UNIVERSIDADE SÃO FRANCISCO Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências da Saúde

MÁRCIA CRISTINA FERNANDES MESSIAS

# ESTUDO LIPIDÔMICO DE PLASMA DE PACIENTES COM CÂNCER DE CÓLON E RETO

Bragança Paulista 2020

# MÁRCIA CRISTINA FERNANDES MESSIAS – RA. 001201705119

# ESTUDO LIPIDÔMICO DE PLASMA DE PACIENTES COM CÂNCER DE CÓLON E RETO

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências da Saúde da Universidade São Francisco, como requisito parcial para obtenção do título de Doutora em Ciências da Saúde.

**Orientadora:** Profa Dra Patrícia de Oliveira Carvalho

Bragança Paulista 2020

WI 529 Messias, Márcia Cristina Fernandes Estudo lipidômico de plasma de pacientes com câncer de cólon e reto / Márcia Cristina Fernandes Messias. – Bragança Paulista, 2020. 119 p.
Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências da Saúde da Universidade São Francisco. Orientação de: Patrícia de Oliveira Carvalho.
1. Plasma. 2. Neoplasias do Colo. 3. Neoplasias Retais.
4. Biomarcadores. 5. Enzimas. 6. Plasmalogênios.
I. Carvalho, Patrícia de Oliveira. II. Título.

Sistema de Bibliotecas da Universidade São Francisco – USF Ficha catalográfica elaborada por: Marina Palmeira Luccas – CRB-8/10466



MESSIAS, Márcia Cristina Fernandes "Estudo lipidómico de plasma de pacientes com câncer de cólon e reto". Tese defendida e aprovada no programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Ciências da Saúde da Universidade São Francisco em 12 de março de 2020 pela Banca examinadora constituída polos memoros pelos membros:

Patricia de Oliveira Carvalho (Orientadora) Universidade São Francisco

Superini Alyandra

Alessandra Sussulini Universidade Estadual de Campinas

Carlos Augusto Real Martinez Universidade São Francisco

Jose J. Merewood Jose Javier Melendez Perez Unifag

twe

Thalita Rocha Universidade São Francisco

Campus Braganya Paulista Campus Gampus S-Unidade Cambui Campus Campus Campus - Unidade Cambui Campus Campus - Unidade Savin Campus Campus - Unidade Savin Campus Campus - Unidade Savin Campus Itatiba

Dedico esta Tese a Vida.

#### AGRADECIMENTOS

A Deus e a Nossa Senhora Aparecida por terem me dado força e luz diante de todas as batalhas enfrentadas.

Minha família (humana e animal), meu alicerce. Tudo que sou e que conquistei foi graças aos ensinamentos de amor, fé e esperança que aprendi com vocês.

Profa Dra Patrícia de Oliveira Carvalho, pela orientação científica, por conceder o espaço físico e estrutural para o desenvolvimento do meu Doutorado, por acreditar no meu potencial discente e profissional e por sempre estar disposta a me ajudar em todas as necessidades pessoais e acadêmicas.

Prof Dr Carlos Augusto Real Martinez pela orientação, parceria doando amostras de sangue de pacientes com câncer reto e cólon e por acreditar no meu potencial discente e profissional. Muito obrigada pelas palavras sábias e de carinho e pelos grandes ensinamentos. Nunca vou esquecer.

Profa Dra Thalita Rocha pela orientação, parceria na técnica de *Western Blotting* (sempre com palavras positivas, que iria dar certo e deu tudo certo!), paciência, os abraços confortantes e por acreditar no meu potencial discente e profissional.

Minha querida amiga Vilma Tescke, obrigada por toda força espiritual e profissional ofertada durante o meu Doutorado. Sempre me acolheu, amparou e me ajudou. Levarei você eternamente no meu coração.

A equipe de residentes de Coloproctologia do Ambulatório do Hospital Universitário São Francisco da Providência de Deus: Lucas, Brunno, Rayama e Rafaela, que Deus abençoe vocês pela ajuda na seleção de pacientes para coleta das amostras de sangue, pelo carinho, respeito e dedicação comigo e com o meu projeto de Doutorado. Vocês são pessoas iluminadas e profissionais exemplares, sou grata por terem feito parte da minha vida acadêmica.

Aos pacientes maravilhosos que participaram do meu estudo: que Deus dê muita saúde, fé e força para vocês nesta batalha contra o câncer. Aprendi muito com cada um de vocês, com cada experiência de vida. Obrigada pelas lindas palavras ofertadas a mim e ao meu Projeto de Doutorado. Como a maioria de vocês me diziam: seu estudo é a nossa esperança e a garantia de vida para muitos no futuro! Vocês estão nas minhas orações.

٧

A equipe de enfermagem do Ambulatório do Hospital Universitário São Francisco da Providência de Deus: Rosangela, Rita, Regina, Paola, Ana Paula e Ana por todo carinho, humanização, respeito e por compartilhar o espaço de vocês comigo.

Ao Dr Pedro Izzo e a equipe do Arquivo Médico do Hospital Universitário São Francisco da Providência de Deus pela autorização e acesso aos prontuários.

Aos meus amigos/irmãos do laboratório: Dona Alice (sempre orando por mim), Gian, Giovani, Marta, Thaís Cavenatti, Laís, Yollanda, Tiago, Aline, Thaís Vanalli, Sabrina, Gabi e Bianca, obrigada pela amizade, pela força perante as adversidades e por sempre estarem do meu lado. Nossa relação sempre foi maravilhosa e envolta de muito respeito e carinho, sempre um ajudando e se preocupando com o outro, mesmo que distantes fisicamente, mas nunca espiritualmente.

Sem mais, a Universidade São Francisco por integrar o PPGSS, a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES – Processo: 88887.148342/2017-00) pela bolsa mensalidade concedida e a FAPESP (Processos: 2016/11905-2 e 2018/13317-6) pelo auxílio financeiro.

"A árvore que dá mais frutos é a que mais leva pedradas."

Autor desconhecido

# LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CAPÍTULO I			
CCD	Câncer colon direito		
CCE	Câncer colon esquerdo		
CCHP	Câncer Colorretal Hereditário Polipose ou Síndrome de Lynch		
CCR	Cancer colorretal		
MSI	Instabilidade microssatélite		
PAF	Polipose Adenomatosa Familiar		
TNM	Tumor, Linfonodo, Metástase		
CAPÍTULO II			
ADHAP-S	Dihydroxyacetone phosphate synthase		
AGPS	Alkylglyceronephosphate synthase		
DHAP	Dihydroxyacetone phosphate		
DHAPAT	Dihydroxyacetone phosphate acyltransferase		
ESI	Electrospray ionization		
FAR	Fatty acid reductase or Acyl CoA reductase		
GLP	Glycerophospholipids		
MS	Mass spectrometry		
PE	Phosphatidylethanolamine		
PC	Phosphatidylcholine		
PL	Phospholipids		
CAPÍTULO III			
GNPAT	Gliceronofosfato O-aciltranferase		
LFC	Lisofosfatidilcolina		
LPCAT	Lisofosfatidilcolina Aciltransferase		
PL	Plasmalogênio		
SCD1	Estearoil-CoA dessaturase 1		
CAPÍTULO IV			
CC	Colon Cancer		
CTR volunteers	Control volunteers		
UHPLC-QTOF	Ultra Performance Liquid Chromatography–Quadrupole Time-of-Flight Mass Spectrometry		

## LISTA DE TABELAS

# **CAPÍTULO I**

Tabela 1: Estadiamento TNM

# CAPÍTULO II

**Table 1:** Categories of Lipids. Representation of the structures of the eight lipid40categories

**Table 2:** Principal alkyl and alkenyl glycerolipids identified in gastrointestinal cancer50patients, the type of tissue sample analyzed and techniques of lipidic analysisemployed

# **CAPÍTULO III**

**Tabela 1:** Dados demográficos e características clínicas de pacientes com câncer69retal e voluntários saudáveis69

## **CAPÍTULO IV**

**Table 1:** Demographic and clinicopathologic characteristics of CC patients and CTR89volunteers

**Table 2:** Statistical data of differential features between CC patients and CTR92volunteers

**Table 3:** Fatty acid composition (relative %) of plasma total lipids in CTR volunteers96and CC patients in the different cancer's stages

# LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I		
Figura 1: Anatomia do intestino grosso	18	
Figura 2: Estimativa mundial do câncer de cólon e reto		
Figura 3: Camadas da parede intestinal e nível de penetração do tumor	25	
CAPÍTULO II		
Figure 1: The six biomarkers categories	41	
Figure 2: Structure of plasmalogen	43	
Figure 3: Schematic representation of the biosynthesis of plasmalogen	46	
CAPÍTULO III		
Figura 1: Estrutura da molécula do plasmalogenio de lisofosfatidilcolina com ácido palmitoleico LPC (P-16:1)		
Figura 2: Análise da expressão da proteína FAR1 por Western Blotting utilizando o plasma de vinte pacientes com câncer retal, segundo estadio (0, I, II, III e IV) e de vinte voluntários saudáveis		
Figura 3: Gráficos representativos das enzimas (A) GNPAT, (B) LPCAT4 e (C) SCD no plasma de pacientes com câncer retal e voluntários saudáveis	73	
Figura 4: Principais vias enzimáticas envolvidas na biossíntese do plasmalogênio de lisofosfatidilcolina com ácido palmitoleico em pacientes com câncer retal	76	
CAPÍTULO IV		
Figure 1: PCA scores plot for plasma samples	90	
<b>Figure 2:</b> PLS-DA scores plots in the negative ion mode of CTR volunteers (green) and CC patients (red)	91	
Figure 3: Distribution of the identified metabolites according to major lipid classes	93	
Figure 4: Pathway analysis performed using MetaboAnalyst 4.0	94	
Figure 5: Plasmalogens elected for the biomarker model	95	
Figure 6: In vitro quantitative measurement of plasmalogen synthesis enzymes	97	

# SUMÁRIO

APRESENTAÇÃO CAPÍTULO I: Características clínica, patológica e epidemiológica do câncer de cólon e reto	13 14			
Resumo	15			
1. Introdução				
2. Anatomia Patológica				
3. Estimativa global para o câncer de cólon e reto				
4. Fatores de Risco	20			
5. Apresentação Clínica				
6. Rastreamento e Diagnóstico	22			
7. Estadio	24			
8. Tratamento	25			
9. Prevenção	26			
10. Conclusão	28			
Referências	29			
CAPÍTULO II: Plasmalogen lipids: functional mechanism and their involvement in gastrointestinal cancer	35			
Abstract	36			
1. Introduction	37			
2. The Lipids in the human body	39			
3. Biomarkers categories	40			
4. Characteristics of plasmalogens	42			
4.1 General structures	42			
4.2 Distribution in different species	43			
4.3 Biosynthesis	44			
4.4 Functions	45			
4.5 Analytical methods to detect plasmalogen	47			
5. Plasmalogens Lipids in gastrointestinal cancer	48			
6. Anti-tumor properties of synthetic plasmalogens and analogues	52			
7. Conclusion and perspective	53			
References	55			
CAPÍTULO III: Potenciais vias enzimáticas envolvidas na biossíntese do plasmalogênio no câncer retal	64			
Resumo	65			
1. Introdução				

2. Materiais e Métodos	68
2.1 Sujeitos da pesquisa	68
3. Ensaios Enzimáticos	69
3.1 Expressão da FAR1 por Western Blotting	69
3.2 Determinação da concentração de GNPAT, LPCAT4 e SCD por ensaio imunoenzimático (ELISA)	70
4. Análise Estatistica	71
5. Resultados	71
5.1 A influência da progressão dos estadios do câncer retal na diminuição da atividade das enzimas redutase, Aciltransferases e dessaturase	71
6. Discussão	73
6.1 A importância das enzimas na biossíntese do plasmalogênio	73
7. Conclusão	77
Referências	78
CAPÍTULO IV: Plasma-based lipids biomarkers panel and key metabolic pathway for the detection of colon cancer	82
Abstract	83
1. Introduction	84
2. Materials and methods	85
2.1 Volunteers, ethical consent and plasma samples	85
2.2 Total lipids extraction	86
2.3 Lipid profile of plasma samples by liquid chromatography-mass spectrometry(LC-MS) analysis	86
2.4 Fatty acid profile by GC-FID analysis	87
2.5 Immunodetection of plasmalogen synthesis enzymes LPCAT4, SCD and GNPAT	87
2.6 Data processing, statistical, biomarkers and pathway analysis	88
3. Results	89
3.1 Demographic and clinicopathological characteristics of CC and CTR subjects	89
3.2 Untargeted lipidomic plasma analysis and discrimination between CC patients and CTR volunteers	90
3.3 Metabolic pathway analysis plot	94
3.4 Phosphatidylserine plasmalogens as biomarkers for CC diagnostics	94
3.5 Analyses of fatty acid composition by gas chromatography	96
3.6 GNPAT, SCD and LPCAT4 concentrations determined by ELISA assay	97
4. Discussion	97
5. Conclusion	101
References	103
ANEXOS	109

#### APRESENTAÇÃO

A presente tese descreve as alterações moleculares envolvendo os lípides do plasma de pacientes com câncer de cólon e reto. Para alcançar esse objetivo foram investigados o perfil lipidômico e as principais vias enzimáticas que levaram a alteração nos níveis de metabólitos lipídicos identificados como possíveis biomarcadores para esses tipos de câncer.

Sua estrutura está dividida em quatro capítulos, sendo que no primeiro capítulo é apresentada uma revisão geral sobre os cânceres de cólon e reto, abordando as características clínicas, patológicas, epidemiológicas, diagnóstico, tratamento e prevenção. Nele está descrito a importância de realizarem estudos individualizados das regiões do intestino grosso, dividindo-as em cólons direito e esquerdo e o reto.

O segundo capítulo mostra uma revisão sistemática sobre os plasmalogênios, uma subclasse dos glicerofosfolípides, como importantes biomarcadores em câncer. Além de suas funções estruturais na membrana e de funcionar como antioxidante endógeno, estudos sugerem que alterações na síntese do plasmalogênio, iniciada no peroxissomo e finalizada no retículo endoplasmático, contribuem no desenvolvimento de vários tipos de cânceres, dentre eles os gastrointestinais.

No terceiro capítulo, que está dividido em duas partes, são apresentadas as principais enzimas envolvidas na síntese do plasmalogênio de lisofosfatidilcolina [LPC (P-16:1)] em plasma de pacientes com câncer retal, avaliados segundo o estadiamento do câncer. Foram avaliadas as concentrações das enzimas aciltransferases (GNPAT e LPCAT4) e dessaturase (SCD) e a expressão da enzima redutase (FAR1), proteína que está presente na membrana peroxissômica e cuja regulação depende dos níveis de plasmalogênio no organismo.

O quarto capítulo, também dividido em duas partes, é dedicado ao estudo lipidômico de plasma de pacientes com câncer de cólon. Na primeira, é apresentada uma análise exploratória inicial de biomarcadores usando a abordagem exploratória (untargeted) para buscar moléculas lipídicas diferentemente expressas entre controle e doente. Na segunda, os resultados mostram as concentrações das enzimas GNPAT, LPCAT4 e SCD envolvidas na biossíntese das moléculas de plasmalogênio.

# CAPÍTULO I: CARACTERÍSTICAS CLÍNICA, PATOLÓGICA E EPIDEMIOLÓGICA DO CÂNCER DE CÓLON E RETO

Márcia Cristina Fernandes Messias; Patrícia de Oliveira Carvalho.

O capítulo apresenta uma breve revisão das atualizações em câncer de cólon e reto, incluindo epidemiologia, fatores de risco, apresentações clínicas, diagnóstico, estadio, tratamento e prevenção. O CCR apresenta-se como um problema de saúde pública de escala mundial. A abordagem enfatiza ainda a importância clínica de se avaliar individualmente as regiões (cólons direito e esquerdo e reto) do intestino grosso.

#### RESUMO

O câncer colorretal é uma doença com alto índice de morbimortalidade mundial, afetando indivíduos de ambos os sexos. A incidência aumenta com a idade, sofrendo um grande incremento a partir dos 60 anos. O local do intestino grosso onde aparece o tumor (cólons direito e esquerdo e reto) também podem estar relacionados com os sinais e sintomas. A prevenção tem papel primordial na diminuição da mortalidade, já que se trata de um câncer de caráter progressivo e de desenvolvimento lento, podendo demorar em torno de 5 anos para apresentar as manifestações clínicas que muitas vezes é precedido por lesões pré-malignas que podem ser detectadas precocemente. O diagnóstico é realizado através de exames de triagem básicos como a pesquisa de sangue oculto nas fezes, colonoscopia, biópsia e tomografia computadorizada, porém outros exames podem ser solicitados. Os principais métodos terapêuticos para o tratamento do câncer de cólon e reto incluem a quimioterapia, radioterapia, cirurgia e imunoterapia e a associação destes conferem, dependendo da localização, tamanho e do estadiamento do tumor, uma melhor chance de sobrevida para o paciente. O sistema de classificação para determinar o estadiamento do tumor é o TNM que considera como parâmetros o tamanho do tumor, número de linfonodos acometidos e a presença ou ausência de metástase à distância. Embora a abordagem clínica do câncer de cólon e reto venha sendo favorecida pelos novos progressos terapêuticos, a aplicação de ações multidisciplinares de promoção à saúde e a detecção precoce da doença ainda são benéficas não apenas para reduzir a incidência global do câncer de cólon e reto, mas também para melhorar a qualidade de vida dos pacientes e de seus familiares.

Palavras-chave: câncer colorretal; cólon; reto; epidemiologia;

## 1. INTRODUÇÃO

Dados epidemiológicos mostraram que o câncer é o problema de saúde pública mais crescente nos últimos anos, com uma estimativa de 20,4 milhões de novos casos e 17 milhões de mortes por ano em todo o mundo até 2030 (ARIF et al., 2017).

A estimativa mundial em 2012 apontou o câncer colorretal (CCR) como o terceiro tipo de câncer mais comum entre os homens (746 mil casos novos – 10% do total dos cânceres) e o segundo nas mulheres (614 mil casos novos – 9,2% do total dos cânceres). Neste mesmo período, para a mortalidade, foram estimados 694 mil casos em ambos os sexos (8,5% do total de óbitos) (WHO, 2012).

Anatomicamente estes tumores acometem três partes do intestino grosso, os cólons direito e esquerdo e o reto. Esta especificidade da localização anatômica permite analisar as diferenças existentes nos estadios dos tumores e também as características clínicas e patológicas, recidivas e os impactos prognósticos da localização dos tumores (KISHIKI et al., 2019).

Na etiopatogenia do CCR fatores importantes como etnia, dieta, idade, depressão, obesidade, sedentarismo, sarcopenia, tabagismo, etilismo, predisposição genética, mutação genética, mudanças epigenéticas, história familiar de CCR e condições como doença intestinal inflamatória e polipose familiar são pontos chaves para o aumento da incidência da doença (PIAZZOLLA, 2015).

Através de um efetivo esquema de rastreamento é possível realizar a detecção precoce do CCR, garantindo não só o seu tratamento em fase inicial, mas também condições ideais para a sua prevenção. Vários testes de rastreamento como exames de sangue, pesquisa de sangue oculto nas fezes, retossigmoidoscopia, enema de bário com duplo contraste, colonografia por tomografia computadorizada, colonoscopia e biópsia podem ser necessários para detectar as lesões colorretais. A microscopia óptica também é utilizada para avaliar o grau de diferenciação e o nível de penetração do tumor através da parede intestinal (TIS, T1, T2, T3 e T4) (MACIEL e MACIEL, 2014).

Diferentes estratégias de tratamento podem ser realizadas, tanto de forma combinada ou isolada, mas isto vai depender do tamanho, extensão e localização do tumor e das condições gerais do paciente. A combinação de cirurgia, quimioterapia,

radioterapia e imunoterapia tem sido empregada com o objetivo de reduzir os índices de recidiva local ou à distância e aumentar a sobrevida do paciente (SOUZA, 2016).

A aplicação de medidas preventivas como a ingestão de dieta balanceada, abandono do etilismo e tabagismo, a prática de atividades físicas de forma a regular e controlar o peso corporal e o aconselhamento genético às pessoas com histórico familiar de câncer ou de polipose, além de auxiliarem na identificação do estagio inicial da doença, diminuem significativamente os índices de morbimortalidade por CCR (MARLEY & NAN, 2016).

Assim, o presente estudo reflete a expectativa de contribuir e sumarizar as evidências encontradas na literatura científica sobre atualizações em câncer colorretal, incluindo epidemiologia, fatores de risco, apresentações clínicas, diagnóstico, estadio, tratamento e a prevenção, para que essas informações possam nortear de forma significativa a prática clínica.

## 2. ANATOMIA PATOLÓGICA

Ao analisarmos a patogênese do CCR, não podemos considerá-lo como uma doença com um tipo único de tumor, já que as características anatômicas do intestino grosso permitem que o mesmo seja dividido em várias partes.

O intestino grosso tem aproximadamente 150 cm de comprimento e se estende da válvula ileocecal até o ânus. Anatomicamente, é composto de oito partes: apêndice, ceco, cólon ascendente, cólon transverso, cólon descendente, sigmoide, reto e ânus (Figura 1) (BARAN et al., 2018).

Um número crescente de estudos tem descrito as diferenças no CCR de acordo com o local do tumor. Há evidências de que o câncer de cólon direito (CCD) é diferente do câncer de cólon esquerdo (CCE) e do câncer retal (LIM et al., 2017).

O reto compreende a porção final do intestino grosso, estando localizado entre o cólon sigmóide e o canal anal. Inicia-se na junção retossigmóide e termina ao nível do anel anorretal. Arbitrariamente ele é dividido em três partes a partir da borda anal: o reto superior (12 a 15 cm), médio (7 a 12 cm) e inferior (0 a 7 cm). Embora não sejam anatomicamente distintas, as partes são de grande importância para o estadiamento do

tumor, avaliação da ressecabilidade e planejamento da cirurgia (POULIN et al, 2016; FAZELI & KERAMATI, 2015).

A distinção entre o cólon direito e esquerdo é baseada primariamente em suas origens embriológicas, já durante a formação fetal. O ceco, o apêndice, o cólon ascendente, a flexura hepática e o cólon transverso são classificados como cólon direito, ao passo que a flexura esplênica, cólon descendente e cólon sigmoide são classificados como cólon esquerdo. Assim, os tumores CCR do lado direito surgem do cólon ascendente até o cólon transverso e os tumores do lado esquerdo do CCR surgem da flexura esplênica até o sigmoide (HU et al., 2018).

Acredita-se que essas diferenças entre cólon direito e esquerdo também estejam correlacionadas às características anatômicas, histológicas, genéticas, imunológicas, aspectos moleculares, microambientes e suprimentos sanguíneos (cólon direito é perfundido pela artéria mesentérica superior e o cólon esquerdo pela artéria mesentérica inferior). Todas estas características podem conferir um grande valor prognóstico e auxiliarem nos desfechos clínicos do CCR (ULANJA et al., 2017; HU et al., 2018; HSU et al., 2019). Outras variáveis como idade, sexo, raça, estágio, grau e localização do tumor e epidemiologia devem ser consideradas (WANG et al.; 2019). Nos últimos anos, a distinção entre CCD e CCE foi focalizada principalmente devido a diferentes resultados, prognósticos e respostas clínicas as terapias (BAEK, 2017).



Figura 1: Anatomia do intestino grosso. Fonte: O autor (2020).

#### 3. ESTIMATIVA GLOBAL PARA O CÂNCER DE CÓLON E RETO

A distribuição do CCR apresenta significativas variações internacionais, sendo maior em países desenvolvidos em decorrência dos processos de urbanização e desenvolvimento (FERLAY et al., 2013). As taxas de incidência de CCR variam amplamente, de 8 e 6 vezes no câncer de cólon e reto, respectivamente, por região do mundo; por este motivo a doença pode ser considerada um marcador de desenvolvimento socioeconômico (FIDLER et al, 2016).

De acordo com estimativas do GLOBOCAN, cerca de 1,8 milhão de novos casos de CCR ocorreram em 2018 em todo o mundo. Em geral, o CCR é o terceiro em incidência e o segundo em mortalidade, compreendendo, respectivamente, adenocarcinomas de cólon e reto, 6,1% (2,9% mulher e 3,2% homem) e 3,9% (1,5% mulher e 2,4% homem) de incidência e 5,8% (2,7% mulher e 3,1% homem) e 3,2% (1,3% mulher e 1,9% homem) de óbitos (Figura 2) (BRAY, et al., 2018).

No Brasil, o CCR é o terceiro tipo de câncer mais comum, sendo previsto para o final de 2020 em torno de 20.520 casos novos em homens e de 20.470 em mulheres. Esses valores correspondem a um risco estimado de 19,63 casos novos a cada 100 mil homens e 19,03 para cada 100 mil mulheres, considerando todas as regiões brasileiras (INCA, 2019).



Figura 2: Estimativa mundial do câncer de cólon e reto. A. Taxa de Mortalidade. B. Taxa de Incidência. Câncer de cólon (vermelho) e câncer retal (laranja).

#### 4. FATORES DE RISCO

O CCR é uma doença multifatorial influenciada principalmente por fatores genéticos, ambientais e relacionadas ao estilo de vida. Ele resulta principalmente do acúmulo progressivo dessas alterações que transformam o epitélio normal em adenocarcinoma (INCA, 2019; DAS et al., 2017).

Nos últimos anos os fatores de risco que mais vem sendo estudados e que podem contribuir particularmente para o início precoce do CCR são: idade, sexo, tabagismo, etilismo, sedentarismo, obesidade, padrão dietético irregular, hiperinsulinemia, histórico familiar, genética e doença inflamatória intestinal (KEUKELEIRE, 2015).

No quesito idade, 10 a 15% dos casos de CCR ocorrem antes dos 50 anos e estudos epidemiológicos reportam que a sua incidência precoce está aumentando cada vez mais (ANTELO et al., 2019). A incidência e mortalidade em indivíduos com mais de 65 anos são mais altas em mulheres do que em homens, o que explica o fato de o CCR ser uma grande ameaça a saúde de mulheres mais velhas (KIM et al., 2015).

O etilismo e tabagismo aumentam o risco de CCR. O álcool ao entrar em contato no cólon é metabolizado em acetaldeído, que degrada o folato e que é necessário para síntese e reparo do DNA. Este processo gera a deficiência de folato e consequentemente o desequilíbrio na síntese de DNA contribuindo assim para o processo tumoral (HOMANN et al.; 2000; DUTHIE, 1999). Em relação ao tabagismo, a capacidade do trato gastrintestinal e sistema circulatório absorverem os produtos carcinógenos do cigarro aumentam os riscos de processos inflamatórios, mutagênicos e da carcinogênese (MARLEY & NAN, 2016).

Com relação a obesidade, dados epidemiológicos mostraram um risco aumentado de 30-70% de CCR em homens do que em mulheres, por isso a importância da prática de atividades físicas para auxiliar na regressão deste quadro inflamatório (BARDOU et al., 2013). A obesidade também pode desencadear um aumento nos níveis de leptina que leva ao crescimento e a proliferação de células tumorais no cólon. A hiperinsulinemia, decorrente da obesidade, promove a proliferação celular e reduz o processo de apoptose, aumentando o risco de CCR (LOPEZ-MORRA, 2014). O efeito protetor da atividade física ainda não está bem elucidado, mas sabe-se que ela diminui o risco de CCR por reduzir o índice de massa corpórea e por apresentar melhoras no trânsito intestinal e nos níveis de insulina (GANDOMANI et al., 2017).

Alimentos ricos em gorduras, principalmente as saturadas, estimulam a produção de ácidos biliares no fígado que ao entrarem em contato com as bactérias anaeróbicas intestinais, são desidrogenados formando os ácidos desoxicólico e litocólico que promovem a carcinogênese (HARRIS, 2016). O consumo de carnes vermelhas cozidas a temperaturas extremamente altas (fritura, cozimento ou grelhada no carvão) também podem aumentar o risco de desenvolvimento do CCR. Durante este processo de cozimento é formado o N-nitroso, um carcinógeno humano oriundo das aminas heterocíclicas mutagênicas e dos hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (KEY et al., 2004).

Doenças inflamatórias intestinais como Colite ulcerativa e Doença de *Crohn* também mostraram correlação com CCR associada à inflamação crônica, decorrente da quantidade de tempo que o paciente passou exposto à condição inflamatória (YASHIRO, 2014). Dois subtipos comuns de síndromes familiares que predispõe ao CCR são a Polipose Adenomatosa Familiar (PAF) e Câncer Colorretal Hereditário Polipose (CCHP ou Síndrome de *Lynch*). A PAF é uma síndrome hereditária autossômica dominante de CCR causada por mutação germinativa no gene supressor de tumor *Adenomatous polyposis coli (APC)* localizado no cromossomo 5q21-22 ou no gene *MUTYH (mutY Homologo E. coli)* que produz a glicosilase (*Mutyh glycosylases*) que atua no reparo do DNA durante o processo de replicação, removendo ou reparando resíduos de nucleotídeos com bases nitrogenadas quimicamente alteradas, levando assim ao desenvolvimento de centenas de pólipos adenomatosos de característica tumoral (GALIATSATOS & FOULKES, 2006). Indivíduos com CCHP, doença autossômica dominante, tem uma predisposição de 2 a 4% de desenvolverem CCR, tendo em média um risco de 20-50% para indivíduos com 70 anos, dependendo do sexo e do gene mutado (DASHTI et al.; 2018).

# 5. APRESENTAÇÃO CLÍNICA

Assim como o câncer retal tem suas particularidades, evidências crescentes sugerem que CCD e CCE estão emergindo como dois tipos diferentes de CCR com características clínicas distintas (HU et al., 2018). As manifestações clínicas no CCR diferem dependendo da frequência e duração dos sintomas, localização do tumor e o estadio da doença.

O sangramento retal é o sintoma mais comum do câncer retal. Com a progressão do tumor, outros sintomas como tenesmo, hematoquezia, evacuação incompleta, diminuição do calibre retal, dores pélvica e retal ou outros sintomas de características obstrutivas podem estar presentes (FAZELI & KERATAMI, 2014). No caso do câncer retal metastático, os sintomas clínicos são referentes ao local da metástase. No reto superior, com drenagem do sistema portal, o local mais comum de metástase é o fígado, seguido pelos pulmões e ossos; no reto distal, drenado pelas veias retal e cava inferiores, a metástase inicial é nos pulmões (DE ROSA et al., 2015).

São frequentemente observadas no CCE a instabilidade cromossômica, mutações em NIC, K-ras, APC, PIK3CA, p53, microRNA-146a, microRNA-147b e microRNA-1288, a boa resposta terapêutica a quimioterapia adjuvante e terapias direcionadas (EGFR), presença de adenocarcinoma tubular, viloso e típico, metástases hepática e pulmonar (BARAN et al., 2018; PETRELLI et al., 2017), hematoquezia, alteração hábito intestinal, aneuploidia, pouca infiltração de células imunes, infiltração estromal acentuada (BELTRÁN et al., 2019) e uma ocorrência maior em homens e em indivíduos com PAF (KIM et al., 2015). Por outro lado, são frequentemente observadas no CCD uma alta instabilidade microssatélite (MSI), mutações na via de reparo de DNA, a presença de adenomas séricos serrilhados ou adenocarcinomas mucinosos, baixa resposta a quimioterapia convencional, mas promissora a imunoterapia, metástase peritoneal (BARAN et al., 2018), tumores pouco diferenciados, lesões polipóides volumosas e exofíticas, anemia por deficiência de ferro, perda de sangue oculto, mutações KRAS, BRAF e micro RNA-31 (PETRELLI et al., 2017), presença de células diplóides com hipermetilação, hipermutação e infiltração de células imunes (BELTRÁN et al., 2019) e uma ocorrência maior em mulheres, idosos e em indivíduos com CCHNP (KIM et al., 2015).

#### 6. RASTREAMENTO E DIAGNÓSTICO

Embora diversos casos assintomáticos de CCR em estadios iniciais sejam diagnosticados a partir dos atuais programas de rastreamento mundial, um número significativo de casos é diagnosticado após o início dos sintomas.

A presença destes programas de rastreamento é de extrema importância para avaliar a incidência e prevalência do CCR. Atualmente, diversos testes de triagem, invasivos e não invasivos e com sensibilidade e especificidade diferenciados, são empregados para detectar tumores em estágios iniciais (MARLEY & NAN, 2016). As modalidades de rastreamento escolhidas vão variar de acordo com o custo e a disponibilidade de recursos diagnósticos, além de funcionarem como ferramentas de detecção precoce ou prevenção do câncer (KUIPERS et al., 2013).

Atualmente, o rastreamento do CCR em adultos é recomendado a partir dos 45 anos. Para adultos com idade entre 76 e 85 anos recomenda-se uma avaliação individualizada, levando em consideração o histórico de triagens anteriores e o estado de saúde geral do paciente. Este rastreamento poderá ser realizado por meio de exames de sangue oculto nas fezes, sigmoidoscopia e colonoscopia (JIN, 2016). Para indivíduos com maior risco de CCR (histórico familiar, adenomas ou doença inflamatória intestinal e síndromes hereditárias) recomenda-se começar a triagem antes dos 50 anos (KEUM & GIOVANNUCCI, 2017).

O teste de sangue oculto nas fezes (FOBT) e os testes imunoquímicos fecais (FIT) são métodos não invasivos e de detecção precoce do CCR. O FOBT detecta a heme e o FIT a globina humana, ou seja, partes da molécula de hemoglobina. Para a detecção desta molécula dois produtos químicos são empregados, o guaiaco e anticorpos (DAS et al., 2017).

A sigmoidoscopia e a colonoscopia são métodos invasivos na qual o médico insere um tubo fino e flexível no intestino grosso, visualizando todas as regiões para verificar a presença de pólipos ou qualquer sinal indicativo de carcinogênese. A sigmoidoscopia visualiza as regiões do reto e sigmoide e sua realização é indicada a cada 5 anos. Já a colonoscopia visualiza o reto, sigmoide e todas as extensões do colón e sua realização é indicada a cada 10 anos (JIN, 2016).

Outros exames como proctológico (inspeção, palpação e toque retal), ressonância magnética, ultrassonografia, tomografia computadorizada, enema de bário com duplo contraste, a colonoscopia virtual, o teste de DNA nas fezes e anatomopatológico também são solicitados por algumas instituições clínicas, dependendo da localização e estadiamento do tumor (GRUNDEI, 2015; MARLEY & NAN, 2016).

O antígeno carcinoembrionário (CEA) e antígeno carboidrato 19-9 (CA19-9) são marcadores tumorais usados no diagnóstico do CCR. Estes marcadores são usados na prática clínica, porém não específicos para a detecção precoce do CCR devido a baixa sensibilidade, o que significa que não podem ser usados no diagnóstico de carcinoma *in* 

*situ*. O CEA também têm valores no acompanhamento pós-tratamento, no planejamento do tratamento cirúrgico e na avaliação do prognóstico (HAQUE & SHEKHAR, 2018).

#### 7. ESTADIO

O grau de diferenciação do tumor apresenta variações conforme a identificação das glândulas, morfologia nuclear e mitoses. A classificação tumor-linfonodo-metástase (TNM), preconizada pela *American Joint Committee on Cancer* (AJCC), é utilizada para identificar o estadiamento do CCR e pode ser diferenciada por dois prefixos: cTNM (classificação clínica) que é estabelecida a partir dos dados do exame físico e dos exames complementares (imagem) e pTNM (classificação patológica) que baseia-se nos achados cirúrgicos e no exame anatomopatológico da peça operatória (INCA, 2017). Os prefixos "p" e "yp" empregados nos estadios TNM, denotam respectivamente o estadio patológico depois da terapia neoadjuvante e da cirurgia (AMIN, et al.; 2017).

O "T" apresenta um número ou letra que descreve o tumor primário (profundidade de invasão na parede), o "N" representa o comprometimento linfonodal e o "M" refere-se à metástase à distância. Assim, a classificação do estadiamento (Tabela 1) permite iniciar uma terapêutica mais adequada para cada categoria aumentando as chances de sobrevida dos pacientes (PIAZZOLLA, 2015).

Estadiamento		TNM			
0	Tis	NO	M0		
I	T1;T2	NO	MO		
IIA	Т3	NO	MO		
IIB	T4a	NO	MO		
IIC	T4b	NO	MO		
IIIA	T1-T2; T1	N1-N1c; N2a	M0		
IIIB	T3-T4a; T2-T3; T1-T2	N1-N1c; N2a; N2b	M0		
IIIC	T4a; T3-T4a; T4b	N2a; N2b; N1-N2	MO		
IVA	Qualquer T	Qualquer N	M1a		
IVB	Qualquer T	Qualquer N	M1b		
IVC	Qualquer T	Qualquer N	M1c		

Tabela 1: Estadiamento TNM. Fonte: AJCC (2017, 8 ed.)

Um entendimento sobre a composição da parede intestinal é necessário para determinar o envolvimento do tumor e o estagio da doença. A parede intestinal (Figura 3) inclui várias camadas, começando pela camada mais interna, a mucosa, que é formada por epitélios e depois a muscular da mucosa. Estas são circundadas respectivamente pela submucosa, muscular, subserosa e a serosa. A parte externa do intestino é coberta por uma camada de tecido adiposo, que contém linfonodos e vasos sanguíneos que alimentam o tecido intestinal (GRESS et al., 2017).

No CCR o estadiamento é determinado pela avaliação da extensão de sua penetração na espessura da parede intestinal (Tis, T1, T2, T3 e T4), pela presença ou ausência de tumor nos linfonodos (metástases linfáticas) que habitualmente fazem parte da estrutura anatômica do órgão ou pela propagação do tumor para outros órgãos (metástases), das quais os mais frequentes são fígado, pulmão e ossos (BRASIL, 2003).



Figura 3: Camadas da parede intestinal e nível de penetração do tumor. Fonte: O autor (2020).

#### 8. TRATAMENTO

As formas de tratamento como a quimioterapia, radioterapia, cirurgia e imunoterapia vão depender do tamanho, extensão e localização do tumor e das condições gerais do paciente e estas podem ser aplicadas de forma isolada ou até mesmo associadas.

No caso do tratamento cirúrgico, ele pode ser curativo (remoção completa do tumor primário, de órgãos ou estruturas adjacentes comprometidas e de metástases localizadas) ou paliativo (reduzir ou controlar os sintomas relacionados ao tumor). Os procedimentos cirúrgicos recomendados para o câncer de cólon são uma ressecção em bloco dos órgãos adjacentes e a linfadenectomia adequada (NCCN, 2019a). Para o câncer retal a cirurgia é realizada 16 semanas após tratamento neoadjuvante e os métodos aplicados compreendem a excisão local, ressecção e anastomose ou ressecção e colostomia (COUWENBERG et al., 2019).

A quimioterapia pode ser realizada antes e após a cirurgia e objetiva diminuir o risco de recidiva tumoral em até 30%. A escolha terapêutica, bem como a duração da terapia, depende do estagio patológico do tumor, da resposta do paciente ao tratamento e do risco de reincidência. As opções para terapia inicial incluem 5-FU e Leucovorina com Oxaliplatina (FOLFOX), 5-Fluorouracil e Leucovorina com Irinotecano (FOLFIRI), Capecitabina e Oxaliplatina (CAPEOX) e 5-Fluorouracil, Leucovorina, Oxaliplatina e Irinotecano (FOLFOXIRI). Dependendo da avaliação clínica do paciente indica-se a adição de agentes biológicos como Bevacizumabe, Cetuximabe ou Panitumumabe. Este tratamento é realizado em ciclos e pode ser diário, semanal ou mensal (NCCB, 2019a; NCCB, 2019b).

A radioterapia também pode ser aplicada antes do procedimento cirúrgico para diminuir o tumor e após a cirurgia para interromper a evolução das áreas remanescentes do câncer. A radiação pode ser aplicada também com o objetivo de aliviar os sintomas do câncer e para impedir recidiva (SOUZA, 2016).

A interação entre as células tumorais e o sistema imunológico levou a uma nova abordagem terapêutica, a imunoterapia (CIARDIELLO et al., 2019). A imunoterapia é aplicada em tumores de CCR com MSI. A MSI decorre da inativação de proteínas de reparo do DNA (*mismatch repair genes* - MMR) e se constitui na base molecular do CCHNP (KATHER et al., 2018; LOSSO et al., 2012). Atualmente existem muitas imunoterapias em desenvolvimento e gradativamente estão sendo aplicadas na terapêutica do CCR, são elas: vacinas, terapia oncolítica viral, terapia com inibidores do *checkpoint* imunológico e moduladores imunológicos (KALYAN et al.; 2018).

#### 9. PREVENÇÃO

Mudanças no estilo de vida como evitar tabagismo, etilismo e o consumo de carnes vermelhas e gorduras saturadas, ingestão de dieta balanceada, a prática diária de atividades físicas com o objetivo de prevenir o ganho de peso e reduzir os níveis de insulina e a inflamação sistêmica e o aconselhamento genético para pessoas com histórico familiar de CCR ou polipose estão associadas a riscos significativamente menores de CCR (DAS et al., 2017).

A presença de fibras, ácido fólico, antioxidantes e vitaminas das frutas e vegetais parecem ter um efeito protetor contra CCR. A dieta rica em fibras pode reduzir o risco de CCR ao aumentar a absorção de ácido fólico, de micronutrientes e a massa fecal e diminuir o pH intestinal, o tempo do trânsito intestinal e a fermentação de bactérias amido resistentes a ácido graxo de cadeia curta (AGCC). O butirato, principal AGCC produzido por fermentação colônica, é a principal fonte de energia para os colonócitos, podendo aumentar a apoptose e inibir a proliferação de células tumorais (SONG et al., 2015; HAMER et al., 2008). O ácido fólico apresenta um papel importante na manutenção da síntese de DNA e na regulação da metilação do DNA que controla a expressão do proto-oncogenese (MASON et al., 2007).

A suplementação oral com cálcio e vitamina D pode reduzir o risco de CCR. O cálcio liga-se aos ácidos graxos ionizados e ácidos biliares diminuindo o efeito cancerígeno destes sobre a mucosa intestinal. Alternativamente, o cálcio também pode reduzir a proliferação celular e promover a diferenciação celular modulando as vias de sinalização (KEUM & GIOVANNUCCI, 2017). A vitamina D é convertida em sua forma ativa, o Calcitriol, que liga-se ao receptor de vitamina D regulando vários processos biológicos incluindo a diminuição da proliferação celular, inibição da angiogênese, a diferenciação celular, o estímulo a apoptose e a melhora na resposta imune (DOU et al., 2016).

Medicamentos como anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) e hormônios pósmenopausa estão associados a redução de casos de CCR, embora seus usos sejam afetados pelos riscos associados. Os AINEs, incluindo a Aspirina, atuam inibindo a via da ciclooxigenase 2, uma via pró-inflamatória que promove a proliferação celular, inibe a apoptose e estimula a angiogênese (SOSTRES et al., 2014). Ainda pouco se sabe sobre a influência da terapia hormonal exógena com estrogênio e progesterona e o risco de CCR. O estrogênio diminui a produção hepática de insulina e do fator de crescimento insulínico (IGF-1) (GUNTER et al., 2008) e a de ácidos biliares (ROZENBERG et al., 2013) que podem promover alterações malignas no tecido colônico. A progesterona parece atuar como efeito antiproliferativo no ciclo proteico do epitélio colorretal (MØRCH et al., 2016).

# 10. CONCLUSÃO

A alta incidência do CCR e as diferenças apresentadas nos resultados dos tratamentos, de acordo com o estadio, reforçam cada vez mais a importância do rastreamento, prevenção e detecção precoce desta doença.

Diversos fatores dificultam a realização de uma efetiva política de prevenção, levando ao atraso do diagnóstico, que muitas vezes se encontra em estadios avançados, a um aumento na demanda de internações prolongadas oriundas do tratamento ou pelas características clínicas da doença e consequentemente a um alto índice de mortalidade.

Mas é claro que, sozinhas, estas ações preventivas não apresentarão resultados positivos, é necessário também que haja uma adesão populacional satisfatória em todas as etapas de investigação da doença.

#### REFERÊNCIAS

AMIN, M. B.; GREENE, F. L.; EDGE, S. B.; COMPTON, C. C.; GERSHENWALD, J. E.; BROOKLAND, R. K.; MEYER, L.; GRESS, D. M.; BYRD, D. R.; WINCHESTER, D. P. The Eighth Edition AJCC Cancer Staging Manual: Continuing to build a bridge from a population based to a more "personalized" approach to cancer staging. *CA Cancer J Clin.* v. 67, n. 2, p. 93-99, 2017. DOI: 10.3322/caac.21388.

AJCC. American Joint Committee on Cancer. 8 ed. **Colon and rectum cancer staging**. 2017.

ANTELO, M.; GOLUBICKI, M.; ROCA, E.; MENDEZ, G.; CARBALLIDO, M.; ISEAS, S.; CUATRECASAS, M.; MOREIRA, L.; SANCHEZ, A.; CARBALLAL, S.; CASTELLS, A.; BOLAND, C. R.; GOEL, A.; BALAGUER, F. Lynch-like syndrome is as frequent as Lynch syndrome in early-onset non-familial non-polyposis colorectal cancer. *Int J Cancer.* v. 145, n. 3, p. 1-29, 2019. DOI: 10.1002/ijc.32160.

ARIF, H.; SOHAIL, A.; FARHAN, M.; REHMAN, A. A.; AHMAD, A.; HADI, S. M. Flavonoids-induced redox cycling of copper ions leads to generation of reactive oxygen species: a potential role in cancer chemoprevention. *Int J Biol Macromol.* n. 106, p. 569-578, 2017. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2017.08.049.

BAEK, S. K. Laterality: Right-sided and left-sided colon cancer. *Ann Coloproctol.* v. 33, n. 6, p.205-206, 2017. DOI: 10.3393/ac2017.33.6.205.

BARAN, B.; OZUPEK, N. M.; TETIK, N. Y.; ACAR, E.; BEKCIOGLU, O.; BASKIN, Y. Difference between left-sided and right-sided colorectal cancer: a focused review of literature. *Gastroenterol Res.* v. 11, n. 4, p. 264-273, 2018. DOI: 10.14740/gr1062w.

BARDOU, M.; BARKUN, A. N.; MARTEL, M. Obesity and colorectal cancer. *Gut.* v. 62, n. 6, p. 933-947, 2013. DOI: 10.1136/gutjnl-2013-304701.

BELTRÁN, L.; GONZÁLEZ-TREJO, S.; CARMONA-HERRERA, D. D.; CARRILLO, J. F.; HERRERA-GEOEPFERT, R.; AIELLO-CROCIFOGLIO, V.; GALLARDO-RINCÓN, D.; MELÉNDEZ-PONCE, N. A.; OCHOA-CARRILLO, F. J.; OÑATE-OCANA, L. F. Prognostic factors and differences in survival of right and left colon carcinoma: a STROBE compliant retrospective cohort study. **Arch Med Res.** v. 50, p. 63-70, 2019. DOI: 10.1016/j.arcmed.2019.05.011.

BRAY, F.; FERLAY, J.; SOERJOMATARAM, I.; SIEGEL, R. L.; TORRE, L. A.; JEMAL, A. Global câncer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *Cancer J Clin.* v. 68, p. 394-424, 2018. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2017.08.049.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Instituto Nacional de Câncer - INCA. Falando sobre câncer de intestino. Rio de Janeiro: 2003, p. 36.

CIARDIELLO, D.; VITIELLO, P. P.; CARDONE, C.; MARTINI, G.; TROIANI, T.; MARTINELLI, E.; CIARDIELLO, F. Immunotherapy of colorectal câncer: challenges for

therapeutic efficacy. *Cancer Treat Rev.* v. 76, p. 22-32, 2019. DOI: 10.1016/j.ctrv.2019.04.003.

COUWENBERG, A. M.; BURBACHB, J. P.; INTVENA, M. P. W.; CONSTENC, E. C. J.; SCHIPHORSTD, A. H. W.; SMITSE, A. B.; WIJFFELSE, N. A. T.; HEIKENSF, J. T.; KOOPMANG, M.; VAN GREVENSTEINH, W. M. U.; VERKOOIJENI, H. M.. Health-related quality of life in rectal cancer patients undergoing neoadjuvant chemoradiation with delayed surgery versus short-course radiotherapy with immediate surgery: a propensity score-matched cohort study. *Acta Oncol.* p.1-10, 2019. DOI:10.1080/0284186x.2018.1551622.

DAS, V.; KALITA, J.; PAL, M. Predictive and prognostic biomarkers in colorectal câncer: A systematic review of recente advances and chalenges. *Biomed Pharmacother*. v. 87, p. 8-19, 2017.

DASHTI, S. G.; WIN, A. K.; HARDIKAR, S. S.; GLOMBICKI, S. E.; MALLENAHALLI, S.; THIRUMURTHI, S.; PETERSO, S. K.; YOU, Y, N.; BUCHANAN, D. D.; FIGUEIREDO, J. C.; CAMPBELL, P. T.; GALLINGER, S.; NEWCOMB, P. A.; POTTER, J. D.; LINDOR, N,M.; LE, MARCHAND L, HAILE RW, HOPPER JL, JENKINS MA, BASEN-ENGQUIST KM, LYNCH P. M.; PANDE, M. Physical activity and the risk of colorectal cancer in Lynch syndrome. *Int J Cancer.* v. 143, n. 9, p. 2250-2260, 2018. DOI: 10.1002/ijc.31611.

DE ROSA, M.; PACE, U.; REGA, D.; COSTABILE, V.; DURATURO, F.; IZZO, P.; DELRIO, P. Genetics, diagnosis and management of colorectal cancer (Review). *Oncol Rep.* v. 34, n. 3, 1087–1096, 2015. DOI:10.3892/or.2015.4108.

DOU, R.; NG, K.; GIOVANNUCCI, E. L.; MANSON, J. E.; QIAN, Z. R.; OGINO, S. Vitamin D and colorectal cancer: molecular, epidemiological and clinical evidence. *Br J Nutr.* v. 115, n. 09, p. 1643-1660, 2016. DOI: 10.1017/s0007114516000696.

DUTHIE, S. J. Folic acid deficiency and cancer: mechanisms of DNA instability. *Br Med Bull*. v. 55, n. 3, p. 578-592, 1999. DOI: 10.1258/0007142991902646.

FAZELI, M. S.; KERAMATI, M. R. Rectal cancer: a rewiew. *Med J Islam Repub Iran*. n. 29, v. 171, p. 1-23, 2015.

FERLAY, J.; SHIN, H. R.; BRAY, F.; FORMAN, D.; MATHERS, C.; PARKIN, D. M. GLOBOCAN 2012: Cancer incidence and mortality worldwide. *IARC Cancer Base.* n. 11, 2013.

FIDLER, M. M.; SOERJOMATARAM, I.; BRAY, F. A global view on cancer incidence and national levels of the Human Development Index. *Int J Cancer*. n. 139, p. 2436-2446, 2016. DOI: 10.1002/ijc.30382.

GALIATSATOS, P.; FOULKES, W. D. Familial adenomatous polyposis. *Am J Gastroenterol*. v. 101, n. 2, p. 385-398, 2006. DOI: 10.1111/j.1572-0241.2006.00375.x.

GANDOMANI, H. S.; YOUSEFI, S. M.; AGHAJANI, M.; MOHAMMADIAN-HAFSHEJANI, A.; TARAZOJ, A. A.; POUYESH, V.; SALEHINIYA, H. Colorectal cancer in the world: incidence, mortality and risk factors. *Biomed Res Ther.* v. 4, n. 10, p. 1656-1675, 2017. DOI: 10.15419/bmrat.v4i10.372.

GRESS, D. M.; EDGE, S. B.; GREENE, F. L.; WASHINGTON, M. K.; ASARE, E. A.; BRIERLEY, J. D.; BYRD, D. R.; COMPTON, C. C.; JESSUP, J. M.; WINCHESTER, D. P.; AMIN, M. B.; GERSHENWALD, J. E. Principles of cancer staging. In: AMIN, M. B.; EDGE, S. B.; GREENE, F. L., et al; *AJCC Cancer Staging Manual*. 8 ed. Springer: New York, 2017.

GRUNDEI T. Frequent proctologic findings from a surgeon's viewpoint. *Hautarzt.* v. 66, n. 6, p.423-429, 2015.

GUNTER, M.J.; HOOVER, D. R.; YU, H.; WASSERTHEIL-SMOLLER, S.; ROHAN, T.E.; MANSON, J. E.; HOWARD, B, V.; WYLIE-ROSETT, J.; ANDERSON, G. L.; HO, G. Y.; KAPLAN, R. C.; LI, J.; XUE, X.; HARRIS, T. G.; BURK, R. D.; STRICKLER, H. D. Insulin, insulin-like growth factor-I, endogenous estradiol, and risk of colorectal cancer in postmenopausal women. *Cancer Res.* v. 68, n. 1, p. 329-337, 2008. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-07-2946.

HAMER, H. M.; JONKERS, D.; VENEMA, K.; VANHOUTVIN, S.; TROOST, F. J.; BRUMMER, R. J. Review article: the role of butyrate on colonic function. *Aliment Pharmacol Ther.* v. 27, n. 2, p. 104-119, 2008. DOI: 10.1111/j.1365-2036.2007.03562.x.

HARRIS, R. *Global epidemiology of cancer*. Burlington: 2016.

HAQUE, S. S.; SHEKAR, R. Diagnostic significance of CEA and CA 19-9 for the early diagnosis of cancer. *J Med Chem Toxicol*. v. 4, n. 1, p.1-3, 2018. DOI: 10.15436/2575-808X.19.2441.

HOMANN, N.; TILLONEN, J.; SALASPURO, M. Microbially produced acetaldehyde from ethanol may increase the risk of colon cancer via folate deficiency. *Int J Cancer*. v. 86, n. 2, p. 169-73, 2000. DOI: 10.1002/(sici)1097-0215(20000415)86:2<169::aid-ijc4>3.0.co;2-3.

HSU, Y.; LIN, C.; JIANG, J.; LIN, H.; LAN, Y.; WANG, H.; YANG, S.; CHEN, W.; LIN, T.; LIN, J.; LIN, P.; CHANG, S. Clinicopathological and molecular differences in colorectal cancer according to location. *Int J Biol Markers*. p. 1-7, 2019. DOI: 104600818807164.

HU, W.; YANG, Y.; LI, X.; HUANG, M.; XU, F.; GE, W.; ZHANG, S.; ZHENG, S. Multiomics approach reveals distinct differences in left- and right-sided colon cancer. *Mol Cancer Res.* n. 16, p. 476-485, 2018. DOI: 10. 1158/1541-7786.MCR-17-0483.

INCA. Instituto Nacional do Câncer. Estimativa 2018: incidência de câncer no Brasil. Rio de

Janeiro: 2017, p. 128.

JIN, J. Screening for Colorectal Cancer. *JAMA*. v. 315, n. 23, p. 2635, 2016. DOI: 10.1001/jama.2016.7569.

KALYAN, A.; KIRCHER, S.; SHAH, H.; MULCAHY, M.; BENSON, A. Updates on immunotherapy for colorectal cancer. *J Gastrointest Oncol*. v. 9, n. 1, p. 160-169, 2018. DOI: 10.21037/jgo.2018.01.17.

KATHER, J. N.; HALAMAA, N.; JAEGER, D. Genomics and emerging biomarkers for immunotherapy of colorectal cancer. *Semin Cancer Biol.* v. 52, p. 189-197, 2018. DOI: 10.1016/j.semcancer.2018.02.010.

KEUKELEIRE, S. Lipid metabolism in colorectal cancer: alterations, therapeutic opportunities and outlook on molecular diagnostics. Bélgica: 2016, 59 p. Dissertação (Mestrado em Medicina). Universiteit Gent, Bélgica, 2016.

KEUM, N.; GIOVANNUCCI, E. L. Epidemiology of colorectal cancer. Capítulo 21. *Pathology and Epidemiology of Cancer.* p. 391-407, 2016. DOI: 10.1007/978-3-319-35153-7\_21.

KEY, T. J.; SCHATZKIN, A.; WILLETT, W. C.; ALLEN, N. E.; SPENCER, E. A.; TRAVIS, R. C. Diet, nutrition and the prevention of cancer. *Public Health Nutr.* v. 7, p. 187-200, 2004. DOI:10.1079/phn2003588.

KIM, S.; PAIK, H. Y.; YOON, H.; LEE, J. E.; KIM, N.; SUNG, M. Sex- and gender-specific disparities in colorectal cancer risk. *World J Gastroenterol*. v. 21, n. 17, p. 5167-5175, 2015. DOI: 10.3748/wjg.v21.i17.5167.

KISHIKI, T.; KUCHTA, K.; MATSUOKA, H.; KOJIMA, K.; ASOU, N.; BENIYA, A.; YAMAUCHI, S<sup>-;</sup> SUGIHARA, K.; MASAKI, T. The impact of tumor location on the biological and oncological differences of colon cancer: multi-institutional propensity scorematched study. *Am J Surg.* v. 217, n. 1, p. 46-52, 2018. DOI: 10.1016/j.amjsurg.2018.07.005.

KUIPERS, E. J.; ROSCH, T.; BRETTHAUER, M. Colorectal cancer screening-optimizing current strategies and new directions, *Nat. Rev. Clin. Oncol.* n. 10, n. 3, p.130–142, 2013. DOI: 10.1038/NRCLINONC.2013.12.

LIM, D. R.; KUK, J. K.; KIM, T.; SHIN, E. J. Comparison of oncological outcomes of rightsided colon cancer versus left-sided colon cancer after curative resection. Wich side is better outcome. *Medicine*. v. 96, n. 42, p. 1-7, 2017. DOI: 10.1097/MD.0000000008241.

LOPEZ-MORRA, H. A.; LINN, S.; TEJADA, J.; OFORI, E. A.; GUZMAN, L. G.; SANIVARAPU, S.; PHAN, S.; DHALIWAL, A. J.; RODRIGUEZ, K. S.; BOORA, S. R.; SHIVJI, T.; SIVAKUMAR, K.; SUNKARA, T.; CULLIFORD, A. N.; ANAND, S. Sa1444 Does Insulin Influence the Risk of Colon Adenomas and Colorectal Cancer a Multicenter Look At a Minority Population. *Gastrointest Endosc.* v. 79, n. 5, p AB214, 2014. DOI: 10.1016/j.gie.2014.05.063.

LOSSO, G.M.; MORAES, R. S.; GENTILI, A. C. Instabilidade de microssatélite – msi nos marcadores (bat26, bat25, d2s123, d5s346, d17s250) no câncer de reto. **ABCD Arq Bras Cir Dig**. v. 25, n. 4, p. 240-244, 2012. DOI: 10.1590/S0102-67202012000400006.

MACIEL, A. C.; MACIEL, I. C. Colonografia por tomografia computadorizada: um método de

rastreamento conhecido porém pouco utilizado. Radiologia Brasileira. v. 47, p. 5-6, 2014.

MARLEY, A., R.; NAN, H. Epidemiology of colorectal cancer. *Int J Mol Epidemiol Genet.* v. 7, n. 3, p.105-114, 2016.

MASON, J. B.; DICKSTEIN, A.; JACQUES, P. F.; HAGGARTY, P.; SELHUB, J.; DALLAL, G.; ROSENBERG, I. H. A temporal association between folic acid fortification and an increase in colorectal cancer rates may be illuminating important biological principles: a hypothesis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* v. 16, n. 7, p. 1325–1329, 2007. DOI: 10.1158/1055-9965.EPI-07-0329.

MØRCH, L. S.; LIDEGAARD, Ø.; KEIDING, N.; LØKKEGAARD, E.; KJÆR, S. K. The influence of hormone therapies on colon and rectal cancer. *Eur J Epidemiol*. v. 31, n. 5, p. 481–489, 2016. DOI:10.1007/s10654-016-0116-z.

NCCN. National Comprehensive Cancer Network. *Clinical Practice Guidelines in Oncology – colon cancer.* p. 181, 2019a.

NCCN. National Comprehensive Cancer Network. *Clinical Practice Guidelines in Oncology – rectal cancer.* p. 166, 2019b.

PETRELLI, F.; TOMASELLO, G.; BORGONOVO, K.; GHIDINI, M.; TURATI, L.; DALLERA, P.; PASSALACQUA, R.; SGROI, G.; BARNI, S. prognostic survival associated with leftsided vs right-sided colon cancer. *JAMA Oncol.* v. 3, n. 2, p. 211-219, 2017. DOI: 10.1001/jamaoncol.2016.4227.

PIAZZOLLA, L. P. Influência da idade na apresentação clínica, no estadiamento patológico, tratamento e nos resultados oncológicos de pacientes com câncer colorretal esporádico. Brasília: UnB, 2015. 104 p. Tese (Doutorado em Ciências Médicas) – Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências Médicas, Universidade de Brasília, Brasília, 2015.

POULIN, E. J.; SHEN, J.; GIERUT, J. J.; HAIGIS, K. M. Pathology and Molecular Pathology of Colorectal Cancer. *Pathology and Epidemiology of Cancer*. p. 409-446, 2016. DOI: 10.1007/978-3-319-35153-7\_22.

ROZENBERG, S.; VANDROMME, J.; ANTOINE, C. Postmenopausal hormone therapy: risks and benefits. *Nat Rev Endocrinol.* v. 9, n. 4, p. 216-227, 2013. DOI: 10.1038/nrendo.2013.17.

SOSTRES, C.; GARGALLO, C. J.; LANAS, A. Aspirin, cyclooxygenase inhibition and colorectal cancer. *World J Gastrointest Pharmacol Ther*. v. 5, n. 1, p. 40-49, 2014. DOI: 10.4292/wjgpt.v5.i1.40.

SONG, M.; GARRETT, W. S.; CHAN, A. T. Nutrients, Foods, and Colorectal Cancer Prevention. *Gastroenterology*. v. 148, n. 6, p. 1244-1260, 2015. DOI:10.1053/j.gastro.2014.12.035.

SOUZA, R. H. S. Dos primeiros sintomas ao início do tratamento: trajetória dos pacientes do sistema único de saúde com neoplasia colorretal atendidos em um hospital público de Curitiba. Curitiba: UFP, 2016.92 p. Tese (Doutorado em Medicina Interna) – Programa de Pós- Graduação *Stricto Sensu* em Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2016.

ULANJA, M. B.; RISHI, M.; BEUTLER, B. D.; SHARMA, M.; PATTERSON, D. R.; GULLAPALLI, N.; AMBIKA, S. Colon cancer sidedness, presentation and survival at different stages. *J Oncol.* p. 1-12, 2019. DOI: 10.1155/2019/4315032.

WANG, C. B.; SHAHJEHAN, F.; MERCHEA, A.; LI, ZHUO.; BEKAII-SAAB, T. S.; GROTHEY, A.; COLIBASEANU, D. T.; KASI, P. M. Impact of tumor location and variables associated with overall survival in patients with colorectal cancer: A Mayo Clinic Colon and Rectal Cancer registry study. *Front. Oncol.* v. 9, n. 76, p. 1-10, 2019. DOI: 10.3389/fonc.2019.00076.

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. *Colorectal Cancer*. Estimated incidence, mortality and prevalence worldwide. 2012.

YASHIRO M. Ulcerative colitis-associated colorectal cancer. *World J Gastroenterol*. v. 20, p.16389-16397, 2014.

# CAPÍTULO II: PLASMALOGEN LIPIDS: FUNCTIONAL MECHANISM AND THEIR INVOLVEMENT IN GASTROINTESTINAL CANCER

MESSIAS, MÁRCIA CRISTINA FERNANDES; MECATTI, GIOVANA COLOZZA; PRIOLLI, DENISE GONÇALVES; DE OLIVEIRA CARVALHO, PATRÍCIA. Plasmalogen lipids: functional mechanism and their involvement in gastrointestinal cancer. Lipids in Health and Disease, v. 17, p. 41, 2018.

Neste capítulo é apresentada uma revisão sobre os plasmalogênios a fim de ampliar a compreensão sobre esta molécula e o seu envolvimento nos cânceres gastrointestinais. O artigo de revisão foi publicado na revista *Lipids in Health and Disease*.

Conforme apresentado nos Anexos 1 e 2, a revista *Lipids in Health and Disease*, detentora dos direitos autorais do manuscrito inserido neste capítulo, autorizou a utilização do mesmo nessa Tese de Doutorado desde que respeitadas as normas do contrato de licença da *BMC* (Anexo 3).
# ABSTRACT

The plasmalogens are a class of glycerophospholipids which contain a vinyl-ether and an ester bond at the *sn-1* and *sn-2* positions, respectively, in the glycerol backbone. They constitute 10 mol% of the total mass of phospholipids in humans, mainly as membrane structure components. Plasmalogens are important for the organization and stability of lipid raft microdomains and cholesterol-rich membrane regions involved in cellular signaling. In addition to their structural roles, a subset of ether lipids are thought to function as endogenous antioxidants and emerging studies suggest that they are involved in cell differentiation and signaling pathways. Although the clinical significance of plasmalogens is linked to peroxisomal disorders, the pathophysiological roles and their possible metabolic pathways are not fully understood since they present unique structural attributes for the different tissue types. Studies suggest that changes in plasmalogens metabolism may contribute to the development of various types of cancer. Here, we review the molecular characteristics of plasmalogens in order to significantly increase our understanding of the plasmalogen molecule and its involvement in gastrointestinal cancers as well as other types of cancers.

Keywords: Plasmalogen, Cancer, Lipidomic, Biomarker

# **1. INTRODUCTION**

Lipids, especially phospholipids (PL), are extremely diverse molecules and act as regulators of various cellular functions such as homeostasis, cell adhesion and migration, neurotransmission, signal transduction, vesicular trafficking, apoptosis and post-translational modification (FERLAY et al., 2012). Among the lipids, the categories that have the most important roles in the membrane structure are glycerophospholipids (GPL), sphingolipids, sterols and triglycerides (LOIZIDES-MANGOLD, 2013). Several studies have shown that the interruption of lipid metabolism is related to the onset and severe progression of some types of human cancers (FHANER et al., 2012). Recent discoveries in the modulation of essential lipid enzymes, signaling lipid molecules and global lipid metabolism alteration in aggressive progression of cancer have fundamentally expanded our perception of lipid metabolism and its impact on tumor etiology. Rewiring of metabolic programs, such as aerobic glycolysis and increased glutamine metabolism, are crucial for cancer cells to shed from a primary tumor, overcome the nutrient and energy deficit, and eventually survive and form metastases (LUO et al., 2017).

Biomarkers can be employed for (early stage) diagnosis of cancer, prognosis (assessing lethality) and prediction (patient's response to treatment) of cancer. Some PL have been described in the literature as potential biomarkers for cancer, among them the plasmalogens, a subclass of GPL (DUECK et al., 1996; BANDU et al., 2016). Plasmalogens were discovered accidentally in 1924 by Feulgen and Voit (BRAVERMAN & MOSER, 2012) while staining sections of tissue with a nuclear dye that reacted with the aldehydes released by DNA acid hydrolysis (SNYDER, 1999). Structurally the plasmalogen exhibits a vinyl ether at the *sn-1* position of glycerol, play several roles in cellular function and are an important component of the cellular plasma membrane (HAN, 2016). Although the mechanisms of action for plasmalogens remain unclear, they are starting to receive medical interest as they are now being linked to Alzheimer's disease, Down syndrome, molecular signaling abnormalities and cancer. Plasmalogens are linearly correlated with metastases spreading *in vivo*. Therefore, they can be useful in the prognosis of the most frequently observed human cancers, particularly in pathological colorectal, breast, lung and prostate tissues.

Among all organ cancers, gastrointestinal (GI) cancers present an interesting pattern in their global distribution. GI cancers is a term for the group of cancers that affect the digestive system and includes gastric, colorectal, intestinal, hepatocellular, esophageal and pancreatic cancers (POURHOSEINGHOLI et al., 2015). According to the World Health Organization (WHO, 2017), in 2015 cancer caused 8.8 million deaths worldwide. Among the types of cancer deaths, the most common are lung cancer (1.69 million deaths), liver (788,000 deaths), colorectal (774,000 deaths), stomach (754,000 deaths) and breast (571,000 deaths). The incidence of cancer is increasing not only because of the limited understanding of its pathophysiology, but also because there is a restriction on access to prevention, treatment and prognosis of the disease for most patients (YAN, et al., 2016). Early detection of cancer through diagnostic, prognostic and predictive biomarkers represents a promising field of research in the identification of early stage cancer and in personalized therapies. Although recent studies have identified a few molecular biomarkers that may detect GI cancer at its early stage and progression, there is still a large gap that needs to be addressed to improve its screening, prevention and treatment (DAS et al., 2017).

Lipidomic analysis can also provide information about the nature of cell dysfunction and also help identify the underlying metabolic pathways and molecular mechanisms of disease (HAN, 2016). To date, analytical strategies have been applied to a wide variety of biological samples such as blood, plasma, serum, cerebrospinal fluid, urine and biological tissue derived from animal models or clinical patients (YANG et al., 2016). Lipidomic analyses make it feasible to characterize the tumor, detect and, classify neoplastic cells and tissues and differentiate between the neoplastic and normal environment and also to evaluate the anticancer treatment (responsiveness and resistance). Consequently lipidomic analysis could lead to the discovery of new tumor biomarkers (PERROTTI et al., 2016).

The aim of this review is to provide an overview of current knowledge of the biology and pathology of plasmalogens with an emphasis on their involvement in GI cancer. Furthermore a better understanding of plasmalogen biology in cancer could also lead to the development of better diagnostic and prognostic biomarkers or new therapeutic target for GI cancers.

# 2. THE LIPIDS IN THE HUMAN BODY

In the last decades there has been an intense effort to develop adequate methodologies to discover, identify and quantitatively monitor the lipids of the biological system (LI et al., 2015). They have several key biological functions, such as the activation of the components of the cell membranes, and they serve as a source for energy storage and participate in the autocrine and paracrine signaling pathways and autophagy (FAHY et al., 2011). This diversity of function is due to the enormous variation and complexity in the structure of their molecules since different biochemical transformations are necessary for their biosynthesis to occur (BRÜGGER et al., 2014).

The Lipid Maps (2017) classification system defines the structure of lipids from two types of biochemical subunits or building blocks: ketoacyl and isoprene groups (FAHY et al., 2011). According to this approach, lipids can be classified into eight categories: fatty acids, glycerolipids, GPL, sphingolipids, saccharolipids and polyketides (derived from the condensation of ketoacyl subunits) and sterol and prenolic lipids (derived from the condensation of isoprene subunits) (Table 1) (YAN et al., 2016).

The major lipids present in the eukaryotic cell membrane are GPL, sterols and sphingolipids (VANCE, 2001). The major classes of GPL include: phosphatidic acid (PA), phosphatidylglycerol (PG), phosphatidylinositol (PI), cardiolipin (CL) and the aminoglycerophospholipids, namely phosphatidylcholine (PC), phosphatidylethanolamine (PE) and phosphatidylserine (PS). GPL are the most abundant in eukaryotic cells and the only subclass of GPL that present a long chain vinyl ether in the *sn-1* position of the glycerol moiety is the plasmalogens (VANCE, 2001; HOSSAIN et al., 2016). The GPL composition of membranes varies with cell type in multicellular organisms and is different in the individual organelles in eukaryotic cells. Plasmalogens are widely distributed in the biological membrane of animals and certain anaerobic bacteria (ONODERA et al., 2014) and appear to be associated with diverse clinical manifestations including metabolic diseases associated with oxidative stress (MAEBA et al., 2015) and cancer (DUECK et al., 1996).

Lipids Categories	Molecular structures	Representative functions	
Fatty acids		Major lipid building block of complex lipids.	
Glycerolipids	Contraction of the second seco	Membrane constituents, metabolic fuels and signaling molecules.	
Glycerophospholipids	~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~	Components of the lipid bilayer of cells.	
Sphingolipids		Formed by a sphingoid base backbone.	
Sterol lipids		Important components of membrane lipids and function as hormones.	
Prenol lipids	Y MA MA CHARACTER	Function as antioxidants.	
Polyketides		Commonly used antimicrobial, antiparasitic and anticancer agents.	
Saccharolipids	HO CH HO HO HO OH OH	Component of membrane lipids.	

#### Table 1: Categories of lipids. Representation of the structures of the eight lipid categories (Lipid Maps)

# 3. BIOMARKERS CATEGORIES

According to the Food & Drug Administration (FDA) (2017) a biological marker or a biomarker is defined as a characteristic that is measured as an indicator of normal biological processes, pathogenic processes, or responses to an exposure or therapeutic intervention.

They can be detected in the circulation (whole blood, serum or plasma) or excretion or secretions (stool, urine, sputum or nipple discharge), and thus easily assessed noninvasively and serially, or can be tissue–derived, and require either biopsy or special imaging for evaluation (NEWTON et a.I, 2011; HENRY & HAYES, 2012). In oncology, biomarkers have many potential applications inclunding risk, screening, diagnosis, prognosis, prediction and monitoring (Figure 1) (HENRY & HAYES., 2012). The six categories of biomarkers have been defined as follows: *Biomarker of risk:* inherent or acquired ability of the body to respond to exposure to a specific substance (NORDBERG, 2010).

Biomarker screening: early detection of disease in real time (HUANG et al., 2010).

*Biomarker diagnosis:* identifies whether a patient has a specific disease condition (GOOSSENS et al., 2015).

*Biomarker prognosis*: informs regarding the risk of clinical outcomes such as disease recurrence or disease progression in the future (SIDERIS & PAPAGRIGORIADIS, 2014).

*Biomarker prediction:* predicts response to specific therapeutic interventions (NEWTON et al., 2011).

*Biomarker monitory*: monitors the disease, recurrence and therapeutic response (HENRY & HAYES, 2012).

Although some approaches are performed in lipid analysis, no biomarker with 100% diagnostic accuracy has been found for any type of cancer because of the heterogeneous nature of the disease. Accordingly, efforts are focused on the search for biomarker panels instead of individual biomarkers (BANDU et al., 2016). Despite the significant improvements obtained in the last decades in the diagnosis and treatment of cancer, the impossibility of early detection of the disease through reliable biomarkers complicates personalized care for patients with cancer (FERLAY et al., 2015). Reliable biomarkers could also be useful in monitoring and controlling toxicity of antitumor treatment (LI et al., 2014).



Figure 1: The six main biomarkers categories. Fonte: O autor (2018)

#### 4. CHARACTERISTICS OF PLASMALOGENS

Based on the substitution present at the sn-1 position of the glycerol structure (ZOELLER et al., 1999), GPL are divided into three subclasses: acyl, alkyl and alkenyl (YAMASHITA et al., 2014). The alkenyls formed are called plasmalogens or plasmenyls or 1-0(1Z-alkenyl)-2-acylglycerophospholipids (BRAVERMAN & MOSER. 2012). Plasmalogens are characterized by the presence of a vinyl-ether bond at the *sn-1* position and an ester bond in the sn-2 position of the glycerol backbone (WALLNER & SCHMITZ, 2011; HU et al., 2017). Other ether PL include plasmanyl PL (containing a saturated ether molety at the sn-1 position), platelet-activating factor (PAF), seminolipid, and partly, the glycosylphosphatidylinositol anchor of membrane proteins. In addition to being present in human biological fluids, plasmalogens are also widely found in anaerobic bacteria, invertebrates and vertebrate animal species (BRAVERMAN & MOSER, 2012). Plasmalogens are characterized by a short half-life: about 30 min for choline plasmalogens and 3 h for ethanolamine plasmalogens (RINTALA et al, 1999). The plasmalogens are located in the cell membrane, organelles and lipid rafts and may represent (at least in selected cases) major constituents of membrane lipids; their presence is responsible for characteristic biophysical properties. The perpendicular orientation of the sn-2 acyl chain and the lack of a carbonyl group at the sn-1 position affect the hydrophobicity of these lipids causing stronger intermolecular hydrogen bonding between the individual phospholipid molecules (LOHNER, 1996). Concerning the biophysical properties, experiments have demonstrated that plasmalogens have lower lamellar gel to liquidcrystalline and lamellar to inverse-hexagonal phase transition temperatures compared to their alky and diacyl counterparts (LOHNER et al, 1984; LOHNER, 1996; HAN & GROSS, 1992).

#### 4.1. General structures

In the GLP category, plasmalogens differ from the other components of the class because they have an ether vinyl at the *sn-1* position of glycerol instead of a fatty acid (BRAVERMAN & MOSER, 2012). To this ether vinyl (R1) are attached the saturated (C16:0) and saturated and monounsaturated carbon chains (C18:0 and C18:1, respectively) (WALNER & SCHMITZ, 2011; BRAVERMAN & MOSER, 2012). In the *sn-2* 

(R2) position, plasmalogens are enriched with polyunsaturated fatty acid, specifically docosahexaenoic acids (C22:6 n-3) or arachidonic acid (C20:4  $\omega$ -6) (FUCHS, 2015). As for the *sn*-3 (X) position, plasmalogens are classified mainly as PC plasmalogens (also called plasmenylcholines) and PE plasmalogens (also called plasmenylethalomines) (MAEBA et al., 2015) (Figure 2).



**Figure 2: Structure of plasmalogen.** R1: saturated fatty acid (SFA), monounsaturated fatty acid (MUFA); R2: polyunsaturated fatty acid (PUFA); *sn-1*, *sn-2* and *sn-3* glycerol position; X: choline or ethanolamine as polar head group. Fonte: O autor (2018).

#### 4.2. Distribution in different species

Plasmalogens are distributed both in the animal kingdom and in certain anaerobic microorganisms (NAGAN & ZOELLER, 2001). In human cells plasmalogens correspond to 10 mol% of the total mass of all PL (HU et al, 2017). In relation to the content of plasmalogens, human tissues and cells may differ significantly in individual values, considering that: lipoproteins contain 5% (ENGELMANN, 2004), myelin 11-12% (NAGAN & ZOELLER, 2001), heart 32-50%, brain 20-50%, inflammatory cells up to 50% and spermatozoa 55% (LEßIG & FUCHS, 2009). In most tissues, ethanolamine is the dominating head group. Choline plasmalogens play an important role in cardiac tissue, but represent a minor species in most other organs. Other head groups, like serine or inositol, are extremely rare. In plasma, specifically, PE and PC plasmalogens represent 50% of total PE and 5% of total PC (OTOKI et al., 2017). Zhan et al (2013) point out that the liver has lower amounts of plasmalogens and that this reduction is possibly related to their synthesis in the liver and subsequent transport by the lipoproteins to other tissues.

### 4.3. Biosynthesis

Peroxisomes are organelles responsible for the activity of several metabolic pathways, including plasmalogen biosynthesis and  $\beta$ -oxidation of long chain fatty acids (BRITES et al, 2008). The absence or dysfunction of peroxisomes may be the cause of some human diseases (FUCHS, 2015).

Synthesis of plasmalogens initiated in peroxisomes occurs in seven steps (Figure 3) and is terminated in the endoplasmic reticulum (HONSHO et al., 2017). The process is initiated by the enzyme dihydroxyacetone phosphate acyltransferase (DHAPAT) where dihydroxyacetone phosphate (DHAP) is esterified with a long-chain acyl-CoA ester (BRITES et al., 2004). In the second step, the alkyl dihydroxyacetone phosphate synthase (ADHAP-S), forms the alkyl DHAP linkage. Out of the peroxisome, the acyl-CoA reductase 1 and 2 (FAR1/FAR2) enzymes provide the fatty alcohol for ADHAP-S (WALLNER & SCHMITZ, 2011). Subsequent steps occur in the endoplasmic reticulum and there is the biosynthesis of the diacylglycerophospholipids (HAN, 2016). In the third step alkyl-DHAP is reduced by alkyl-DHAP reductase to form 1-alkyl-glycerol-3-phosphate/G-3-P) (GOLDFINE, 2010). Then, in the fourth step, 1-alkyl-G-3-P acylation occurs with acyl-CoA to produce alkylacylglycerophosphate (HAN, 2016). The enzyme phosphatidate phosphohydrolase removes, in step five, the alkylacylglycerol phosphate (diacylglycerol analogue), which will be used in step six as a substrate to produce choline or ethanolamine GPL (NAGAN & ZOELLER, 2001). In the final step of the biosynthesis, the desaturation of the ether present in these two GPL by the C1-alkyl desaturase leads to the production of choline or ethanolamine plasmalogens (NAGAN & ZOELLER, 2001; HAN, 2016).

Membrane plasmalogen composition is tightly controlled by synthesis, remodeling, signaling induced hydrolysis and degradation. The fatty acyl-CoA reductase provides fatty alcohols used in the formation of alkyl bonds bound to ether (HONSHO et al, 2010). Lysoplasmalogenase, a specific enzyme of the plasmalogens *sn-2* position, catalyzes hydrolytic clevage of the vinyl-ether bond of lisoplasmalogen, forming a fatty aldehyde and glycerophosphocholine or glycerophosphoethanolamine (JURKOWITZ-ALEXANDER, 1991). It modulates the properties by similarity of the cell membrane, controlling the levels of plasmalogens and lisoplasmalogen in the cells (WU et al, 2011). Another enzyme that also acts in the *sn-2* position is Phospholipase A2 (PLA2). It catalyzes the hydrolysis of the

*sn-2* position of glycerol, releasing arachidonic acid, a precursor of eicosanoids (prostaglandins and leukotrienes) and it also produces lysophospholipids (MURAKAMI & KUDO, 2002).

# 4.4. Functions

Although the role of plasmalogens has not yet been fully elucidated, studies suggest that they have unique functions within the cells and that these are directly related to the bonds of *sn-1* vinyl ether and *sn-2* positions of polyunsaturated fatty acids (BRAVERMAN & MOSER, 2012). In addition, plasmalogens can act directly in reducing PL surface tension and viscosity, on the synaptic transmission process, on alveolar surfactants, improving membrane dynamics during respiratory cycles, on signal transduction (BRITES et al., 2004), on membrane vesicle formation, on ion transport, on the platelet activation factor (MANKIDY et al, 2010), the regulation of fusion, fission and fluidity of the cell membrane, control of membrane proteins activity (HU et al, 2017), as a reservoir for second lipid messengers (NAGAN & ZOELLER, 2001) and supporting polyunsaturated fatty acids (ANDRÉ et al., 2006).

Differences between the catabolism of ether GPL by specific phospholipases enzymes might be involved in the generation of lipid second messenger systems such as prostaglandins and arachidonic acid that are important in signal transduction (SPECTOR & YOREK, 1985). Ether lipids can also act directly in cell signaling, as the PAF is an ether lipid signaling molecule that is involved in leukocyte function in the mammalian immune system (DEMOPOULOS et al., 1979).

Plasmalogens play a crucial role as an endogenous antioxidants, protecting other PL, lipid and lipoprotein particles from oxidative stress (BRITES et al., 2004). This is due to the fact that the vinyl ether bond is preferably oxidized, while protecting the polyunsaturated fatty acids present in the *sn-2* oxidation position (ANDRÉ et al., 2006). As the hydrogen atoms adjacent to the vinyl ether bond have relatively low dissociation energy, they end up being oxidized when exposed to various oxidizing reagents (peroxyl radicals, metal ions, UV light, singlet oxygen and halogenating species) (FERNÁNDEZ et al., 2015). Consequently there is the consumption of plasmalogens in the reaction and the polyunsaturated fatty acids and other membrane lipids are spared from oxidation, suggesting the role of sacrificial oxidant for plasmalogens (BRAVERMANN & MOSER,

2012). They undergo oxidative decomposition more readily than their fatty acid ester analogues (BRONIEC et al., 2011). The oxidative products of plasmalogens are unable to further propagate lipid peroxidation; they may terminate the lipid oxidation process (SINDELAR et al., 1999). Thus, it is suggested that plasmalogens interfere in the propagation step rather than in the initiation of lipid peroxidation (ZEMSKI-BERRY & MURPHY, 2005). The product profile resulting from oxidation of plasmalogens will depend on the type of fatty acid esterified in the *sn-1* and *sn-2* positions of glycerol and on the nature of oxidative stress initiators (BRONIEC et al., 2011). These products have been used to assess the severity of pathological conditions involving oxidative stress (ZEMSKI-BERRY & MURPHY, 2005). Plasmalogens, in addition to being prone to the oxidative process, also play a role in the inhibition of iron-induced peroxidation of polyunsaturated fatty acid and in copper-induced oxidation of low density lipoproteins (BRITES et al., 2004). Thus plasmalogens could have a decisive role in the defense systems against lipid oxidation (HAHNEL et al., 1999).



Figure 3: Schematic representation of the biosynthesis of plasmalogens. See text for nomenclature and abbreviations. Fonte: O autor (2018).

#### 4.5. Analytical methods to detect plasmalogen

Several methods for identifying, characterizing and quantifying plasmalogens molecules have been developed with the aim of gaining broader knowledge about lipid ether activity in the pathogenesis of disease (HU et al., 2017; FHANER et al., 2013). Plasmalogen analysis can be performed through various analytical techniques (chromatography, mass spectrometry and other spectrometric techniques), each with its advantages and disadvantages (FUCHS, 2015). Just as with any other lipid, prior to analysis by analytical methods, plasmalogens should normally be extracted using solvents such as chloroform and methanol to remove water-soluble metabolites (FOLCH et al, 1957). The phase obtained with chloroform can be used without the need for purification (FUCHS, 2015). It is worth mentioning that any addition of acid should be avoided since plasmalogens are extremely sensitive and can affect the formation of lysophospholipids and aldehydes (FUCHS et al, 2010).

Among the chromatographic methods used for plasmalogen analysis are Thin-layer Chromatography (TLC) and High Performance Liquid Chromatography (HPLC) (YAMASHITA et al., 2014). These techniques, based on relative or absolute quantification and the use of internal standards, help in the identification of different plasmalogen subspecies as well as new plasmalogens (BRAVERMAN & MOSER, 2012). TLC allows several types of samples to be investigated in a single plate (LEßIG & FUCHS, 2009). In this method the plasmalogens react with acid dinitrophenylhydrazine (DNPH) leading to their hydrolysis (NIMPTSCH et al, 2013). The aldehyde released in this process is converted to 2,4-dinitrophenylhydrazone, an orange compound, which can be measured densiometrically, determining the plasmalogens content in the sample (FUCHS, 2015). A study by Maeba & Ueta (2004) with HPLC using radioactive iodine identified PC and PE plasmalogens in human plasma. Acid hydrolysis of the plasmalogens produces the lysophospholipid and a fatty acid, thus, the plasmalogen measurement is performed by quantifying one of the two products formed by HPLC (MURPHY et al, 1993). Many applications of HPLC quantification for plasmalogens analysis exist and are well documented in the literature (MURPHY, 1993; PATTON & ROBINS, 1998; MAWATARI, 2007). Currently, mass spectrometry (MS) and tandem mass spectrometry (MS/MS) methods are being used as tools for lipid analysis. Although MS has a high resolving power and mass precision, it can still be limited since many lipids have the same m/z

values (BUSIK et al., 2009). Strategies based on GC-MS and LC-MS for the analysis of chlorinated plasmalogen lipids (which are generated in the presence of activated chlorine) were summarized by Wacker et al, 2013. Optimized LC MS/MS conditions using alkali metals make it possible to selectively and sensitively identify PC and PE plasmalogens at the molecular species level in biological samples (rat brain and heart) (OTOKI et al., 2015). Although a number of different ionization techniques are currently available in lipid research, only two of them play a major role: electrospray ionization (ESI) and matrixassisted laser desorption and ionization (MALDI). The determination of the molecular weight alone does not provide structural information and tandem mass spectrometry (MS/MS) is normally required. Strategies currently used in lipidomic include direct infusion ESI-MS and ESI-MS/MS and MALDI combined with Fourier transform ion cyclotron resonance MS (MALDI-FTICR-MS) or time-of-flight MS (MALDI-TOF-MS) (FUCK et al., 2014). A combination of high-resolution, FI-FTICR-MS and flow-injection tandem mass spectrometry (FI-MS/MS) has been used to identify and confirm specific dysregulated metabolic systems associated with pancreatic cancer in two ethnically and geographically diverse populations (RITCHIE et al., 2013).

A very simple method to identify plasmalogens in crude lipid extracts was suggested. The reaction of plasmalogens with DNPH directly leads to the hydrolysis of the plasmalogens and the subsequent conversion of the released aldehyde into a 2,4dinitrophenylhydrazone that is easily detectable in the negative ion MALDI spectrum (NIMPTSCH et al., 2013).

Individual GPL classes and even the fatty acyl composition and the linkage type in *sn-1* position of a given lipid can be differentiated by phosphorus nuclear magnetic resonance spectroscopy (<sup>31</sup>P NMR) (LEßIG et al., 2004). Analysis of the tissue phospholipid extracts by <sup>31</sup>P NMR was found to be capable of discriminating between esophageal cancer and adjacent normal tissues, including the non-involved esophagus and normal stomach (MERCHANT et al., 1999).

#### 5. PLASMALOGENS LIPIDS IN GASTROINTESTINAL CANCER

Decades ago it was observed that cancer cells have remarkably higher levels of alkyl and alk-1-enyl ethers lipids compared to normal cells (SNYDER & WOOD, 1969; HOWARD et al., 1972; ALBERT & ANDERSON, 1977; ROOS & CHOPPIN, 1984). Encouraged by these findings, there were efforts trying to establish ether lipids as tumour markers in medical cancer diagnostics. Some studies have also reported decreased amounts of ether lipids in cancer patients (MERCHANT et al., 1999; RITCHIE et al., 2013).

In Table 2 it is possible to evaluate some plasmalogens that were identified in colorectal, gastric, pancreatic and esophageal cancer as well as the samples and techniques of lipidic analysis applied.

Although many studies suggest altered plasmalogen production in cancer patients, the mechanism is not yet understood, suggesting a need for future research. It was observed that the plasmalogens can activate phosphatidylinositol 3-kinase, stimulate cell growth, participate in mitogenic responses (MISRA et al., 1994) and have also been correlated with the levels of several oncogenic signaling lipids involved in the regulation of cell survival, cancer aggressiveness and tumor growth (BENJAMIN et al., 2013). Benjamin et al (2013) reported increased expression of the ether lipid synthetic enzyme ADHAP-S (also called alkylglyceronephosphate synthase, AGPS) in various cancer cell lines and primary tumors. AGPS knockdown impaired experimental cancer pathogenesis, including cell survival, migration, and invasion. The pathogenic impairments conferred by AGPS knockdown in cancer cells are due to the specific depletion of the oncogenic signaling lipid lysophosphatidic acid ether and prostaglandins. The studies indicated that AGPS may serve as an attractive therapeutic target for combatting malignant human cancers, through altering the landscape of oncogenic signaling lipids that drive cancer aggressiveness (PIANO et al., 2015).

Concerning the relationship of plasmalogens and tumors, Merchant et al (1991) reported a statistically significant elevation in the relative concentration of LPC and PC plasmalogens of malignant human colon specimens analyzed by <sup>31</sup>P NMR. They also showed that the PE plasmalogens and PS are significantly diminished in esophageal tumors when compared to normal esophageal tissues obtained from the same patients. The data revealed a correlation between decreasing levels of four of the PL (5-dihydrosphingomyelin, lysoalkylacylphosphatidylcholine, lysophosphatidylcholine and phosphatidylglycerol) and increasing tumor aggressiveness as indicated by *T* stage and tumor grade (MERCHANT et al, 1999).

	Samples	Biomarker	Analytical Methods	References
Liver	Hepatocellular carcinoma	↑ Neutral 0- alkylglycerolipids	Gas-chromatographic (GC) and colorimetric estimation	LIN et al, 1980
Colon	Tissue - 16 malignant human colon and 11 non-malignant	↑ PC plasmalogen ↓ PE plasmalogen	Nuclear magnetic resonance spectroscopy ( <sup>31</sup> P NMR)	MERCHANT et al., 1991
Colon	Tissue - human colon carcinoma	↑ PC and PE plasmalogen	Thin Layer Chromatography (TLC)	DUECK et al., 1996
Esophageal	Tissue - 36 malignant esophageal tumor	$\downarrow$ PE plasmalogen	Nuclear magnetic resonance spectroscopy ( <sup>31</sup> P NMR)	MERCHANT et al., 1999
Colorectal cancer liver metastasis	Tissue – 40 liver metastasis of colorectal cancer and 31 primary colorectal adenocarcinoma	↑PE plasmalogen (34:2)	Desorption electrospray ionization (DESI)	GERBIG et al., 2012
Pancreatic	Serum – 40 japonese pancreatic cancer and 50 controls	↓ PE plasmalogen	Flow-injection Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry (FI-FTICR- MS)	RITCHIE et al., 2013
Colorectal cancer	Visceral and subcutaneous adipose tissue in 59 CRC patients (tumor stages I–IV)	↓ PC and PE plasmalogen (P- 38:4/ P-36:4/) in visceral adipose tissue	Gas Chromatography time- of-flight mass spectrometry (CG-TOF-MS) and Liquid Chromatography quadrupole time-of-flight mass spectrometry (LC- QqTOF-MS)	LIESENFELD et al., 2015
Gastric	Plasma - 29 gastric carcinoma and 30 normal control	↑ Plasmalogen	Method of Sevennerholm (by iodine disappearance method)	JUN LV et al., 2015
Colorectal cancer liver metastasis	Tissue - 52 liver lesions from 50 patients	↑ PE Plasmalogen (P-16:0/18:2, P- 16:0/18:1)	Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry imaging (MALDI-MSI)	PATTERSON et al., 2016

**Table 2:** Principal alkyl and alkenyl glycerolipids identified in GI cancer patients, the type of tissue sample analyzed and techniques of lipidic analysis employed

According to Dueck et al (1996), alterations in the levels of different subclasses of plasmalogens may be related to the reduction of the activity of the Phospholipases C and D and increase of the activity of the phosphocholine cytidyltransferase enzyme in human colon cancer. For Christen et al (1999) the connection between plasmalogens and colorectal cancer can only be hypothesized, since the fluidity in the membrane, provided by plasmalogens, can facilitate the capture of carcinogenic substances, both microbial and via diet. Quantitative chromatographic analysis of the phospholipid content of colorectal carcinoma showed a generally elevated concentration of PL, also including na PE plasmalogens species (34:2) (Gerbig et al., 2002).

Ritchie et al (2013) confirmed the involvement of three major dysregulated metabolic systems in the serum of pancreatic cancer patients: very long-chain fatty acids, choline-containing GPL and PE plasmalogens. Although most of the individual metabolites showed a significant reduction in PC patient serum, the strongest discriminator based on multiple statistical criteria was PC-594.

In gastric carcinoma patients, the plasma plasmalogens content was significantly elevated and was positively correlated with elevated level of gangliosides and total cholesterols, but it was negatively correlated with level of total PL (JUN et al., 2015). Although many studies consistently reported higher concentration of plasma plasmalogens in cancer patients, the mechanism is not yet understood. The mechanism may be that the key plasmalogens enzyme, phosphodihydroxyacetone acyltransferase, strengthens activity (SUGIRA et al., 1990). Phosphatidyl cytonucleotide transferase activity can strengthen synthesis of plasmalogen (SCHRAKAMP et al., 1985).

Patterson et al, 2016 identify single lipid moieties that are overexpressed in different histopathological features from colorectal cancer liver metastasis specimens resected from patients preoperatively treated with chemotherapy, which have potential as new biomarkers for assessing response to therapy. Ceramides and plasmalogens were identified in the necrosis areas and made it possible to distinguish between different types of necrosis (usual necrosis and that typical of tumor progression) in tissue specimens that may not be clearly revealed by histopathology. PE plasmalogens (PE(p-16:0/18:2) and PE(p-16:0/18:1)) were associated with both tumor areas and areas of inflammation, whereas PC plasmalogens are exclusively abundant in areas of usual necrosis.

Although plasmalogens represent up to 20% of the total phospholipid mass in humans (BRAVERMAN & MOSER, 2012), found in plasma, different tissues and exosomes secreted by the colorectal cancer cell line (LYDIC et al., 2015), they have been excluded from profiles presented in many other studies in spite of the fact that the alterations of these active molecules are known to occur.

Altered metabolism of plasmalogens has also been reported in other cancers, such as breast, ovarian and lung. Merchant et al, 1991, showed that PC plasmalogens were increased in neoplastic human breast tissue compared to benign tissue and LPC was significantly depressed in benign tissue compared to normal tissue. PL indices computed to further characterize the three tissue groups showed PC plasmalogens/PC elevated in malignant tissue compared to benign tissue and PE plasmalogens/PE depressed in malignant tissue compared to noninvolved tissue. These findings support previous investigations reporting that the alkyl-phospholipid analogues of PC are released by malignant tissues and that levels of PE are elevated in malignant tissues.

Smith et al (2008) investigate the suitability of a lipid tumor marker derived from ether-linked PL in normal, benign and neoplastic samples from human breast, lung and prostate tissues. They observed that a biochemical marker derived from PE plasmalogens provides a reliable index capable of distinguishing between benign and neoplastic tissues and it correlates linearly with metastases spreading in vivo. A notable decrease of relative abundances of ether and vinyl ether (PIs) lipid species was detected for PEs, but no difference is apparent for PCs in tissues of breast cancer patients (CÍFKOVÁ et al., 2015). Recently, a lipidomics study on breast cancer patients identified increased plasma etherlinked phosphatidylcholine species as a diagnostic marker for breast cancer (CHEN et al., 2016). Compared to that found in benign patients, the plasma concentration of LPC and CE were observed to decrease in cancer patients, while PC and ether-linked phosphatidylcholine were increased. The results showed that lipid profiles may be a promising avenue for the investigation of diagnostic biomarkers of breast cancer.

Opposing trends are observed in ovarian cancer. Hou et al (2015) described that the epithelial ovarian cancer patients have reduced levels of plasmalogens compared with benign ovarian tumors and normal controls. The decreased PC and PE plasmalogens levels in these patients suggested that most cancer cells might exhibit elevated oxidative stress, which is consistent with previous findings that oxidative stress is associated with cancer progression (SITI et al., 2015).

# 6. ANTI-TUMOR PROPERTIES OF SYNTHETIC PLASMALOGENS AND ANALOGUES

Ether lipids have been shown to have anti-tumor properties, including reduction of tumor cell invasion and inhibition of tumor metastases. It is proposed that these chemotherapeutic agents interfere with lipid homeostasis due to their similarity with endogenous PL, targeting membrane lipid rafts and altering lipid-linked signalling, hence leading to apoptosis (BLITTERSWIJK & VERHEIJ, 2013; KOSTADINOVA et al., 2015). Typical representatives of this group are ether PL ET-18-OCH<sub>3</sub> (edelfosine) and BM 41.440 (ilmofosine) as well as hexadecylphosphocholine (miltefosine) (LOHMEYER & BITTMAN, 1994). Encouraging results have been found with all these compounds and

novel, promising analogues such as erucylphosphocholine (ErPC) and its homocholine analogue erufosine (ErPC3) also hold promise as a single-agent (monotherapy) or in combination regimens (RIOS MARCO et al., 2017). Several studies combining the more recent ether lipids derivatives with diverse antineoplastic agents provide clinically significant benefits (KOSTADINOVA et al., 2015). Shin et al (2001) described the synthetic pathway applied to the synthesis of 1-O-1'- (Z) -hexadecenyl-2-O-methyl-rac-glycero-3-phosphocholine, the Z-vinyl ether analogue of ET-18- OMe, which shows significant antitumor activity in pancreatic tumor cells. Also, Bittman et al (2001) reported the incorporation of a cis-O-vinyl linkage into the sn-1 position of glycerol of plasmalogens to synthesize a new antitumor ether lipid analogue of ET-18–OCH<sub>3</sub>.

The expression of plasmalogens is characteristic for tumorigenicity and an abnormal level of these glycerolipids was identified in various cancerous membranes. Flasinski et al, 2014 showed that the addition of ether lipids (PAF, lyso-PAF and edelfosine) destabilizes the films on model membranes with higher choline plasmalogens content (HL-60 and normal + PC-plasma model membranes) and strengthens the interactions in systems lacking choline plasmalogens (normal leucocytes model membrane) or of lower choline plasmalogens level (K-562). It should be pointed out that cell membranes sensitive to edelfosine have a lower level of cholesterol and are enriched by choline plasmalogens (HL-60), while insensitive species have a higher sterol level and simultaneously lack plasmalogens (normal erythrocytes) or are of decreased choline plasmalogens level compared to the sensitive cells (e.g. K-562 cells). Interestingly, the level of choline plasmalogens in cells insensitive to the effect of edelfosine, normal lymphocytes and K-562 cells is lower when compared with HL-60 cells (CHABOT et al., 1989).

#### 7. CONCLUSION AND PERSPECTIVE

Changes in plasmalogens levels were shown in this review to be exceptionally significant in biofluids and tissues of various cancer types compared with controls, which makes this category of plasmalogens good candidates as potential cancer biomarkers. This review aimed to give an overview of the current knowledge in this field with a focus on the involvement of plasmalogens in cancer. Although there is a growing body of evidence of their involvement in human diseases, many studies do not report the existence of these molecules in plasma or tissue samples from GI cancer patients. Lipidomics has just begun

to enter the field of cancer diagnostics and tumor biology and the evolution of lipidomic analysis with new high through put, high sensitivity methods such as mass spectrometry has made major advances in the plasmalogen field possible, by enabling detailed analyses of lipid species concentrations. Also, sophisticated statistical softwares (chemometrics) have enabled meaningful information extraction from the lipidomic data. In the near future this will lead to the identification and validation of novel, more specific biomarkers for disease detection and monitoring. The published data shows that plasmalogen levels in tissue or plasma are altered in several types of cancer. In this context, further studies should be carried out to evaluate the role of plasmalogens as potential biomarkers in patients with GI cancer and also to determine whether targeted inhibition of the vinyl-ether lipid synthetic pathway could treat these malignancies.

# ACKNOWLEDGMENT

This work has been supported by grants from Fapesp and Capes.

# CONFLICT OF INTEREST

The authors declare there is no conflict of interest in submission of this manuscript to this journal.

#### REFERENCES

ALBERT, D. H.; ANDERSON, C. E. Ether-linked glycerolipids in human brain tumors. *Lipids*. v. 12, n. 2, p. 188–192, p. 1977.

ANDRÉ, A.; JUANÉDA, P.; SÉBÉDIO, J.; CHARDIGNY, J. Plasmalogen metabolismrelated enzymes in rat brain during aging: influence of n-3 fatty acid intake. *Biochimie*. v. 88, n. 1, p. 103-111, 2006. DOI: 10.1016/j.biochi.2005.06.010.

BANDU, R.; MOK, H.; KIM, K. Phospholipids as cancer biomarkers: Mass spectrometrybased analysis. *Mass Spectrom Rev*, 2016. DOI: 10.1002/ mas.21510.

BENJAMIN, D. I.; COZZO, A.; JI, X.; ROBERTS, L. S.; LOUIE, S. M.; MULVIHILL, M. M.; LUO, K.; NOMURA, D. K. Ether lipid generating enzyme AGPS alters the balance of structural and signaling lipids to fuel cancer pathogenicity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. v. 110, n. 37, p. 14912–14917, 2013. DOI:10.1073/pnas.1310894110.

BITTMAN, R.; QIN, D.; WONG, D A.; TIGYI, G.; SAMADDER, P.; ARTHUR, G. Synthesis and antitumor properties of a plasmalogen methyl ether analogue. *Tetrahedron*. v. 57, p. 4277-4282, 2001. DOI: 10.1016/S0040-4020(01)00371-4.

BLITTERSWIJK, W. J. V.; VERHEIJ, M. Anticancer mechanisms and clinical application of alkylphospholipids, *Biochim. Biophys. Acta.* v. 183, p. 663–674, 2013. DOI: 10.1016/j.bbalip.2 012.10.008

BRAVERMAN, N.; MOSER, A. Functions of plasmalogen lipids in health and disease. *Biochim Biophys Acta.* v. 1822, n. 9, p. 1442-1452, 2012. DOI: 10.1016/j.bbadis.20 12.05.008.

BRITES, P.; WATERHAM, H.; WANDERS, R. Functions and biosynthesis of plasmalogens in health and disease. *Biochim Biophys Acta.* v. 1636, n. 2-3, p. 219-231, 2004. DOI: 10.1016/j.bbalip.2003.12.010

BRITES, P.; MOOYER, P.; MRABET, L. EL.; WATERHAM, H.; WANDERS, R. Plasmalogens participate in very-long-chain fatty acid-induced pathology. *Brain.* v. 132, n. 2, p. 482-492, 2008. DOI: 10.1093/brain/awn 295.

BRONIEC, A.; KLOSINSKI, R.; PAWLAK, A.; WRONA-KROL, M.; THOMPSON, D.; SARNA, T. Interactions of plasmalogens and their diacyl analogs with singlet oxygen in selected model systems. *Free Radic Biol Med.* v. 50, n. 7, p. 892-898, 2011. DOI: 10.1016/j.freerad biomed.2011.01.002.

BRÜGGER, B. Lipidomics: Analysis of the Lipid Composition of Cells and Subcellular Organelles by Electrospray Ionization Mass Spectrometry. *Annu Rev Biochem*. v. 83, n. 1, p. 79-98, 2014. DOI:10.1146/annurev-biochem-060713-035324.

BUSIK, J. V.; REID, G. E.; LYDIC, T. A. Global analysis of retina lipids by complementary precursor ion and neutral loss mode tandem mass spectrometry. *Methods Mol Biol.* v. 579, p. 33–70, 2009. DOI: 10.1007/978-1-60761-322-0\_3.

CHABOT, M. C.; WYKLE, R. L.; MODEST, E. J.; DANIEL, L. W. Correlation of ether lipid content of human leukemia cell lines and their susceptibility to 1-OOctadecyl-I-O-methyl-rac-glycero-S-phosphocholine. *Cancer Res.* v. 49, n. 16, p. 4441–4445, 1989.

CHEN, X.; CHEN, H.; DAI, M.; AI, J.; LI, Y.; MAHON, B.; DAI, S.; DENG, Y. Plasma lipidomics profiling identified lipid biomarkers in distinguishing early-stage breast cancer from benign lesions. *Oncotarget*. v. 7, n. 24, p. 36622-36631, 2016.

CÍFKOVÁ, E.; HOLCAPEK, M.; LÍSA, M.; VRÁNA, D.; GATEK, J.; MELICHAR, B. Determination of lipidomic diferences between human breast câncer and surrounding normal tissues using HILIC-HPLC/ESI-MS and multivariate data analysis. *Anal Bioanal Chem.* v. 407, p. 991-1002, 2015. DOI: 10.1007/s00216-014-8272-z.

DAS, V.; KALITA, J.; PAL, M. Predictive and prognostic biomarkers in colorectal cancer: A systematic review of recent advances and challenges. *Biomed Pharmacother*. v. 87, p. 8-19, 2017. DOI:10.1016/j.biopha.2016.12.064.

DE VET, E. C. J. M.; IJLST, L.; OOSTHEIM, W.; WANDERS, R. J. A.; BOSCH, H. V. D. Alkyl-dihydroxyacetonephosphate synthase. Fate in peroxisome biogenesis disorders and identification of the point mutation underlying a single enzyme deficiency. *J Biol Chem.* v. 273, p. 10296–10301, 1998. DOI: 10.1074/jbc.273.17.10296.

DEMOPOULOS, C.; PINCKARD, R.; HANAHAN, D. Platelet-activating factor. Evidence for 1-O-alkyl-2-acetyl-sn-glyceryl-3-phosphorylcholine as the active component (a new class of lipid chemical mediators). *J Biol Chem.* v. 254, n.19, p. 9355–8, 1979.

DUECK, D.; CHAN, M.; TRAN, K.; WONG, J.; JAY, F.; LITTMAN, C; STIMPSON, R.; CHOY, P. C. The modulation of choline phosphoglyceride metabolism in human colon cancer. *Mol Cel Biochem*. v. 162, n. 2, p. 97-103, 1996. DOI:10.1007/BF00227535.

ENGELMANN, B. Plasmalogens: targets for oxidants and major lipophilic antioxidants. *Biochem Soc Trans.* v. 32, n. 1, p. 147-150, 2004. DOI: 10.1042/bst0320147.

FAHY, E.; COTTER, D.; SUD, M.; SUBRAMANIAM, S. Lipid classification, structures and tools. *Biochim Biophys Acta.* v. 1811, n. 11, p. 637-647, 2011. DOI: 10.1016/j.bbali p.2011.06.009.

FDA. *U S Food and Drug Administration*. Disponível em: <http://www.fda.gov>. Acesso: 20 de maio de 2017.

FERLAY, J.; SOERJOMATARAM, I.; DIKSHIT, R.; ESER, S; MATHERS, C.; REBELO, M.; PARKIN, D. M.; FORMAN, D.; BRAY, F. Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int. J. Cancer*. n. 136, p. 359–386, 2015. DOI: 10.1002/ijc.29210.

FERNÁNDEZ, R.; GARATE, J.; LAGE, S.; TERÉS, S.; HIGUERA, M.; BESTARD-ESCALAS, J.; LÓPEZ, D. H.; GUARDIOLA-SERRANO, F.; ESCRIBÁ, P. V.; BARCELÓ-COBLIJN, G.; FERNÁNDEZ, J. A. Identification of Biomarkers of Necrosis in Xenografts Using Imaging Mass Spectrometry. *J Am Soc Mass Spectr.* v. 27, n. 2, p. 244-254, 2015. DOI: 10.1007/s13361-015-1268-x. FHANER, C.; LIU, S.; JI, H.; SIMPSON, R.; REID, G. Comprehensive Lipidome Profiling of Isogenic Primary and Metastatic Colon Adenocarcinoma Cell Lines. *Anal Chem.* v. 84, n. 21, p. 8917-8926, 2012. DOI: 10.1021/ac302154g.

FHANER, C.; LIU, S.; ZHOU, X.; REID, G. Functional Group Selective Derivatization and Gas-Phase Fragmentation Reactions of Plasmalogen Glycerophospholipids. *Mass Spectr.* v. 2, p. S0015, 2013. DOI: 10.5702/massspectrometry.

FLASIŃSKI, M.; HĄC-WYDRO, K.; WYDRO, P.; DYNAROWICZ-ŁĄTKA, P. Influence of platelet-activating factor, lyso-platelet-activating factor and edelfosine on Langmuir monolayers imitating plasma membranes of cell lines differing in susceptibility to anticancer treatment: the effect of plasmalogen level. *J. R. Soc. Interface*. v. 11, p. 1-11, 2014. DOI: 10.1098/rsif.2013.1103

FOLCH, H.; LESS, M.; STANLEY, H. A. A simple method for isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J Biol Chem.* v. 226, p. 497-499, 1957. DOI: 10.1371/journal.pone.00 20510.

FUCHS, B.; SÜß, R.; SCHILLER, J. An update of MALDI-TOF mass spectrometry in lipid research. *Prog Lipid Res.* v. 49, n. 4, p. 450-475, 2010. DOI:10.1016/j. plipres.2010.07.001.

FUCHS, B. Analytical methods for (oxidized) plasmalogens: Methodological aspects and applications. *Free Radic Res.* v. 49, n. 5, p. 599-617, 2015. DOI:10.3109/10715762.2014.99967 5.

FUCK, B. Analytical methods for (oxidized) plasmalogens: Methodological aspects and applications. *Free Radic Res.* v. 49, n. 5, p. 599-617, 2014. DOI: 10.3109/10715762.2014.9996 75.

GERBIG, S.; GOLF, O.; BALOG, J.; DENES, J.; BARANYAI, Z.; ZARAND, A.; RASO, E.; TIMAR, J.; TAKATS, Z. Analysis of colorectal adenocarcinoma tissue by desorption electrospray ionization mass spectrometric imaging. *Anal Bioanal Chem* v. 403, p. 2315-2325, 2012. DOI: 10.1007/s00216-012-5841-x.

GOLDFINE, H. The appearance, disappearance and reappearance of plasmalogens in evolution. *Prog Lipid Res.* v. 49, n. 4, p. 493-498, 2010. DOI: 10.1016/j.plipres.2010.07.003.

GOOSSENS, N.; NAKAGAWA, S.; SUN, X.; HOSHIDA, Y. Cancer biomarker discovery and validation. *Transl Cancer Res.* v. 4, n. 3, p. 256–269, 2015. DOI: 10.3978/j.issn.2218-676X.2015.06.04.

HAHNEL, D.; HUBER, T.; KURZE, V.; BEYER, K.; ENGELMANN, B. Contribution of copper binding to the inhibition of lipid oxidation by plasmalogen phospholipids. *Biochem J.* v. 340, n. 2, p. 377-383, 1999. DOI: 10.1042/0264-6021:3400377.

HAN, X.; GROSS, R. W. Nonmonotonic alterations in the fluorescence anisotropy of polar head group labeled fluorophores during the lamellar to hexagonal phase transition of

phospholipids. *Biophys. J.* v. 63, v. 2, p. 309–316, 1992. DOI: 10.1016/S0006-3495(92)81616-8.

HAN, X. Lipidomics for studying metabolism. *Nat Revi Endocrinol*. v. 12, n. 11, p. 668-679, 2016. DOI: 10.1038/nrendo.2016.98.

HENRY, N. L.; HAYES, D. F. Cancer biomarkers. *Mol Oncol.* v. 6, p. 140-146, 2012. DOI: 10.1016/j.molonc.2012.01.010.

HONSHO, M.; ASAOKU, S.; FUJIKI, Y. Posttranslational Regulation of Fatty Acyl-CoA Reductase 1, Far1, Controls Ether Glycerophospholipid Synthesis. *J Biol Chem.* v. 285, n. 12, p. 8537-8542, 2010. DOI: 10.1074/jbc.M109.083311.

HONSHO, M.; ABE, Y.; FUJIKI, Y. Plasmalogen biosynthesis is spatiotemporally regulated by sensing plasmalogens in the inner leaflet of plasma membranes. *Sci Rep.* v. 7, p. 43936, 2017. DOI: 10.1038/srep43936.

HOSSAIN, M.; MINENO, K.; KATAFUCHI. Neuronal Orphan G-Protein Coupled Receptor Proteins Mediate Plasmalogens-Induced Activation of ERK and Akt Signaling. *PLOS ONE*. v. 11, n. 3, p. 1-14, 2016. DOI: 10.1371/journal.pone.0150846.

HOU, Y.; LI, J.; XIE, H.; SUN, F.; YANG, K.; WANG, J.; KE, C.; LOU, G.; LI, K. Differential plasma lipids profiling and lipid signatures as biomarkers in the early diagnosis of ovarian carcinoma using UPLC-MS. *Metabolomics*. v. 12, n. 18, p. 1-12, 2016. DOI: 10.1007/s11306-015-0891-7.

HOWARD, B. V.; MORRIS, H. P.; BAILEY, J. M. Ether-lipids, -glycerol phosphate dehydrogenase and growth rate in tumors and cultured cells. *Cancer Res.* v. 32, n. 7, p. 1533–1538, 1972.

HU, C.; WANG, M.; HAN, X. Shotgun lipidomics in substantiating lipid peroxidation in redox biology: Methods and applications. *Redox Biol.* v. 12, p. 946-955, 2017. DOI: 10.1016/j. redox.20 17.04.030.

HUANG, Z.; HUANG, D.; NI, S.; PENG, Z.; SHENG, W.; DU, X. Plasma microRNAs are promising novel biomarkers for early detection of colorectal cancer. *Int J Cancer*. v. 127, n. 1, p. 118-126, 2010. DOI:10.1002/ijc.25007.

JUN, L.; CAN-QUN, L.; LEI, X.; HONG, Y. Plasma content variation and correlation of plasmalogen and GIS, TC and TPL in gastric carcinoma patients: a comparative study. *Med Sci Monit Basic Res.* v. 21, p. 157-160, 2015. DOI: 10.12659/MSMBR.893908.

JURKOWITZ-ALEXANDER, M. S.; HIRASHIMA, Y.; HORROCKS, L. A. Coupled enzyme assays for phospholipase activities with plasmalogen substrates. *Methods Enzymol.* v. 197, p. 79–89, 1991. DOI: 10.1016/0076-6879(91)97135-L.

KOSTADINOVA, A.; TOPOUZOVA-HRISTOVA, T.; MOMCHILOVA, A.; TZONEVA, R.; BERGER, M.R. Antitumor lipids-structure, functions, and medical applications, *Adv. Protein Chem. Struct. Biol.* v. 101, p. 27–66, 2015. DOI: 10.1016/bs.apcsb.2015.08.001.

LEßIG, J.; GEY, C.; SÜß, R.; SCHILLER, J.; GLANDER, H. J.; ARNHOLD, J. Analysis of the lipid composition of human and boar spermatozoa by MALDI-TOF mass spectrometry,

thin layer chromatography and 31P NMR spectroscopy. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol.* v. 137, n. 2, p. 265-277, 2004. DOI: 10.1016/j.cbpc.2003.12.001.

LEßIG, J.; FUCHS, B. Plasmalogens in Biological Systems: Their Role in Oxidative Processes in Biological Membranes, their Contribution to Pathological Processes and Aging and Plasmalogen Analysis. *Curr Med Chem.* v. 16, n. 16, p. 2021-2041, 2009. DOI: 10.2174/09298607097886821 64.

LI, M.; YANG, L.; BAI, Y.; LIU, H. Analytical Methods in Lipidomics and Their Applications. *Anal Chem.* v. 86, n. 1, p. 161-175, 2014. DOI: 10.1021/ac403554h.

LI, M.; FAN, P.; WANG, Y. Lipidomics in health and diseases – beyond the analysis of lipids. *J. Glycomics Lipidomics*. v. 5, p. 1-15, 2015. DOI: 10.4172/2153-0637.100 0126.

LIESENFELD, D.; GRAPOV, D.; FAHRMANN, J.; SALOU, M.; SCHERER, D.; TOTH, R.; HABERMANN, N.; BÖHM, J.; SCHROTZ-KING, P.; GIGIC, B.; SCHNEIDER, M.; ULRICH, A.; HERPEL, E.; SCHIRMACHER, P.; FIEHN, O.; LAMPE, J. W.; ULRICH, C. M. Metabolomics and transcriptomics identify pathway differences between visceral and subcutaneous adipose tissue in colorectal cancer patients: the ColoCare study. *Am J Clin Nutr.* v. 102, n. 2, p. 433-443, 2015. DOI: 10.3945/ajcn.114.103804.

LIN, H. J.; WU, P. C.; HO, J. C. I. The ether lipid tumour marker in human liver with hepatocellular carcinoma. *Br J Cancer.* v. 41, n. 2, p. 320-324, 1980.

LIPID MAPS LIPIDOMICS GATEWAY: *Lipidmaps.org*. Disponível em: <a href="http://www.lipidmaps.org">http://www.lipidmaps.org</a>. Acesso em: 20 de maio de 2017.

LOHMEYER, M.; BITTMAN, R. Antitumor ether lipids and alkylphosphocholines. *Drugs Future*. v. 19, p. 1021-1037, 1994.

LOHNER, K.; HERMETTER, A.; PALTAUF, F. Phase behavior of ethanolamine plasmalogen. *Chem. Phys. Lipids*. v. 34, n. 2, p. 163–170, 1984. DOI: 10.1016/0009-3084(84)90041-0.

LOHNER, K. Is the high prospensity of ethanolamine plasmalogens to form non-lamellar lipid structures manifested in the properties of biomembranes? *Chem Phys Lipids*. v. 81, v. 2, p. 167-184, 1996. DOI: 10.1016/0009-3084(96)02580-7.

LOIZIDES-MANGOLD, U. On the future of mass-spectrometry-based lipidomics. *FEBS Journal*. v. 280, n. 12, p. 2817-2829, 2013. DOI:10.1111/febs.12202.

LUO, X.; CHENG, C.; TAN, Z.; LI, N.; TANG, M.; YANG, L.; CAO, Y. Emerging roles of lipid metabolism in cancer metastasis. *Mol Cancer*. v. 16, n. 1, p. 76, 2017. DOI: 10.11 86/s12943-017-0646-3.

LYDIC, T. A.; TOWNSEND, S.; ADDA, C. G.; COLLINS, C.; MATHIVANAN, S.; REID, G. E. Rapid and comprehensive 'shotgun' lipidome profiling of colorectal cancer cell derived exosomes. *Methods*. v. 87, p. 83-95, 2015. DOI: 10.1016/j.ymeth.2015.04.014.

MAEBA, R.; UETA, N. Determination of choline and ethanolamine plasmalogens in human

plasma by HPLC using radioactive triiodide (1-) ion (125I3-). *Anal Biochem*. v. 331, n. 1, p. 169-176, 2004. DOI: 10.1016/j.ab.2004.05.030.

MAEBA, R.; NISHIMUKAI, M.; SAKASEGAWA, S.; SUGIMORI, D.; HARA, H. Plasma/serum plasmalogens: methods of analysis and clinical significance. *Adv Clin Chem.* v. 70, p. 31-91, 2015. DOI: 10.1016/bs.acc.2015.03.005.

MANKIDY, R.; AHIAHONU, P. W.; MA, H.; AYASINGHE, J. D.; RITCHIE, S. A.; KHAN, M. A.; SU-MYAT, K. K.; WOOD, P. L.; GOODENOWE, D. B. Membrane plasmalogen composition and cellular cholesterol regulation: a structure activity study. *Lipids Health Dis.* v. 9, p. 62, 2010. DOI:10.1186/1476-511X-9-62.

MAWATARI, S.; OKUMA, Y.; FUJINO, T. Separation of intact plasmalogens and all other phospholipids by a single run of high-performance liquid chromatography. *Anal Biochem.* v. 370, n. 1, p. 54-59, 2007. DOI: 10.1016/j.ab.2007.05.020

MERCHANT, T.; KASIMOS, J.; DE GRAAF, P.; MINSKY, B.; GIERKE, L.; GLONEK, T. Phospholipid profiles of human colon cancer using 31P magnetic resonance spectroscopy. International *J Colorectal Dis.* v. 6, n. 2, p. 121-126, 1991. DOI: 10.1007/BF00300208.

MERCHANT, T. E.; MINSKY, B. D.; LAUWERS, G. Y.; DIAMANTIS, P. M.; HAIDA, T.; GLONEK, T. Esophageal cancer phospholipids correlated with histopathologic findings: a 31P NMR study. *NMR Biomed.* v. 12, n. 4, p. 1-5, 1999. DOI: 10.1002/(SICI)1099-1492(199906)12:4<184::AID-NBM560>3.0.CO;2-M.

MISRA, S.; GHOSH, A.; VARTICOVSKI, L. Naturally occurring ether linked phosphatidylcholine activates phosphatidylinositol 3-kinase and stimulates cell growth. *J Cell Biochem*. v. 55, n. 1, p. 146-53, 1994. DOI: 10.1002/jcb.240550116.

MURAKAMI, M.; KUDO, I. Phospholipase A2. *J Biochem*. v. 131, n. 3, p. 285-292, 2002. DOI: 10.1093/oxfordjournals.jbchem.a003101.

MURPHY, E.; STEPHENS, R.; JURKOWITZ-ALEXANDER, M.; HORROCKS, L. Acidic hydrolysis of plasmalogens followed by high-performance liquid chromatography. *Lipids*. v. 28, n. 6, p. 565-568, 1993. DOI: 10.1007/BF02536090.

NAGAN, N.; ZOELLER, R. Plasmalogens: biosynthesis and functions. *Prog Lipid Res.* v. 40, n. 3, p. 199-229, 2001. DOI: 10.1016/S0163-7827(01)00003-0.

NEWTON, K.; NEWMAN, W.; HILL, J. Review of biomarkers in colorectal cancer. *Colorectal Dis.* v. 14, n. 1, p. 3-17, 2011. DOI:10.1111/j.1463-1318.2010.0243 9.x.

NIMPTSCH, A.; FUCHS, B.; SÜß, R.; ZSCHÖRNIG, K.; JAKOP, U.; GÖRITZ, F.; SCHILLER, J.; MÜLLER, K. A simple method to identify ether lipids in spermatozoa samples by MALDI-TOF mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem.* v. 405, n. 21, p. 6675-6682, 2013. DOI: 10.1007/s00216-013-7147-z.

NORDBERG, G. Biomarkers of exposure, effects and susceptibility in humans and their application in studies of interactions among metals in China. *Toxicol Lett.* v. 192, n. 1, p. 45-49, 2010. DOI:10.1016/j.toxlet.2009.06.859.

ONODERA, T.; FUTAI, E.; KAN, E.; ABE, N.; UCHIDA, T.; KAMIO, Y.; KANEKO, J. Phosphatidylethanolamine plasmalogen enhances the inhibiting effect of phosphatidylethanolamine on secretase activity. *J Biochem.* v. 157, n. 5, p. 301-309, 2014. DOI: 10.1093/jb/mvu074.

OTOKI, Y.; NAKAGAWA, K.; KATO, S.; MIYAZAWA, T. MS/MS and LC-MS/MS analysis of choline/ethanolamine plasmalogens via promotion of alkali metal adduct formation. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* v. 1004, p. 85-92, 2015. DOI: 10.1016/j.jchromb.2015.09.012.

OTOKI, Y.; KATO, S.; KIMURA, F.; FURUKAWA, K.; YAMASHITA, S.; ARAI, H.; MIYAZAWA, T.; NAKAGAWA, K. Accurate quantitation of choline and ethanolamine plasmalogen molecular species in human plasma by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *J Pharm Biomed Anal.* v.134, p. 77-85, 2017. DOI: 10.1016/j.jpba.2016.11.019.

PATTERSON, N. H.; ALABDULKARIM, B.; LAZARIS, A.; THOMAS, A.; MARCINKIEWICZ, M. M.; GAO, Z. H.; VERMEULEN, P. B.; CHAURAND, P.; METRAKOS, P. Assessment of pathological response to therapy using lipid mass spectrometry imaging. *Sci Rep.* v. 6, n. 36814, 2016. DOI: 10.1038/srep36814.

PATTON, G. M.; ROBINS, S. J. Separation and quantification of phospholipid classes by HPLC. Lipoproteins Protocols. *Methods Mol Biol.* v. 110, p. 193-215, 1998.

PIANO, V.; BENJAMIN, D. I.; VALENTE, S.; NENCI, S.; MAI, A.; ALIVERTI, A.; NOMURA, D. K.; MATTEVI, A. Discovery of inhibitors for the ether lipid-generating enzyme AGPS as Anti-Cancer Agents. **ACS Chem Biol**. v. 10, n. 11, p. 2589-2597, 2015. DOI: 10.1021/acSchembio.5 b00466.

PERROTTI, F.; ROSA, C.; CICALINI, I.; SACCHETTA, P.; GENOVESI D DEL BOCCIO, P.; GENOVESI, D.; PIERAGOSTINO, D. Advances in Lipidomics for Cancer Biomarkers Discovery. *Inter J Mol Sci.* v. 17, n. 12, p. 1992, 2016. DOI: 10.3390/ijms17121992.

POURHOSEINGHOLI, M. A.; VAHEDI, M.; BAGHESTANI, A. R. Burden of gastrointestinal cancer in Asia: an overview. *Gastroenterol Hepatol Bed Bench*. v. 8, n.1, p. 19-27, 2015.

RINTALA, J.; SEEMANN, R.; CHANDRASEKARAN, K.; ROSENBERGER, T. A.; CHANG, L.; CONTRERAS, M. A.; RAPOPORT, S.; CHANG, M. C. J. 85 kDa cytosolic phospholipase A2 is a target for chronic lithium in rat brain. *NeuroReport.* v. 10, n. 18, p. 3887-3890, 1999. DOI: 10.1097/00001756-199912160-00030.

RÍOS-MARCO, P.; MARCO, C.; GÁLVEZ, X.; JIMÉNEZ-LÓPEZ, J M.; CARRASCO, M P. Alkylphospholipids: na update on molecular mechanisms and clinical relevance. *Biochim Biophys Acta*. v. 1859, p. 1657-1667, 2017. DOI: 10.1016/j.bbamem.2017.02.016.

RITCHIE, S. A.; AKITA, H.; TAKEMASA, I.; EGUCHI, H.; PASTURAL, E.; NAGANO, H.; MONDEN, M.; DOKI, Y.; MORI, M.; JIN, W.; SAJOBI, T. T.; JAYASINGHE, D.; CHITOU,

B.; ROOS, D. S.; CHOPPIN, P. W. Tumorigenicity of cell lines with altered lipid composition. *Proc Natl Acad Sci U S A*. v. 81, p. 7622–7626, 1984.

SCHRAKAMP, G.; SCHUTGENS, R. B.; WANDERS, R. J.; HEYMANS, H. S. A.; TAGER, J. M.; BOSCH, H. V. D. The cerebro-hepato-renal (Zellweger) syndrome. Impaired *de novo* biosynthesis of plasmalogens in cultured skin fibroblasts. *Biochim Biophys Acta.* v. 833, n. 1, p. 170–174, 1985. DOI: 10.1016/0005-2760(85)90266-8.

SIDERIS, M.; PAPAGRIGORIADIS, S. Molecular biomarkers and classification models in the evaluation of the prognosis of colorectal cancer. *Anticancer Res.* v. 34, n. 1, p. 2061–2068, 2014.

SINDELAR, P.; GUAN, Z.; DALLNER, G.; ERNSTER, L. The protective role of plasmalogens in iron-induced lipid peroxidation. *Free Radic Biol Med.* v. 26, n. 3-4, p. 318-324, 1999. DOI: 10.1016/S0891-5849(98)00221-4.

SITI, H. N.; KAMISAH, Y.; KAMSIAH, J. The role of oxidative stress, antioxidants and vascular inflammation in cardiovascular disease (a review). *Vascular Pharmacology*. v. 71, p. 40-56, 2015. DOI: 10.1016/j.vph.2015.03.005.

SHIN, J.; QUALLS, M. M.; BOOMER, J. A.; ROBARGE, J.; THOMPSON, D. H. An efficient new route to plasmenyl-type lipids: synthesis and cytotoxicity of a plasmenylcholine analogue of the antitumor ether lipid ET-18-OMe. *J Am Chem Soc.* v. 123, p. 508-509, 2001. DOI: 10.1021/ja005522t.

SMITH, R.; LESPI, P.; LUCA, M.; BUSTOS, C.; MARRA, F.; ALANIZ, M.; MARRA, C. A reliable biomarker derived from plasmalogens to evaluate malignancy and metastatic capacity of human cancers. *Lipids*. v. 43, n. 1, p. 79-89, 2008. DOI: 10.1007/s11745-007-3133-6.

SNYDER, F.; WOOD, R. Alkyl and alk-1-enyl ethers of glycerol in lipids from normal and neoplastic human tissues. *Cancer Res.* v. 29, n. 1, p. 251–257, 1969.

SNYDER, F. The ether lipid trail: a historical perspective. *Biochim Biophys Acta*. v. 1436, n. 3, p. 265-278, 1999. DOI: 10.1016/S0005-2760(98)00172-6.

SPECTOR A, YOREK M. Membrane lipid composition and cellular function. *J Lipid Res.* v. 26, n. 9, p.1015–35, 1985.

SUGIURA, T.; FUKUDA, T.; MASUZAWA, Y.; WAKU, K. Ether lysophospholipid-induced production of platelet-activating factor in human polymorphonuclear leukocytes. *Biochim Biophys Acta*. v. 1047, p. 223–232, 1990. DOI:10.1016/0005-2760(90)90520-8.

VANCE, J. E. Membrane lipid biosynthesis. Wiley Online Library. 2001.

WACKER, B. K.; ALBERT, C. J.; FORD, B. A.; FORD, D. A. Strategies for the analysis of chlorinated lipids in biological systems. *Free Radic Biol Med.* v. 59, p. 92-99, 2013. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2012.06.013.

WALLNER, S.; SCHMITZ, G. Plasmalogens the neglected regulatory and scavenging lipid species. *Chem. Phys. Lipids*. v. 164, p. 573–589, 2011. DOI: 10.1016/j.chemphyslip.2011. 06.008.

WORLD GASTRINTESTINAL CANCER. *The ESMO 12th World Congress on Gastrointestinal Cancer*. Disponível em: <a href="http://www.worldgicancer.com">http://www.worldgicancer.com</a>. Acesso em: 08 de Agosto de 2017.

WU, L.; PFEIFFER, D.; CALHOON, E.; MADIAI, F.; MARCUCCI, G.; LIU, S.; JURKOWITZ, M. S. Purification, Identification, and Cloning of Lysoplasmalogenase, the Enzyme That Catalyzes Hydrolysis of the Vinyl Ether Bond of Lysoplasmalogen. *J Biol Chem.* v. 286, n. 28, p. 24916-24930, 2011. DOI: 10.1074/jbc.M111.247163.

YAMASHITA, S.; HONJO, A.; ARUGA, M.; NAKAGAWA, K.; MIYAZAWA, T. Preparation of Marine Plasmalogen and Selective Identification of Molecular Species by LC-MS/MS. *J Oleo Sci*. v. 63, n. 5, p. 423-430, 2014. DOI: 10.5650/jos.ess13188.

YAMAZAKI, Y.; HITE, T.; GOODENOWE, D. B. Metabolic system alterations in pancreatic cancer patient serum: potential for early detection. *BMC Cancer*. v. 13, n. 416, p. 1-17, 2013. DOI: 10.1186/1471-2407-13-416.

YAN, G.; LI, L.; ZHU, B.; LI, Y. Lipidome in colorectal cancer. *Oncotarget*. v. 7, p. 33429-33439, 2016. DOI: 10.18632/oncotarget.7960.

YANG, K.; HAN, X. Lipidomics: Techniques, applications, and outcomes related to biomedical sciences. *Trends Biochem Sci*. v. 41, p. 954–969, 2016. DOI:10.101 6/j.tibs.2016.08.010.

ZHAN, Y.; WANG, L.; LIU, J.; MA, K.; LIU, C.; ZHANG, Y.; ZOU, W. Choline Plasmalogens Isolated from Swine Liver Inhibit Hepatoma Cell Proliferation Associated with Caveolin-1/Akt Signaling. *PLOS ONE*. v. 8, n. 10, p. e77387, 2013. DOI: 10.1371/journal.pone.0077387.

ZEMSKI BERRY, K.; MURPHY, R. Free Radical Oxidation of Plasmalogen Glycerophosphocholine Containing Esterified Docosahexaenoic Acid: Structure Determination by Mass Spectrometry. *Antioxid Redox Signal*. v. 7, n. 1-2, p. 157-169, 2005. DOI: 10.1089/ars .2005.7.157.

ZOELLER, R.; LAKE, A.; NAGAN, N.; GAPOSCHKIN, D.; LEGNER, M.; LIEBERTHAL, W. Plasmalogens as endogenous antioxidants: somatic cell mutants reveal the importance of the vinyl ether. *Biochem J*. v. 338, n. 3, p. 769-776, 1999. DOI: 10.1042/bj3380769.

# CAPÍTULO III: POTENCIAIS VIAS ENZIMÁTICAS ENVOLVIDAS NA BIOSSÍNTESE DO PLASMALOGÊNIO EM PLASMA DE PACIENTES COM CÂNCER RETAL

Márcia Cristina Fernandes Messias; Thalita Rocha; Carlos Augusto Real Martinez; Lucas de Sena Leme; Brunno Augusto José Costa; Rayama Moreira Siqueira; Marta Rodrigues Gracia; Thaís Cavenatti Bueno; Patrícia de Oliveira Carvalho.

Este capítulo reporta a continuidade da pesquisa desenvolvida durante o meu Mestrado visando a identificação de vias enzimáticas envolvidas na biossíntese do plasmalogênio em plasma de pacientes com câncer retal. Na dissertação intitulada *"Avaliação de Biomarcadores Oxidativos e de Perfil Lipidômico em Pacientes com Câncer de Reto"*, descrevemos a identificação de um biomarcador identificado como plasmalogênio de lisofosfatidilcolina com o ácido palmítico, o LPC (P-16:1) que estava reduzido em plasma de pacientes com câncer retal.

Baseada no contexto inovador desta molécula e cuja descrição na literatura é escassa, o presente capítulo descreve a avaliação das principais vias enzimáticas envolvidas na biossíntese do plasmalogênio a fim de elucidar os possíveis mecanismos que levaram a redução dos níveis dessa molécula em pacientes com câncer retal.

### RESUMO

Evidências recentes sugerem que 0 plasmalogênio, uma subclasse dos glicerofosfolípides, tem uma estreita associação com os cânceres gastrointestinais. Trabalho anterior do nosso grupo (MESSIAS et al. 2018) mostrou níveis reduzidos de plasmalogênio de lisofosfatidilcolina (LPC (P-16:1)) no plasma de pacientes com câncer retal. No presente trabalho foram estudadas as principais vias enzimáticas na tentativa de elucidar a diminuição deste metabólito durante a progressão do câncer retal. O estudo incluiu 20 amostras de plasma de voluntários saudáveis e 20 amostras de plasma de pacientes com câncer retal (n=4 para cada estadio 0, I, II, III e IV). A expressão da enzima redutase (FAR1) foi avaliada Western Blotting e as medidas das concentrações das enzimas aciltransferases (LPCAT4 e GNPAT) e dessaturase (SCD) foram realizadas por ELISA. A expressão da FAR1 e as concentrações plasmáticas das aciltransferases estavam reduzidas em todos os estadios do câncer retal, enguanto que a de dessaturase apenas nos estadios II, III e IV. Portanto, essas enzimas parecem exercer um papel importante na alteração dos níveis de LPC em pacientes com câncer retal. Investigações mais aprofundadas são necessárias para determinar o papel deste metabólito como potencial biomarcador assim como a relação entre as vias metabólicas alteradas no câncer retal.

Palavras-chave: enzimas; plasmalogênio; câncer retal; peroxissomo;

# 1. INTRODUÇÃO

O câncer retal vem se tornando uma das neoplasias mais frequentes na população adulta mundial, com alta taxa de morbidade e mortalidade, sendo responsável por 29% dos casos de câncer colorretal (CCR) (CRIMÌ et al., 2018).

Muitas doenças humanas, incluindo doenças metabólicas, imunes e do sistema nervoso central, bem como já citado, o câncer, são consequências de alterações metabólicas das enzimas lipídicas e de suas vias. Isto mostra o papel fundamental dos lípides na manutenção da homeostase da membrana e da função normal em células saudáveis (BELORIBI-DJEFAFLIA et al., 2016).

As enzimas fornecem o ímpeto necessário para que essas reações químicas ocorram a um ritmo que possa suportar a vida biológica. Porém, quando alguma via metabólica específica desta é desregulada, ela acaba levando ao desenvolvimento do processo tumoral. Um exemplo pode ser observado durante a síntese do plasmalogênio (PL). Cada etapa da biossíntese deste éter lípide é mediada por uma enzima específica. Qualquer desregulação ou disfunção enzimática durante este processo pode implicar em consequências fisiológicas graves que contribuem significativamente para o desenvolvimento de vários tipos de câncer, dentre eles o retal (MOSER et al., 2011; MESSIAS et al., 2018). Nosso estudo anterior mostrou que houve uma diminuição de plasmalogênio de lisofosfatidilcolina (LPC (P-16:1)) (Figura 1), em pacientes com câncer retal (MESSIAS et al, 2018). Por tratar-se de uma molécula inovadora e com escassa descrição na literatura, buscamos nesta pesquisa mostrar potenciais vias enzimáticas que possam estar envolvidas na redução dessa molécula neste grupo de pacientes.

As diferentes espécies lipídicas celulares são sintetizadas através das atividades de enzimas distintas, sendo as funções chaves desempenhadas pelas enzimas dessaturase (SCD), aciltransferase (NGUYEN et al., 2017) e redutase (FAR) (LOPEZ et al., 2018).

A lisofosfatidilcolina aciltransferase (LPCAT), que transacila a lisofosfatidilcolina (LFC) em fosfatidilcolina (FC), é uma enzima importante para a realização da reação de remodelação. A LFCAT possui 4 isoformas (LFCATs 1, 2 3 e 4), usando um éster lisofosfolípide e acil-coenzima A (acil-CoA) como substrato (MARTIN et al., 2014; SHI et al., 2018). As isoformas LFCAT 1, 2 e 4 são as principais enzimas que ligam as vias de *Lands* e *Kennedy*, uma vez que permitem o processo de reatividade (COTTE et al., 2018). As LFCATs estão relacionadas a doenças metabólicas, como diabetes (LFCAT1),

hiperlipidemia e hiperglicemia (LFCAT3), distúrbios inflamatórios (LFCAT1-4) e esteatose hepática não alcoólica (LFCAT1-4) e cânceres como carcinoma hepatocelular, estômago, mama, carcinoma epidermóide oral, CCR, câncer de próstata resistente à castração e carcinoma renal de células claras (LFCAT1), próstata (LFCAT2), processo tumorigênico (LFCAT3) e CCR (LFCAT4) (SHI et al., 2018).

As enzimas ácido graxo redutase 1 (FAR1) e o gliceronofosfato O-aciltransferase (GNPAT), são responsáveis pela síntese dos éteres lípides no peroxissomo. Estes éteres contribuem com características estruturais únicas para membranas biológicas como a regulação da diferenciação celular, que impacta na sinalização celular e reduz o estresse oxidativo por atuarem como potenciais antioxidantes endógenos (DEAN e LODHI, 2017).

A estearoil-CoA dessaturase (SCD) é uma enzima chave que catalisa reações para inserir duplas ligações na formação dos ácidos graxos insaturados. A SCD também tem sido amplamente estudada na pesquisa de câncer e vem sendo considerada como um novo alvo molecular para tumores (WANG et al., 2015). Os seres humanos têm dois homólogos de SCD (SCD1 e SCD5), enquanto os ratos têm quatro (SCD1-SCD4) (BAI et al., 2015). Encontrada no RE, a SCD é responsável por catalisar a conversão de acil-CoA saturado (principalmente 16:0, palmitoil-CoA e 18:0, estearoil-CoA) em acil-CoA monoinsaturado (16:1n7, palmitoleoil-CoA e 18:1n-9, oleoil-CoA, respectivamente), levando a uma mudança na proporção de ácidos graxos saturados (AGS) para AGMI (PRESLER et al, 2018). Essa conversão de AGS em AGMI por SCD também gera FC monoinsaturadas e LFCAT (GUO et al., 2014). Os AGMI gerados servem como substratos para a síntese de vários tipos de lípides, incluindo fosfolípides, triglicerídeos, ésteres de colesterol, ésteres de cera e alguildiacigliceróis. Além de serem os componentes dos lípides, os AGMI também atuam como mediadores na transdução de sinal e diferenciação celular (PATON e NTAMBI, 2009). A SCD1 é necessária para estimular a biossíntese lipídica para fornecer novos fosfolípides para a biogênese da membrana celular no processo do ciclo celular da mitose (CHEN et al, 2016). A alta expressão do gene que codifica SCD1 quando associada a níveis aumentados de AGMI no sangue e tecidos tumorais é considerada uma característica metabólica em muitas células cancerígenas (PRESLER et al, 2018). Na ausência de SCD1 celular, o metabolismo lipídico não pode fornecer a síntese de AGMI, portanto, os níveis de C16:1 n-9 e C18:1 n-11 diminuem (FERRERI e CHATGILIALOGLU, 2012). Assim, a expressão de SCD1 pode estar

relacionada a processos de carcinogênese que envolvem alterações no equilíbrio da proliferação/apoptose (MINVILLE-WALZ, 2010).

Assim, espera-se neste estudo investigar as possíveis vias enzimáticas que potencialmente desencadearam a desregulação no metabolismo lipídico do PL em células de pacientes com câncer retal.



**FIGURA 1:** Estrutura da molécula do plasmalogênio de lisofosfatidilcolina com ácido palmitoleico - LFC (P-16:1). Fonte: O autor (2020)

# 2. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 2.1 Sujeitos da Pesquisa

Foram obtidas amostras de plasma de 20 pacientes com câncer retal e 20 de voluntários saudáveis, sendo estratificadas em cinco grupos (estadios 0, I, II, III e IV), de acordo com o sistema de classificação TNM do *American Joint Committee on Cancers* (AJCC, 2017). O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa da Universidade São Francisco (USF, CAAE: 14958819.8.0000.5514 - Anexo 4). As amostras, os dados demográficos e as características clínicas dos pacientes com câncer retal foram obtidas no Ambulatório do Hospital Universitário São Francisco da Providência de Deus no período de 2018 e 2020 (Tabela 1). Todos os pacientes acima de 18 anos com câncer retal e diagnosticados por histopatologia foram incluídos no estudo. O consentimento foi adquirido dos participantes antes da coleta de sangue e o mesmo protocolo foi utilizado na coleta de amostras de plasma de pacientes e controles. Os dados foram coletados considerando as seguintes informações: idade, sexo, IMC, raça, tabagismo, etilismo, diagnóstico, estadio TNM e patologias de base. As amostras foram colhidas antes dos pacientes serem submetidos aos tratamentos neoadjuvante, cirúrgico

e adjuvante. O exame clínico associado à análise hemato-bioquímica foi usado para rastrear indivíduos saudáveis. Para o estudo, foram coletados 4 mL de sangue venoso em tubo contendo EDTA. As amostras foram centrifugadas a 2500 rpm/15 min para separação dos componentes sanguíneos, sendo as alíquotas de plasma armazenadas em freezer a -80°C até o momento das análises.

	Pacientes com câncer retal	Voluntários saudáveis
N	20	20
Sexo (M/F)	10 : 10	10 : 10
ldade (anos)	57,5 ± 11,8	37,9 ± 11,3*
Raça (%)		
Branca	16 (80)	16 (80)
Negra	3 (15)	3 (15)
Parda	1 (5)	1 (5)
Amarela	0	0
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	$26,8 \pm 6,1$	25,1 ± 1,8
Tabagismo (%)		
Sim	3 (15)	
Não	7 (35)	
Ex	10 (50)	
Etilismo (%)		
Sim	0	
Não	18 (90)	
Ex	2 (10)	
Estadio (%)		
0	4 (20)	
I	4 (20)	
II	4 (20)	
III	4 (20)	
IV	4 (20)	

Tabela 1: Dados demográficos e características clínicas de pacientes com câncer retal e voluntários saudáveis

\*p<0.0001 comparado ao grupo câncer retal (média ± desvio padrão).

# 3. ENSAIOS ENZIMÁTICOS

# 3.1 Expressão da FAR1 por Western Blotting

A técnica de *Western Blotting* foi padronizada a partir das modificações realizadas no protocolo de Zhang et al. (2012). A concentração total de proteínas nas amostras de

plasma foi determinada pelo método de *Bradford* (1976). Para determinação das bandas de proteínas plasmáticas foi preparado um gel de poliacrilamida a 10%. Em cada, foi aplicado um volume variável da amostra na concentração de 30 µg de proteínas totais de cada grupo (câncer retal e voluntários saudáveis), e a migração eletroforética (corrida) acompanhada por um padrão de peso molecular conhecido *Kaleidoscope Prestained SDS-Page Standards (BioRad Laboratories, Hercules, EUA).* 

Para migração eletroforética, o dispositivo *Bio Rad*, modelo *Power Pac*<sup>TM</sup> *HC*, foi utilizado à 120 volts por 90 minutos. Os géis obtidos foram então transferidos para membranas de nitrocelulose. As membranas foram bloqueadas com BSA a 5% por 2 horas à temperatura ambiente, seguidas de incubação *overnight* com os anticorpos primários anti- $\beta$ -actina (1:1000 - *Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, EUA*) e *anti-FAR1* (1:1000 - *Atlas Antibodie, Stockholm, Sweden*), diluídos em BSA a 3%.

Em seguida, foram realizadas sucessivas lavagens com solução basal e as membranas foram incubadas em anticorpo secundário *IgG anti-mouse* (1:10.000 - *Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, EUA*) e *anti-IgG rabbit* (1:1000 - *GeneTex Inc, Irvine, EUA*) conjugados com *HRP-peroxidase* e diluídos em BSA a 1% por 2 horas à temperatura ambiente. Após esse período, as membranas foram lavadas novamente com solução basal e submetidas à detecção de banda usando o *kit* de reagentes quimioluminescentes (*BioRad Laboratories, Hercules, EUA*). Para revelação, foi utilizado o *Film Kodak*.

# 3.2 Determinação da concentração de GNPAT, LPCAT4 e SCD por ensaio imunoenzimático (ELISA)

As concentrações plasmáticas das aciltransferases (GNPAT e LPCAT4) e dessaturase (SCD) foram determinadas usando os *kits ELISA* (*Invitrogen, Eugene, EUA; MyBioSource, San Diego, EUA; Cloud-Clone Corp, Texas, EUA*) respectivamente, de acordo com as instruções do fabricante. O método de imunoensaio ligado a enzima é realizado para detectar a presença e/ou quantificação da proteína alvo na amostra de plasma. A microplaca é revestida por um anticorpo contra o antígeno de interesse presente na amostra. Posteriormente, um anticorpo secundário marcado com a enzima é adicionado, ligando-se ao antígeno alvo presente na microplaca. Finalmente, um substrato (TMB) é aplicado e convertido num produto cromógeno que pode ser medido

por espectrofotometria e seus dados convertidos em valores numéricos. A mudança de cor indica a presença da proteína de interesse na amostra. Para a determinação da concentração do antígeno na amostra. É necessário produzir uma curva padrão usando um antígeno de concentração conhecida (JOVE, 2014).

#### 4. Análise estatística

Foi usado o leitor *ELISA (Stat Fax 2100, Awareness Technology, Dusseldorf, Germany)* e a análise estatística realizada com o software Multicalc V10. Para Western Blotting, a análise densitométrica das bandas de proteínas foi realizada usando o software NIH ImageJ versão 1.34e (National Institute for Health, EUA). A expressão relativa foi calculada por regra de 3, tendo-se a  $\beta$ -actina como 100% e dividindo-se as intensidades das bandas do FAR1 (proteína de interesse) pela da  $\beta$ -actina. A análise foi realizada em triplicata. Os dados estatísticos e os gráficos dos ensaios *ELISA* e Western Blotting foram analisados por meio do teste de ANOVA one-way e o detalhamento realizado pelo teste de *Dunnett* no software GraphPad Prism 8.0.

#### **5. RESULTADOS**

# 5.1 A influência da progressão dos estadios do câncer retal na diminuição da atividade das enzimas redutase, aciltransferases e dessaturase

Foi observada uma redução significativa da expressão da enzima FAR1 durante a progressão dos estadios do câncer retal. A análise de transferência (Figura 2A) mostra claramente uma redução progressiva na expressão da FAR1 e do controle endógeno  $\beta$ -actina nos pacientes com câncer retal, sendo tal diminuição significativa para FAR1 nos estadios III e IV.

O nível de expressão relativa de FAR1 (Figura 2B) em pacientes com câncer retal foi de 82,6% no estadio 0, 81,4% no estadio I, 69,7% no estadio II, 57,5% no estadio III e 37,6% no estadio IV. Assim, no plasma de pacientes com os estadios de câncer mais avançados (III e IV) há menor expressão da FAR1 quando comparada aos voluntários
saudáveis. A análise foi realizada em triplicata e nos valores da média ± desvio padrão foi considerado n=4/grupo. \*p<0,0001.



**Figura 2:** Análise da expressão da proteína FAR1 por *Western Blotting* utilizando o plasma de vinte pacientes com câncer retal, segundo estadio (0, I, II, III e IV) e de vinte voluntários saudáveis. **2A**. *Western Blotting* para proteína FAR1.  $\beta$ -actina foi utilizada como controle endógeno. **2B**. Os níveis de expressão de FAR1 foram representados considerando 100 para  $\beta$ -actina. Todos os dados foram analisados por análise de variância unidirecional (*ANOVA*) seguida pelo teste de *Dunnett*. \*p<0,0001. Massa molecular: FAR1 (50 KDa);  $\beta$ -actina (25 KDa).

As concentrações plasmáticas das enzimas GNPAT, LPCAT4 e SCD nos pacientes com câncer retal e voluntários saudáveis estão descritas na Figura 3. Os níveis plasmáticos das enzimas GNPAT e LPCAT4 em pacientes com câncer retal mostraram uma diminuição significativa em todos os estadios (0, 1, II, III e IV) em comparação aos voluntários saudáveis (p<0,05). Em relação aos níveis plasmáticos de SCD, houve diferença estatística apenas nos estadios II, III e IV entre os grupos de pacientes com câncer retal em relação aos voluntários saudáveis.



Figura 3: Gráficos representativos das enzimas (A) GNPAT, (B) LPCAT4 e (C) SCD no plasma de pacientes com câncer retal e voluntários saudáveis. As barras de erro representam o erro padrão da média. Os valores de p foram determinados pelo teste de comparação múltipla de *Dunnett.* \*p <0,05 comparado ao grupo controle saudáveis.

## 6. DISCUSSÃO

## 6.1 A importância das enzimas na biossíntese do plasmalogênio

Os glicerofosfolípides (GFLs) são os fosfolípides mais abundantes e sua classificação é baseada na ligação sn-1, como é o caso do PL que contêm uma ligação de vinil éter na posição sn-1. A biossíntese do PL (Figura 4) é iniciada no peroxissomo e finalizada no RE por meio de reações que ocorrem em sete fases. Duas enzimas peroxissômicas, GNPAT e alquildiidroxi acetonafosfato sintase (AGPS) iniciam a

biossíntese do PL onde a 1-alquil dihidroxiacetofosfato (DHAP) é gerada pela substituição da cadeia acil de 1-acil-DHAP pela FAR1, uma proteína ancorada na extremidade C do peroxissomo (HOSSAIN et al., 2013; HONSHO et al., 2017).

A FAR1 é encontrada fortemente ligada à membrana do peroxissomo na face citosólica (EXNER et al., 2019) e sua atividade é maior em tecidos contendo grandes quantidades de éter de GFLs (BURDETT et al., 1991). O presente estudo demonstrou através da técnica de Western Blotting que houve uma redução gradativa de FAR1 nos estadios mais avançados do câncer retal (III e IV) quando comparada ao seu controle endógeno  $\beta$ -actina e a FAR1 de voluntários saudáveis. Honsho (2017) usou células HeLa (adenocarcinoma de cérvix) e CHO-K1 para investigar as funções fisiológicas de FAR1, uma vez que na linhagem de ambas as células a concentração desta é reduzida. A  $\beta$ actina tem sido incorporada em diversos estudos como proteína de controle endógeno por manter suas características estruturais conservadas em diversos estados patológicos (GUO et al., 2013). No entanto, estudos recentes mostram que a expressão da  $\beta$ -actina pode sofrer modificações em resposta a estímulos bioquímicos gerados durante a carcinogênese (RUAN e LAI, 2007). Esta desregulação acelera a invasão e metástase de diversos cânceres, inclusive o CCR (NEUHAUS, et al., 2016). Blanquicett et al. (2002) mostraram através das técnicas Microarray e Western Blotting que o nível de expressão da  $\beta$ -actina foi quatro vezes menor em células DLD-1 de CCR transduzidas por MDA7 quando comparada as não transduzidas.

Outra enzima localizada exclusivamente dentro do peroxissomo e envolvida na biossíntese de éter fosfolípide é a dihidroxiacetonafosfato aciltransferase (DHAPAT), também conhecida como GNPAT (YAMASHITA et al., 2014). A medida da atividade do GNPAT é importante não apenas para identificar sua deficiência, mas também para auxiliar os pacientes no diagnóstico de doenças originadas por um distúrbio peroxissômico (WANDERS et al., 1995). Nossos resultados em amostras de plasma de pacientes com câncer retal mostraram uma redução significativa do GNPAT em todos os estadios do câncer quando comparados a indivíduos saudáveis, sugerindo uma falha na biossíntese de peroxissomo. Por outro lado Gu et al. (2018) mostraram em ensaios de *Western Blotting* que os níveis da enzima GNPAT estavam superexpressos nas linhas celulares e nas amostras de carcinoma hepatocelular humano quando comparadas aos tecidos hepáticos normais. Pacientes com estadios II, III e IV apresentaram expressão significativamente maior de GNPAT do que aqueles com estadio I. Pacientes com alta

expressão de GNPAT tiveram sobrevida significativamente pior do que aqueles com baixa expressão de GNPAT. Outro estudo interessante foi realizado por Liu et al. (2005) com a linhagem celular NRel-4 que é incapaz de sintetizar PL devido à redução severa da atividade GNPAT. Foi realizada uma transferência de plasmídeo contendo o cDNA de GNPAT humano, onde recuperou a atividade do GNPAT e a biossíntese dos PL, comprovando o defeito no gene que codifica essa enzima.

Outra enzima importante é a LPCAT, que LFC em FC e apresenta uma correlação direta entre a reação de transacilação e tumorigênese/malignidade, já que é superexpressa em alguns tipos de câncer (DAS et al., 2014). Os resultados obtidos neste estudo mostraram que a LFCAT4 estava reduzida em todos os estadios do câncer retal, sugerindo uma falha na síntese da LFC, mediada pelo bloqueio da PLA2 e que consequentemente poderá gerar um aumento na síntese de FC. Os dados obtidos através das técnicas de Microarray, PCR-RT e imuno-histoquímica mostraram alta expressão de LFCAT1 em amostras de tecido humano de adenocarcinoma colorretal guando comparado à mucosa normal (MANSILLA et al., 2009). Cotte et al. (2018) usando linhas de células CCR humanas (SW620, LoVo, Hct116, Hct8, SW480 e HT29) e CCR murino (CT26) mostraram que a superexpressão de LFCAT2 e a superprodução de gotículas lipídicas conferem às células CCR resistência ao bloqueio do RE pelo estresse induzido por quimioterapias, a translocação de calreticulina na membrana e subsequente morte celular. Níveis elevados de FC (16:0/16:1) foram observados em tecido humano de CCR avançado quando comparado ao tecido mucoso não neoplásico, indicando o desempenho de LFCAT4. A taxa de FC (16:0/16:1) para LFC (16:0) foi maior CCR, postulando a atividade de LFCAT4 nesse câncer. No mesmo estudo, a análise in vitro mostrou que a LFCAT4 está envolvida na desregulação da FC (16:0/16:1) no CCR, enguanto na análise imuno-histoquímica a LFCAT4 mostrou superexpressão no CCR (KURABE et al., 2013).

Atualmente, tem sido dada atenção ao papel dos ácidos graxos monoinsaturados (AGMI) e das enzimas dessaturases no câncer, uma vez que a transformação do conteúdo saturado em insaturado resulta na sobrevivência celular durante o desenvolvimento do tumor (CHEN et al., 2016). Um dos principais reguladores da composição de ácidos graxos nos lípides celulares é a SCD. Ao aplicarmos o método ELISA na análise de SCD em plasma de pacientes com câncer retal observamos uma baixa atividade desta enzima nos estadios II, III e IV. Messias et al. (2018) mostraram uma redução do ácido palmitoléico em plasma de pacientes com adenocarcinoma retal.

Foi observado também redução de SCD em amostras de tecido CCR humano quando comparadas a indivíduos saudáveis (ZHANG et al., 2013). Por outro lado, estudos de Guo et al. (2014) e Chen et al. (2016), ambos com amostras de tecido tumoral de pacientes com CCR apresentaram superexpressão de SCD1.



**Figura 4:** Principais vias enzimáticas envolvidas na biossíntese do plasmalogênio de lisofosfatidilcolina com ácido palmitoleico [LPC (P-16:1)] em pacientes com câncer retal. Fonte: O autor (2020).

## 7. CONCLUSÃO

A redução nas concentrações plasmáticas de LPC (P-16:1), previamente observada pelo nosso grupo de pesquisa em trabalho anterior (MESSIAS et al, 2018) em pacientes com câncer retal, parece ter relação direta com as vias metabólicas alteradas envolvendo as enzimas FAR1, GNPAT, SCD e LPCAT. Embora os plasmalogênios sejam sintetizados por processos que envolvem a ação destas enzimas, muitas outras vias são conhecidas que envolvem a ação de diferentes enzimas regulatórias. Assim, um estudo mais completo envolvendo proteômica, genômica e metabolômica poderão elucidar melhor outros mecanismos bioquímicos envolvidos nas alterações dos níveis plasmáticos de plasmalogênio e de seus metabólitos em câncer de reto.

## REFERÊNCIAS

ALSHENAIFI, J., EWIDA, N., ANAZI, S., SHAMSELDIN, H. E., PATEL, N., MADDIREVULA, S., ALKURAYA, F. S. The many faces of peroxisomal disorders: Lessons from a large Arab cohort. *Clin Genet*. v. 95, n.2, p. 310-319, 2018. DOI:10.1111/cge.13481.

BAI, Y., MCCOY, J. G., LEVIN, E. J., SOBRADO, P., RAJASHANKAR, K. R., FOX, B. G., & ZHOU, M. X-ray structure of a mammalian stearoyl-CoA desaturase. *Nature*. v. 524, n. 7564, p. 252–256, 2015. DOI:10.1038/nature14549.

BLANQUICETT, C.; JOHNSON, M. R.; HESLIN, M.; DIASIO, R. B. Housekeeping gene variability in normal and carcinomatous colorectal and liver tissues: applications in pharmacogenomic gene expression studies. *Anal Biochem.* v. 303, n.2, p. 209–14, 2002. DOI: 10.1006/abio.2001.5570.

BELORIBI-DJEFAFLIA, S. Lipid metabolic reprogramming in cancer cells. *Oncogenesis*. v. 5, p. 1-10, 2016. DOI: 10.1038/oncsis.2015.49.

BRADFORD, M. M. A. Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.* v. 72, p. 248 -254, 1976.

BRAVERMAN, N. E.; MOSER, A. B. Functions of plasmalogen lipids in health and disease. *Biochim Biophys Acta.* v. 1822,n . 9,p. 1442-1452, 2012. DOI:10.1016/j.bbadis.2012.05.008.

BURDETT, K.; LARKINS, L. K.; DAS, A. K.; AJRAP, A.K. Peroxisomal Localization of Acyl-coenzyme A Reductase (Long Chain Alcohol Forming) in Guinea Pig Intestine Mucosal Cells. *J Biol Chem.* v. 266, n. 19, p. 12201-12206, 1991.

CHEN, L.; REN, J.; YANG, L.; LI, Y.; FU, J.; LI, Y.; TIAN, Y.; QIU, F.; LIU, Z.; QIU, Y.. Stearoyl-CoA desaturase-1 mediated cell apoptosis in colorectal cancer by promoting ceramide synthesis. *Sci Rep.* v. 6, n. 1, P. 1-11, 2016. DOI:10.1038/srep19665.

COTTE, A. K.; AIRES, V.; FREDON, M.; LIMAGNE, E.; DERANGÈRE, V.; THIBAUDIN, M.; HUMBLI, E.; SCAGLIARINI, A.; BARROS, J. P. P.; HILLON, P.; GHIRINGHELLI, F.; DELMAS, D. Lysophosphatidylcholine acyltransferase 2-mediated lipid droplet production supports colorectal cancer chemoresistance. *Nat Commun.* v. 9, n. 1, p. , 2018. DOI:10.1038/s41467-017-02732-5.

CRIMÌ, F.; LACOGNATA, C.; CECCHIN, D.; ZUCHETTA, P.; POMERRI, F. Rectal cancer staging: An up-to-date pictorial review. *J Med Imaging Radiat Oncol.* p. 1-8, 2018. DOI:10.1111/1754-9485.12759

DAS, S.; MARTINEZ, L. R.; RAY, S. Phospholipid remodeling and eicosanoid signaling in colon cancer cells. *Indian J Biochem Biophys.* v. 51, n. 6, p. 512-519, 2014. DOI: 10.1007/112\_2006\_0702.

DEAN, J. M.; LODHI, I. J. Structural and functional roles of ether lipids. *Protein Cell*. v. 9, n. 2, p. 196-206, 2018. DOI: 10.1007/s13238-017-0423-5.

EXNER, T.; ROMERO-BREY, I.; YIFRACH, E.; RIVERA-MONROY, J.; SCHRUL, B.; ZOUBOULIS, C. C.; FÜLLEKRUG, J. An alternative membrane topology permits lipid droplet localization of peroxisomal fatty acyl-CoA reductase 1. *J Cell Sci.* v. 132, p. 1-15, 2019; jcs.223016. DOI:10.1242/jcs.223016.

FERRERI, C.; CHATGILIALOGLU, C. Role of fatty acid-based functional lipidomics in the development of molecular diagnostic tools. *Expert Rev Mol.* v. 12, n. 7, p. 767–780, 2012. DOI:10.1586/erm.12.73.

GU, L.; ZHU, Y.; LIN, X.; LI, Y.; CUI, K.; PROCHOWNIK, E. V.; LI, Y. Amplification of glyceronephosphate O-acyltransferase and recruitment of USP30 stabilize DRP1 to promote. hepatocarcinogenesis. *Cancer Res.* v. 78 ,n. 20, p. 5808-5819, 2018. DOI:10.1158/0008-5472.can-18-0340.

GUO, C.; LIU, S.; WANG, J.; SUN, M.Z.; GREENAWAY, F. T. ACTB in cancer. *Clin Chim Acta*. v. 417, p. 39-44, 2013. DOI:10.1016/j.cca.2012.12.012.

GUO, S.; WANG, Y.; ZHOU, D.; LI, Z. Significantly increased monounsaturated lipids relative to polyunsaturated lipids in six types of cancer microenvironment are observed by mass spectrometry imaging. *Sci Rep.* v.4, n. 1, p. 1-9, 2014. DOI:10.1038/srep05959.

HONSHO, M.; ASAOKU, S.; FUJIKI, Y. Posttranslational regulation of fatty acyl- CoA reductase 1, Far1, controls ether glycerophospholipid synthesis. *J Biol Chem.* v. 285, n. 12, p. 8537-8542, 2010. DOI: 10.1074/jbc.M109.083311.

HONSHO, M.; ABE, Y.; FUJIKI, Y. Plasmalogen biosynthesis is spatiotemporally regulated by sensing plasmalogens in the inner leaflet of plasma membranes. *Sci Rep.* v. 7, n.1, p. 1-14, 2017. DOI:10.1038/srep43936.

HOSSAIN, M. S.; IFUKU, M.; TAKE, S.; KAWAMURA, J.; MIAKE, K.; KATAFUCHI, T. Plasmalogens Rescue Neuronal Cell Death through an Activation of AKT and ERK Survival Signaling. **PLoS ONE**. v. 8, n. 12, p. 1-14. 2013 DOI:10.1371/journal.pone.0083508.

JOVE. Science Education Database. *Basic Methods in Cellular and Molecular Biology:* The ELISA Method. *J Vis Exp*. p. 1-2, 2014. DOI: 10.3791/5061.

KURABE, N.; HAYASAKA, T.; OGAWA, M.; MASAKI, N.; IDE, Y.; WAKI, M.; NAKAMURA, T.; KURACHI, K.; KAHYO, T.; SHINMURA, K.; MIDORIKAWA, Y.; SUGIYAMA, Y.; SETOU M.; SUGIMURA, H. Accumulated phosphatidylcholine (16:0/16:1) in human colorectal cancer; possible involvement of LPCAT4. *J Mol Med*. v. 87, n. 1, p.85–97, 2009. DOI:10.1007/s00109-008-0409-0.

LIU, D.; NAGAN, N.; JUST, W. W.; RODEMER, C.; THAI, T. P.; ZOELLER, R. A. (2005). Role of dihydroxyacetonephosphate acyltransferase in the biosynthesis of plasmalogens and nonether glycerolipids. *J Lipid Res.* v. 46, n. 4, p. 727–735, 2005. DOI:10.1194/jlr.m400364-jlr200.

LOPEZ, D. H.; BESTARD-ESCALAS, J.; GARATE, J.; MAIMÓ-BARCELÓ, A.; FERNÁNDEZ, R.; REIGADA, R.; KHORRAMI, S.; GINARD, D.; OKAZAKI, T.;

FERNÁNDEZ J. A.; BARCELÓ-COBLIJN, G. Tissue-selective alteration of ethanolamine plasmalogen metabolism in dedifferentiated colon mucosa. *Biochim Biophys Acta.* v. 1863, n. 8, p. 928-938, 2018. DOI: 10.1016/j.bbalip.2018.04.017.

MANSILLA, F.; DA COSTA, K. A.; WANG, S.; KRUHØFFER, M.; LEWIN, T. M.; ØRNTOFT, T. F.; BIRKENKAMP-DEMTRÖDER, K. Lysophosphatidylcholine acyltransferase 1 (LPCAT1) overexpression in human colorectal cancer. *J Mol Med.* v. 87, n. 1, p. 85–97, 2009. DOI:10.1007/s00109-008-0409-0.

MARTIN, S. A., GIJÓN, M. A., VOELKER, D. R., & MURPHY, R. C. Measurement of lysophospholipid acyltransferase activities using substrate competition. *J Lipid Res.* v. 55, n. 4, p. 782–791, 2014. DOI:10.1194/jlr.d044636.

MAWATARI, S.; KATAFUCHI, T.; MIAKE, K.; FUJINO, T. Dietary plasmalogen increases erythrocyte membrane plasmalogen in rats. *Lipids Health Dis.* v. 11, n. 161, p. 1-7, 2012. DOI:10.1186/1476-511x-11-161.

MESSIAS, M. C. F.; MECATTI, G. C.; ANGOLINI, C. EBERLIN, M. N.; CREDIDIO, L.; MARTINEZ, C. A. R.; COY, C. S. R.; CARVALHO, P. O. Plasma lipidomic signature of rectal adenocarcinoma reveals potential biomarkers. *Front Oncol.* V. 7, n. 325, p. 1-9, 2018. DOI: 0.3389/fonc.2017.00325.

MINVILLE-WALZ, M.; PIERRE, A. S.; PICHON, L.; BELLENGER, S.; FÈVRE, C.; BELLENGER, J.; TESSIER, C.; NARCE, M.; RIALLAND, M. Inhibition of Stearoyl-CoA Desaturase 1 Expression Induces CHOP-Dependent Cell Death in Human Cancer Cells. *PLoS ONE*, v. 5, n. 12, p. 1-13, 2010. DOI:10.1371/journal.pone.0014363.

MOSER, A. B.; STEINBERG, S. J.; WATKINS, P. A.; MOSER, H. W.; RAMASWAMY, K.; SIEGMUND, K. D.; LEE, D. R.; ELY, J. J.; RYDER, O. A.; HACIA, J. G. Human and great ape red blood cells differ in plasmalogen levels and composition. *Lipids Health Dis.* v. 10, n. 101, p. 1-14, 2011.

NGUYEN, A.; et al. Using lipidomics analysis to determine signalling and metabolic changes in cells. *Cur Opin Biotechnol*. v. 43, p. 96-103, 2017. DOI: 10.1016/j.copbio.2016.10.003.

OSMAN, C.; VOELKER, D. R.; LANGER, T. Making heads or tails of phospholipids in mitochondria. *J Cell Biol.* v. 192, n. 1, p. 7–16, 2011. DOI:10.1083/jcb.201006159.

OTOKI, Y.; KATO, S.; KIMURA, F.; FURUKAWA, K.; YAMASHITA, S.; ARAI, H.; MIYAZAWA, T.; NAKAGAWA, K. Accurate quantitation of choline and ethanolamine plasmalogen molecular species in human plasma by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *J Pharmaceut Biomed Anal.* v. 134, p. 77–85, 2017. DOI:10.1016/j.jpba.2016.11.019.

PATON, C. M.; NTAMBI, J. M. Biochemical and physiological function of stearoyl-CoA desaturase. *Am J Physiol Endocrinol Metabo.* v. 297, n. 1, p. 28-37, 2009. DOI:10.1152/ajpendo.90897.2008.

PRESLER, M.; WOJTCZYK-MIASKOWSKA, A.; SCHLICHTHOLZ, B.; KALUZNY, A.; MATUSZEWSKI, M.; MIKA, A.; SLEDZINSKI, T.; SWIERCZYNSKI, J. Increased

expression of the gene encoding stearoyl-CoA desaturase 1 in human bladder cancer. *Mol Cel Biochem*. v. 447, n. 1-2, p. 217-224, 2018. DOI:10.1007/s11010-018-3306-z.

RUAN, W.; LAI, M. Actin, a reliable marker of internal control? *Clin Chim Acta.* v. 385, n.1-2, 1-5, 2007. DOI:10.1016/j.cca.2007.07.003.

SHI, C.; QIAO, S.; WANG, S.; WU, T.; JI, G. Recent progress of lysophosphatidylcholine acyltransferases in metabolic disease and cancer. *Int J Clin Exp Med.* v. 11, n. 9, p. 8941-8953, 2018.

SWISHER, C. N. Fatty acyl-CoA reductase 1 deficiency. *Pediatr Neurol Briefs*. v. 29, n. 1, p. 6, 2015. DOI: 10.15844/pedneurbriefs-29-1-5.

WANDERS, R. J. A.; OFMAN, R.; ROMEIJN, G. J.; SCHUTGENS, R. B. H.; MOOIJER, P. A. W.; DEKKER, C.; VAN DEN BOSCH, H. Measurement of dihydroxyacetone-phosphate acyltransferase (DHAPAT) in chorionic villous samples, blood cells and cultured cells. *J Inherit Metab Dis.* v. 18, n. S1, p. 90–100, 1995. DOI:10.1007/bf00711432.

WANG, H.; et al. Crystal structure of human stearoyl–coenzyme A desaturase in complex with substrate. *Nat Struc Mol Biol.* p. 1-6, 2015. DOI: 10.1038/nsmb.3049.

WATERHAM, H. R.; FERDINANDUSSE, S.; WANDERS, R. J. A. Human disorders of peroxisome metabolism and biogenesis. *Biochim Biophys Acta.* v. 1863, n. 5, p. 922–933, 2016. DOI:10.1016/j.bbamcr.2015.11.015.

YAMASHITA, A.; HAYASHI, Y.; MATSUMOTO, N.; NEMOTO-SASAKI, Y.; OKA, S.;TANIKAWA, T.; SUGIURA, T. Glycerophosphate/Acylglycerophosphate Acyltransferases. *Biology*. v. 3, n. 4, p. 801–830, 2014. DOI:10.3390/biology3040801.

ZHANG, J.; ZHANG, L.; YE, X.; CHEN, L.; ZHANG, L.; GAO, Y.; KANG, J. X.; CAI, C. Characteristics of fatty acid distribution is associated with colorectal cancer prognosis. *Prostaglandins, Leukot Essent Fatty Acids.* v. 88, n. 5, p. 355–360, 2013. DOI:10.1016/j.plefa.2013.02.005.

## CAPÍTULO IV: PLASMA-BASED LIPIDS BIOMARKERS PANEL AND KEY METABOLIC PATHWAYS FOR THE DETECTION OF COLON CANCER

Anna Maria Alves de Piloto Fernandes, Márcia Cristina Fernandes Messias, Gustavo Henrique Bueno Duarte, Gabrielle Kristtine Doratiotto de Santis, Giovana Colozza Mecatti, Andreia de Melo Porcari, Michael Murgu, Ana Valéria Colnaghi Simionato, Thalita Rocha, Carlos Augusto Real Martinez, Patrícia de Oliveira Carvalho

Neste capítulo é apresentado o estudo lipidômico *untarget*ed de plasma de pacientes com câncer de cólon (n=50) e voluntários saudáveis (n=50) usando as técnicas de cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas e cromatografia gasosa (GC-FID). Também foram avaliadas as concentrações das enzimas GNPAT, LPCAT4 e SCD e sua relação com os biomarcadores identificados. Os resultados mostraram a redução da concentração plasmática da enzima GNPAT no plasma dos pacientes e 42 moléculas lipídicas diferenciais entre os grupos avaliados. A análise discriminante por mínimos quadrados parciais (PLS-DA) possibilitou a discriminação entre os grupos. A partir da curva ROC (do inglês *Receiver Operator Characteristic*) foi possível identificar três plasmalogênios de fosfatidilserina, PS (P-36: 1), PS (P-38: 3) e PS (P-40: 5) como possíveis biomarcadores para o câncer de cólon.

## ABSTRACT

Colon cancer (CC) is a silent disease whose first symptoms may take 10-15 years to appear by which time the disease is at an advanced stage. In this era of precision medicine, there is an increasingly urgent need for highly sensitive and more specific tests for detecting tumors, so plasma lipidomics based on mass spectrometry is an emerging tool in an array of clinical diagnostics and in disease management. We used ultraperformance liquid chromatography coupled with electrospray ionization guadrupole timeof-flight mass spectrometry operating in MS<sup>E</sup> mode (UHPLC-QTOF-MS<sup>E</sup>) and gas chromatography (GC) to investigate differences between the plasmatic lipidic composition of CC patients (n=50) and control (CTR) subjects. Key enzymes in lipidic metabolism were investigated using immuno-based detection assays. Our partial least squares discriminant analysis (PLS-DA) resulted in a suitable discrimination between CTR and CC plasma samples. Forty-three statistically significant discriminating lipids were putatively identified. Ether lipids showed a prominent presence among the differential molecules and accordingly, a decrease in glyceronephosphate O-acyltransferase (GNPAT) enzyme activity was found. A receiver operating characteristic (ROC) curve built for three phosphatidylserine plasmalogens, PS(P-36:1), PS(P-38:3) and PS(P-40:5), presented an area under the curve (AUC) of 0.998, sensitivity and specificity of 100 and 85.7% respectively, positive predictive value (PPV) of 86.1% and negative predictive value (NPV) of 100%. These results show significant differences in CC patients' plasma lipid composition that may be useful in discriminating them from CTR individuals. Ether lipids, plasmalogens in particular, seem to be of special interest in this evaluation.

Keywords: colon cancer; biomarkers; lipidomic; mass spectrometry; plasmalogens;

## **1. INTRODUCTION**

Colorectal cancer (CRC) accounts for 1 in 10 cancer cases and deaths worldwide and is the third pathology in terms of incidence, and second in terms of mortality (BRAY et al., 2018; ORANGIO, 2018). Colon cancer (CC) alone is the fourth most diagnosed type of cancer, representing more than one million new cases worldwide in 2018, more than fifty percent of which resulted in death (BRAY et al., 2018). Cancers in the colon and rectum are frequently studied together; however, there are clinicopathological differences in cancers across those sites (VAN DER SIJP et al., 2016).

As the CC stage advances, the five-year survival rate decreases (SIMON, 2016). Less invasive bio-fluid-based early detection strategies (urine and peripheral blood and its components) are attractive alternatives compared to colonoscopic screening methods (GHOSH et al., 2017; HYOTYLAINEN & ORESIC, 2016). Additionally, unravelling and understanding alterations in plasma metabolic profile associated with cancer could lead to the development of new strategies for cancer cure and prevention.

Lipids are fundamental metabolites in human physiology that play vital roles in the homeostasis of the organism at the cellular level, acting as structural molecules in the cell membrane and, at a systemic level, as intra- and inter-cellular signals. Accordingly, many human diseases, including metabolic, immune and central nervous system diseases, as well as cancer, are consequences of metabolic changes in lipid enzymes and their pathways (QUEHENBERGER & DENNIS, 2011; BELORIBI-DJEFALLIA et al., 2016).

Chromatographic techniques coupled to mass spectrometric methods combined with multi and univariate statistical analyses have been extensively used in the past few decades, constituting powerful and indispensable lipidomics tools. While gas chromatography (GC) enables the qualitative and quantitative evaluation of fatty acid (FA) composition of the lipidic portion in biological samples, the use of an ultra- performance liquid chromatograph coupled to a quadrupole time-of-flight mass spectrometry (UPLC-QTOF) analyzer makes it possible to separate the major lipid classes with high resolution and sensitivity, which improves the detection of low-abundant lipid species (KNITTELFELDER et al., 2014). Also, high energy mass spectrometry (MSE) has made the amount of biological information that may be obtained from a single sample, to increase when comparing to any other current analytical systems. MS<sup>E</sup> scans enable

85

simultaneous acquisition of full scan data and collision induced fragmentation to improve identification of lipid classes and to obtain structural information (ZHAO & LIN, 2014).

MS-based lipidomic studies have been applied to different types of cancer (PERROTTI et al., 2012; YANG & HAN, 2016; BANDU et al., 2018; CHEN et al., 2018; CALA et al., 2018; DUSCHARLA et al., 2016; MESSIAS et al., 2018). Although many other studies have reported alterations in metabolic end products for CRC (PAKIET et al., 2019; ZHANG et al., 2017; PERTULLA et al., 2018; LI et al., 2013; BUTLER et al., 2017 GEIJSEN et al., 2019; ZHAO et al., 2007) none of them, to the best of our knowledge, have investigated the alterations of lipids in plasma of CC patients.

In this work, we used a UPLC-QTOF-MS<sup>E</sup>-based untargeted lipidomic approach to investigate differences between the lipid profiles of CC patients and those of CTR volunteers. Fatty acids (FA) composition was complementarity analyzed by GC coupled to flame ionization detection (GC-FID). The objective was to identify potential biomarkers and metabolic pathways associated with CC in order to contribute to a better understanding of this pathology and to indicate putative diagnostic biomarkers. As a consequence, the key enzymes in the biosynthesis of the plasmalogens (NGUYEN et al., 2017; LOPEZ et al., 2018), glycerophosphate O-acyltransferase (GNPAT), lysophosphatidylcholine acyltransferase 4 (LPCAT4) and stearoyl-CoA desaturase 1 (SCD1) were investigated by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Plasmalogens are a special class of ether lipids. It has already been shown that plasmalogen levels are much higher in cancer cells than in normal cells (DEAN & LODHI, 2018). Those findings have encouraged many endeavors to establish plasmalogens as tumor markers in medical cancer diagnostics (LV et al., 2015).

### 2. MATERIALS AND METHODS

## 2.1 Volunteers, ethical consent and plasma samples

This cross-sectional study included fifty healthy volunteers from the CTR group and fifty CC patients from the São Francisco University Hospital (HUSF). Patient recruitment took place from January 2018 to June 2019. Before blood collection, written informed consent was acquired from all the participants and the same protocol was applied to both

CC and CTR volunteers. The study was approved by the ethics committee of the São Francisco University, CAAE 57114716.8.1001.5514 (Annex 5). Venous blood was collected from fasted individuals from 12 hours using a tube potassium EDTA. After collection, the blood was centrifuged for 10 min at 2500 x g at 20 °C and the plasma was fractionated into 100 µL aliquots in micro centrifuge tubes and immediately stored at -80 °C until analysis. For CC patients, samples were taken prior to their submission to surgical procedures, chemotherapy, and/or radiotherapy. Only CC patients with diagnoses confirmed by histopathology were considered. The TNM classification system of the American Joint Committee on Cancers (AJCC, 2017) was used to stratify the CC patients into three groups for analysis: stage I, stage II and stage III/IV. Only non-smoker CTR volunteers were selected and screened based on hemato-biochemical analysis combined with clinical examination.

## 2.2 Total lipids extraction

Plasma samples (0.8 mL) were extracted with 2.5 ml of chloroform–methanol (2:1) and 0.5 mL of an aqueous solution of NaCl (0.1 mol L<sup>-1</sup>) as previously reported by Folch et al. (1957). The lower organic layer was collected and separated into two fractions that were dried under nitrogen flow and stored at -80 °C for analysis in a period no longer than 6 months.

# 2.3 Lipid profile of plasma samples by liquid chromatography–mass spectrometry (LC–MS) analysis

For LC-MS analysis, dried lipid samples were reconstituted in 1 mL of an isopropanol/acetonitrile/water (2:1:1, v/v/v) solution. Data were acquired using an ACQUITY FTN liquid chromatograph coupled to a XEVO-G2XSQTOF mass spectrometer (Waters, Milford, MA, USA) using MassLynx 4.1 software an Acquity UPLC CSH C18 column (2.1 × 100 mm, 1.7  $\mu$ m, Waters) was used. The mobile phase consisted of 10 mM of ammonium formate with 0.1% formic acid in acetonitrile/water (60:40, v/v) (A) and 10 mM ammonium formate with 0.1% formic acid in isopropanol/acetonitrile (90:10, v/v) (B) at a flow rate of 0.4 mL min<sup>-1</sup> with a linear gradient (in % B): 0 - 0.5 min: 40 - 43%; 0.5 – 0.6

min: 63%; 0.6 – 4 min: 68%; 4 – 4.1 min: 70%; 4.1 – 6.5 min: 99%; 6.5 min: decrease to 40%; 6.5 – 8.1 min: 40% (with a further 1.9 min for column reequilibration) resulting in a 10 min analysis. The injection volume was 0.1  $\mu$ L. For the electrospray ionization source, the parameters were set as follows: capillary voltage of 2 kV, sampling cone of 30 V, source temperature of 130 °C, desolvation temperature of 450 °C, cone gas flow of 100 L h<sup>-1</sup>, desolvation gas flow of 800 L h<sup>-1</sup> for positive mode; capillary voltage of 1.0 V, sampling cone of 40 V, source temperature of 130 °C, desolvation temperature of temperature of 450 °C, cone gas flow of 50 L h<sup>-1</sup>, desolvation gas flow of 800 L h<sup>-1</sup> for negative mode. The acquisition scan range was from 50 to 2000 Da and the data were acquired using MS<sup>E</sup> approach. Leucine encephalin (molecular mass = 555.62; 200 pg  $\mu$ L<sup>-1</sup> in 1:1 ACN:H2O) was used as a lock mass for accurate mass measurements, and a 0.5 mM sodium formate solution was used for instrument calibration. Pooled samples were injected every twenty injections.

## 2.4 Fatty acid profile by GC-FID analysis

Lipid dry extracts were treated with boron trifluoride-methanol for FA derivatization before GC analysis. The fatty acid methyl esters (FAME) resuspended in hexane were injected in the splitless mode (1  $\mu$ L) and analyzed by GC in triplicate, using a CP 9001 GC-FID chromatograph (CHROMPACK, Middelburgburg, ZE, Netherlands) and a capillary column CP-Sil 88 (WCOT Fused Silica 59 m × 0.25 mm) as previously reported (CASADEI et al., 2014). FA identification was performed by comparing the retention time of sample components with authentic FAME standards (Supelco Chemical Co., Bellefonte, PA, USA) injected under the same conditions. FA composition was expressed in relation to the percentage of total FA and calculated according to the area value of each peak using the Chromatostation N2000 system (Surwit Technology Inc., Hangzhou, ZJ, China). GC-FID data was expressed as mean  $\pm$  standard deviation (SD).

## 2.5 Immunodetection of plasmalogen synthesis enzymes LPCAT4, SCD and GNPAT

*In vitro* quantitative measurements of LPCAT4 (SEG532Hu 96 Tests), SCD (SEF419Hu 96 Tests) and GNPAT (Cat.No: BS9320649) in plasma samples were carried out using commercial quantitative sandwich ELISA kits (Cloud-Clone Corp®, Miami, FL,

USA for LPCAT4 and SCD; MyBioSource.com, San Diego, CA, USA for GNPAT) according to the manufacturer's instructions. ELISA data were analyzed using a Stat Fax 2100 reader (Awareness Technology, Palm City, FL, USA). The values were processed automatically by the program MultCalc (PerkinElmer Life Sciences, Waltham, MA, U.S.A.). The analysis was performed in triplicate and for the mean and standard deviation calculations, the numerical values of the blank, standards, controls and plasma samples were considered. Results were expressed in ng.mL<sup>-1</sup>.

#### 2.6 Data processing, statistical, biomarker and pathway analyses

Liquid chromatographic MS raw data was processed with Progenesis QI software (Waters) for peak detection, alignment, integration, deconvolution, data filtering, ion annotation and MS<sup>E</sup> based putative identification of compounds. The LIPID MAPS database was used for this identification with the following search parameters: precursor mass error  $\leq$  5 ppm, fragment tolerance  $\leq$  10 ppm. Fragmentation score, mass accuracy, isotope similarity and the Human Metabolome Database (HMDB) matching were considered for the identification of the molecules. Statistical, biomarker and pathway analyses were performed using the MetaboAnalyst 4.0 web platform. Univariate and multivariate statistical analyses were carried out to find significant differences between plasma lipid profiles from CC patients and CTR volunteers. Data were normalized by sum and pareto scaled before performing statistics. Fold change (FC), T-test and Volcano plot methods were applied for univariate analysis. Only features that fulfilled log2(FC) > 1, pvalue < 0.05 and FDR < 0.05 were considered significant. Principal component analysis (PCA) was used for unsupervised, multivariate data analysis, and partial least square discriminant analysis (PLS-DA) for supervised multivariate data analysis. The PLS-DA model was built using all features and a subsequent model was evaluated by cross validation and permutation tests. Variable importance in projection (VIP) from PLS-DA was used in addition to hierarchical analysis to construct a heat map. Classical univariate ROC (receiver operating characteristic curve) analysis was performed using a linear support vector machine (linear-SVM). This analysis was performed with all the features to evaluate the AUC (area under the curve). Evaluation of the ROC curve-based model for the selected phospatidylserine plasmalogens was also performed in order to verify the

potential of these ether lipids as biomarkers. Data from positive and negative modes were divided into a training set (70% of samples) and a validation set (30% of samples).

For GC-FID and imunoassays data, unpaired Student's t-test and one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's *post hoc* test were performed using GraphPad Instat 3.0 and Prism 8 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA) respectively. A significance level of p < 0.05 was adopted.

## 3. RESULTS

## 3.1 Demographic and clinicopathological characteristics of CC and CTR subjects

Participants in this study included 50 CC and 50 CTR volunteers, aged from 18 to 80. Among the CC patients, 58% had CC in early stages (TNM staging I and II, respectively), 24% had CC at an advanced stage (TNM staging III and IV), and 18% were determined as unclassified. Demographic and clinicopathological characteristics of the subjects are summarized in Table 1.

	CC patients	CTR volunteers
Ν	50	50
Sex (M/F)	24/26	25/25
Age (years)	$62.4 \pm 9.4$	57.2 ± 12.9
Race (%)		
White	42 (84)	43 (86)
Black	5 (10)	6 (12)
Mulatto	3 (6)	1 (2)
BMI (kg/m²)	23.9 ± 6.1	$29.2 \pm 6.7$
Smoker (%)		
Yes	8 (16)	-
No	16 (32)	-
Ex	12 (24)	-
No information	14 (28)	-
Stages (%)		
I	11 (22)	-
II	18 (36)	-
III/IV	12 (24)	-
No information	9 (18)	-

 Table 1: Demographic and clinicopathologic characteristics of CC patients and CTR volunteers

# 3.2 Untargeted lipidomic plasma analysis and discrimination between CC patients and CTR volunteers

A total of 2,190 features were detected in the positive and 2,528 in the negative ionization modes. Compound detection was based on extracted ion chromatograms.

Principal Component Analysis (PCA) was performed with all features obtained by both ionization modes, achieving a good segregation between CC and CTR groups (Figures 1A-B).



Figure 1: PCA scores plot for plasma samples. CC patients (red) and CTR volunteers (green) in the positive (A) and negative (B) ion modes.

PLS-DA confirmed the excellent discrimination between the CC patients and CTR volunteer groups (Figure 2A, positive mode) with good predictive performances ( $R^2 = 0.90$  and  $Q^2 = 0.89$ , two components, Figure 2B) and a very significant p value (< 0.001) for the permutation test statistics (Figure 2C).



Figure 2: PLS-DA scores plots in the negative ion mode of CTR volunteers (green) and CC patients (red). A: 48.2 and 15.7 % represent the scores of components 1 and 2, respectively. B: Performance measures of the PLS-DA model (prediction accuracy, R2, and Q2), \*best value of Q2 (0.97). C: Permutation test statistics at 1000 permutations (p < 0.001).

Features were then classified according to their VIP scores in the first component,  $log_2$  fold change ( $log_2(FC)$ ), p-value, false discovery ratio (FDR) and area under curve (AUC), resulting in the selection of 167 statistically significant features in the positive ionization mode, and 141 features in the negative ionization mode. Progenesis QI identification and HMDB matching resulted in the annotation of 42 out of the 167 significant features as putative biomarkers for CC plasma samples classification (Table 2).

Number	Peak (rt_m/z or n)	ESI	p-value	log2(FC)	FDR	AUC	VIP/Comp. 1	Molecular Formula	Adducts
1	2.01 355.1570m/z	-	6,18E-05	2,25	1,26E-04	0,882	1,56	C19H30O5S	M+ FA - Ac -H
2	2.10 390.2767n	+	1,33E-17	1,14	5,18E-17	0,956	3,64	C24H38O4	M+Na, M+K, M+H
3	5.97 369.3515m/z	+	3,08E-11	5,00	7,82E-11	0,986	1,26	C27H46O	M+H
4	2.59 447.3463m/z	+	3,06E-21	1,45	1,64E-20	0,985	1,05	C13H24O2	2M+Na
5	2.88 629.4570m/z	-	3,42E-24	4,25	4,36E-23	0,990	1,68	C35H69O8P	M+ FA - Ac -H
6	3.63 662.5226n	+	2,77E-17	2,23	1,05E-16	0,955	1,63	C37H75O7P	M+H, M+NH4
7	4.08 705.5172m/z	+	2,12E-25	1,61	1,95E-24	0,997	1,06	C37H70NO8P	M+NH4
8	2.60 826.5939m/z	+	1,31E-09	3,94	2,96E-09	0,973	1,08	C46H86NO10P	M+H-H2O
	-						1	C46H81O9P	M+NH4
9	2.50 826.5932m/z	+	5,35E-11	4,06	1,33E-10	0,987	1,61	C46H84NO9P	M+H
10	2.18 839.5655n	+	2,74E-16	2,46	9,54E-16	0,957	2,85	C46H82NO10P	M+H-H2O, M+Na, M+H
11	2.49 850.5926m/z	+	1,60E-11	5,76	4,15E-11	0,982	1,02	C50H85NO7	M+K
12N	2.15 773.5560n	-	8,07E-08	2,49	2,31E-07	0,772	1,40	C42H80NO9P	M+ FA - Ac -H, M+FA-H
12P	2.20 773.5562n	+	1,11E-10	4,46	2,69E-10	0,982	2,21	C42H80NO9P	M+H, M+Na
13	2.40 824.5790m/z	+	6.54E-12	3.91	1.74E-11	0.99	1.09	C46H84NO10P	M+H-H2O
14N	2.28 797.5557n	-	2,21E-09	3,56	7,34E-09	0,797	1,85	C44H80NO9P	M+ FA - Ac -H, M+FA-H
14P	2.33 797.5561n	+	3,17E-10	4,61	7,48E-10	0,983	2,58	C44H80NO9P	M+H, M+Na
15	2.11 866.5535m/z	-	5,66E-09	4,30	1,80E-08	0,816	1,10	C46H80NO9P	M+FA-H
16	2.21 222.1266n	-	1.19E-28	3.68	2.91E-27	0.991	2.71	C31H58O5	2M-H, 2M+FA-H
17	6.01 698.5829n	+	8,68E-30	2,23	1,78E-28	1,000	1,57	C45H78O5	M+Na, M+K, M+H
18	7.08 549.4876m/z	+	3,38E-22	-1,80	2,01E-21	0,998	3,31	C35H66O5	M+H-H2O
19	7.08 575.5029m/z	+	2.66E-17	-1.09	1.01E-16	0.952	1.38	C37H68O5	M+H-H2O
20	2.31 445.2374m/z	-	1.06E-14	-1.40	5.37E-14	0.937	4.14	C23H30O6	M-H2O-H
21	2.04 443.2218m/z	-	4,39E-15	-2,15	2,27E-14	0,962	1,25	C23H39O7P	M+ FA - Ac -H
22	6.99 535.4711m/z	+	2,88E-16	-1,27	1,00E-15	0,955	1,46	C16H32O2	C16H32O2
23	3.35 766.5390m/z	-	2,08E-07	-1,54	5,71E-07	0,822	2,37	C44H80NO8P	M+ FA - Ac -H
24	3.10 741.5662n	-	1,13E-10	-1,26	4,16E-10	0,886	2,19	C42H80NO7P	M+ FA - Ac -H, M+FA-H
25	3.01 810.5648m/z	-	6,22E-12	-1,31	2,52E-11	0,911	1,87	C44H80NO7P	M+FA-H
26	3.08 767.5821n	-	3,09E-15	-1,38	1,63E-14	0,930	3,09	C44H82NO7P	M+ FA - Ac -H, M+FA-H
27	3.52 795.6107n	-	1,58E-11	-1,39	6,20E-11	0,877	1,87	C46H86NO7P	M+ FA - Ac -H, M+FA-H
28	3.10 838.5954m/z	-	1,10E-13	-1,26	5,13E-13	0,911	2,59	C46H84NO7P	M+FA-H
29	4.40 781.5053m/z	-	1,59E-13	-2,78	7,38E-13	0,974	1,33	C44H77O10P	M+FA-H
30	3.91 779.4898m/z	-	1,27E-20	-2,65	1,09E-19	0,993	1,92	C44H75O10P	M+FA-H
31	3.49 777.4740m/z	-	5,73E-19	-2,85	4,18E-18	0,982	1,10	C44H73O10P	M+FA-H
32	6.65 748.6574n	+	2,82E-18	-1,40	1,17E-17	0,98	2,87	C47H88O6	M+NH4, M+Na
33	7.98 1044.9853m/z	+	4,18E-30	-3,17	9,15E-29	1,000	1,08	C67H126O6	M+NH4
34	6.75 823.6784m/z	+	6,63E-18	-1,35	2,65E-17	0,977	3,22	C53H90O6	M+H
35	7.24 832.7507n	+	2,34E-16	-1,08	8,20E-16	0,947	8,06	C53H100O6	M+NH4, 2M+Na
36	6.91 846.7531m/z	+	7,63E-22	-1,44	4,39E-21	0,990	3,69	C53H96O6	M+NH4
37	6.89 851.7096m/z	+	1,59E-15	-1,01	5,23E-15	0,932	3,77	C55H94O6	M+H
38	7.52 888.8131n	+	1,10E-22	-1,85	6,94E-22	0,999	4,10	C57H108O6	M+NH4, M+Na
39	7.39 904.8315m/z	+	1,15E-19	-1,36	5,52E-19	0,985	2,57	C57H106O6	M+NH4
40	7.79 944.8742n	+	3,16E-22	-1,85	1,89E-21	0,997	4,90	C61H116O6	M+NH4, M+Na
41	7.68 938.8257n	+	7,58E-16	-1,42	2,58E-15	0,958	1,94	C61H110O6	M+H, M+NH4
42	7.80_970.8893n	+	3,56E-23	-2,20	2,44E-22	0,996	3,25	C63H118O6	M+NH4, M+Na

Table 2: Statistical data of differential features between CC patients and CTR volunteers

According to the PLS-DA model, glycerophospholipids were the class of compounds that most contributed to the separation of groups, accounting for 51% of the classifier features, followed by glycerolipids (37%) and minor constituents such as sterols (9%) and one fatty acid (3%) (Figure 3A). Within the glycerophospholipids class, 33% was composed of phosphatidylserine, 29% of phosphatidylcholine, 24% of phosphatidylglycerol, 9% of phosphatidic acids, and 5% of phosphatidylethanolamines (Figure 3B). Ether lipids and diacyl phospholipids corresponded to 64% and 36% of the glycerolipids, respectively (Figure 3C). Figure 3D shows the differences in the chemical

structures of those phospholipids with an emphasis on the three different FAs bound to the SN-1 position of the glycerol backbone, namely: *i*) an ester bond for diacyl phospholipids; *ii*) an ether bond for alkyl-acylphospholipids; *iii*) a double bond adjacent to the oxygen in the ether group for the alkenyl-acylphospholipid, which is defined as a plasmalogen. Alkyl-acylphospholipids are also known as 'ether lipids'.



Figure 3: Distribution of the identified metabolites according to major lipid classes. A: AS = androsterone sulfate, AA = apocholic acid, CHL = cholesterol, TA = trihydroxycoprostanoic acid, DG = diacylglycerols, TG = triacylglycerols and 16:0 = palmitic acid. B: Distribution in the class of Glycerophospholipids: PS = phosphatidylserine, PC = phosphatidylcholine, PG = phosphatidylglycerol, PA = phosphatidic acid and PE = phosphatidylethanolamine. C: Percentages of ether and regular diacyl glycerophospholipids in the glycerophospholipid class. D: General chemical structures of glycerophospholipids where X = serine, choline, glycerol, H or ethanolamine. The different kinds of binding to the fatty acid moiety of the glycerol oxygen in the SN1 position are highlighted.

## 3.3 Metabolic pathway analyses plot

Pathway analysis was performed with the differentiated metabolites (Figure 4). The size and the position of the circles show the impact of the metabolite on the pathway. Indeed, larger circles, which are also those with higher coordinates values, show more prominent impact of those metabolites on the respective pathway. The data indicate that the glycerophospholipid and glycerolipid metabolism pathways are significantly involved in the differentiation of CC and CTR volunteers. Other pathways, such as that of primary bile acids biosynthesis, were also impacted but they were not statistically significant at this point.



**Figure 4: Pathway analysis performed using MetaboAnalyst 4.0.** \*Pathways with the highest pathway impact with p-value < 0.05. (E).

## 3.4 Phosphatidylserine plasmalogens as biomarkers for CC diagnostics

PLS-DA revealed the phosphatidylserine plasmalogens PS (P-36:1), PS (P-38:3) and PS (P-40:5) as being more abundant in CC than in CTR samples as shown in the boxplots of Figure 5A. The ROC curve, constructed with these PS plasmalogens, which

plots the sensitivity (true positive rate) as a function of 1-specificity (false positive rate, for a 95% confidence interval - CI) is shown in Figure 5B. The model presented an AUC of 0.998, reflecting the outstanding ability of the selected parameters to distinguish between CC and CTR groups. Figure 5C shows the p - value for the permutation test (found to be very significant). The resulting support vector machine (SVM) model was applied to classify the validation set, correctly classifying 30 out of 35 CTR samples and all cancer samples. Therefore, the positive predictive value (PPV) of these plasmalogens is 86.1%, the negative predictive value (NPV) is 100%, with a specificity of 85.7%, and a sensitivity of 100% for a per-patient analysis. The average accuracy based on 100 cross validations was 91.1%.



**Figure 5: Plasmalogens elected for the biomarker model. A:** Boxplots of the phosphatidylserine plasmalogens PS (P-36:1), PS (P-38:3) and PS (P-40:5). **B:** ROC curve (and 95% confidence interval) exhibiting an AUC of 0.998 for the plasmalogens predictive model. **C:** Permutation statistic result for the supporting vector machine (SVM) model (p < 0.05).

## 3.5 Analyses of fatty acid composition by gas chromatography

Table 3 shows the results for the plasma FA composition of the CTR volunteers and CC patients with different cancer stages. The main FA found in all groups were the saturated FA (SFA) followed by the n-6 polyunsaturated FA (PUFA) and the monounsaturated FA (MUFA). Slight differences from CTR volunteers were observed according to the cancer stage for FA (14:0), which was reduced in stage II, and FA (20:4 n-6), which was reduced in stages III/IV. Significant reductions were observed for 22:5 n-3 PUFA for CC in stages I and III/IV and 22:6 n-3 for all stages, when compared to the CTR group. No statistical differences were observed among the evaluated groups when considering total plasma FA composition (SFA, MUFA, n-6 and n-3 PUFA).

different cancer's stages	5				
Fatty acids	CTR volunteers	Stage I	Stage II	Stage III/IV	
14:0	3.06 ± 1.63	$2.08 \pm 0.25$	1.64 ± 0.88*	4.51 ± 2.43	
16:0	$27.33 \pm 4.37$	$30.23 \pm 2.00$	$30.63 \pm 5.79$	$33.25 \pm 3.31$	
18:0	7.68 ± 1.44	$7.39 \pm 0.88$	7.62 ± 1.70	$7.38 \pm 0.92$	
∑ SFAs	38.07 ± 7.44	39.70 ± 3.13	39.89 ± 8.37	45.14 ± 6.66	
16:1 n-9	$5.08 \pm 0.79$	$4.40 \pm 0.81$	$5.35 \pm 2.99$	5.50 ± 1.22	
18:1 n-9	20.06 ± 3.36	23.04 ± 1.02	21.25 ± 5.26	19.81 ± 0.88	
∑ MUFAs	25.14 ± 4.15	27.44 ± 1.83	26.60 ± 8.25	25.31 ± 2.10	
18:2 n-6	28.35 ± 5.66	27.96 ± 3.41	27.77 ± 5.75	25.46 ± 1.44	
20:4 n-6 (ARA)	5.12 ± 1.01	$3.87 \pm 2.69$	4.42 ± 2.21	$3.33 \pm 0.62^{*}$	
∑ n-6 PUFAs	33.47 ± 6.67	31.83 ± 6.10	32.19 ± 7.96	28.79 ± 2.06	
18:3 n-3	1.35 ± 1.38	$0.30 \pm 0.23$	$0.63 \pm 0.32$	0.42 ± 0.31	
20:5 n-3 (EPA)	$0.54 \pm 0.42$	$0.35 \pm 0.08$	$0.18 \pm 0.09$	0.21 ± 0.12	
22:5 n-3 (DPA)	$0.33 \pm 0.19$	$0.09 \pm 0.04^*$	$0.19 \pm 0.13$	$0.18 \pm 0.01^*$	
22:6 n-3 (DHA)	$0.63 \pm 0.28$	0.22 ± 0.15*	0.28 ± 0.07*	$0.18 \pm 0.04^*$	
∑ n-3 PUFAs	2.85 ± 2.27	0.96 ± 0.32	1.30 ± 0.54	0.98 ± 0.47	

**Table 3:** Fatty acid composition (relative %) of plasma total lipids in CTR volunteers and CC patients in the different cancer's stages

\*p<0.05 compared to the CTR group (mean±standard deviation). SFAs: saturated fatty acids. MUFAs: monounsaturated fatty acids. PUFAs: polyunsaturated fatty acids. EPA: eicosapentaenoic acid, DPA: docosapentaenoic acid and DHA: docosahexaenoic acid.

## 3.6 GNPAT, SCD and LPCAT4 concentrations determined by ELISA assay

Concentrations of GNPAT, SCD and LPCAT4 in plasma samples from CC patients and CTR volunteers are described in Figure 6. ELISA analysis revealed a decrease in the concentration of GNPAT in the plasma of CC patients when compared to CTR volunteers (p < 0.05). Regarding the concentrations of SCD and LPCAT4, there was no statistical difference between the groups.



**Figure 6:** *In vitro* **quantitative measurement of plasmalogen synthesis enzymes.** GNPAT, SCD and LPCAT4 concentrations in plasma samples from CC patients and CTR volunteers. \* p<0.05.

## 4. DISCUSSION

This study reports the lipidomic investigation of plasma samples from CC patients compared to CTR volunteers in order to detect putative lipid biomarkers with potential to differentiate both groups. Fatty acid and enzyme analyses were also used to complement the findings and aid the comprehension of the metabolic pathways most impacted by the carcinogenesis process. UPLC-MS<sup>E</sup> data assisted by multivariate analysis showed a clear difference between the plasma lipid profile of CC patients and CTR volunteers and 42 compounds were revealed as the most relevant and statistically significant molecules for

discriminating the groups. We found that gender causes some segregation in the CTR group but not in CC patients suggesting that this factor is not as important as CC is for the discrimination of the groups.

In the MSE mode of acquisition, MS and MS/MS data are acquired from the same single analytical run. Alternating scans are acquired at either low or high collision energy in the collision cell thus producing precursor ion and fragments mass information. This technique improves the efficiency of the instrument in terms of amount of data produced since all analytes will be fragmented without the need of a pre-selection of any analyte m/z value in the quadrupole.

For LC-MS analysis, both positive and negative ionization modes were used. Although most of the selected features could be detected in both ionization modes, plasmalogen PS (P-40:5) was detected only in the negative one. Thus, considering the number of detected features, our data suggest that positive ionization mode should be used for this study. On the other hand, for targeted analysis of plasmalogens, negative ionization mode should be considered.

PS was the most prevalent class of glycerophospholipids. PS is an immunosuppressive anionic phospholipid whose essential functions are to activate important kinases, such as PKC, PDK1 and AKT, and it serves as an interaction molecule for several signaling proteins (VALLABHAPURAPU, 2015; DE et al., 2018). The process of tumorigenesis involving PS occurs because cancer cells inhibit the maturation of dendritic cells and decrease the production of cytotoxic T cells (SHARMA & KANWAR, 2018). Overexpression of PS has already been observed in human breast cancer cell lines (MDA-MB-231-Luc-D3H2LN), glioblastoma (Gli36) and astrocytoma (U371) and CRC (DE et al., 2018).

It is also worth noting the relative amount of ether lipids among the list of potential glycerophospholipid biomarkers of CC. In humans, the average concentration of ether lipids is 20% of the pool of the phospholipids, varying according to the tissue. In this work, more than 60% of the pool of glycerophospholipids were ether lipids (BRAVERMAN & MOSER, 2012).

Higher levels of ether lipids in tumors have been described since the late 1960s (SNYDER & WOOD, 1969; SNYDER et al., 1966) and since then, many reports have correlated these molecules to pathological states such as breast cancer (DEAN & LODHI, 2018) and to anti-metastatic drugs action mechanisms (JAFFRES et al., 2016).

Plasmalogens can be considered as a subset of ether lipids (GLADE & SMITH, 2015). The ROC curve, constructed to evaluate the potential of PS plasmalogens as diagnostic biomarkers, showed excellent sensitivity, 100% (NPV of 100%), meaning that all cancer subjects would be positively classified for the disease in our predictive model. Therefore, a blood test using this panel of biomarkers could possibly be used before colonoscopy, as confirmed by the specificity achieved by this model (PPV of 86.1%). This result is in agreement with previous studies that also point to plasmalogens as good candidates as biomarkers of cancer disease. However, a higher number of samples must be analyzed before that, in order to biologically validate the biomarker characteristics of these plasmalogens. These preliminary results are comparable to, or even better than other non-invasive and non-radiologic biofluid-based screening methods for CRC, especially in terms of sensitivity. The FDA-approved fecal immunochemical test combined with stool DNA test (FIT-DNA) showed a sensitivity for detection of CRC of 92.3% (specificity of 86.6%), while the blood-based analysis for the presence of circulating methylated SEPT9 DNA has shown a sensitivity of 48.2% and a specificity of 91.5% (INADOMI, 2017).

Glycerolipid class evaluation revealed a consistent decrease in DGs and TGs in CC patients' plasma. This finding is in agreement with the decrease in body mass index (BMI) found in CC patients TISDALE, 2009; DAS & HOEFFER, 2013). A previous study using rapid evaporative ionization mass spectrometry (REIM) showed a specific decrease in TG (54:0) content in cancer tissue of patients undergoing elective surgical resection for CRC (ALEXANDER, 2017).

Androsterone sulfate, apocholic acid, cholesterol and trihydroxycoprostanoic acid are sterols (QUEHENBERGER & DENNIS, 2011) and found in increased amounts in plasma samples from CC patients. Statins, the first choice medication to control the low-density lipoprotein (LDL) cholesterol levels in the blood, have been successfully tested in CRC patient (VOORNEVELD et al., 2017) and in CC stem cells (ZHANG et al., 2017) metabolite in suggesting the participation of this cancer progression. Trihydroxycoprostanic acid is a C27-bile acid intermediate, which is converted to cholic acid in peroxisomes (BERENDSE et al., 2016; WANDERS et al; 1987). Bile acids are steroid acids primarily produced by the liver and metabolized by enteric bacteria in the colon to form secondary toxic derivatives that have been implicated in the acceleration and progression of CRC (GADALETA, 2017; AJOUZ et al; 2014). Recently, a consistent

increase in genes for secondary bile acid conversion in CRC-associated microbiomes has been reported (THOMAS et al., 2019). Our pathway analysis also reported primary bile acid biosynthesis as one of the impacted pathways, albeit without statistical significance at this point. Our results are in agreement with the connection between a fat/meat-rich diet and CC occurrence hypothesis (AJOUZ et al; 2014). More specific experiments must be performed to better explore these results. Androsterone sulfate is a constituent of the sulfated sterol fraction of the human blood and the most abundant 5 $\alpha$ -androgen (DURY et al., 2015; MITAMURA et al., 2005). It has been suggested that the combined levels of androsterone sulfate and epiandrosterone sulfate (EpiA-S) could be one of the markers of the 5 $\alpha$ -reductase activity, an enzyme related to androgen-dependent disease, such as prostate cancer (STEERS, 2001). To the best of our knowledge, this is the first time this metabolite has been implicated in CC.

Samples analyses by HPLC-MS<sup>E</sup> showed lower relative concentration of palmitic acid in plasma samples of CC patients when compared to normal control volunteers. Depletion of palmitic acid levels has been previously observed in CC plasma samples (MESSIAS et al., 2018; KONDO, 2011). Palmitic acid is a key intermediate in the biosynthesis of FA. The tumor microenvironment is extremely flexible in its metabolic demands, and tumor cells may become dependent on saturated FA uptake during oxygen restrictions and unsaturation impairment (ROHRIG & SCHULZE, 2016).

GC-FID analysis elucidated more information about FA variations according to CC stage. The results showed a reduction in the 22:6 n-3 PUFA levels in CC, suggesting that the synthesis of PUFA - and possibly its oxidation products - have a proeminent role in CC. One possible explanation is the high susceptibility of PUFAs to oxidation due the presence of multiple double bonds in them, as previously reported by our group for patients with rectal adenocarcinoma (MESSIAS et al., 2018). Lipid peroxidation with the formation of reactive compounds, such as malonaldehyde, hexanal, and 4-hydroxynonenal, lead to changes in the permeability and fluidity of the membrane lipid bilayer altering cell integrity (DIX & AIKENS, 1993) and has been described as an important determinant of cancer cell function (CARRACEDO et al., 2013; ZAYTSEVA et al., 2015). Preliminary data have also reported lower 3 PUFA content in plasma samples of CRC (OKUNO et al., 2013) and rectal adenocarcinoma patients (MESSIAS et al., 2018) as well as a decrease very-long-chain dicarboxylic acid 28:4 in plasma levels from Italian and Brazilian CRC patient cohorts (WOOD et al., 2018).

An increased relative abundance of PE (32:2) in CC samples was also observed in this study. Accordingly, an increased content of PE(34:4) was found in the tissue analysis of colon adenoma by REIMS (rapid evaporative ionization mass spectrometry) (ALEXANDER, 2017) PA, showed a dual tendency. While PAs formed by saturated FA presented an increase in their relative abundance in CC samples, those PA with unsaturated FA (20: 3 and 20:4) were lower in these samples. These findings are in good agreement with our GC analysis which showed a significant decrease in the arachidonic acid (20:4 n-6) levels, especially at III/IV cancer stages. An increase of saturated PA (34:0) was also reported in colon adenomas analyzed by REIM (ALEXANDER, 2017). This decrease in polyunsaturated PAs, namely PA (38:3) and PA (40:5) was also previously reported in CRC tissue analyzed by Mass Spectrometry Image (MSI) (ROHRIG & SCHULZE, 2016). PGs were only detected in unsaturated form and in decreased concentrations in CC patients, in agreement with what was found in colorectal tissue (ALEXANDER, 2017).

Enzymatic analysis showed a significant reduction of GNPAT concentration as well as a non-significant reduction of SCD in CC patients compared to CTR individuals. In the biosynthesis of ether lipids, the peroxisomal enzymes, GNPAT and AGPS generate 1-alkyl dihydroxyacetophosphate (1-alkylDHAP) by replacing the acyl chain of 1-acyl-DHAP with a fatty alcohol that is synthesized by fatty acyl-CoA reductase 1 (FAR1), a protein anchored in the cytoplasmic peroxisome tail (BRAVERMAN & MOSER, 2012; HONSHO et al, 2010)). Experimental evidence suggests that the rate-limiting step of ether lipids synthesis is that of fatty alcohol synthesis by FAR1 that is subject to feedback regulation by cellular plasmalogen levels which can induce FAR1 protein degradation (HONSHO et al, 2017). Those results underscore the need for more specific studies of the action of those enzymes in the altered metabolic pathways related to plasmalogen synthesis in colon cancer patients.

## 5. CONCLUSION

The UHPLC-QTOF-MS<sup>E</sup>-based untargeted lipidomic study presented here, demonstrates a remarkable differentiation between the lipid composition of plasmatic samples from CC and CTR volunteers. The alterations described here are in good agreement with previously described for other types of cancer, reinforcing the relevance of

our findings. Additionally, our prediction model based on plasmalogens of PS indicates that these ether lipids can be potential biomarkers of this neoplasia and could find some application in routine screening for colorectal neoplasia. The understanding of alterations in plasmatic lipidomic profiles and metabolic pathways involved with the arising and grown of tumors could lead to the discovery of new approaches for diagnostic, prevent or treatment of CC.

## REFERENCES

AJCC. American Joint Committee on Cancer. 8 ed. **Colon and rectum cancer staging**. 2017.

AJOUZ, H.; MUKHERJI, D.; SHAMSEDDINE, A. Secondary bile acids: an underrecognized cause of colon cancer. *World J Surg Oncol.* v. 12, p. 164, 2014. DOI: 10.1186/1477-7819-12-164.

ALEXANDER, J.; GILDEA, L.; BALOG, J.; SPELLER, A.; MCKENZIE, J.; MUIRHEAD, L.; SCOTT, A.; KONTOVOUNISIOS, C.; RASHEED, S.; TEARE, J.; HOARE, J.; VESELKOV, K.; GOLDIN, R. A novel methodology for in vivo endoscopic phenotyping of colorectal cancer based on real-time analysis of the mucosal lipidome: a prospective observational study of the iKnife. *Surg Endosc.* v. 31, n. 3, p. 1361-70, 2017. DOI: 10.1007/s00464-016-5121-5.

BANDU, R.; MOK, H. J.; KIM, K. P. Phospholipids as cancer biomarkers: Mass spectrometry-based analysis. *Mass Spectrom Rev.* v. 37, n. 2, p. 107-38, 2018. DOI: 10.1002/mas.21510.

BELORIBI-DJEFAFLIA, S. Lipid metabolic reprogramming in cancer cells. *Oncogenesis*. v. 5, p. 1-10, 2016. DOI: 10.1038/oncsis.2015.49.

BERENDSE, K.; KLOUWER, F. C.; KOOT, B. G.; KEMPER, E. M.; FERDINANDUSSE, S.; KOELFAT, K.V.; LENICE, K. M.; SCHAAP, F. G.; WATERHAM, H. R.; VAZ, F. M.; ENGELEN, M.; JANSEN, P. L.; WANDERS, R. J. Cholic acid therapy in Zellweger spectrum disorders. *J Inherit Metab Dis.* v. 39, n. 6, p. 859-68, 2016. DOI: 10.1007/s10545-016-9962-9.

BRAVERMAN, N.; MOSER, A. Functions of plasmalogen lipids in health and disease. *Biochim Biophys Acta.* v. 1822, n. 9, p. 1442-1452, 2012. DOI: 10.1016/j.bbadis.20 12.05.008.

BRAY, F.; FERLAY, J.; SOERJOMATARAM, I.; SIEGEL, R. L.; TORRE, L. A.; JEMAL, A. Global câncer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *Cancer J Clin.* v. 68, p. 394-424, 2018. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2017. 08.049.

BUTLER, L. M.; YUAN, J. M.; HUANG. JY.; SU, J.; WANG, R.; KOH, W. P.; ONG, C. N. Plasma fatty acids and risk of colon and rectal cancers in the Singapore Chinese Health Study. *NPJ Precis Oncol.* v. 1, n. 1, p. 38, 2017. DOI: 10.1038/s41698-017-0040-z.

CALA, M. P.; ALDANA, J.; MEDINA, J.; SANCHEZ, J.; GUIO, J.; WIST, J.; MEESTERS, R. J. W. Multiplatform plasma metabolic and lipid fingerprinting of breast cancer: A pilot control-case study in Colombian Hispanic women. *PLoS One.* v. 13, n. 2, p. 0190958, 2018. DOI: 10.1371/journal.pone.0190958.

CARRACEDO, A.; CANTLEY, L. C.; PANDOLFI, P. P. Cancer metabolism: fatty acid oxidation in the limelight. *Nat Rev Cancer.* v. 13, n. 4, p. 227-32, 2013. DOI: 10.1038/nrc3483.

CASADEI, B.R.; CARVALHO, P.O.; RISKE, K. A.; BARBOSA, R. M.; DE PAULA, E.; DOMINGUES, C. C. Brij detergents reveal new aspects of membrane microdomain in erythrocytes. *Mol Membr Biol.* v. 31, n. 6, p. 195-205, 2014. DOI: 10.3109/09687688.2014.949319.

CHEN, Y.; MA, Z.; SHEN, X.; LI, L.; ZHONG, J.; MIN, L. S.; XU, L.; LI, H.; ZHANG, J.; DAI, L. Serum Lipidomics Profiling to Identify Biomarkers for Non-Small Cell Lung Cancer. *Biomed Res Int*. p. 5276240, 2018. DOI: 10.1155/2018/5276240.

DAS, S. K.; HOEFLER, G. The role of triglyceride lipases in cancer associated cachexia. *Trends Mol Med*. v. 19, n. 5, p. 292-301, 2013. DOI: 10.1016/j.molmed.2013.02.006.

DE, M.; GHOSH, S.; SEN, T.; SHADAB, M.; BANERJEE, I.; BASU, S.; ALI, N. A Novel Therapeutic Strategy for Cancer Using Phosphatidylserine Targeting Stearylamine-Bearing Cationic Liposomes. *Mol Ther Nucleic Acids.* v. 10, p. 9-27, 2017. DOI: 10.1016/j.omtn.2017. 10.019.

DEAN, J. M.; LODHI, I. J. Structural and functional roles of ether lipids. *Protein & Cell*. v. 9, n. 2, p. 196-206, 2018. DOI: 10.1007/s13238-017-0423-5.

DIX, T. A.; AIKENS, J. Mechanisms and biological relevance of lipid peroxidation initiation. *Chem Res Toxicol.* v. 6, n. 1, p. 2-18, 1993. DOI: 10.1021/tx00031a001.

DURY, A. Y.; KE, Y.; GONTHIER, R.; ISABELLE, M.; SIMARD, J. N.; LABRIE, F. Validated LC-MS/MS simultaneous assay of five sex steroid/neurosteroid-related sulfates in human serum. *J. Steroid Biochem Mol Biol.* v. 149, p. 1-10, 2015. DOI: 10.1016/j.jsbmb.2015.01.006.

DUSCHARLA, D.; BHUMIREDDY, S. R.; LAKSHETTI, S.; POSPISIL, H.; MURTHY, P. V.; WALTHER, R.; SPRIPADI, P.; UMMANNI, R. Prostate Cancer Associated Lipid Signatures in Serum Studied by ESI-Tandem Mass Spectrometryas Potential New Biomarkers. *PLOS One.* v. 11, n. 3, p. 0150253, 2016. DOI: 10.1371/journal.pone.0150253.

FOLCH, H.; LESS, M.; STANLEY, H. A. A simple method for isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J Biol Chem.* v. 226, p. 497-499, 1957. DOI: 10.1371/journal.pone.0020510.

GADALETA, R. M.; GARCIA-IRIGOYEN, O.; MOSCHETTA, A. Bile acids and colon cancer: Is FXR the solution of the conundrum? *Mol Aspects Med* . v. 56, p. 66-74, 2017. DOI: 10.1016/j.mam.2017.04.002.

GEIJSEN, A.; BREZINA, S.; KESKI-RAHKONEN, P.; BAIERL A, B. T.; BERGMANN, M. M.; BOEHM, J.; BRENNER, H.; CHANG-CLAUDE, J.; VAN DUIJNHOVEN, F. J. B.; GIGIC, B.;, GUMPENBERGER, T.; HOFER, P.; HOFFMEISTER, M. Plasma metabolites associated with colorectal cancer: A discovery-replication strategy. *Int J Cancer.* v. 145, n. 5, p. 1221-31, 2019. DOI: 10.1002/ijc.32146.

GHOSH, A.; NISHTALA, K. Biofluid lipidome: a source for potential diagnostic biomarkers. *Clin Transl Med.* v. 6, n. 1, p. 22, 2017. DOI: 10.1186/s40169-017-0152-7.

GLADE, M. J.; SMITH, K. Phosphatidylserine and the human brain. *Nutrition*. 2015;31(6):781-6. DOI: 10.1016/j.nut.2014.10.014.

HONSHO, M.; ASAOKU, S.; FUJIKI, Y. Posttranslational regulation of fatty acyl- CoA reductase 1, Far1, controls ether glycerophospholipid synthesis. *J Biol Chem.* v. 285, n. 12, p. 8537-8542, 2010. DOI: 10.1074/jbc.M109.083311.

HONSHO, M.; ABE, Y.; FUJIKI, Y. Plasmalogen biosynthesis is spatiotemporally regulated by sensing plasmalogens in the inner leaflet of plasma membranes. *Sci Rep.* v. 7, n.1, p. 1-14, 2017. DOI:10.1038/srep43936.

HYOTYLAINEN, T.; ORESIC, M. Bioanalytical techniques in nontargeted clinical lipidomics. *Bioanalysis.* v. 8, n. 4, p. 351-64, 2016. DOI: 10.4155/bio.15.244.

INADOMI, J. M. Screening for Colorectal Neoplasia. *N Engl J Med.* v. 376, n. 2, p. 149-56, 2017. DOI: 10.1056/NEJMcp1512286.

JAFFRES, P. A.; GAJATE, C.; BOUCHET, A. M.; COUTHON-GOURVES, H.; CHANTOME, A.; POTIER-CARTEREAU, M.; BESSON, P.; BOUGNOUX, P.; MOLLINEDO, F.; VANDIER, C. Alkyl ether lipids, ion channels and lipid raft reorganization in cancer therapy. *Pharmacol Therapeut.* v. 165, p. 114-131, 2016. DOI: 10.1016/j.pharmthera.2016.06.003.

KNITTELFELDER, O. L.; WEBERHOFER, B. P.; EICHMANN, T. O.; KOHLWEIN, S. D.; RECHBERGER, G. N. A versatile ultra-high performance LC-MS method for lipid profiling. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. p. 951-952:119-28, 2014. DOI: 10.1016/j.jchromb.2014.01.011.

KONDO, Y.; NISHIUMI, S.; SHINOHARA, M.; HATANO, N.; IKEDA, A.; YOSHIE, T.; KOBAYASHI, T.; SHIOMI, Y.; IRINO, Y.; TAKENAWA, T.; AZUMA, T.; YOSHIDA, M. Serum fatty acid profiling of colorectal cancer by gas chromatography/mass spectrometry. *Biomark Med.* v. 5, n. 4, p. 451-60, 2011. DOI: 10.2217/bmm.11.41.

KOSITSAWAT, J.; FLANIGAN, R. C.; MEYDANI, M.; CHOI, Y. K.; FREEMAN, V. L. The ratio of oleic-to-stearic acid in the prostate predicts biochemical failure after radical prostatectomy for localized prostate cancer. *J Urol*. v. 178, n. 6, p. 2391-6, 2007. DOI: 10.1016/j.juro.2007. 08.005.

LI, F.; QIN, X.; CHEN, H.; QIU, L.; GUO, Y.; LIU, H.; CHEN, G.; SONG, G.; WANG, X.; LI, F.; GUO, S.; WANG, B.; LI, Z. Lipid profiling for early diagnosis and progression of colorectal cancer using direct-infusion electrospray ionization Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry. *Rapid Commun Mass.* v. 27, n. 1, p. 24-34, 2013. DOI: 10.1002/rcm.6420.

LOPEZ, D. H.; BESTARD-ESCALAS, J.; GARATE, J.; MAIMÓ-BARCELÓ, A.; FERNÁNDEZ, R.; REIGADA, R.; KHORRAMI, S.; GINARD, D.; OKAZAKI, T.; FERNÁNDEZ J. A.; BARCELÓ-COBLIJN, G. Tissue-selective alteration of ethanolamine plasmalogen metabolism in dedifferentiated colon mucosa. *Biochimi Biophysi Acta.* v. 1863, n. 8, p. 928-938, 2018. DOI: 10.1016/j.bbalip.2018.04.017.

LV J, LV CQ, XU L, YANG H. Plasma Content Variation and Correlation of Plasmalogen and GIS, TC, and TPL in Gastric Carcinoma Patients: A Comparative Study. *Med Sci Monit Basic Res.* v. 21, p. 157-160, 2015. DOI: 10.12659/MSMBR.893908.

MESSIAS, M. C. F.; MECATTI, G. C.; ANGOLINI, C. EBERLIN, M. N.; CREDIDIO, L.; MARTINEZ, C. A. R.; COY, C. S. R.; CARVALHO, P. O. Plasma lipidomic signature of rectal adenocarcinoma reveals potential biomarkers. *Front Oncol.* V. 7, n. 325, p. 1-9, 2018. DOI: 0.3389/fonc.2017.00325.

MITAMURA, K.; SETAKA, M.; SHIMADA, K.; HONMA, S.; NAMIKI, M.; KOH, E.; MIZOKAMI, A. Determination of sulfates of androsterone and epiandrosterone in human serum using isotope diluted liquid chromatography-electrospray ionization-mass spectrometry. *Biomed Chromatogr.* v. 19, n. 10, p. 796-801, 2005. DOI: 10.1002/bmc.522.

NGUYEN, A.; RUDGE, S.; ZHANG, Q.; WAKELAM, M. J. O. Using lipidomics analysis to determine signalling and metabolic changes in cells. *Curr Opin Biotechnol.* v. 43, p. 96-103, 2017. DOI: 10.1016/j.copbio.2016.10.003.

OKUNO, M.; HAMAZAKI, K.; OGURA, T.; KITADE, H.; MATSUURA, T.; YOSHIDA, R.; HIJIKAWA, T.; KWON, M.; ARITA, S.; ITOMURA, M.; HAMAZAKI, T.; TAKADA, H. Abnormalities in Fatty Acids in Plasma, Erythrocytes and Adipose Tissue in Japanese Patients with Colorectal Cancer. *In Vivo*. v. 27, n. 2, p. 7, 2013. DOI:

ORANGIO, G. R. The Economics of Colon Cancer. *Surg Oncol Clin N Am.* v. 27, n. 2, p. 327-47, 2018.

PAKIET, A.; KOBIELA, J.; STEPNOWSKI, P.; SLEDZINSKI, T.; MIKA, A. Changes in lipids composition and metabolism in colorectal cancer: a review. *Lipids Health Dis.* v. 18, n. 1, p. 29, 2019. DOI: 10.1186/s12944-019-0977-8.

PERROTTI, F.; ROSA, C.; CICALINI, I.; SACCHETTA, P.; DEL BOCCIO, P.; GENOVESI, D.; PIERAGOSTINO, D. Advances in Lipidomics for Cancer Biomarkers Discovery. *Int J Mol Sci.* v. 17, n. 12, 2016. DOI: 10.3390/ijms17121992.

PERTTULA, K.; SCHIFFMAN, C.; EDMANDS, W. M. B.; PETRICK, L.; GRIGORYAN, H.; CAI, X.; GUNTER, M. J.; NACCARATI, A.; POLIDORO, S.; DUDOIT, S.; VINEIS, P.; RAPPAPORT, S. M. Untargeted lipidomic features associated with colorectal cancer in a prospective cohort. *BMC Cancer.* v. 18, n. 1, p. 996, 2018. DOI: 10.1186/s12885-018-4894-4.

QUEHENBERGER, O.; DENNIS, E. A. The human plasma lipidome. *N Engl J Med.* v. 365, n. 19, p. 1812-23, 2011. DOI: 10.1056/NEJMra1104901.

RÖHRIG, F.; SCHULZE, A. The multifaceted roles of fatty acid synthesis in cancer. *Nature Reviews.* p. 1-18, 2016. DOI: 10.1038/nrc.2016.89.

SHARMA, B.; KANWAR, S. S. Phosphatidylserine: a cancer cell targeting biomarker. *Semin Cancer Biol.* v. 52, p. 17-25, 2018. DOI: 10.1016/j.semcancer.2017.08.012.

SIMON, K. Colorectal cancer development and advances in screening. *Clin Interv Aging*. v. 11, p. 967-76, 2016. DOI: 10.2147/CIA.S109285.

SNYDER, F.; CRESS, E. A.; STEPHENS, N. An unidentified lipid prevalent in tumors. *Lipids.* v. 1, n. 6, p. 7, 1966. DOI: 10.1007/BF02532540.

SNYDER, F.; WOOD, R. Alkyl and alk-1-enyl ethers of glycerol in lipids from normal and neoplastic human tissues. *Cancer Res.* v. 29, n. 1, p. 251–257, 1969.

STEERS, W. D. 5α-reductase activity in the prostate. *Urology*. v. 58, n. 6, p. 17-24, 2001. DOI: 10.1016/s0090-4295(01)01299-7.

THOMAS, A. M.; MANGHI, P.; ASNICAR, F.; PASOLLI, E.; ARMANINI, F.; ZOLFO, M.; BEGHINI, F.; MANARA, S,.; KARCHER, N.; POZZI, C.; GANDINI, S.; SERRANO, D.; TARALLO, S. Metagenomic analysis of colorectal cancer datasets identifies cross-cohort microbial diagnostic signatures and a link with choline degradation. *Nat Med.* v. 25, n. 4, p. 667-78, 2019. DOI: 10.1038/s41591-019-0405-7.

TISDALE, M. J. Mechanisms of cancer cachexia. *Physiol. Rev.* v. 89, p. 381–410, 2009. DOI: 10.1152/physrev.00016.2008.

VALLABHAPURAPU, S. D.; BLANCO, V. M.; SULAIMAN, M. K.; VALLABHAPURAPU, S. L.; CHU, Z.; FRANCO, R. S.; QI, X. Variation in human cancer cell external phosphatidylserine is regulated by flippase activity and intracellular calcium. *Oncotarget.* v. 6, p. 34375-34388, 2015.DOI: 10.18632/oncotarget.6045.

VAN DER SIJP, M. P.; BASTIAANNET, E.; MESKER, W. E.; VAN DER GEEST, L. G.; BREUGOM, A. J.; STEUP, W. H.; MARINELLI, A. W.; TSENG, L. N.; TOLLENAAR, R. A.; VAN DE VELDE, C. J.; DEKKER, J. W. Differences between colon and rectal cancer in complications, short-term survival and recurrences. *Int J Colorectal Dis.* v. 31, n. 10, p.1683-91, 2016. DOI: 10.1007/s00384-016-2633-3.

VOORNEVELD, P. W.; REIMERS, M. S.; BASTIAANNET, E.; JACOBS, R. J.; VAN EIJK, R.; ZANDERS, M. M. J.; HERINGS, R. M. C.; VAN HERK-SUKEL, M. P. P.; KODACH, L.L.; VAN WEZEL, T.; KUPPEN, P. J. K.; MORREAU, H.; VAN DE VELDE, C. J. H. Statin Use After Diagnosis of Colon Cancer and Patient Survival. *Gastroenterology*. v. 153, n. 2, p. 470-479, 2017. DOI: 10.1053/j.gastro.2017.05.011.

WANDERS, R. J. A.; SCHUTGENS, R. B. H.; HEYMANS, H. S. A. Deficient cholesterol side chain oxidation in patients without peroxisomes (Zellweger syndrome): evidence for the involvement of peroxisomes in bile acid synthesis in man. *Clin Chim Acta.* v. 162, n. 3, p. 295-301, 1987. DOI: 10.1016/0009-8981(87)90048-9.

WOOD, P.L.; DONOHUE. M. M.; CEBAK, J. E.; BECKMANN, T. G.; MESSIAS, M.C. F.; CREDIDIO, L,.; COY, C.S. R.; CARVALHO, P. O.; CROTTI, S.; D'ARONCO, S.; URSO, E. D. L.; AGOSTINI, M. Reduced Plasma Levels of Very-Long-Chain Dicarboxylic Acid 28:4 in Italian and Brazilian Colorectal Cancer Patient Cohorts. *Metabolites.* v. 8, n. 4, 2018. DOI: 10.3390/metabo8040091.
YANG, K.; HAN, X. Lipidomics: Techniques, Applications, and Outcomes Related to Biomedical Sciences. *Trends Biochem Sci.* v. 41, n. 11, p. 954-69, 2016. DOI: 10.1016/j.tibs.2016.08.010.

ZAYTSEVA, Y. Y.; HARRIS, J. W.; MITOV, M. I.; KIM, J. T.; BUTTERFIELD, D. A.; LEE, E. Y.; WEISS, H. L.; GAO, T.; EVERS, B. M. Increased expression of fatty acid synthase provides a survival advantage to colorectal cancer cells via upregulation of cellular respiration. *Oncotarget*. v. 6, v. 22, p. 18891-904, 2015. DOI: 10.18632/oncotarget.3783.

ZHANG, Z. Y.; ZHENG, S. H.; YANG, W. G.; YANG, C.; YUAN, W. T. Targeting colon cancer stem cells with novel blood cholesterol drug pitavastatin. *Eur Rev Med Pharmaco*. v. 21, n. 6, p. 8, 2017. DOI: 10.1007/978-1-4614-0809-3\_10.

ZHAO, Z.; XIAO, Y.; ELSON, P.; TAN, H.,; PLUMMER, S. J.; BERK, M.; AUNG, P. P.; LAVERY, I. C.; ACHKAR, J. P.; LI, L.; CASEY, G.; XU, Y. Plasma lysophosphatidylcholine levels: potential biomarkers for colorectal cancer. *Am J Clin Oncol.* v. 25, n. 19, p. 2696-701, 2007. DOI: 10.1200/JCO.2006.08.5571.

ZHAO, Y. Y.; LIN, R. C. UPLC-MS(E) application in disease biomarker discovery: the discoveries in proteomics to metabolomics. *Chem Biol Interact.* v. 215, p. 7-16, 2014. DOI: 10.1016/j.cbi.2014.02.014.

ZHENG, N.; WANG, X.; WANG, Y.; XU, G.; ZHANG, H.; DAI, W.; ZHANG, Q.; JI, J.; WANG, X. A sensitive liquid chromatography/electrospray tandem mass spectroscopy method for simultaneous quantification of a disulfide bond doxorubicin conjugation prodrug and activated doxorubicin: Application to cellular pharmacokinetic and catabolism studies. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. p. 1065-1066:96-103, 2017. DOI: 10.1016/j.jchromb.2017.09.035.

# **ANEXOS**

# Anexo 1: Capítulo II – E-mail de autorização da revista Lipids in Health and Disease



MSc. Marcia Cristina Fernandes Messias Pharmacist - Doctoral Student in Health sciences Laboratory of Multidisciplinary Research Sao Francisco University - Braganca Paulista - Brazil +55 (11) 2454 - 8076 ORCID: http://orcid.org/0000-0003-3214-5776

# Anexo 2: Capítulo II - Artigo Publicado

Messias et al. Lipids in Health and Disease (2018) 17:41 https://doi.org/10.1186/s12944-018-0685-9

Lipids in Health and Disease

(CrossMark

# Plasmalogen lipids: functional mechanism and their involvement in gastrointestinal cancer

Márcia Cristina Fernandes Messias, Giovana Colozza Mecatti, Denise Gonçalves Priolli and Patrícia de Oliveira Carvalho

#### Abstract

The plasmalogens are a class of glycerophospholipids which contain a vinyl-ether and an ester bond at the sn-1 and sn-2 positions, respectively, in the glycerol backbone. They constitute 10 mol% of the total mass of phospholipids in humans, mainly as membrane structure components. Plasmalogens are important for the organization and stability of lipid raft microdomains and cholesterol-rich membrane regions involved in cellular signaling. In addition to their structural roles, a subset of ether lipids are thought to function as endogenous antioxidants and emerging studies suggest that they are involved in cell differentiation and signaling pathways. Although the clinical significance of plasmalogens is linked to peroxisomal disorders, the pathophysiological roles and their possible metabolic pathways are not fully understood since they present unique structural attributes for the different tissue types. Studies suggest that changes in plasmalogen metabolism may contribute to the development of various types of cancer. Here, we review the molecular characteristics of plasmalogens in order to significantly increase our understanding of the plasmalogen molecule and its involvement in gastrointestinal cancers as well as other types of cancers.

Keywords: Plasmalogen, Cancer, Lipidomic, Biomarker

#### Background

Lipids, especially phospholipids (PL), are extremely diverse molecules and act as regulators of various cellular functions such as homeostasis, cell adhesion and migration, neurotransmission, signal transduction, vesicular trafficking, apoptosis and post-translational modification [1]. Among the lipids, the categories that have the most important roles in the membrane structure are glycerophospholipids (GPL), sphingolipids, sterols and triglycerides [2]. Several studies have shown that the interruption of lipid metabolism is related to the onset and severe progression of some types of human cancers [3]. Recent discoveries in the modulation of essential lipid enzymes, signaling lipid molecules and global lipid metabolism alteration in aggressive progression of cancer have fundamentally expanded our perception of lipid metabolism and its impact on tumor etiology. Rewiring

\* Correspondence: marcia\_cfmessias@hotmail.com; patricia.carvalho@usf.edu.br

Laboratory of Multidisciplinary Research, São Francisco University, USF, São Francisco de Assis Avenue, 218, Bragança Paulista, SP 12916-900, Brazil

**BioMed** Central

of metabolic programs, such as aerobic glycolysis and increased glutamine metabolism, are crucial for cancer cells to shed from a primary tumor, overcome the nutrient and energy deficit, and eventually survive and form metastases [4].

Biomarkers can be employed for (early stage) diagnosis of cancer, prognosis (assessing lethality) and prediction 117 (of patient's response to treatment). Some PL have been described in the literature as potential biomarkers for cancer, among them the plasmalogens, a subclass of GPL [5, 6]. Plasmalogens were discovered accidentally in 1924 by Feulgen and Voit [7] while staining sections of tissue with a nuclear dye that reacted with the aldehydes released by DNA acid hydrolysis [8]. Structurally plasmalogens exhibit a vinyl ether at the sn-1 position of glycerol, play several roles in cellular function and are an important component of the cellular plasma membrane [9]. Although the mechanisms of action for plasmalogens remain unclear, they are starting to receive medical interest as they are now being linked to Alzheimer's disease, Down syndrome, molecular signaling abnormalities

© The Author(s). 2018 Open Access This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (ht is.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and International Decision (http://teatrecommons.cog/necessory/act, which permits direstructor dec, userouter, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.

# Anexo 3: Capítulo II – Contrato de Licença da BMC

#### BMC License agreement

In submitting an article to any of the journals published by BMC I certify that;

1. I am authorized by my co-authors to enter into these arrangements.

2. I warrant, on behalf of myself and my co-authors, that:

- the article is original, has not been formally published in any other peer-reviewed journal, is not under consideration by any other journal and does not infringe any existing copyright or any other third party rights;
- I am/we are the sole author(s) of the article and have full authority to enter into this agreement and in granting rights to BMC are not in breach of any other obligation;
- the article contains nothing that is unlawful, libellous, or which would, if published, constitute a breach of contract or of confidence or of commitment given to secrecy;
- I/we have taken due care to ensure the integrity of the article. To my/our and currently
  accepted scientific knowledge all statements contained in it purporting to be facts are true
  and any formula or instruction contained in the article will not, if followed accurately, cause any
  injury, illness or damage to the user.

3. I, and all co-authors, agree that the article, if editorially accepted for publication, shall be licensed under the Creative Commons Attribution License 4.0. In line with BMC's Open Data Policy, data included in the article shall be made available under the Creative Commons 1.0 Public Domain Dedication waiver, unless otherwise stated. If the law requires that the article be published in the public domain, I/we will notify BMC at the time of submission, and in such cases not only the data but also the article shall be released under the Creative Commons 1.0 Public Domain Dedication waiver. For the avoidance of doubt it is stated that sections 1 and 2 of this license agreement shall apply and prevail regardless of whether the article is published under Creative Commons Attribution License 4.0 or the Creative Commons 1.0 Public Domain Dedication waiver.

[End of BMC's license agreement]

# Explanatory notes regarding BMC's license agreement

As an aid to our authors, the following paragraphs provide some brief explanations concerning the Creative Commons licenses that apply to the articles published in BMC-published journals and the rationale for why we have chosen these licenses.

The Creative Commons Attribution License (CC BY), of which CC BY 4.0 is the most recent version, was developed to facilitate open access as defined in the founding documents of the movement, such as the 2003 Berlin Declaration. Open access content has to be freely available

online, and through licensing their work under CC BY authors grant users the right to unrestricted dissemination and re-use of the work, with only the one proviso that proper attribution is given to authors. This liberal licensing is best suited to facilitate the transfer and growth of scientific knowledge. The Open Access Scholarly Publishers Association (OASPA) therefore strongly recommends the use of CC BY for the open access publication of research literature, and many research funders worldwide either recommend or mandate that research they have supported be published under CC BY. Examples for such policies include funders as diverse as the Wellcome Trust, the Australian Governments, the European Commission's Horizon 2020 framework programme, or the Bill & Melinda Gates Foundation.

The default use of the Creative Commons 1.0 Public Domain Dedication waiver (CC0 or CC zero) for data published within articles follows the same logic, facilitating maximum benefit and the widest possible re-use of knowledge. It is also the case that in some jurisdictions copyright does not apply to data. CC0 waives all potential copyrights, to the extent legally possible, as well as the attribution requirement. The waiver applies to data, not to the presentation of data. If, for instance, a table or figure displaying research data is reproduced, CC BY and the requirement to attribute applies. Increasingly, however, new insights are possible through the use of big data techniques, such as data mining, that harness the entire corpus of digital data. In such cases attribution is often technically infeasible due to the sheer mass of the data mined, making CC0 the most suitable licensing tool for research outputs generated from such innovative techniques.

It is important to differentiate between legal requirements and community norms. It is first and foremost a community norm, not a law, that within the scientific community attribution mostly takes the form of citation. It is also a community norm that researchers are expected to refer to their sources, which usually takes the form of citation. Across all cases of research reuse (including data, code, etc), community norms will apply as is appropriate for the situation: researchers will cite their sources where it is feasible, regardless of the applicable license. CC0 therefore covers those instances that lie beyond long-established community norms. The overall effect, then, of CC0 for data is to enable further use, without any loss of citations. For further explanation, we recommend you refer to our Open Data page.

In the following, we provide the licenses' summaries as they can be found on the Creative Commons website.

The Creative Commons Attribution License 4.0 provides the following summary (where 'you' equals 'the user'):

# You are free to:

- Share copy and redistribute the material in any medium or format.
- Adapt remix, transform, and build upon the material for any purpose, even commercially. The licensor cannot revoke these freedoms as long as you follow the license terms.

# Under the following terms:

- Attribution— you must give appropriate credit, provide a link to the license, and indicate if changes were made. You may do so in any reasonable manner, but not in any way that suggests the licensor endorses you or your use.
- No additional restrictions—you may not apply legal terms or technological measures that legally restrict others from doing anything the license permits.

# Notices

You do not have to comply with the license for elements of the material in the public domain or where your use is permitted by an applicable exception or limitation.

No warranties are given. The license may not give you all of the permissions necessary for your intended use. For example, other rights such as publicity, privacy, or moral rights may limit how you use the material.

Please note: For the terms set in italics in the summary above further details are provided on the Creative Commons web page from which the summary is taken (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

The Creative Commons 1.0 Public Domain Dedication waiver provides the following summary:

# No copyright

The person who associated a work with this deed has dedicated the work to the public domain by waiving all of his or her rights to the work worldwide under copyright law, including all related and neighbouring rights, to the extent allowed by law.

You can copy, modify, distribute and perform the work, even for commercial purposes, all without asking permission. See Other information below.

# Other information

- In no way are the patent or trademark rights of any person affected by CC0, nor are the rights that other persons may have in the work or in how the work is used, such as publicity or privacy rights.
- Unless expressly stated otherwise, the person who associated a work with this deed makes no warranties about the work, and disclaims liability for all uses of the work, to the fullest extent permitted by applicable law.

 When using or citing the work, you should not imply endorsement by the author or the affirmer. Please note: for the terms set in italics in the summary above further details are provided on the Creative Commons web page from which the summary is taken (http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1). Anexo 4: Capítulo III - Parecer do comitê de ética e pesquisa da Universidade São Francisco - Bragança Paulista



Pesquisador: Patricia de Oliveira Carvalho Área Temática: Versão: 1

CAAE: 14958819.8.0000.5514

Instituição Proponente: Universidade São Francisco-SP Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.401.124

### Apresentação do Projeto:

A abordagem atual usada para o adenocarcinoma de reto implica em um tratamento neoadjuvante com quimioradioterapia (QRT) associado com a cirurgia de excisão total do mesorreto. Entretanto, os pacientes respondem de maneiras variadas a esta terapia, não se conhecendo completamente os mecanismos envolvidos nesta resposta. Neste projeto, em continuidade aos estudos realizados por nosso grupo, pretende-se estudar as bases bioquímicas-moleculares envolvidas nas alterações do lipidoma do plasma de pacientes com câncer de reto e avaliar o efeito da resposta à terapia neoadjuvante a partir de uma assinatura molecular do plasma em pacientes resistentes ao tratamento. Serão utilizadas amostras de sangue de pacientes (n=80) atendidos no Ambulatório de Oncologia do Hospital Universitário São Francisco na Providência

e Deus (Bragança Paulista, SP), coletadas em dois tempos (antes e após a QRT neoadjuvante). Cromatografia e espectrometria de massas serão usadas para a caracterização dos lipídeos e medidas bioquímicas e moleculares (ELISA e Western Blotting) para a quantificação dos produtos de oxidação e da expressão de enzimas relacionados ao metabolismo de lipídeos. O estudo da lipidômica deve colaborar para um melhor entendimento da fisiopatologia do câncer de reto, relacionando uma assinatura característica, capaz de caracterizar a presença e também o comportamento do câncer de reto frente a terapia neoadjuvante.

Endereco:	Av. São Francisco d	e Assis, 218, sala 35, prédic	central		
Bairro: C	idade Universitária	CEP:	12.916-900		
UF: SP	Município:	BRAGANCA PAULISTA			
Telefone:	(11)2454-8981		E-mail:	comiteetica@usf.edu.br	

Página 01 de 03





Continuação do Parecer: 3.401.124

#### Objetivo da Pesquisa:

Avaliar as bases bioquímicas-moleculares envolvidas nas alterações do lipidoma de pacientes com adenocarcinoma de reto e o efeito da resposta a quimioradioterapia (QRT) neoadjuvante a partir de uma assinatura molecular do plasma em pacientes resistentes ao tratamento.

#### Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os responsáveis relatam que pode ocorrer, durante ou após a realização da punção venosa no ato da coleta de sangue um pequeno hematoma no qual poderá ser usado compressas frias para atenuar se houver dor. Quanto aos benefícios nada foi relatado.

#### Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de um estudo observacional e analítico onde serão recrutados 80 voluntários acima de 18 anos de ambos os sexos. As análises serão feitas de forma comparativa entre os grupos utilizando o website Metabo Analyst para as análises dos conjuntos de dados. Primeiramente serão feitas dois métodos de análise multifatorial: a análise do componente principal (PCA) e a análise discriminatória parcial dos quadrados mínimos (PLS-DA), de acordo com os resultados obtidos, serão feitos testes de análise de variância (ANOVA) e, quando necessário, o teste t ou teste de Fisher. A importância da variável na projeção (VIP) será utilizada para identificar os íons que tiveram maior efeito discriminatório entre os grupos em cada comparação. Após a estatística, os íons serão identificados no banco de dados online, através do m/z detectado pelo equipamento.

#### Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

A documentação e o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) atendem as normas do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP).

#### Recomendações:

Este CEP recomenda que no tópico "tipo de estudo" seja adicionado o carates de avaliação analítica e não apenas observacional.

### Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não foram observados óbices éticos.

# Considerações Finais a critério do CEP:

APÓS DISCUSSÃO EM REUNIÃO DO DIA 13/06/2019, O COLEGIADO DELIBEROU PELA APROVAÇÃO DO PROJETO DE PESQUISAS. APÓS A CONCLUSÃO DO PROJETO É OBRIGATÓRIO O ENVIO DO RELATÓRIO FINAL PARA ENCERRAMENTO DO PROJETO.

 Endereço:
 Av. São Francisco de Assis. 218. sala 35. prédio central

 Bairro:
 Cidade Universitária
 CEP: 12.916-900

 UF:
 SP
 Município:
 BRAGANCA PAULISTA

 Telefone:
 (11)2454-8981
 E-mail: comiteetica@usf.edu.br





Continuação do Parecer: 3.401.124

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_P ROJETO_1369430 pdf	03/06/2019 14:11:40		Aceito
Folha de Rosto	folhaderosto.pdf	03/06/2019 14:09:08	Patricia de Oliveira Carvalho	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.pdf	01/06/2019 10:57:59	Patricia de Oliveira Carvalho	Aceito
Outros	Carta_autoriz_assinada.pdf	01/06/2019 10:53:40	Patricia de Oliveira Carvalho	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Termo_compromisso.pdf	01/06/2019 10:52:27	Patricia de Oliveira Carvalho	Aceito
Declaração de Pesquisadores	termo_confidencialidade.pdf	01/06/2019 10:52:11	Patricia de Oliveira Carvalho	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura	Projeto_descritivo.pdf	01/06/2019 10:51:22	Patricia de Oliveira Carvalho	Aceito

Situação do Parecer: Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP: Não

BRAGANCA PAULISTA, 19 de Junho de 2019

Assinado por: Mário Angelo Claudino (Coordenador(a))

 Endereço:
 Av. São Francisco de Assis. 218. sala 35. prédio central

 Bairro:
 Cidade Universitária
 CEP: 12.916-900

 UF:
 SP
 Municipio:
 BRAGANCA PAULISTA

 Telefone:
 (11)2454-8981
 E-mail:
 comiteetica@usf.edu.br

Anexo 5: Capítulo IV - Parecer do comitê de ética e pesquisa da Universidade São Francisco - Bragança Paulista



#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Investigação de potenciais biomarcadores avaliados em sangue humano usando a estratégia lipidômica Pesquisador: Giovana Colozza Mecatti

Área Temática: Versão: 1 CAAE: 57114716.8.1001.5514 Instituição Proponente: ASSOCIACAO LAR SAO FRANCISCO DE ASSIS NA PROVIDENCIA DE DEUS Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

### DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.617.254

### Apresentação do Projeto:

No presente trabalho é proposta uma avaliação sistemática (quali e quantitativa) e ampla de lípides contidos em amostras de sangue (plasma e eritrócitos) de voluntários saudáveis e doentes com o objetivo de identificar potenciais biomarcadores para diferentes patologias. Trata-se de um estudo multicêntrico para a identificação de

biomarcadores com foco nas desordens cognitivas, psiquiátricas e em oncologia. As amostras de sangue dos voluntários adultos saudáveis (n=100)

serão fornecidas pela UNIFAG (Unidade Integrada de Farmacologia e Gastroenterologia – Universidade São Francisco) e dos doentes (n=500) coletadas em pacientes atendidos nos ambulatórios do HUSF (Hospital Universitário São Francisco na Providência de Deus) e no Serviço de Psiquiatria (Hospital DIA -USF). Também serão usadas amostras de sangue coletadas em outros centros de pesquisa previamente aprovados pelo

CEP da instituição participante. Será empregada a estratégia lipidômica, onde o conjunto de lípides contidos nas amostras será caracterizado a

partir de análises cromatográficas e por espectrometria de massas de alta resolução e, então, os lipídeos diferenciais serão indicados por meio de ferramentas estatísticas multivariadas. A abordagem lipidômica será de fundamental importância na descoberta de biomarcadores, bem





Continuação do Parecer: 1.617.254

como na compreensão das bases moleculares das patologias de interesse.

#### Objetivo da Pesquisa:

Avaliação sistemática (quali e quantitative) de lipídeos contidos em amostras de sangue (plasma e eritrócitos) de indivíduos saudáveis e de

pacientes com diferentes

# Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os riscos estão relacionados a punção venosa para coleta de amostras para a análise (hematomas, dor no local da punção).Não haverá benefícios para os sujeitos da pesquisa. Entretanto se encontrado biomarcador relacionado as patologias estudadas o diagnóstico

dessas doenças poderá ser feita mais precocemente, permitindo rápida intervenção e melhoria da assistência.

#### Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Pesquisa pertinente

### Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os documentos foram devidamente apresentados.

# Recomendações:

Inserir o endereço completo do CEP no termo de consentimento

#### Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Aprovado

# Considerações Finais a critério do CEP:

APÓS DISCUSSÃO EM REUNIÃO DO DIA 30/06/2016, O COLEGIADO DELIBEROU PELA APROVAÇÃO DO PROJETO DE PESQUISAS.

#### Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_P ROJETO 667420.pdf	16/06/2016 14:46:03		Aceito
Folha de Rosto	Folhaderosto.pdf	16/06/2016 14:43:28	Giovana Colozza Mecatti	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto.pdf	13/06/2016 14:46:13	Giovana Colozza Mecatti	Aceito

Endereço: SAO FRANCISCO DE ASSIS 218						
Bairro:	JARDIM SAO JOSE	CEP:	12.916-900			
UF: SP	Município:	BRAGANCA PAULISTA				
Telefone	: (11)2454-8981	Fax: (11)4034-1825	E-mail:	comite.etica@saofrancisco.edu.br		





Continuação do Parecer: 1.617.254

TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.docx	13/06/2016 14:34:59	Giovana Colozza Mecatti	Aceito
Declaração de Pesquisadores	ABC.pdf	13/06/2016 14:31:42	Giovana Colozza Mecatti	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Gastrocentro.jpg	13/06/2016 14:31:14	Giovana Colozza Mecatti	Aceito
Outros	neurologia.pdf	22/02/2016 22:43:53	Giovana Colozza Mecatti	Aceito
Outros	hospitaldia.pdf	22/02/2016 22:41:16	Giovana Colozza Mecatti	Aceito
Outros	oncologia.pdf	22/02/2016 22:38:23	Giovana Colozza Mecatti	Aceito

Situação do Parecer: Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP: Não

BRAGANCA PAULISTA, 01 de Julho de 2016

Assinado por: Alessandra Gambero (Coordenador)

 Endereço:
 SAO FRANCISCO DE ASSIS 218

 Bairro:
 JARDIM SAO JOSE
 CEP:
 12.916-900

 UF:
 Município:
 BRAGANCA PAULISTA

 Telefone:
 (11)2454-8981
 Fax:
 (11)4034-1825

 E-mail:
 comite.etica@saofrancisco.edu.br