovery from Pancreatic Cancer Secretome Using a Differential Proteomic Approach. *Mol. Cell. Proteom.* **2006**, *5*, 157–171. [[CrossRef](#)]
38. Belczacka, I.; Latosinska, A.; Metzger, J.; Marx, D.; Vlahou, A.; Mischak, H.; Frantzi, M. Proteomics biomarkers for solid tumors: Current status and future prospects. *Mass Spectrom. Rev.* **2018**, 47–78. [[CrossRef](#)]
39. Makridakis, M.; Vlahou, A. Secretome proteomics for discovery of cancer biomarkers. *J. Proteom.* **2010**, *73*, 2291–2305. [[CrossRef](#)]

40. Pavlou, M.P.; Diamandis, E.P. The cancer cell secretome: A good source for discovering biomarkers? *J. Proteom.* **2010**, *73*, 1896–1906. [[CrossRef](#)]
41. Brandi, J.; Pozza, E.D.; Dando, I.; Biondani, G.; Robotti, E.; Jenkins, R.; Elliott, V.; Park, K.; Marengo, E.; Costello, E.; et al. Secretome protein signature of human pancreatic cancer stem-like cells. *J. Proteom.* **2016**, *136*, 1–12. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Ray, P.; Rialon-Guevara, K.L.; Veras, E.; Sullenger, B.A.; White, R.R. Comparing human pancreatic cell secretomes by in vitro aptamer selection identifies cyclophilin B as a candidate pancreatic cancer biomarker. *J. Clin. Invest.* **2012**, *122*, 1734–1741. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Schiarea, S.; Solinas, G.; Allavena, P.; Scigliuolo, G.M.; Bagnati, R.; Fanelli, R.; Chiabrando, C. Secretome analysis of multiple pancreatic cancer cell lines reveals perturbations of key functional networks. *J. Proteome Res.* **2010**, *9*, 4376–4392. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Xue, H.; Lu, B.; Lai, M. The cancer secretome: A reservoir of biomarkers. *J. Transl. Med.* **2008**, *6*, 52. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Klein-Scory, S.; Tehrani, M.M.; Eilert-Micus, C.; Adamczyk, K.A.; Wojtalewicz, N.; Schnölzer, M.; Hahn, S.A.; Schmiegel, W.; Schwarte-Waldhoff, I. New insights in the composition of extracellular vesicles from pancreatic cancer cells: Implications for biomarkers and functions. *Proteome Sci.* **2014**, *12*, 50. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Chang, Y.T.; Wu, C.C.; Shyr, Y.M.; Chen, T.C.; Hwang, T.L.; Yeh, T.S.; Chang, K.P.; Liu, H.P.; Liu, Y.L.; Tsai, M.H.; et al. Secretome-based identification of ULBP2 as a novel serum marker for pancreatic cancer detection. *PLoS ONE* **2011**, *6*, e20029. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Liu, P.; Weng, Y.; Sui, Z.; Wu, Y.; Meng, X.; Wu, M.; Jin, H.; Tan, X.; Zhang, L.; Zhang, Y. Quantitative secretomic analysis of pancreatic cancer cells in serum-containing conditioned medium. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 37606. [[CrossRef](#)]
48. Borrebaeck, C.A.K. Precision diagnostics: Moving towards protein biomarker signatures of clinical utility in cancer. *Nat. Rev. Cancer* **2017**, *17*, 199–204. [[CrossRef](#)]
49. Adamczyk, K.A.; Klein-Scory, S.; Tehrani, M.M.; Warnken, U.; Schmiegel, W.; Schnölzer, M.; Schwarte-Waldhoff, I. Characterization of soluble and exosomal forms of the EGFR released from pancreatic cancer cells. *Life Sci.* **2011**, *89*, 304–312. [[CrossRef](#)]
50. Ristorcelli, E.; Beraud, E.; Verrando, P.; Villard, C.; Lafitte, D.; Sbarra, V.; Lombardo, D.; Verine, A. Human tumor nanoparticles induce apoptosis of pancreatic cancer cells. *FASEB J.* **2008**, *22*, 3358–3369. [[CrossRef](#)]
51. Hyo, S.L.; Jeong, J.; Lee, K.J. Characterization of vesicles secreted from insulinoma NIT-1 cells. *J. Proteome Res.* **2009**, *8*, 2851–2862.
52. 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* **2016**, *17*, 352–360. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Walsh, N.; Dowling, P.; O'Donovan, N.; Henry, M.; Meleady, P.; Clynes, M. Aldehyde dehydrogenase 1A1 and gelsolin identified as novel invasion-modulating factors in conditioned medium of pancreatic cancer cells. *J. Proteom.* **2008**, *71*, 561–571. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. McKinney, K.Q.; Lee, Y.Y.; Choi, H.S.; Groseclose, G.; Iannitti, D.A.; Martinie, J.B.; Russo, M.W.; Lundgren, D.H.; Han, D.K.; Bonkovsky, H.L.; et al. Discovery of putative pancreatic cancer biomarkers using subcellular proteomics. *J. Proteom.* **2011**, *74*, 79–88. [[CrossRef](#)]
55. Srirajaskanthan, R.; Caplin, M.E.; Waugh, M.G.; Watkins, J.; Meyer, T.; Hsuan, J.J.; Beaumont, N.J. Identification of Mac-2-binding protein as a putative marker of neuroendocrine tumors from the analysis of cell line secretomes. *Mol. Cell. Proteom.* **2010**, *9*, 656–666. [[CrossRef](#)]
56. 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 Genom. Proteom.* **2015**, *12*, 49–55.
57. Zhang, H.; Lv, L.; Liu, H.; Cui, L.; Chen, G.; Bi, P.; Li, Z. Profiling the potential biomarkers for cell differentiation of pancreatic cancer using iTRAQ and 2-D LC-MS/MS. *Proteom. Clin. Appl.* **2009**, *3*, 862–871. [[CrossRef](#)]
58. Xiao, J.; Lee, W.; Zhao, Y.; Cao, R.; Go, V. Profiling Pancreatic Cancer-Secreted Proteome Using 15N Amino Acids and Serum-Free Media. *Pancreas* **2010**, *39*, e17–e23. [[CrossRef](#)]

59. Yu, K.H.; Barry, C.G.; Austin, D.; Busch, C.M.; Sangar, V.; Rustgi, A.K.; Blair, I.A. Stable isotope dilution multidimensional liquid chromatography-tandem mass spectrometry for pancreatic cancer serum biomarker discovery. *J. Proteome Res.* **2009**, *8*, 1565–1576. [[CrossRef](#)]
60. Sitek, B.; Luttes, J.; Marcus, K.; Kloppel, G.; Schmieg, W.; Meyer, H.E.; Hahn, S.A.; Stuhler, K. Application of fluorescence difference gel electrophoresis saturation labelling for the analysis of microdissected precursor lesions of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Proteomics* **2005**, *5*, 2665–2679. [[CrossRef](#)]
61. Qi, T.; Han, J.; Cui, Y.; Zong, M.; Liu, X.; Zhu, B. Comparative proteomic analysis for the detection of biomarkers in pancreatic ductal adenocarcinomas. *J. Clin. Pathol.* **2008**, *61*, 49–58. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
62. Turtoi, A.; Musmeci, D.; Wang, Y.H.; Dumont, B.; Somja, J.; Bevilacqua, G.; De Pauw, E.; Delvenne, P.; Castronovo, V. Identification of Novel Accessible Proteins Bearing Diagnostic and Therapeutic Potential in Human Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *J. Proteome Res.* **2011**, *10*, 4302–4313. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
63. Satoh, M.; Takano, S.; Sogawa, K.; Noda, K.; Yoshitomi, H.; Ishibashi, M.; Mogushi, K.; Takizawa, H.; Otsuka, M.; Shimizu, H.; et al. Immune-complex level of cofilin-1 in sera is associated with cancer progression and poor prognosis in pancreatic cancer. *Cancer Sci.* **2017**, *108*, 795–803. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
64. Lin, C.; Wu, W.-C.; Zhao, G.-C.; Wang, D.-S.; Lou, W.-H.; Jin, D.-Y. ITRAQ-based quantitative proteomics reveals apolipoprotein A-I and transferrin as potential serum markers in CA19-9 negative pancreatic ductal adenocarcinoma. *Medicine* **2016**, *95*, e4527. [[CrossRef](#)]
65. Kosanam, H.; Prassas, I.; Chrystoja, C.C.; Soleas, I.; Chan, A.; Dimitromanolakis, A.; Blasutig, I.M.; Rückert, F.; Gruetzmänn, R.; Pilarsky, C.; et al. Laminin, gamma 2 (LAMC2): A Promising New Putative Pancreatic Cancer Biomarker Identified by Proteomic Analysis of Pancreatic Adenocarcinoma Tissues. *Mol. Cell. Proteom.* **2013**, *12*, 2820–2832. [[CrossRef](#)]
66. Mayerle, J.; Kalthoff, H.; Reszka, R.; Kamlage, B.; Peter, E.; Schniewind, B.; Maldonado, S.G.; Pilarsky, C.; Heidecke, C.D.; Schatz, P.; et al. Metabolic biomarker signature to differentiate pancreatic ductal adenocarcinoma from chronic pancreatitis. *Gut* **2017**, *61*, 128–137. [[CrossRef](#)]
67. Takadate, T.; Onogawa, T.; Fukuda, T.; Motoi, F.; Suzuki, T.; Fujii, K.; Kihara, M.; Mikami, S.; Bando, Y.; Maeda, S.; 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* **2013**, *132*, 1368–1382. [[CrossRef](#)]
68. 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* **2006**, *6*, 2259–2272. [[CrossRef](#)]
69. Kuwae, Y.; Kakehashi, A.; Wakasa, K.; Wei, M. Paraneoplastic Ma Antigen—Like 1 as a Potential Prognostic. *Pancreas* **2014**, *44*, 106–115. [[CrossRef](#)]
70. Tian, R.; Wei, L.-M.; Qin, R.-Y.; Li, Y.; Du, Z.-Y.; Xia, W.; Shi, C.-J.; Jin, H. 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.* **2008**, *53*, 65–72. [[CrossRef](#)]
71. Cui, Y.; Tian, M.; Zong, M.; Teng, M.; Chen, Y.; Lu, J.; Jiang, J.; Liu, X.; Han, J. Proteomic analysis of pancreatic ductal adenocarcinoma compared with normal adjacent pancreatic tissue and pancreatic benign cystadenoma. *Pancreatol.* **2009**, *9*, 89–98. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
72. 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.* **2008**, *78*, 245–251. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
73. Cui, Y.; Zhang, D.; Jia, Q.; Li, T.; Zhang, W.; Han, J. Proteomic and tissue array profiling identifies elevated hypoxia-regulated proteins in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer Investig.* **2009**, *27*, 747–755. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
74. Britton, D.; Zen, Y.; Quaglia, A.; Selzer, S.; Mitra, V.; Löbner, C.; Jung, S.; Böhm, G.; Schmid, P.; Prefot, P.; et al. Quantification of pancreatic cancer proteome and phosphorylome: Indicates molecular events likely contributing to cancer and activity of drug targets. *PLoS ONE* **2014**, *9*. [[CrossRef](#)]
75. Pan, S.; Chen, R.; Tamura, Y.; Crispin, D.A.; Lai, L.A.; May, D.H.; McIntosh, M.W.; Goodlett, D.R.; Brentnall, T. A Quantitative Glycoproteomics Analysis Reveals Changes in N-Glycosylation Level Associated with Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *J. Proteome Res.* **2014**, *13*, 1293–1306. [[CrossRef](#)]
76. Kawahara, T.; Hotta, N.; Ozawa, Y.; Kato, S.; Kano, K.; Yokoyama, Y.; Nagino, M.; Takahashi, T.; Yanagisawa, K. 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* **2013**, *8*, e79654. [[CrossRef](#)]

77. Chen, R.; Pan, S.; Ottenhof, N.A.; de Wilde, R.F.; Wolfgang, C.L.; Lane, Z.; Post, J.; Bronner, M.P.; Willmann, J.K.; Maitra, A.; et al. Stromal galectin-1 expression is associated with long-term survival in resectable pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer Biol. Ther.* **2012**, *13*, 899–907. [\[CrossRef\]](#)
78. Kojima, K.; Bowersock, G.J.; Kojima, C.; Klug, C.A.; Grizzle, W.E.; Mobley, J.A. Validation of a robust proteomic analysis carried out on formalin-fixed paraffin-embedded tissues of the pancreas obtained from mouse and human. *Proteomics* **2012**, *12*, 3393–3402. [\[CrossRef\]](#)
79. Zhang, G.; He, P.; Tan, H.; Budhu, A.; Gaedcke, J.; Michael Ghadimi, B.; Ried, T.; Yfantis, H.G.; Lee, D.H.; Maitra, A.; et al. Integration of metabolomics and transcriptomics revealed a fatty acid network exerting growth inhibitory effects in human pancreatic cancer. *Clin. Cancer Res.* **2013**, *19*, 4983–4993. [\[CrossRef\]](#)
80. Weeks, M.E.; Hariharan, D.; Petronijevic, L.; Radon, T.P.; Whiteman, H.J.; Kocher, H.M.; Timms, J.F.; Lemoine, N.R.; Crnogorac-Jurcevic, T. Analysis of the urine proteome in patients with pancreatic ductal adenocarcinoma. *Proteom. Clin. Appl.* **2008**, *2*, 1047–1057. [\[CrossRef\]](#)
81. 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* **2007**, *1162*, 117–125. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
82. Jenkinson, C.; Elliott, V.L.; Evans, A.; Oldfield, L.; Jenkins, R.E.; O'Brien, D.P.; Apostolidou, S.; Gentry-Maharaj, A.; Fourkala, E.O.; Jacobs, I.J.; et al. Decreased serum thrombospondin-1 levels in pancreatic cancer patients up to 24 months prior to clinical diagnosis: Association with diabetes mellitus. *Clin. Cancer Res.* **2016**, *22*, 1734–1743. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
83. Hocker, J.R.; Postier, R.G.; Li, M.; Lerner, M.R.; Lightfoot, S.A.; Peyton, M.D.; Deb, S.J.; Baker, C.M.; Williams, T.L.; Hanas, R.J.; et al. Discriminating patients with early-stage pancreatic cancer or chronic pancreatitis using serum electrospray mass profiling. *Cancer Lett.* **2015**, *359*, 314–324. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
84. Guo, X.; Lv, X.; Fang, C.; Lv, X.; Wang, F.; Wang, D.; Zhao, J.; Ma, Y.; Xue, Y.; Bai, Q.; et al. Dysbindin as a novel biomarker for pancreatic ductal adenocarcinoma identified by proteomic profiling. *Int. J. Cancer* **2016**, *139*, 1821–1829. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
85. Chen, J.; Chen, L.J.; Xia, Y.L.; Zhou, H.C.; Yang, R.B.; Wu, W.; Lu, Y.; Hu, L.W.; Zhao, Y. Identification and verification of transthyretin as a potential biomarker for pancreatic ductal adenocarcinoma. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **2013**, *139*, 1117–1127. [\[CrossRef\]](#)
86. Sogawa, K.; Takano, S.; Iida, F.; Satoh, M.; Tsuchida, S.; Kawashima, Y.; Yoshitomi, H.; Sanda, A.; Kodera, Y.; Takizawa, H.; et al. Identification of a novel serum biomarker for pancreatic cancer, C4b-binding protein α -chain (C4BPA) by quantitative proteomic analysis using tandem mass tags. *Br. J. Cancer* **2016**, *115*, 949–956. [\[CrossRef\]](#)
87. Radon, T.P.; Massat, N.J.; Jones, R.; Alrawashdeh, W.; Dumartin, L.; Ennis, D.; Duffy, S.W.; Kocher, H.M.; Pereira, S.P.; Guarner, L.; et al. Identification of a three-biomarker panel in urine for early detection of pancreatic adenocarcinoma. *Clin. Cancer Res.* **2015**, *21*, 3512–3521. [\[CrossRef\]](#)
88. Lee, M.J.; Na, K.; Jeong, S.-K.; Lim, J.-S.; Kim, S.A.; Lee, M.-J.; Song, S.Y.; Kim, H.; Hancock, W.S.; Paik, Y.-K. Identification of Human Complement Factor B as a Novel Biomarker Candidate for Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *J. Proteome Res.* **2014**, *13*, 4878–4888. [\[CrossRef\]](#)
89. Chen, K.T.; Kim, P.D.; Jones, K.A.; Devarajan, K.; Patel, B.B.; Hoffman, J.P.; Ehya, H.; Huang, M.; Watson, J.C.; Tokar, J.L.; et al. Potential Prognostic Biomarkers of Pancreatic Cancer. *Pancreas* **2014**, *43*, 22–27. [\[CrossRef\]](#)
90. Chen, J.; Wu, W.; Chen, L.; Zhou, H.; Yang, R.; Hu, L.; Zhao, Y. 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. *Pancreatol.* **2013**, *13*, 290–297. [\[CrossRef\]](#)
91. Tian, M.; Cui, Y.-Z.; Song, G.-H.; Zong, M.-J.; Zhou, X.-Y.; Chen, Y.; Han, J.-X. Proteomic analysis identifies MMP-9, DJ-1 and A1BG as overexpressed proteins in pancreatic juice from pancreatic ductal adenocarcinoma patients. *BMC Cancer* **2008**, *8*, 241. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
92. Tomaino, B.; Cappello, P.; Capello, M.; Fredolini, C.; Ponzetto, A.; Novarino, A.; Ciuffreda, L.; Bertetto, O.; De Angelis, C.; Gaia, E.; et al. Autoantibody signature in human ductal pancreatic adenocarcinoma. *J. Proteome Res.* **2007**, *10*, 4025–4031. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
93. 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.* **2012**, *11*, 1749–1758. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

94. Petersen, T.N.; Brunak, S.; von Heijne, G.; Nielsen, H. SignalP 4.0: Discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nat. Methods* **2011**, *8*, 785–786. [[CrossRef](#)]
95. 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.* **2004**, *17*, 349–356. [[CrossRef](#)]
96. Kalra, H.; Simpson, R.J.; Ji, H.; Aikawa, E.; Altevogt, P.; Askenase, P.; Bond, V.C.; Borràs, F.E.; Breakefield, X.; Budnik, V.; et al. Vesiclepedia: A Compendium for Extracellular Vesicles with Continuous Community Annotation. *PLoS Biol.* **2012**, *10*, e1001450. [[CrossRef](#)]
97. Mathivanan, S.; Fahner, C.J.; Reid, G.E.; Simpson, R.J. ExoCarta 2012: Database of exosomal proteins, RNA and lipids. *Nucleic Acids Res.* **2012**, *40*, D1241–D1244. [[CrossRef](#)]
98. Nanjappa, V.; Thomas, J.K.; Marimuthu, A.; Muthusamy, B.; Radhakrishnan, A.; Sharma, R.; Ahmad Khan, A.; Balakrishnan, L.; Sahasrabuddhe, N.A.; Kumar, S.; et al. Plasma Proteome Database as a resource for proteomics research: 2014 update. *Nucleic Acids Res.* **2014**, *42*, D959–D965. [[CrossRef](#)]
99. 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.* **2000**, *300*, 1005–1016. [[CrossRef](#)]
100. 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.* **2001**, *305*, 567–580. [[CrossRef](#)]
101. Szklarczyk, D.; Morris, J.H.; Cook, H.; Kuhn, M.; Wyder, S.; Simonovic, M.; Santos, A.; Doncheva, N.T.; Roth, A.; Bork, P.; et al. The STRING database in 2017: Quality-controlled protein-protein association networks, made broadly accessible. *Nucleic Acids Res.* **2017**, *45*, D362–D368. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
102. Tang, Z.; Li, C.; Kang, B.; Gao, G.; Li, C.; Zhang, Z. GEPIA: A web server for cancer and normal gene expression profiling and interactive analyses. *Nucleic Acids Res.* **2017**, *45*, W98–W102. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
103. Vivian, J.; Rao, A.A.; Nothaft, F.A.; Ketchum, C.; Armstrong, J.; Novak, A.; Pfeil, J.; Narkizian, J.; Deran, A.D.; Musselman-Brown, A.; et al. Toil enables reproducible, open source, big biomedical data analyses. *Nat. Biotechnol.* **2017**, *35*, 314–316. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
104. Lonsdale, J.; Thomas, J.; Salvatore, M.; Phillips, R.; Lo, E.; Shad, S.; Hasz, R.; Walters, G.; Garcia, F.; Young, N.; et al. The Genotype-Tissue Expression (GTEx) project. *Nat. Genet.* **2013**, *45*, 580–585. [[CrossRef](#)]
105. Lowenfels, A.B.; Maisonneuve, P.; DiMagno, E.P.; Elitsur, Y.; Gates, L.K.; Perrault, J.; Whitcomb, D.C. Hereditary pancreatitis and the risk of pancreatic cancer. International Hereditary Pancreatitis Study Group. *J. Natl. Cancer Inst.* **1997**, *89*, 442–446. [[CrossRef](#)]
106. Lowenfels, A.B.; Maisonneuve, P.; Cavallini, G.; Ammann, R.W.; Lankisch, P.G.; Andersen, J.R.; Dimagno, E.P.; Andren-Sandberg, A.; Domellof, L. Pancreatitis and the Risk of Pancreatic Cancer. *N. Engl. J. Med.* **1993**, *328*, 1433–1437. [[CrossRef](#)]
107. Aguirre-Gamboa, R.; Gomez-Rueda, H.; Martínez-Ledesma, E.; Martínez-Torteya, A.; Chacolla-Huaringa, R.; Rodriguez-Barrientos, A.; Tamez-Peña, J.G.; Treviño, V. SurvExpress: An online biomarker validation tool and database for cancer gene expression data using survival analysis. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e74250. [[CrossRef](#)]
108. Tomczak, K.; Czerwińska, P.; Wiznerowicz, M. The Cancer Genome Atlas (TCGA): An immeasurable source of knowledge. *Contemp. Oncol.* **2014**, *19*, A68–A77. [[CrossRef](#)]
109. International Cancer Genome Consortium, T.I.C.G.; Hudson, T.J.; Anderson, W.; Artez, A.; Barker, A.D.; Bell, C.; Bernabé, R.R.; Bhan, M.K.; Calvo, F.; Eerola, I.; et al. International network of cancer genome projects. *Nature* **2010**, *464*, 993–998. [[CrossRef](#)]
110. Chen, D.T.; Davis-Yadley, A.H.; Huang, P.Y.; Husain, K.; Centeno, B.A.; Permeth-Wey, J.; Pimiento, J.M.; Malafa, M. Prognostic fifteen-gene signature for early stage pancreatic ductal adenocarcinoma. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0133562. [[CrossRef](#)]
111. Uhlen, M.; Oksvold, P.; Fagerberg, L.; Lundberg, E.; Jonasson, K.; Forsberg, M.; Zwahlen, M.; Kampf, C.; Wester, K.; Hober, S.; et al. Towards a knowledge-based Human Protein Atlas. *Nat. Biotechnol.* **2010**, *28*, 1248–1250. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
112. Garbis, S.; Lubec, G.; Fountoulakis, M. Limitations of current proteomics technologies. *J. Chromatogr. A* **2005**, *1077*, 1–18. [[CrossRef](#)]
113. Reymond, M.A.; Schlegel, W. Proteomics in cancer. *Adv. Clin. Chem.* **2007**, *44*, 103–142. [[PubMed](#)]
114. Lim, L.C.; Lim, Y.M. Proteome Heterogeneity in Colorectal Cancer. *Proteomics* **2018**, *18*, 1700169. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
115. Bateman, N.W.; Conrads, T.P. Recent Advances and Opportunities in Proteomic Analyses of Tumor Heterogeneity. *J. Pathol.* **2018**, *244*, 628–637. [[CrossRef](#)]

116. Anderson, L.; Seilhamer, J. A comparison of selected mRNA and protein abundances in human liver. *Electrophoresis* **1997**, *18*, 533–537. [\[CrossRef\]](#)
117. Gygi, S.P.; Rochon, Y.; Franza, B.R.; Aebersold, R. Correlation between Protein and mRNA Abundance in Yeast. *Mol. Cell. Biol.* **1999**, *19*, 1720–1730. [\[CrossRef\]](#)
118. Hsiao, Y.C.; Chu, L.J.; Chen, J.T.; Yeh, T.S.; Yu, J.S. Proteomic profiling of the cancer cell secretome: Informing clinical research. *Expert Rev. Proteom.* **2017**, *14*, 737–756. [\[CrossRef\]](#)
119. Konigsbrugge, O.; Posch, F.; Riedl, J.; Reitter, E.-M.; Zielinski, C.; Pabinger, I.; Ay, C. Association Between Decreased Serum Albumin With Risk of Venous Thromboembolism and Mortality in Cancer Patients. *Oncologist* **2016**, *21*, 252–257. [\[CrossRef\]](#)
120. Deng, Q.L.; Dong, S.; Wang, L.; Zhang, C.Y.; Ying, H.F.; Li, Z.S.; Shen, X.H.; Guo, Y.B.; Meng, Z.Q.; Yu, J.M.; et al. Development and Validation of a Nomogram for Predicting Survival in Patients with Advanced Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 11524. [\[CrossRef\]](#)
121. 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.* **2011**, *106*, 371–378. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
122. Kondo, S.; Sasaki, M.; Hosoi, H.; Sakamoto, Y.; Morizane, C.; Ueno, H.; Okusaka, T. Incidence and risk factors for venous thromboembolism in patients with pretreated advanced pancreatic carcinoma. *Oncotarget* **2018**, *9*, 16883–16890. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
123. Follia, L.; Ferrero, G.; Mandili, G.; Beccuti, M.; Giordano, D.; Spadi, R.; Satolli, M.A.; Evangelista, A.; Katayama, H.; Hong, W.; et al. Integrative Analysis of Novel Metabolic Subtypes in Pancreatic Cancer Fosters New Prognostic Biomarkers. *Front. Oncol.* **2019**, *9*, 115. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
124. Chen, T.; Huang, Z.; Tian, Y.; Lin, B.; He, R.; Wang, H.; Ouyang, P.; Chen, H.; Wu, L. Clinical significance and prognostic value of Triosephosphate isomerase expression in gastric cancer. *Medicine* **2017**, *96*, e6865. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
125. Song, Y.; Luo, Q.; Long, H.; Hu, Z.; Que, T.; Zhang, X.; Li, Z.; Wang, G.; Yi, L.; Liu, Z.; et al. Alpha-enolase as a potential cancer prognostic marker promotes cell growth, migration, and invasion in glioma. *Mol. Cancer* **2014**, *13*, 65. [\[CrossRef\]](#)
126. Hsiao, K.C.; Shih, N.Y.; Fang, H.L.; Huang, T.S.; Kuo, C.C.; Chu, P.Y.; Hung, Y.M.; Chou, S.W.; Yang, Y.Y.; Chang, G.C.; et al. Surface α -Enolase Promotes Extracellular Matrix Degradation and Tumor Metastasis and Represents a New Therapeutic Target. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e69354. [\[CrossRef\]](#)
127. Principe, M.; Ceruti, P.; Shih, N.Y.; Chattaragada, M.S.; Rolla, S.; Conti, L.; Bestagno, M.; Zentilin, L.; Yang, S.H.; Migliorini, P.; et al. Targeting of surface alpha-enolase inhibits the invasiveness of pancreatic cancer cells. *Oncotarget* **2015**, *6*, 11098–11113. [\[CrossRef\]](#)
128. Principe, M.; Borgoni, S.; Cascione, M.; Chattaragada, M.S.; Ferri-Borgogno, S.; Capello, M.; Bulfamante, S.; Chapelle, J.; Di Modugno, F.; Defilippi, P.; et al. Alpha-enolase (ENO1) controls α v/ β 3 integrin expression and regulates pancreatic cancer adhesion, invasion, and metastasis. *J. Hematol. Oncol.* **2017**, *10*, 16. [\[CrossRef\]](#)
129. Miles, L.A.; Dahlberg, C.M.; Plescia, J.; Felez, J.; Kato, K.; Plow, E.F. Role of cell-surface lysines in plasminogen binding to cells: Identification of alpha-enolase as a candidate plasminogen receptor. *Biochemistry* **1991**, *30*, 1682–1691. [\[CrossRef\]](#)
130. López-Aleman, R.; Longstaff, C.; Hawley, S.; Mirshahi, M.; Fábregas, P.; Jardí, M.; Merton, E.; Miles, L.A.; Félez, J. Inhibition of cell surface mediated plasminogen activation by a monoclonal antibody against α -Enolase. *Am. J. Hematol.* **2003**, *72*, 234–242. [\[CrossRef\]](#)
131. Legler, D.F.; Johnson-Léger, C.; Wiedle, G.; Bron, C.; Imhof, B.A. The α v β 3 integrin as a tumor homing ligand for lymphocytes. *Eur. J. Immunol.* **2004**, *34*, 1608–1616. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
132. Liu, Z.; Wang, F.; Chen, X. Integrin α v β 3-targeted cancer therapy. *Drug Dev. Res.* **2008**, *69*, 329–339. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
133. Yin, H.; Wang, L.; Liu, H.-L. ENO1 Overexpression in Pancreatic Cancer Patients and Its Clinical and Diagnostic Significance. *Gastroenterol. Res. Pract.* **2018**, *2018*, 1–7. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
134. 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* **2016**, *11*, e0158296. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

135. Tsai, S.-T.; Chien, I.-H.; Shen, W.-H.; Kuo, Y.-Z.; Jin, Y.-T.; Wong, T.-Y.; Hsiao, J.-R.; Wang, H.-P.; Shih, N.-Y.; Wu, L.-W. ENO1, a potential prognostic head and neck cancer marker, promotes transformation partly via chemokine CCL20 induction. *Eur. J. Cancer* **2010**, *46*, 1712–1723. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
136. Liberti, M.V.; Locasale, J.W.; Biology, C.; Biology, C. Review- The Warburg Effect: How Does it Benefit Cancer Cells? *Trends Biochem. Sci.* **2017**, *41*, 211–218. [[CrossRef](#)]
137. Zhu, W.; Ma, L.; Qian, J.; Xu, J.; Xu, T.; Pang, L.; Zhou, H.; Shu, Y.; Zhou, J. The molecular mechanism and clinical significance of LDHA in HER2-mediated progression of gastric cancer. *Am. J. Transl. Res.* **2018**, *10*, 2055–2067.
138. Rong, Y.; Wu, W.; Ni, X.; Kuang, T.; Jin, D.; Wang, D.; Lou, W. Lactate dehydrogenase A is overexpressed in pancreatic cancer and promotes the growth of pancreatic cancer cells. *Tumor Biol.* **2013**, *34*, 1523–1530. [[CrossRef](#)]
139. Liu, Y.; Guo, J.Z.; Liu, Y.; Wang, K.; Ding, W.; Wang, H.; Liu, X.; Zhou, S.; Lu, X.C.; Yang, H.B.; et al. Nuclear lactate dehydrogenase A senses ROS to produce α -hydroxybutyrate for HPV-induced cervical tumor growth. *Nat. Commun.* **2018**, *9*, 4429. [[CrossRef](#)]
140. Feng, Y.; Xiong, Y.; Qiao, T.; Li, X.; Jia, L.; Han, Y. Lactate dehydrogenase A: A key player in carcinogenesis and potential target in cancer therapy. *Cancer Med.* **2018**, *7*, 6124–6136. [[CrossRef](#)]
141. Yu, X.; Li, S. Non-metabolic functions of glycolytic enzymes in tumorigenesis. *Oncogene* **2017**, *36*, 2629–2636. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
142. Steeg, P.S.; Kopper, L.; Thorgeirsson, U.P.; Talmadge, E.; Liotta, L.A.; Sobep, M.E. Evidence for a Novel Gene Associated With Low Tumor Metastatic Potential. *J. Natl. Cancer Inst.* **1988**, *80*, 200–204. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
143. Ohshio, G.; Imamura, T.; Okada, N.; Suwa, H.; Yamaki, K.; Imamura, M.; Ogasahara, K.; Tsukayama, C.; Yamabe, H. Immunohistochemical expression of nm23 gene product, nucleotide diphosphate kinase, in pancreatic neoplasms. *Int. J. Gastrointest. Cancer* **2008**, *22*, 59–66. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
144. Nakamori, S.; Ishikawa, O.; Ohigashi, H.; Imaoka, S.; Sasaki, Y.; Kameyama, M.; Kabuto, T.; Furukawa, H.; Iwanaka, T.; Kimura, N. Clinicopathological features and prognostic significance of nucleoside diphosphate kinase/nm23 gene product in human pancreatic exocrine neoplasms. *Int. J. Pancreatol.* **1993**, *14*, 125–133.
145. Takadate, T.; Onogawa, T.; Fujii, K.; Motoi, F.; Mikami, S.; Fukuda, T.; Kihara, M.; Suzuki, T.; Takemura, T.; Minowa, 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. Proteom.* **2012**, *9*, 8. [[CrossRef](#)]
146. Liu, L.; Li, M.; Zhang, C.; Zhang, J.; Li, G.; Zhang, Z.; He, X.; Fan, M. Prognostic value and clinicopathologic significance of nm23 in various cancers: A systematic review and meta-analysis. *Int. J. Surg.* **2018**, *60*, 257–265. [[CrossRef](#)]
147. Royds, J.A.; Cross, S.S.; Silcocks, P.B.; Scholefield, J.H.; Rees, R.C.; Stephenson, T.J. Nm23 ‘anti-metastatic’ gene product expression in colorectal carcinoma. *J. Pathol.* **1994**, *172*, 261–266. [[CrossRef](#)]
148. Orozco, C.A.; Martinez-Bosch, N.; Guerrero, P.E.; Vinaixa, J.; Dalotto-Moreno, T.; Iglesias, M.; Moreno, M.; Djurec, M.; Poirier, F.; Gabius, H.-J.; et al. Targeting galectin-1 inhibits pancreatic cancer progression by modulating tumor–stroma crosstalk. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2018**, *115*, E3769–E3778. [[CrossRef](#)]
149. Zhang, P.F.; Li, K.S.; Shen, Y.H.; Gao, P.T.; Dong, Z.R.; Cai, J.B.; Zhang, C.; Huang, X.Y.; Tian, M.X.; Hu, Z.Q.; et al. Galectin-1 induces hepatocellular carcinoma EMT and sorafenib resistance by activating FAK/PI3K/AKT signaling. *Cell Death Dis.* **2016**, *7*, e2201. [[CrossRef](#)]
150. Van Woensel, M.; Mathivet, T.; Wauthoz, N.; Rosière, R.; Garg, A.D.; Agostinis, P.; Mathieu, V.; Kiss, R.; Lefranc, F.; Boon, L.; et al. Sensitization of glioblastoma tumor micro-environment to chemo- and immunotherapy by Galectin-1 intranasal knock-down strategy. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 1217. [[CrossRef](#)]
151. Yeh, C.-C.; Hsu, C.-H.; Shao, Y.-Y.; Ho, W.-C.; Tsai, M.-H.; Feng, W.-C.; Chow, L.-P. 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. Proteom.* **2015**, *14*, 1527–1545. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
152. Su, Y.C.; Davuluri, G.V.N.; Chen, C.H.; Shiau, D.C.; Chen, C.C.; Chen, C.L.; Lin, Y.S.; Chang, C.P. Galectin-1-induced autophagy facilitates cisplatin resistance of hepatocellular carcinoma. *PLoS ONE* **2016**, *11*, e0148408. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

153. Chung, L.Y.; Tang, S.J.; Sun, G.H.; Chou, T.Y.; Yeh, T.S.; Yu, S.L.; Sun, K.H. Galectin-1 promotes lung cancer progression and chemoresistance by upregulating p38 MAPK, ERK, and cyclooxygenase-2. *Clin. Cancer Res.* **2012**, *18*, 4037–4047. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
154. Zhang, P.; Zhang, P.; Shi, B.; Zhou, M.; Jiang, H.; Zhang, H.; Pan, X.; Gao, H.; Sun, H.; Li, Z. Galectin-1 overexpression promotes progression and chemoresistance to cisplatin in epithelial ovarian cancer. *Cell Death Dis.* **2014**, *5*, e991. [[CrossRef](#)]
155. Mathieu, V.; Le Mercier, M.; De Neve, N.; Sauvage, S.; Gras, T.; Roland, I.; Lefranc, F.; Kiss, R. Galectin-1 knockdown increases sensitivity to temozolomide in a B16F10 mouse metastatic melanoma model. *J. Investig. Dermatol.* **2007**, *127*, 2399–2410. [[CrossRef](#)]
156. Lykken, J.M.; Horikawa, M.; Minard-Colin, V.; Kamata, M.; Miyagaki, T.; Poe, J.C.; Tedder, T.F. Galectin-1 drives lymphoma CD20 immunotherapy resistance: Validation of a preclinical system to identify resistance mechanisms. *Blood* **2016**, *127*, 1886–1895. [[CrossRef](#)]
157. Cui, G.; Cui, M.; Li, Y.; Liang, Y.; Li, W.; Guo, H.; Zhao, S. Galectin-3 knockdown increases gefitinib sensitivity to the inhibition of EGFR endocytosis in gefitinib-insensitive esophageal squamous cancer cells. *Med. Oncol.* **2015**, *32*, 124. [[CrossRef](#)]
158. Mirandola, L.; Yu, Y.; Cannon, M.J.; Jenkins, M.R.; Rahman, R.L.; Nguyen, D.D.; Grizzi, F.; Cobos, E.; Figueroa, J.A.; Chiriva-Internati, M. Galectin-3 inhibition suppresses drug resistance, motility, invasion and angiogenic potential in ovarian cancer. *Gynecol. Oncol.* **2014**, *135*, 573–579. [[CrossRef](#)]
159. Streetly, M.J.; Maharaj, L.; Joel, S.; Schey, S.A.; Gribben, J.G.; Cotter, F.E. GCS-100, a novel galectin-3 antagonist, modulates MCL-1, NOXA, and cell cycle to induce myeloma cell death. *Blood* **2010**, *115*, 3939–3948. [[CrossRef](#)]
160. Mazurek, N.; Byrd, J.C.; Sun, Y.; Hafley, M.; Ramirez, K.; Burks, J.; Bresalier, R.S. Cell-surface galectin-3 confers resistance to TRAIL by impeding trafficking of death receptors in metastatic colon adenocarcinoma cells. *Cell Death Differ.* **2012**, *19*, 523–533. [[CrossRef](#)]
161. Kyu, J.C.; Yu, J.P.; Min, J.L.; Jin, H.K.; Ha, J.; Choe, W.; Sung, S.K. Overexpressed cyclophilin A in cancer cells renders resistance to hypoxia- and cisplatin-induced cell death. *Cancer Res.* **2007**, *67*, 3654–3662.
162. Zhu, X.; Miao, X.; Wu, Y.; Li, C.; Guo, Y.; Liu, Y.; Chen, Y.; Lu, X.; Wang, Y.; He, S. ENO1 promotes tumor proliferation and cell adhesion mediated drug resistance (CAM-DR) in Non-Hodgkin's Lymphomas. *Exp. Cell Res.* **2015**, *335*, 216–223. [[CrossRef](#)]
163. Maiso, P.; Huynh, D.; Moschetta, M.; Sacco, A.; Aljawai, Y.; Mishima, Y.; Asara, J.M.; Roccaro, A.M.; Kimmelman, A.C.; Ghobrial, I.M. Metabolic Signature Identifies Novel Targets for Drug Resistance in Multiple Myeloma. *Cancer Res.* **2015**, *75*, 2071–2082. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
164. Zeng, H.Z.; Qu, Y.Q.; Zhang, W.J.; Xiu, B.; Deng, A.M.; Liang, A. Bin Proteomic analysis identified DJ-1 as a cisplatin resistant marker in non-small cell lung cancer. *Int. J. Mol. Sci.* **2011**, *12*, 3489–3499. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
165. Sagulenko, V.; Muth, D.; Sagulenko, E.; Paffhausen, T.; Schwab, M.; Westermann, F. Cathepsin D protects human neuroblastoma cells from doxorubicin-induced cell death. *Carcinogenesis* **2008**, *29*, 1869–1877. [[CrossRef](#)]
166. Bai, D.; Ueno, L.; Vogt, P. Akt-mediated regulation of NFkB for the oncogenicity of PI3K and Akt. *Int. J. Cancer* **2009**, *125*, 2863–2870. [[CrossRef](#)]
167. Fresno Vara, J.Á.; Casado, E.; de Castro, J.; Cejas, P.; Belda-Iniesta, C.; González-Barón, M. P13K/Akt signalling pathway and cancer. *Cancer Treat. Rev.* **2004**, *30*, 193–204. [[CrossRef](#)]
168. Gry, M.; Rimini, R.; Strömberg, S.; Asplund, A.; Pontén, F.; Uhlén, M.; Nilsson, P. Correlations between RNA and protein expression profiles in 23 human cell lines. *BMC Genom.* **2009**, *10*, 365. [[CrossRef](#)]
169. Pillai, R.S.; Bhattacharyya, S.N.; Filipowicz, W. Repression of protein synthesis by miRNAs: How many mechanisms? *Trends Cell Biol.* **2007**, *17*, 118–126. [[CrossRef](#)]
170. Haussler, J.; Zavolan, M. Identification and consequences of miRNA-target interactions-beyond repression of gene expression. *Nat. Rev. Genet.* **2014**, *15*, 599–612. [[CrossRef](#)]
171. Raphael, B.J.; Hruban, R.H.; Aguirre, A.J.; Moffitt, R.A.; Yeh, J.J.; Stewart, C.; Robertson, A.G.; Cherniack, A.D.; Gupta, M.; Getz, G.; et al. Integrated Genomic Characterization of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Cancer Cell* **2017**, *32*, 185–203. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
172. Felix, T.F.; Lopez Lapa, R.M.; De Carvalho, M.; Berton, N.; Tokar, T.; Oliveira, R.A.; Rodrigues, M.A.M.; Hasimoto, C.N.; Oliveira, W.K.; Pelafsky, L.; et al. MicroRNA modulated networks of adaptive and innate immune response in pancreatic ductal adenocarcinoma. *PLoS ONE* **2019**, *14*, e0217421. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

173. Slater, E.P.; Fendrich, V.; Strauch, K.; Rospleszcz, S.; Ramaswamy, A.; Matthäi, E.; Chaloupka, B.; Gress, T.M.; Langer, P.; Bartsch, D.K. LCN2 and TIMP1 as potential serum markers for the early detection of familial pancreatic cancer. *Transl. Oncol.* **2013**, *6*, 99–103. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
174. Bartsch, D.; Gercke, N.; Strauch, K.; Wieboldt, R.; Matthäi, E.; Wagner, V.; Rospleszcz, S.; Schäfer, A.; Franke, F.; Mintziras, I.; et al. The Combination of MiRNA-196b, LCN2, and TIMP1 is a Potential Set of Circulating Biomarkers for Screening Individuals at Risk for Familial Pancreatic Cancer. *J. Clin. Med.* **2018**, *7*, 295. [\[CrossRef\]](#)
175. Yu, S.; Li, Y.; Liao, Z.; Wang, Z.; Wang, Z.; Li, Y.; Qian, L.; Zhao, J.; Zong, H.; Kang, B.; et al. Plasma extracellular vesicle long RNA profiling identifies a diagnostic signature for the detection of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Gut* **2020**, *69*, 540–550. [\[CrossRef\]](#)
176. Xu, Q.; Li, P.; Chen, X.; Zong, L.; Jiang, Z.; Nan, L.; Lei, J.; Duan, W.; Zhang, D.; Li, X.; et al. MiR-221/222 induces pancreatic cancer progression through the regulation of matrix metalloproteinases. *Oncotarget* **2015**, *6*, 14153–14164. [\[CrossRef\]](#)
177. Moriyama, T.; Ohuchida, K.; Mizumoto, K.; Yu, J.; Sato, N.; Nabae, T.; Takahata, S.; Toma, H.; Nagai, E.; Tanaka, M. MicroRNA-21 modulates biological functions of pancreatic cancer cells including their proliferation, invasion, and chemoresistance. *Mol. Cancer Ther.* **2009**, *8*, 1067–1074. [\[CrossRef\]](#)
178. Freire, P.P.; Fernandez, G.J.; Moraes, D.D.; Cury, S.S.; Pai-Silva, M.D.; Pintor, P.; Rogatto, S.R.; Carvalho, R.F. The expression landscape of cachexia-inducing factors in human cancers. *J. Cachexia Sarcopenia Muscle* **2020**. [\[CrossRef\]](#)
179. 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.* **2019**, 2622–2635. [\[CrossRef\]](#)
180. Yuan, F.; Zhang, Y.H.; Wan, S.; Wang, S.; Kong, X.Y. Mining for candidate genes related to pancreatic cancer using protein-protein interactions and a shortest path approach. *Biomed Res. Int.* **2015**, *2015*, 623121. [\[CrossRef\]](#)
181. Vareed, S.K.; Bhat, V.B.; Thompson, C.; Vasu, V.T.; Fermin, D.; Choi, H.; Creighton, C.J.; Gayatri, S.; Lan, L.; Putluri, N.; et al. Metabolites of purine nucleoside Phosphorylase (NP) in serum have the potential to delineate Pancreatic Adenocarcinoma. *PLoS ONE* **2011**, *6*, e17177. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
182. He, X.; Zheng, Z.; Li, J.; Ben, Q.; Liu, J.; Zhang, J.; Ji, J.; Yu, B.; Chen, X.; Su, L.; et al. DJ-1 promotes invasion and metastasis of pancreatic cancer cells by activating SRC/ERK/uPA. *Carcinogenesis* **2012**, *33*, 555–562. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
183. Maurer, H.C.; Holmstrom, S.R.; He, J.; Laise, P.; Su, T.; Ahmed, A.; Hibshoosh, H.; Chabot, J.A.; Oberstein, P.E.; Sepulveda, A.R.; et al. Experimental microdissection enables functional harmonisation of pancreatic cancer subtypes. *Gut* **2019**, *68*, 1034–1043. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
184. Liberati, A.; Altman, D.G.; Tetzlaff, J.; Mulrow, C.; Gøtzsche, P.C.; Ioannidis, J.P.A.; Clarke, M.; Devereaux, P.J.; Kleijnen, J.; Moher, D. The PRISMA statement for reporting systematic reviews and meta-analyses of studies that evaluate health care interventions: Explanation and elaboration. *Ann. Intern. Med.* **2009**, *151*, W65–W94. [\[CrossRef\]](#)
185. Metsalu, T.; Vilo, J. ClustVis: A web tool for visualizing clustering of multivariate data using Principal Component Analysis and heatmap. *Nucleic Acids Res.* **2015**, *43*, W566–W570. [\[CrossRef\]](#)
186. Starrau, J.; De Back, W.; Brusch, L.; Deutsch, A. Morpheus: A user-friendly modeling environment for multiscale and multicellular systems biology. *Bioinformatics* **2014**, *30*, 1331–1332. [\[CrossRef\]](#)

