



Revista Colombiana de Química
ISSN: 0120-2804
ISSN: 2357-3791
rcolquim_fcbog@unal.edu.co
Universidad Nacional de Colombia
Colombia

Estudio proteómico 2DE-DIGE en plasma sanguíneo de pacientes en etapa infantil con leucemia linfoblástica aguda

Calderón-Rodríguez, Sandra Isabel; Umaña-Pérez, Adriana

Estudio proteómico 2DE-DIGE en plasma sanguíneo de pacientes en etapa infantil con leucemia linfoblástica aguda

Revista Colombiana de Química, vol. 48, núm. 1, 2019

Universidad Nacional de Colombia, Colombia

Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=309058491007>

Estudio proteómico 2DE-DIGE en plasma sanguíneo de pacientes en etapa infantil con leucemia linfoblástica aguda

2DE-DIGE proteomic study in blood plasma of patients in childhood stage with acute lymphoblastic leukemia

Estudo proteômico 2DE-DIGE no plasma sanguíneo de pacientes em estágio infantil com leucemia linfoblástica aguda

Sandra Isabel Calderón-Rodríguez
Universidad Nacional de Colombia, Colombia, Bogotá.,
Colombia
sicalderonr@unal.edu.co

Redalyc: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=309058491007>

Adriana Umaña-Pérez
Universidad Nacional de Colombia, Colombia, Bogotá.,
Colombia
yaumanap@unal.edu.co

Recepción: 27 Septiembre 2018
Aprobación: 17 Enero 2019

RESUMEN:

En Colombia, durante la última década, la leucemia linfoblástica aguda (LLA) ha causado más del 40% de las muertes por cáncer en menores de edad. Entre los factores que influyen en estas cifras, el diagnóstico tardío es uno de los factores que más afecta el éxito del tratamiento. Por lo anterior, esta investigación se centró en el estudio del proteoma plasmático de niños colombianos diagnosticados con LLA tipo B, en comparación con controles en la búsqueda de proteínas que podrían ser clasificadas como biomarcadores de diagnóstico. En vista de los avances en las herramientas proteómicas y de espectrometría de masas y teniendo en cuenta que son una alternativa para abordar la complejidad molecular de enfermedades como el cáncer, se utilizó una aproximación proteómica basada en una separación por electroforesis bidimensional diferencial (2DE-DIGE) con posterior separación por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MS) en tándem. Se encontraron ocho proteínas con expresión diferencial en plasma de pacientes con LLA-B, entre las cuales resaltan la Serotransferrina, la Alfa-1-antitripsina, la Haptoglobina, la Alfa-2-glicoproteína de zinc y el Complemento C3.

PALABRAS CLAVE: leucemia linfoblástica aguda, electroforesis bidimensional, proteómica comparativa, LC-MS/MS, proteínas de fase aguda, biomarcadores.

ABSTRACT:

In Colombia, during the last decade, acute lymphoblastic leukemia (ALL) has caused more than 40% of cancer deaths in children. Among the factors that influence these figures, late diagnosis is one of the factors that affects the treatment success. Therefore, this research focused on the plasma proteome study of Colombian children diagnosed with B-cell ALL, as compared with healthy controls in the search of proteins that could be classified as diagnostic biomarkers. Now, in view of the advances in the proteomics and mass spectrometry tools and taking into account that they are an alternative to address the molecular complexity of diseases such as cancer, a proteomic approach, based on bidimensional difference gel electrophoretic separation (2DE-DIGE) coupled to LC-MS/MS, was used. We found eight differentially expressed proteins in plasma from B-cell ALL patients as follows: Serotransferrin, Alpha-1-antitrypsin, Haptoglobin, Zinc-alpha-2-glycoprotein, and Complement C3.

KEYWORDS: acute lymphoblastic leukemia, two-dimensional electrophoresis, comparative proteomics, LC-MS/MS, acute phase proteins, biomarkers.

RESUMO:

NOTAS DE AUTOR

yaumanap@unal.edu.co

Na Colômbia, durante a última década, a leucemia linfoblástica aguda (LLA) tem sido o câncer com maior incidência, com mais de 40% das mortes por câncer em menores atribuídas a essa doença. Entre os fatores que influenciam esses números, o diagnóstico tardio talvez seja o fator mais sensível que afeta negativamente o sucesso do tratamento. Esta pesquisa enfocou o estudo do proteoma plasmático de crianças colombianas diagnosticadas com LLA tipo B, dada a sua alta incidência, em comparação com controles na busca por proteínas que poderiam ter potencialidade para serem classificadas como biomarcadores diagnósticos. Agora, em vista dos avanços nas ferramentas de proteômica e espectrometria de massa e sabendo que eles são uma alternativa para abordar a complexidade molecular de doenças como o câncer, usamos uma abordagem proteômica baseada em uma separação por eletroforese bidimensional diferencial (2DE-DIGE) com subsequente separação por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa em tandem. Encontramos 8 proteínas com expressão diferencial no plasma de pacientes com LBA, dentre os quais a Serotransferrina, a Alfa-1-antitripsina, a Haptoglobina, a Glicoproteína alfa-2-zinco e o Complemento C3.

PALAVRAS-CHAVE: leucemia linfoblástica aguda, eletroforese bidimensional, proteômica comparativa, LC-MS/MS, proteínas de fase aguda, biomarcadores.

INTRODUCCIÓN

La leucemia linfoblástica aguda es una enfermedad heterogénea caracterizada por mecanismos alterados de auto-renovación, proliferación y diferenciación en células progenitoras hematopoyéticas comprometidas con el linaje linfóide. Las células leucémicas son comúnmente conocidas como blastos y su fenotipo leucémico resulta de múltiples lesiones genéticas/epigenéticas en células progenitoras hematopoyéticas [1]. La clasificación actual de la LLA según la Organización Mundial de la Salud (OMS) se basa en la clasificación de inmunofenotipo y de marcadores citogenéticos y moleculares [2], [3]. Gracias a los avances en la comprensión de la genética molecular y la patogénesis de la enfermedad, la incorporación de la terapia adaptada al riesgo y la llegada de nuevos agentes quimioterapéuticos dirigidos, las tasas de curación y los resultados de supervivencia para los pacientes con LLA han mejorado drásticamente en las últimas décadas, principalmente en niños. En los países desarrollados se reportan tasas de supervivencia a cinco años de hasta más del 90% [4]. No obstante, en países de América Latina, las tasas de incidencia y mortalidad son muy altas [5].

En Colombia se estima que la tasa de mortalidad supera el 50% de los casos diagnosticados de LLA pediátrica [6]. Este hecho desfavorable se debe, principalmente, a barreras en el acceso a los sistemas de salud, diagnóstico incorrecto o tardío, tratamiento no oportuno o abandono del mismo, así como el impacto por múltiples traslados, demoras, instalaciones médicas inadecuadas y, en general, factores socioeconómicos bajos, lo cual impide un acceso igualitario a toda la población [7]. Por lo anterior, se hace necesario contar con un sistema de detección temprana de la enfermedad en la población colombiana, que permita realizar un tamizaje de la población y ayude a mitigar el alto impacto de la LLA en nuestro país.

El análisis proteómico ha sido una estrategia ampliamente utilizada, particularmente en la búsqueda de biomarcadores en fluidos biológicos de fácil acceso como orina, saliva, lágrimas y sangre. Esta última es una de las preferidas, debido a que transporta gran cantidad de proteínas con el potencial de considerarse biomarcadoras liberadas por órganos y tejidos alterados o enfermos o producidas en respuesta a dicha alteración [8-9].

En este trabajo se utilizó una estrategia de proteómica comparativa basada en gel con un marcaje diferencial de las proteínas con moléculas fluorescentes (*CyDyes*), lo cual permite distinguir las proteínas provenientes de muestras de plasma de pacientes frente a las de controles sanos. Se utilizó una mezcla de todas las muestras como estándar interno para comparar y normalizar los resultados [7, 10, 11]. Posteriormente, a través de la separación por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem LC-MS/MS, se buscó identificar proteínas diferencialmente expresadas.

Estos enfoques proteómicos día tras día se han convertido en una poderosa tecnología en investigación biológica y actualmente permite la caracterización del proteoma plasmático en gran profundidad [9, 12]. Los avances en las tecnologías basadas en proteómica han permitido identificar con éxito varios biomarcadores prometedores en diversos tipos de cáncer [13-15].

Para LLA solo se encuentran unos pocos estudios relacionados con la búsqueda de biomarcadores para diagnóstico temprano de la enfermedad. Saha *et al.* [16] presentaron un estudio proteómico comparativo basado en gel de linfocitos B de pacientes con LLA tipo B (LLA-B) y controles sanos e identificaron 79 proteínas reguladas diferencialmente en las células malignas. Xu *et al.* [17], mediante *shotgun proteomics*, identificaron 86 proteínas expresadas diferencialmente en muestras de médula ósea de pacientes pediátricos con LLA-B de alto riesgo versus pacientes sanos, resaltando 35 proteínas que eventualmente tendrían roles importantes en la leucomogénesis.

Así, teniendo en cuenta lo anterior, nuestra investigación estuvo dirigida a la búsqueda de proteínas alteradas en una muestra de fácil acceso como la sangre que puedan clasificarse como biomarcadores de diagnóstico o pronóstico para LLA infantil. Este enfoque no solo traería beneficios en cuanto a la facilidad de acceso a la muestra, sino que, además en etapas posteriores de investigación, podría escalar al diseño de una prueba de tamizaje que guíe el diagnóstico inicial de la enfermedad en centros de menor complejidad.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestras de pacientes

El material biológico se colectó en el Grupo de Investigación en Hormonas, bajo el proyecto Estudio exploratorio de potenciales biomarcadores en Leucemia Linfóide Aguda en Colombia. Las muestras de sangre periférica se obtuvieron de seis pacientes, de sexo masculino o femenino entre 1 y 10 años, diagnosticados con LLA-B y sin tratamiento para la enfermedad (Tabla 1). Este grupo constituye el grupo Casos: P1 a P6. Los padres de los pacientes firmaron el consentimiento informado de inclusión en el estudio, con la colaboración del centro de Hemato-oncología del Instituto Nacional de Cancerología E.S.E. y el Hospital Departamental de Villavicencio durante un periodo de dos años. El grupo Controles (C1 a C6) se compone de muestras de sangre periférica de voluntarios sanos asistentes a control pediátrico en el Servicio de Salud UNISALUD, cumpliendo los mismos criterios de número, sexo y rango de edad que los pacientes con LLA-B. Los protocolos de trabajo fueron avalados por los comités de ética de las instituciones participantes en el estudio.

Tabla 1. Características clínicas de los pacientes.

Característica	Controles	Casos
Edad (años)	6 (3-9)	4,5 (2-9)
Sexo (masculino/femenino)	6/0	4/2
Conteo total de glóbulos blancos (x10 ⁹ /L)	-	3,89 (0,47-112,8)
Hemoglobina (g/dL)	-	8,3 (5,02-10,9)
Porcentaje de blastos en médula ósea	-	61 (35-80)

Los datos son presentados como la media (rango mínimo y máximo) excepto el sexo.

Separación de plasma e inmunodepleción

El plasma se obtuvo centrifugando la sangre a 1300 G durante 10 min a 4 °C, seguido de una segunda centrifugación a 2400 G durante 20 min. Se tomaron alícuotas de 50 µL y se almacenaron a -70 °C hasta su análisis. La cuantificación de proteína total en plasma se realizó por el método del ácido bicinconínico (BCA, PierceTM, Thermo ScientificTM Rockford, IL, USA).

Se realizó inmunodepleción del plasma utilizando el sistema en columna de inmutoafinidad ProteoPrep[®] (Immunoaffinity Albumin and IgG Depletion kit, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), para remover específicamente albúmina e inmunoglobulina G. El procedimiento se siguió de acuerdo con el protocolo del fabricante. Se cargaron 2 mg de proteína equivalentes a 30 µL de plasma aproximadamente; se eluyeron las proteínas con *ProteoPrep[®] Immunoaffinity Equilibration Buffer* y se cuantificó la cantidad de proteína recuperada en la fracción eluida, utilizando el método del BCA (PierceTM, Thermo ScientificTM Rockford, IL, USA). Posteriormente, la muestra inmunodepletada se precipitó por adición de ácido tricloroacético (TCA) frío, suficiente para obtener una concentración del 10%. Se incubó durante 1 h a -10 °C y se centrifugó a 8500 G por 15 min a 4 °C. El pellet se lavó tres veces con acetona fría y una última vez con una mezcla acetona-agua 90:10; en todos los casos se centrifugó a 8500 G por 5 min a 4 °C. La proteína se secó y se almacenó a -70 °C hasta el momento de su análisis.

Preparación de la muestra para electroforesis bidimensional diferencial

Se solubilizaron 100 µg de proteína sometida a inmunodepleción en 50 µL de buffer de lisis (Urea 8 M, CHAPS 4% *p/v*, Tris base 20 mM pH 8,5). Se procesó en frío con un sonicador ultrasónico de punta *Vibra-cell*[®] con 10 pulsos de 10 s de una amplitud del 40%. Posteriormente, se agitó con vórtex durante 30 s y luego se centrifugó a 20000 G durante 15 min a 4 °C.

Se realizaron cuatro mezclas de muestras: Mezcla 1 (pacientes 1-3), Mezcla 2 (pacientes 4-6), Mezcla 3 (controles 1-3) y Mezcla 4 (controles 4-6) con volúmenes iguales de cada muestra, 25 µL en cada caso. Se cuantificó la cantidad de proteína utilizando el método *RcDc[®]* (Bio-Rad[®], Hércules, CA, USA) y el resto de muestra se almacenó a -80 °C hasta el momento del marcaje DIGE.

Proceso de marcaje y 2DE-DIGE

Las proteínas se marcaron utilizando el kit *Amersham CyDyeTM DIGE Fluor, minimal dye labeling kit* UK, siguiendo las recomendaciones del fabricante. Se tomaron 50 µg de proteína de cada una de las mezclas obtenidas y se marcaron con 400 pmol de los fluoróforos Cy3 o Cy5 en hielo y en oscuridad durante 30 min. En ambos estudios se introdujo un estándar interno que contenía cantidades iguales de cada mezcla marcada con el fluoróforo Cy2. La reacción de marcaje se detuvo con 1 µL de lisina 10 mM en hielo durante 10 min en oscuridad. Tras la reacción de marcaje, las mezclas y el estándar interno se combinaron según el diseño experimental descrito en la Tabla 2. Cada una de estas cuatro preparaciones de muestras marcadas se diluyeron 1:1 con buffer de isoelectroenfoque (Urea 8 M, CHAPS 2%, trazas de azul de bromofenol, 1% de IPG Buffer pH 4-7 (GE Healthcare- Björksgatan, Uppsala, Sweden) y DTT 130 mM).

Tabla 2. Diseño experimental para estudio comparativo por análisis DIGE.

	Cy3	Cy5	Cy2 Estándar interno
Gel 1	Mezcla 1- CASOS 1-3	Mezcla 3- CONTROLES 1-3	Mezcla 1- a Mezcla 4
Gel 2	Mezcla 2- CASOS 4-6	Mezcla 4- CONTROLES 4-6	Mezcla 1- a Mezcla 4
Gel 3	Mezcla 3- CONTROLES 1-3	Mezcla 1- CASOS 1-3	Mezcla 1- a Mezcla 4
Gel 4	Mezcla 4- CONTROLES 4-6	Mezcla 2- CASOS 4-6	Mezcla 1- a Mezcla 4

Las proteínas marcadas se cargaron mediante el método de carga en copa en tiras de gel de acrilamida de 24 cm con un gradiente lineal inmovilizado de pH 4 a 7 (ReadyStrips™ IPG strips pH 4-7, Bio-Rad®) previamente rehidratadas pasivamente durante 16 h con 450 µL de buffer de isoelectroenfoque (Urea 8 M, CHAPS 2%, trazas de azul de bromofenol), 1% de IPG Buffer pH 4 a 7 y DeStreak™ 97 mM (GE Healthcare- Björkgatan, Uppsala, Sweden). Las tiras se colocaron en una bandeja de cerámica que se situó en la unidad de focalización *Ettan IPGphor™ II system* (GE Healthcare- Björkgatan, Uppsala, Sweden) utilizando 50 #A/tira a 20 °C. Se cubrió toda la tira con *IPG Cover Fluid* (GE Healthcare- Björkgatan, Uppsala, Sweden) para evitar la precipitación de la urea.

Se siguió una rampa de voltaje así: 300 V durante 3 h, gradiente lineal de 1000 V en 6 h, gradiente lineal de 8000 V en 2 h y finalmente 8000 V hasta estabilizarse, hasta completar 70000 Vh. Finalizado el isoelectroenfoque, las tiras se incubaron con DTT 65 mM en buffer de equilibrio (Tris pH 8,8 50 mM, urea 6 M, glicerol 30% (v/v), SDS 2%, y trazas de azul bromofenol) durante 15 min y luego con IAA 143 mM en buffer de equilibrio durante otros 15 min. A continuación, las proteínas se separaron por electroforesis SDS-PAGE en geles de poliacrilamida del 13% usando el sistema *Ettan™ Dalt Six device* (GE Healthcare- Björkgatan, Uppsala, Sweden) a 20 °C.

Adquisición y análisis de imágenes

La adquisición de imágenes se realizó en el escáner de fluorescencia *Typhoon™ FLA 9500* (GE Healthcare). Las imágenes resultantes correspondieron a la fluorescencia emitida por los fluorocromos Cy2, Cy3 y Cy5 unidos a las proteínas presentes en cada gel. Las longitudes de onda de excitación/emisión fueron correspondientemente Cy2 (473/520 nm), Cy3 (532/580 nm) y Cy5 (635/670 nm), todos los geles se escanearon a una resolución de 100 #m.

Las imágenes se analizaron usando el software *Progenesis SameSpots v4.5* (Nonlinear Dynamics Ltd.), con el fin de detectar *spots* de proteína en cada gel y evaluar la expresión diferencial de los mismos en los dos grupos de estudio Controles *versus* Casos. La cuantificación de los *spots* de proteína se normalizó usando el estándar interno (Cy2). Todas las imágenes de geles se alinearon a la imagen de estándar interno correspondiente (Cy2) y cada imagen de estándar interno se alinea a un gel de referencia (elegido por el usuario o sugerido por el programa). Después de la detección y el filtrado de *spots* de proteína, las imágenes se separaron en dos

grupos (Controles y Casos) y se analizaron para determinar los cambios significativos en la abundancia de spots en el mapa 2-D.

Análisis mediante espectrometría de masas en tándem

Inmediatamente después de la adquisición de imágenes, los geles se sometieron a un proceso de tinción con plata [18], con el fin de visualizar los *spots* de proteína y consecuentemente llevar a cabo el proceso de corte de los *spots* diferencialmente expresados, resultado del análisis de imágenes. Los *spots* cortados se sometieron a digestión con tripsina (Promega, Madison, WI, USA) en un digestor automático Digest ProMS y el extracto con los péptidos se concentró en Speed VacTM hasta sequedad. Los péptidos tripticos se suspendieron en 20 μ L de una solución de ACN:TFA al 0,1% y se analizaron en un sistema LC acoplado en línea con un espectrómetro de masas Orbitrap LTQ XL (Thermo Fisher Scientific) equipado con una fuente de iones nanoESI. Se utilizó un cartucho de preconcentración C18 (Agilent Technologies) conectado a una columna C18 de 75 μ m (Nikkyo Technos Co.). La separación se realizó a un flujo de 0,3 μ L/min en un gradiente de 30 min de ACN de 3 a 40% (disolvente A: TFA al 0,1%, disolvente B: acetonitrilo-0,1% de TFA). El sistema de HPLC estaba compuesto por una bomba nano capilar Agilent 1200, una bomba binaria, un microinyector termostático y una válvula de microinterruptor. El Orbitrap LTQ XL se trabajó en modo de iones positivos con una tensión de rociado de 1,8 kV. Los espectros de masa (MS1) se registraron en el rango m/z 400-1800 a una resolución de 60000 en modo DDA y se seleccionaron los 10 iones precursores de mayor intensidad para fragmentación (MS/MS) por CID. El sistema se controló por el programa XcaliburTM (Thermo Fischer Scientific) y los resultados se exportaron en formato Thermo *Raw*.

Identificación de proteínas

Los espectros se analizaron usando el software SEQUEST (Proteome Discoverer v1.4, Thermo Fisher Scientific) con los siguientes parámetros: tolerancia de masas de péptidos 20 ppm, tolerancia de fragmentos 0,6 Da, enzima establecida como tripsina y tolerancia hasta una escisión perdida, modificación dinámica de metionina (+16 Da) y acetilación N-terminal (+42 Da), modificación fija de carbamidometilación de cisteína (+57 Da). Se utilizó para la búsqueda la base de datos humana UniProtKB/Swiss-Prot [19], descargada el 16 de mayo de 2016, a la cual se le agregaron algunos contaminantes comunes.

Análisis bioinformático

Para comprender mejor la relevancia biológica de las proteínas diferenciales, realizamos un análisis de enriquecimiento funcional con ClueGO versión 2.3.4 [20] en Cytoscape versión 3.4.0 [21], aplicación que facilita la visualización de genes funcionalmente relacionados que se muestran como una red y un gráfico agrupados. Se estableció el nivel de término GO de 3 a 8, teniendo en cuenta anotaciones para todas las evidencias excepto las inferidas electrónicamente (IEA) con un $P < 0,05$, mínimo de 2 a 4 genes de pertenencia al *clúster* y de 3 a 5% de genes compartidos; estos son parámetros de nivel medio en ClueGO. El enriquecimiento de anotaciones se realizó mediante test de distribución hipergeométrica en el lado derecho con un umbral de $P < 0,05$, aplicando corrección de Bonferroni y el método *step-down* para ajustar los valores P . Se utilizó la opción GOFusion para combinar términos similares, los cuales se agruparon usando un umbral de puntaje Kappa de 0,4. El ajuste de agrupamiento de términos de ontología de genes (GO) se realizó con un tamaño de grupo inicial de 1 y la fusión de grupos se estableció en el 50%.

Paralelamente, se realizó un análisis de redes de interacción de proteínas con el fin de obtener información de relaciones físicas y funcionales predichas para las proteínas diferencialmente expresadas. El primer análisis de redes se realizó en STRING v.10.5 [22], que proporciona información sobre interacciones experimentales y predichas de diversas fuentes basadas en vecindad, fusión de genes, co-ocurrencia, co-expresión, datos experimentales y minería de datos en literatura. Finalmente, se realizó un análisis de redes de interacción de proteínas utilizando la aplicación CluePedia253 v 1.3.4 empleando la base de datos de acciones de STRING v.10.5 [22]. En este caso se realizó un enriquecimiento en nodos *hub* adicionando para cada análisis 10 nodos.

Análisis estadístico

Todos los geles se compararon entre sí y los valores de *fold change* así como los valores de P de todos los *spots* se calcularon en el software SameSpots utilizando un análisis ANOVA de una vía. Se consideraron diferenciales a los *spots* de proteínas con un valor de $P < 0,05$ y una variación de abundancia absoluta (*fold change*) $> 1,5$. Se realizó un Análisis de Componentes Principales (PCA) dentro del software SameSpots con los valores del volumen de los *spots* considerados diferenciales. Los resultados de identificación de proteínas se filtraron por péptido, dos péptidos por proteína y confianza peptídica alta (1% FDR).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Análisis DIGE de proteínas plasmáticas diferencialmente expresadas entre pacientes LLA-B y controles

La estrategia 2DE-DIGE junto con el análisis LC-MS/MS utilizada en esta investigación, con un proceso previo de inmunodepleción de dos de las proteínas más abundantes en plasma sanguíneo (IgG y albúmina) nos permitió visualizar los proteomas plasmáticos de los dos grupos de estudio, observar diferencias en el perfil de spots de proteínas mediante el análisis de imágenes e identificar las proteínas diferenciales.

De acuerdo con el programa Progenesis SameSpots v4.5 (Nonlinear Dynamics Ltd.) se alinearon un total de 1722 *spots* de proteínas en cada gel (Figura 1), que se localizaron en un intervalo de pI entre 4 a 7. Entre estos, 22 spots fueron diferenciales con un valor de $P < 0,05$ y un *fold change* > 2 ; 10 spots de proteínas aumentados en las muestras de los pacientes y 5 disminuidos.

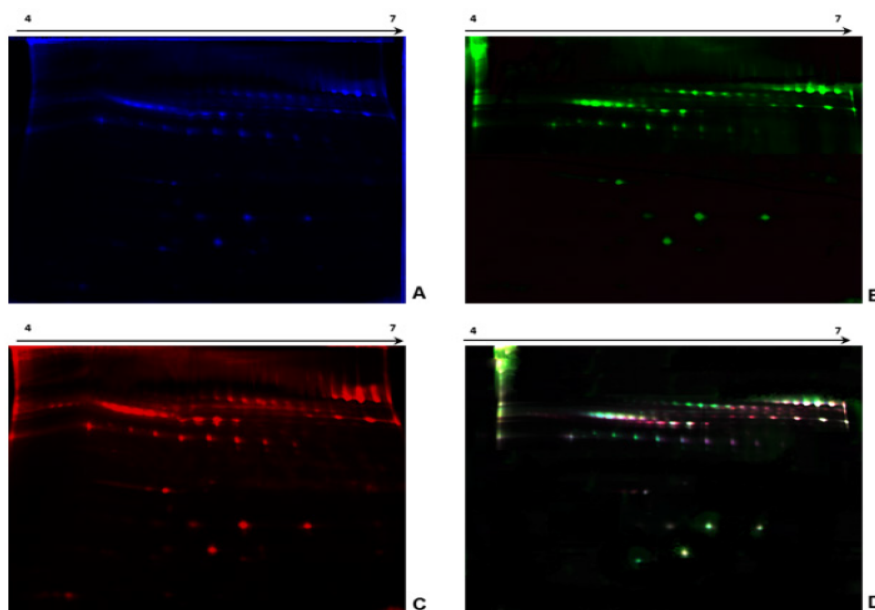


Figura 1. Perfiles representativos del ensayo 2DE-DIGE de plasma inmunodepletado de pacientes LLA-B y controles. Se separaron 150µg de plasma por 2D-PAGE usando tiras IPG de 18cm pH 4 a 7 lineal y geles de poliacrilamida al 13%. Las imágenes se adquirieron con un escáner de fluorescencia TyphoonTM. A. fluorescencia azul (Cy2) Estándar interno, B. fluorescencia verde (Cy3) Pacientes LLA-B, C. fluorescencia roja (Cy5) Controles, D. Imágenes sobrepuestas con los tres fluorocromos.

El análisis de PCA refleja de manera visual similitudes o diferencias entre los geles (Figura 2). Este análisis mostró que los proteomas correspondientes al grupo control (cuadrante izquierdo, puntos azules) fueron diferentes a los del grupo de pacientes con LLA-B (cuadrante derecho, puntos rosados).

Del gel se cortaron 16 de los 22 *spots* diferenciales, porque, aunque se visualizaron en el programa Progenesis SameSpots, no todos fueron visibles con la tinción con plata. Luego de la digestión con tripsina y del análisis LC-MS/MS, se realizó el proceso de identificación de proteínas utilizando el algoritmo SEQUEST en el programa Proteome Discoverer (Thermo Fisher Scientific); las proteínas identificadas se muestran en la Figura 3 y en la Tabla 3. Seis proteínas tienen abundancia mayor en las muestras de pacientes: Haptoglobina, Zinc-alfa-2-glicoproteína, Alfa-1-antitripsina, Serotransferrina, Complemento C3 y la Alfa-2 Glicoproteína rica en leucina y dos proteínas, la Apolipoproteína AI y la cadena gamma del Fibrinógeno, se encuentran disminuidas en las muestras de pacientes.

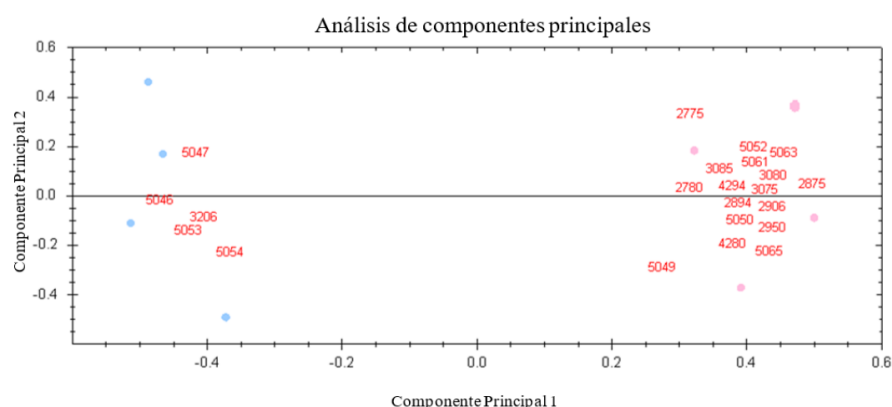


Figura 2. Análisis de componentes principales de datos de volumen de los *spots*. La figura ilustra los dos componentes principales que explican la mayoría de las variaciones en el conjunto de datos, trazadas una contra la otra. Cada gel individual se muestra mediante puntos en los que se indican los geles del grupo control con puntos azules y los geles del grupo de pacientes con LLA-B con puntos rosados. Los *spots* de proteína se indican con su número identificador.

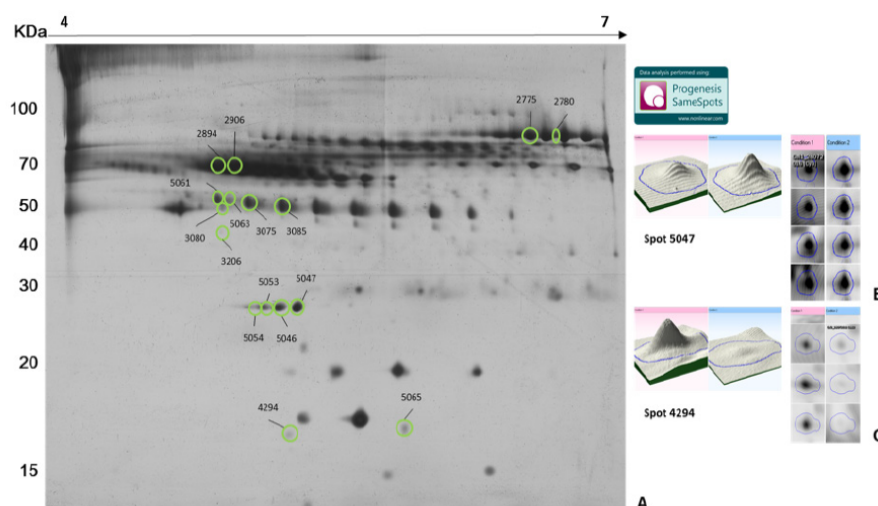


Figura 3. Análisis de imágenes mediante Progenesis SameSpots v4.5 en plasma inmunodepletado de pacientes LLA-B y controles. A. Gel representativo 1 teñido con plata donde se ubican los *spots* de proteína diferencialmente expresados con un $P < 0,05$ y un fold change > 2 . B. *spot* 5047: vista 3D en un mismo gel y vista 2D en varios geles. C. *spot* 4294: vista 3D en un mismo gel y vista 2D en varios geles.

Tabla 3. Proteínas con expresión diferencial entre muestras de pacientes LLA-B y controles.

Spot	Expresión en pacientes	Código Uniprot	Descripción	Puntuación	#péptidos únicos	MW [Da]	Valor de P	Fold change	pI Teórico
2894	Aumenta	P01009	Alfa-1-antitripsina	163,99	22	46,707	0,0065	2,025	5,59
2906	Aumenta	P01009	Alfa-1-antitripsina	163,99	22	46,707	0,0072	2,027	5,59
5046	Disminuye	P02647	Apolipoproteína AI	24,52	7	30,759	0,0006	3,150	5,76
5047	Disminuye	P02647	Apolipoproteína AI	14,33	2	30,759	0,0087	2,205	5,76
5053	Disminuye	P02647	Apolipoproteína AI	24,52	7	30,759	0,0145	3,994	5,76
5054	Disminuye	P02647	Apolipoproteína AI	24,52	7	30,759	0,0016	6,652	5,76
5061	Aumenta	P01024	Complemento C3	23,98	5	187,030	0,0109	2,651	6,40
4294	Aumenta	P00738	Haptoglobina	52,39	10	38,427	0,0118	11,47	6,60
3075	Aumenta	P00738	Haptoglobina	52,39	10	38,427	0,0132	2,799	6,60
3085	Aumenta	P00738	Haptoglobina	52,39	10	38,427	0,0086	2,728	6,60
5065	Aumenta	P00738	Haptoglobina	52,39	10	38,427	0,0135	4,050	6,60
3206	Disminuye	P02679	Cadena gamma del Fibrinógeno	6,50	2	49,465	0,0057	2,685	6,09
3080	Aumenta	P25311	Zinc Alfa-2-glicoproteína	34,93	8	34,237	0,0096	2,646	6,05
5063	Aumenta	P02750	Alfa-2-glicoproteína rica en leucina	5,22	2	38,154	0,0451	3,258	6,95
2775	Aumenta	P02787	Serotransferrina	520,90	60	77,014	0,0051	2,045	7,12
2780	Aumenta	P02787	Serotransferrina	520,90	60	77,014	0,0417	2,965	7,12

Análisis bioinformático

Las ontologías sobrerrepresentadas en el listado de proteínas diferencialmente expresadas se analizaron por enriquecimiento de términos GO. El resultado del análisis se muestra como una red de términos agrupados funcionalmente (Figura 4A) en el que cada nodo es un término. Los colores iguales definen la pertenencia al grupo y cada arista refleja la relación entre los términos basado en la similitud de los genes asociados. El término líder del grupo es el término sobresaliente en cada agrupamiento o clúster.

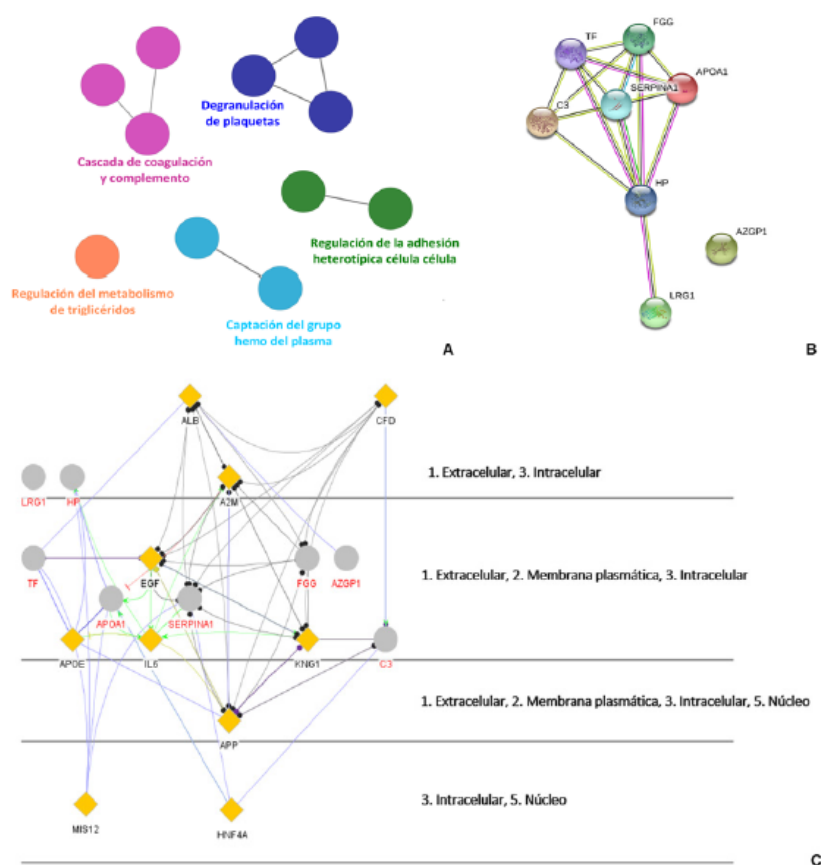


Figura 4. Análisis ontológico de las proteínas consideradas diferenciales. A. Red de anotaciones, los nodos representan la ontología de Proceso Biológico (BP) y vías de señalización (KEGG, Reactome y WikiPathways). B. Red de interacción de proteínas con visualización de evidencia y un score de confianza medio (0,4). C. Red obtenida en CluePedia enriquecida en visualización *Cerebral Layout* que refleja el componente celular. Los nodos de entrada corresponden a las proteínas diferencialmente expresadas y se presentan como círculos de color gris, los nodos enriquecidos o proteínas hub se presentan como triángulos de color amarillo. HP: Haptoglobina, AZGP1: Zinc-alfa-2-glicoproteína, Serpina 1: Alfa-1-antitripsina, TF: Serotransferrina, C3: Complemento C3, LRG1: Alfa-2 Glicoproteína rica en leucina, APO A1: Apolipoproteína AI, FGG: Cadena gamma del Fibrinógeno, EGF: Factor de crecimiento epidermal, A2M: Alfa-2-macroglobulina.

La red obtenida muestra una prevalencia de términos que se relacionan con la regulación del proceso metabólico de triglicéridos, regulación de la adhesión heterotípica célula-célula, además de otros procesos biológicos relacionados más directamente con la naturaleza misma de la muestra: procesos de degranulación de plaquetas, captación del grupo hemo del plasma y cascadas de complemento y coagulación [23- 24].

Resulta particularmente interesante encontrar relacionado el proceso metabólico de triglicéridos dada su relevancia en estados malignos. Anteriormente, se ha reportado que el metabolismo de lípidos se altera en función del crecimiento de un tumor, no solo por una reprogramación en las enzimas involucradas en las vías metabólicas de lípidos, sino además por la alteración en la cantidad y disponibilidad de los lípidos en casos de cáncer [25]. Las proteínas Apolipoproteína AI, Complemento C3 y la cadena gamma del fibrinógeno relacionadas con este proceso biológico se reportaron metabólicamente alteradas en diversos tipos de cáncer. Así, por ejemplo, el fibrinógeno, específicamente la cadena gamma que presentó niveles disminuidos en pacientes en comparación con las muestras controles, es un miembro importante en la hemostasia, actúa como sustrato para la formación de coágulos de fibrina y en la unión a plaquetas para desencadenar la

agregación plaquetaria. Esta proteína es producida en el hígado como respuesta a la estimulación con citoquinas y puede reflejar el desarrollo tumoral y el estado inflamatorio del individuo [26].

El fibrinógeno, en la cadena gamma, se considera una proteína reactiva de fase aguda que aumenta en la progresión tumoral. Varios estudios han demostrado un aumento de fibrinógeno en suero o plasma de pacientes con tumores sólidos y se ha indicado que los niveles aumentados de fibrinógeno pueden ser un factor pronóstico de baja supervivencia [27- 30]. En casos de leucemia, los resultados son diversos; se han encontrado niveles tanto aumentados como disminuidos de fibrinógeno. Berger y Wei [31- 32] encontraron que los niveles elevados de fibrinógeno en el diagnóstico se asocian con una menor supervivencia. Por el contrario, niveles disminuidos de fibrinógeno se encuentran en casos de coagulación intravascular diseminada (CID) activa [33- 34]. Esta proteína llama la atención como posible molécula marcadora de diagnóstico o pronóstico, dado que es usualmente medida a nivel clínico, y aunque debería establecerse un diagnóstico diferencial con coagulopatías podría introducirse para seguimiento.

Por su parte, la Apolipoproteína A1, el principal componente proteico de la lipoproteína de alta densidad (HDL), se sintetiza principalmente en el hígado y el intestino delgado y se ha encontrado desregulada en varios tipos de cáncer [35- 36]. En este estudio encontramos niveles disminuidos de la Apolipoproteína A1 en pacientes comparados con los controles. Nuestros resultados también muestran una relación importante de los fenómenos asociados con coagulación sanguínea, procesos de coagulación y degranulación de plaquetas. Varios estudios confirman que un alto porcentaje de los pacientes con cáncer presentan anomalías en dichos procesos [37- 38].

Entre las proteínas que se relacionan encontramos la Haptoglobina, la Alfa-1-antitripsina y la Transferrina, que a su vez se han relacionado con procesos tumorales. La Haptoglobina, por ejemplo, que es sintetizada en el hígado y se asocia con enfermedades infecciosas y traumatismos, tiene un rol central en procesos de migración celular y degradación de la matriz extracelular, por lo cual se ha relacionado con proceso de angiogénesis y metástasis [39]. Diversos estudios la han postulado como posible biomarcador para algunos tipos de cáncer como cáncer gástrico [40], de colon [41], de pulmón [42], y también ha sido asociada con leucemia [43].

La Alfa-1-antitripsina, es una glicoproteína sérica que se sintetiza principalmente en el hígado humano y en los macrófagos, pertenece a la familia de las serpinas, proteínas homólogas con funciones diversas involucradas en procesos tales como coagulación sanguínea, fibrinólisis, muerte celular programada, desarrollo e inflamación [44]. Se ha demostrado que muchos tipos de células cancerosas expresan y secretan Alfa-1-antitripsina. También se han reportado niveles séricos elevados de esta proteína en diferentes tipos de cáncer [45-47]. Asimismo, se ha mostrado que, en cáncer de pulmón y cáncer de próstata, hay una disminución en los niveles séricos de la proteína varias semanas después del tratamiento, lo que sugeriría que esta proteína puede ser un indicador importante de la efectividad del tratamiento [48]. Nuestro estudio muestra un aumento de esta proteína en plasma sanguíneo de pacientes con LLA-B en comparación con las muestras controles. Se confirmó su alteración debido a estados malignos y se notó su potencialidad como molécula útil para diagnóstico o seguimiento.

La proteína Complemento C3, relacionada con el sistema del complemento [49], se encontró con una expresión aumentada en pacientes con LLA-B comparado a los controles. Este resultado resulta relevante teniendo en cuenta que el sistema del complemento es una parte esencial de la respuesta inmune innata que participa en la eliminación de las células alteradas del cuerpo. Debido a la gran cantidad de alteraciones genéticas y epigenéticas asociadas con la carcinogénesis, la transformación neoplásica puede aumentar la capacidad de las células malignas para activar este sistema, lo que puede explicar la sobreexpresión de esta proteína. Aunque las células malignas a menudo desarrollan mecanismos de protección y resistencia al complemento, investigaciones recientes sobre los mecanismos que regulan la actividad del complemento mostraron que las proteínas sobreexpresadas tenían actividad inhibidora [50- 51].

La Figura 4B, por su parte, muestra la red obtenida en la plataforma STRING. Allí, el color de la línea indica el tipo de interacción asociada. Cada nodo denota una proteína, las líneas representan interacciones entre las proteínas, las líneas de color violeta indican interacciones determinadas experimentalmente, las de color negro indican co-expresión y las de color verde indican vecindad del gen. Observamos que las proteínas de entrada se encuentran altamente relacionadas dado que la red obtenida está conectada a través de interacciones determinadas experimentalmente e interacciones de co-expresión. Sin embargo, la proteína Alfa-2-glicoproteína de zinc no se conectó a la red central (Figura 4B). Esta proteína está relacionada con procesos de lipólisis por lo que también se conoce como factor movilizador de lípidos reconocido con una alta expresión en estado de caquexia por cáncer [52]. Este factor se ha postulado como posible marcador sérico de cáncer de próstata [53] y otros tipos de cáncer [54- 55], manifestando un aumento de su expresión en los estados tempranos del crecimiento tumoral. El resultado obtenido en este estudio es correspondiente a lo previamente publicado. Se encontró un aumento de dicho factor en muestras de pacientes con LLA-B en comparación con los controles.

Finalmente, mostramos la red obtenida en CluePedia con un enriquecimiento en nodos *hubs* (Figura 4C) y su visualización tipo *Cerebral Layout* que muestra el componente celular asociado a cada proteína. Los nodos *input* se presentan en círculos grises y los nodos enriquecidos en rombos de color amarillo. Las uniones entre nodos representan activación (verde), unión (azul), catálisis (morado), expresión (amarillo) y reacción (negro). De manera correspondiente con la naturaleza de la muestra, el componente celular de las proteínas diferenciales se relaciona con espacio extracelular o membrana plasmática.

Asimismo, queremos resaltar algunas proteínas *hubs* enriquecidas en el análisis realizado en CluePedia, dado que pueden dar idea de un estado biológico más general. Encontramos, por ejemplo, el factor de crecimiento epidermal (EGF), potente factor mitógeno que juega un papel importante en la proliferación, crecimiento y diferenciación de numerosos tipos de células. Esta proteína actúa uniéndose a su receptor (EGFR) en la superficie celular [56]. El EGF se ha relacionado con la progresión de ciertos tipos de cáncer incluyendo la leucemia, en la que se encuentra alterada la expresión de su receptor y se ha asociado a mutaciones [57- 58].

También queremos resaltar la proteína *hub* Alfa-2-macroglobulina (A2M) que tiene un papel importante en el control de la actividad proteasa en la sangre. A2M se une covalentemente a las principales clases de proteasas contrarrestando su acción y evitando así diversas enfermedades. También puede unir varias citoquinas, factores de crecimiento y otras moléculas no proteolíticas que en conjunto colaboran a su actividad inhibidora proteasa [59- 60]. A2M inhibe la proliferación de células tumorales cuando se une a su receptor [61] y se ha postulado como biomarcador en cáncer de próstata [62] y de mama [63].

Algunas de las proteínas con expresión diferencial están clasificadas como reactantes de fase aguda y su interpretación biológica debe ser cautelosa dado que pueden ser proteínas marcadoras no específicas de enfermedad y deberían contemplarse en conjunto con otras manifestaciones clínicas. Sin embargo, gracias a los avances recientes en proteómica, se puede realizar una asociación entre las proteínas reactantes de fase aguda y el cáncer más allá de una respuesta inflamatoria inespecífica [64]. Se ha mostrado que las proteínas de fase aguda séricas de pacientes con cáncer tienen expresiones alteradas para distintos tipos, subtipos e, incluso, etapas de cáncer frente a muestras de controles sanos [65].

Finalmente, resaltamos que la búsqueda de proteínas alteradas en muestras de fácil acceso para el diagnóstico temprano de la LLA es un campo aún poco explorado. Existen algunos estudios en muestras de médula ósea y en líneas celulares que presentan listas de proteínas diferencialmente expresadas en pacientes con LLA versus controles sanos [17- 66- 67]. No obstante, aún son muy escasos los estudios en muestras de fácil acceso como los derivados de sangre periférica, de tal forma que esta investigación es pionera en el estudio proteómico del plasma sanguíneo de pacientes pediátricos colombianos con miras a encontrar proteínas diferencialmente expresadas que pueden ser candidatos para clasificarse como biomarcadores de diagnóstico y resalta el potencial del análisis proteómico en la búsqueda de biomarcadores.

CONCLUSIÓN

Se encontraron en total ocho proteínas plasmáticas expresadas diferencialmente que podrían ser consideradas como posibles biomarcadores para un diagnóstico temprano de LLA-B. Sin embargo, el potencial de utilizar estos biomarcadores para detectar y diagnosticar LLA-B requiere una siguiente etapa de validación utilizando estrategias dirigidas para la cuantificación de cada una de ellas en un mayor número de muestras.

REFERENCIAS

- [1] D. Bhojwani and J. J. Yang, "Biology of Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia", *Pediatr Clin N Am*, vol. 62, pp. 47–60, 2015, doi: 10.1016/j.pcl.2014.09.004
- [2] W. L. Carroll, M. Loh, A. Biondi, and C. Willman, *The Biology of Acute Lymphoblastic Leukemia*. 2012, doi.org/10.1007/978-3-642-13781-5_2
- [3] D. A. Arber, A. Orazi, R. Hasserjian, M. J. Borowitz, M. M. Le Beau, C. D. Bloomfield, M. Cazzola, and J. W. Vardiman, "The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia", *Blood*, vol. 127, no. 20, pp. 2391–2406, 2016, doi.org/10.1182/blood-2016-03-643544
- [4] A. V. Moorman, "New and emerging prognostic and predictive genetic biomarkers in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia", *Haematologica*, vol. 101, no. 4, pp. 407–416, 2016, doi.org/10.3324/haematol.2015.141101
- [5] M. P. Curado, T. Pontes, M. E. Guerra-Yi, and M. D. C. Cancela, "Leukemia mortality trends among children, adolescents, and young adults in Latin America", *Rev. Panam. Salud Publica*, vol. 29, no. 2, pp. 96–102, 2011, doi.org/10.1590/s1020-49892011000200004
- [6] A. Suarez, M. Pina, D. X. Nichols-Vinueza, and J. Lopera, "A Strategy to Improve Treatment-Related Mortality and Abandonment of Therapy for Childhood ALL in a Developing Country Reveals the Impact of Treatment Delays", *Pediatr Blood Cancer*, vol. 62, pp. 1395–1402, 2015, doi.org/10.1002/pbc.25510
- [7] C. Rodriguez-Galindo, P. Friedrich, P. Alcasabas, F. Antillon, S. Banavali, L. Castillo, T. Israels, S. Jeha, M. Harif, M. J. Sullivan, T. C. Quah, C. Patte, C. H. Pui, R. Barr, and T. Gross, "Toward the cure of all children with cancer through collaborative efforts: Pediatric oncology as a global challenge", *Journal of Clinical Oncology*, vol. 33, no. 27, pp. 3065–3073, 2015, doi.org/10.1200/jco.2014.60.6376
- [8] M. Frantzi, A. Bhat, and A. Latosinska, "Clinical proteomic biomarkers: relevant issues on study design & technical considerations in biomarker development", *Clin. Transl. Med.*, vol. 3, no. 1, p. 7, 2014, doi.org/10.1186/2001-1326-3-7
- [9] R. Huang, Z. Chen, L. He, N. He, Z. Xi, Z. Li, Y. Deng, and X. Zeng, "Mass spectrometry-assisted gel-based proteomics in cancer biomarker discovery: approaches and application", *Theranostics*, vol. 7, no. 14, pp. 3559–3572, 2017, doi.org/10.7150/thno.20797
- [10] G. Arentz, F. Weiland, M. K. Oehler, and P. Hoffmann, "State of the art of 2D DIGE", *Proteomics - Clin. Appl.*, vol. 9, pp. 277–288, 2015, doi.org/10.1002/prca.201400119
- [11] S. Viswanathan, M. Ünlü, and J. S. Minden, "Two-dimensional difference gel electrophoresis", *Nat. Protoc.*, vol. 1, no. 3, pp. 1351–1358, 2006, doi.org/10.1038/nprot.2006.234
- [12] P. E. Geyer, L. M. Holdt, D. Teupser, and M. Mann, "Revisiting biomarker discovery by plasma proteomics", *Mol. Syst. Biol.*, vol. 13, no. 9, p. 942, 2017, doi.org/10.15252/msb.20156297
- [13] P. Dowling, V. Palmerini, M. Henry, P. Meleady, V. Lynch, J. Ballot, G. Gullo, J. Crown, M. Moriarty, and M. Clynes, "Transferrin-bound proteins as potential biomarkers for advanced breast cancer patients", *BBA Clin.*, vol. 2, pp. 24–30, 2014, doi.org/10.1016/j.bbacli.2014.08.004
- [14] N.-J. Fan, R. Kang, X.-Y. Ge, M. Li, Y. Liu, H.-M. Chen, and C.-F. Gao, "Identification alpha-2-HS-glycoprotein precursor and tubulin beta chain as serology diagnosis biomarker of colorectal cancer", *Diagn. Pathol.*, vol. 9, pp. 1–11, 2014, doi.org/10.1186/1746-1596-9-53.

- [15] J. D. Pallua, G. Schaefer, C. Seifarth, M. Becker, S. Meding, S. Rauser, A. Walch, M. Handler, M. Netzer, M. Popovskaia, M. Osl, C. Baumgartner, H. Lindner, L. Kremser, B. Sarg, G. Bartsch, C. W. Huck, G. K. Bonn, and H. Klocker, "MALDI-MS tissue imaging identification of biliverdin reductase B overexpression in prostate cancer", *J. Proteomics*, vol. 91, pp. 500–514, 2013, doi.org/10.1016/j.jprot.2013.08.003
- [16] S. Saha, S. Banerjee, D. Banerjee, S. Chandra, and A. Chakrabarti, "2DGE and DIGE based proteomic study of malignant B-cells in B-cell acute lymphoblastic leukemia", *EuPA Open Proteomics*, vol. 3, pp. 13–26, 2014, doi.org/10.1016/j.euprot.2014.01.002
- [17] G. Xu, Z. Li, L. Wang, F. Chen, Z. Chi, M. Gu, S. li, D. Wu, J. Miao, Y. Zhang, L. Hao, and Y. Fan, "Label-free quantitative proteomics reveals differentially expressed proteins in high risk childhood acute lymphoblastic leukemia", *J. Proteomics*, vol. 150, pp. 1–8, 2017, doi.org/10.1016/j.jprot.2016.08.014
- [18] A. Shevchenko, M. Wilm, O. Vorm, and M. Mann, "Mass Spectrometric Sequencing of Proteins from Silver-Stained Polyacrylamide Gels Mass Spectrometric Sequencing of Proteins from Silver-Stained Polyacrylamide Gels", vol. 68, no. 5, pp. 850–858, 1996, doi.org/10.1021/ac950914h
- [19] A. Bateman et al., "UniProt: The universal protein knowledgebase", *Nucleic Acids Res.*, vol. 45, no. D1, pp. D158–D169, 2017, doi.org/10.1093/nar/gky092
- [20] G. Bindea, B. Mlecnik, H. Hackl, P. Charoentong, M. Tosolini, A. Kirilovsky, W. H. Fridman, F. Pagès, Z. Trajanoski, and J. Galon, "ClueGO: A Cytoscape plug-in to decipher functionally grouped gene ontology and pathway annotation networks", *Bioinformatics*, vol. 25, no. 8, pp. 1091–1093, 2009, doi.org/10.1093/bioinformatics/btp101
- [21] P. Shannon, A. Markiel, 2 Owen Ozier, N. S. Baliga, J. T. Wang, D. Ramage, N. Amin, B. Schwikowski, and T. Ideker, "Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks", *Genome Res.*, no. 13, pp. 2498–2504, 2003, doi.org/10.1101/gr.1239303
- [22] D. Szklarczyk, J. H. Morris, H. Cook, M. Kuhn, S. Wyder, M. Simonovic, A. Santos, N. T. Doncheva, A. Roth, P. Bork, L. J. Jensen, and C. von Mering, "The STRING database in 2017: quality-controlled protein-protein association networks, made broadly accessible", *Nucleic Acids Res.*, vol. 45, no. D1, pp. D362–D368, 2017, doi.org/10.1093/nar/gkw937
- [23] S. Surinova, R. Schiess, R. Hu, and F. Cerciello, "On the Development of Plasma Protein Biomarkers", *J. Proteome Res.*, vol. 10, pp. 5–16, 2011, doi.org/10.1021/pr1008515
- [24] P. E. Geyer, N. A. Kulak, G. Pichler, L. M. Holdt, D. Teupser, and M. Mann, "Plasma Proteome Profiling to Assess Human Health and Disease", *Cell Syst.*, vol. 2, no. 3, pp. 185–195, 2016, doi.org/10.1016/j.cels.2016.02.015
- [25] S. Beloribi-Djefaffia, S. Vasseur, and F. Guillaumond, "Lipid metabolic reprogramming in cancer cells", *Oncogenesis*, vol. 5, no. 1, p. e189, 2016, doi.org/10.1038/oncsis.2015.49
- [26] M. W. Mosesson, "Fibrinogen and fibrin structure and functions", *J. Thromb. Haemost.*, vol. 3, no. 8, pp. 1894–1904, 2005, doi.org/10.1111/j.1538-7836.2005.01365.x
- [27] Y. Luo, H. S. Kim, M. Kim, M. Lee, and Y. S. Song, "Elevated plasma fibrinogen levels and prognosis of epithelial ovarian cancer: A cohort study and meta-analysis", *J. Gynecol. Oncol.*, vol. 28, no. 3, pp. 1–12, 2017, doi.org/10.3802/jgo.2017.28.e36
- [28] P. Chen, C. Wang, B. Cheng, E. U. Nesa, Y. Liu, Y. Jia, Y. Qu, Z. Jiang, J. Han, and Y. Cheng, "Plasma fibrinogen and serum albumin levels (FA score) act as a promising prognostic indicator in non-small cell lung cancer", *Onco. Targets. Ther.*, vol. 10, pp. 3107–3118, 2017, doi.org/10.2147/ott.s138854
- [29] F. Liu, H. Gao, C. Wu, and Z. Zhu, "The association of plasma fibrinogen with clinicopathological features and prognosis in esophageal cancer patients", *Oncotarget*, vol. 8, no. 54, pp. 93029–93038, 2017, doi.org/10.18632/oncotarget.21746
- [30] Y. L. Tao, Y. Li, J. Gao, Z. G. Liu, Z. W. Tu, G. Li, B. Q. Xu, D. L. Niu, C. Bin Jiang, W. Yi, Z. Q. Li, J. Li, Y. M. Wang, Z. Bin Cheng, Q. D. Liu, L. Bai, C. Zhang, J. Y. Zhang, M. S. Zeng, and Y. F. Xia, "Identifying FGA peptides as nasopharyngeal carcinoma-associated biomarkers by magnetic beads", *J. Cell. Biochem.*, vol. 113, no. 7, pp. 2268–2278, 2012, doi.org/10.1002/jcb.24097

- [31] M. D. Berger, A. D. Heini, K. Seipel, B. Mueller, A. Angelillo-Scherrer, and T. Pabst, "Increased fibrinogen levels at diagnosis are associated with adverse outcome in patients with acute myeloid leukemia", *Hematol. Oncol.*, 2016, doi.org/10.1002/hon.2307
- [32] Q. Wei, T. Niu, M. Wang, J. Yang, P. Liu, and Y. Yi, "A Revised Fibrinogen Cutoff Value in the Chinese Disseminated Intravascular Coagulation Scoring System May Provide a Better Prognostic Value for Hematological Malignancies", *Acta Haematol.*, vol. 137, no. 3, pp. 132–140, 2017, doi.org/10.1159/000456645
- [33] M. Levi and M. Scully, "How I treat disseminated intravascular coagulation", *Blood*, vol. 131, no. 8, pp. 845–854, 2018, doi.org/10.1182/blood-2017-10-804096
- [34] Walker Deborah Kirk, "Acute Promyelocytic Leukemia: An Overview With Implications for Oncology Nurses", *Clin. J. Oncol. Nurs.*, vol. 14, no. 6, pp. 747–759, 2010, doi.org/10.1188/10.cjon.747-759
- [35] M. Zamanian-Daryoush and J. A. DiDonato, "Apolipoprotein A-I and cancer", *Front. Pharmacol.*, vol. 6, no. NOV, pp. 1–10, 2015, doi.org/10.3389/fphar.2015.00265
- [36] S. Borgquist, T. Butt, P. Almgren, D. Shiffman, T. Stocks, M. Orho-Melander, J. Manjer, and O. Melander, "Apolipoproteins, lipids and risk of cancer", *Int. J. Cancer*, vol. 138, no. 11, pp. 2648–2656, 2016, doi.org/10.1002/ijc.30013
- [37] C. Reddel, C. Tan, and V. Chen, "Thrombin Generation and Cancer: Contributors and Consequences", *Cancers (Basel)*, vol. 11, no. 1, p. 100, 2019, doi.org/10.3390/cancers11010100
- [38] M. D.G., T. S.C., K. S., S. A.K., C. J.D., and H. K.V., "Platelets and cancer: A casual or causal relationship: Revisited", *Cancer Metastasis Rev.*, vol. 33, no. 1, pp. 231–269, 2014, doi.org/10.1007/s10555-014-9498-0
- [39] I. K. Quaye, "Haptoglobin, inflammation and disease", *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, vol. 102, no. 8, pp. 735–742, 2008, doi.org/10.1016/j.trstmh.2008.04.010
- [40] W. Liu, B. Liu, Q. Cai, J. Li, X. Chen, and Z. Zhu, "Proteomic identification of serum biomarkers for gastric cancer using multi-dimensional liquid chromatography and 2D differential gel electrophoresis", *Clin. Chim. Acta*, vol. 413, no. 13–14, pp. 1098–1106, 2012, doi.org/10.1016/j.cca.2012.03.003
- [41] L. Sun, S. Hu, L. Yu, C. Guo, L. Sun, Z. Yang, J. Qi, and Y. Ran, "Serum haptoglobin as a novel molecular biomarker predicting colorectal cancer hepatic metastasis," *Int. J. Cancer*, vol. 138, no. 11, pp. 2724–2731, 2016, doi.org/10.1002/ijc.29993
- [42] J. Park, J. S. Yang, G. Jung, H. I. Woo, H. D. Park, J. W. Kim, W. Huh, J. W. Ko, H. Kim, J. Y. Cho, and S. Y. Lee, "Subunit-specific mass spectrometry method identifies haptoglobin subunit alpha as a diagnostic marker in non-small cell lung cancer", *J. Proteomics*, vol. 94, pp. 302–310, 2013, doi.org/10.1016/j.jprot.2013.09.019
- [43] S. Nevo and I. Tatarsky, "Serum haptoglobin types and leukemia", *Hum. Genet.*, vol. 73, no. 3, pp. 240–244, 1986, doi.org/10.1007/bf00401236
- [44] D. Van Gent, P. Sharp, K. Morgan, and N. Kalsheker, "Serpins: Structure, function and molecular evolution", *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, vol. 35, no. 11, pp. 1536–1547, 2003, doi.org/10.1016/s1357-2725(03)00134-1
- [45] S. Pan, T. A. Brentnall, and R. Chen, "Proteomics analysis of bodily fluids in pancreatic cancer", *Proteomics*, vol. 15, no. 15, pp. 2705–2715, 2015, doi.org/10.1002/pmic.201400476
- [46] E. López-Árias, A. Aguilar-Lemarroy, L. Felipe Jave-Suárez, G. Morgan-Villela, I. Mariscal-Ramírez, M. Martínez-Velázquez, Á. H. Álvarez, A. Gutiérrez-Ortega, and R. Hernández-Gutiérrez, "Alpha 1-antitrypsin: A novel tumor-associated antigen identified in patients with early-stage breast cancer", *Electrophoresis*, vol. 33, no. 14, pp. 2130–2137, 2012, doi.org/10.1002/elps.201100491
- [47] A. L. Trachte, S. E. Suthers, M. R. Lerner, J. S. Hanas, E. R. Jupe, A. E. Sienko, A. M. Adesina, S. a Lightfoot, D. J. Brackett, and R. G. Postier, "Increased expression of alpha-1-antitrypsin, glutathione S-transferase pi and vascular endothelial growth factor in human pancreatic adenocarcinoma", *Am. J. Surg.*, vol. 184, no. 6, pp. 642-7-8, 2002, doi.org/10.1016/s0002-9610(02)01105-4
- [48] Z. J. El-akawi, A. M. Abu-awad, and N. A. Khouri, "Alpha-1 Antitrypsin Blood Levels as Indicator for the Efficacy of Cancer Treatment", *World J Oncol*, vol. 4, no. 2, pp. 83–86, 2013, doi.org/10.4021/wjon663e
- [49] S. Jain, V. Gautam, and S. Naseem, "Acute-phase proteins: As diagnostic tool", *J. Pharm. Bioallied Sci.*, vol. 3, no. 1, p. 118, 2011, doi.org/10.4103/0975-7406.76489

- [50] Afshar-Kharghan, Vahid “The role of the complement system in cancer”, *The Journal of Clinical Investigation*, vol. 127, no. 3, pp. 780-789, 2017, doi.org/10.1172/JCI90962
- [51] S. Mamidi, S. Höne, and M. Kirschfink, “The complement system in cancer: Ambivalence between tumour destruction and promotion”, *Immunobiology*, vol. 222, no. 1, pp. 45–54, 2017, doi.org/10.1016/j.imbio.2015.11.008
- [52] Y. Huang, L. Z. Li, C. Z. Zhang, C. Yi, L. L. Liu, X. Zhou, G. B. Xie, M. Y. Cai, Y. Li, and J. P. Yun, “Decreased expression of zinc-alpha2-glycoprotein in hepatocellular carcinoma associates with poor prognosis”, *J. Transl. Med.*, vol. 10, no. 1, pp. 1–10, 2012, doi.org/10.1186/1479-5876-10-106
- [53] I. Katafigiotis, S. I. Tyritzis, K. G. Stravodimos, C. Alamanis, K. Pavlakis, A. Vlahou, M. Makridakis, A. Katafigioti, S. D. Garbis, and C. A. Constantinides, “Zinc α 2-glycoprotein as a potential novel urine biomarker for the early diagnosis of prostate cancer”, *BJU Int.*, vol. 110, no. 11 B, pp. 688–693, 2012, doi.org/10.1111/j.1464-410x.2012.11501.x
- [54] M. Rydén, T. Agustsson, J. Andersson, J. Bolinder, E. Toft, and P. Arner, “Adipose zinc- α 2-glycoprotein is a catabolic marker in cancer and noncancerous states”, *J. Intern. Med.*, vol. 271, no. 4, pp. 414–420, 2012, doi.org/10.1111/j.1365-2796.2011.02441.x
- [55] V. Dubois, L. Delort, F. Mishellany, T. Jarde, H. Billard, C. Lequeux, O. Damour, F. Penault-Llorca, M. P. Vasson, and F. Caldefie-Chezet, “Zinc- α 2-glycoprotein: A new biomarker of breast cancer?”, *Anticancer Res.*, vol. 30, no. 7, pp. 2919–2925, 2010
- [56] N. F. Endres, K. Engel, R. Das, E. Kovacs, and J. Kuriyan, “Regulation of the catalytic activity of the EGF receptor”, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, vol. 21, no. 6, pp. 777–784, 2011, doi.org/10.1016/j.sbi.2011.07.007
- [57] M. Wobus, M. Bornhäuser, A. Jacobi, M. Kräter, O. Otto, C. Ortlepp, J. Guck, G. Ehninger, C. Thiede, and U. Oelschlägel, “Association of the EGF-TM7 receptor CD97 expression with FLT3-ITD in acute myeloid leukemia”, *Oncotarget*, vol. 6, no. 36, pp. 38804–38815, 2015, doi.org/10.18632/oncotarget.5661
- [58] L. Anelli, A. Zagaria, N. Coccaro, G. Tota, L. Impera, C. F. Minervini, D. Pastore, A. Minervini, P. Casieri, G. Specchia, and F. Albano, “A novel t(4;16)(q25;q23.1) associated with EGF and ELOVL6 deregulation in acute myeloid leukemia”, *Gene*, vol. 529, no. 1, pp. 144–147, 2013, doi.org/10.1016/j.gene.2013.07.105
- [59] A. A. Rehman, H. Ahsan, and F. H. Khan, “Alpha-2-macroglobulin: A physiological guardian”, *J. Cell. Physiol.*, vol. 228, no. 8, pp. 1665–1675, 2013, doi.org/10.1002/jcp.24266
- [60] K. J. Clemetson, Chapter 9 Blood glycoproteins, vol. 29, no. PART B. Elsevier Masson SAS, 1997, doi.org/10.1016/s0167-7306(08)60622-5
- [61] I. Lindner, N. Y. A. Hemdan, M. Buchold, K. Huse, M. Bigl, I. Oerlecke, A. Ricken, F. Gaunitz, U. Sack, A. Naumann, M. Hollborn, D. Thal, R. Gebhardt, and G. Birkenmeier, “A2-Macroglobulin Inhibits the Malignant Properties of Astrocytoma Cells By Impeding B-Catenin Signaling”, *Cancer Res.*, vol. 70, no. 1, pp. 277–287, 2010, doi.org/10.1158/0008-5472.can-09-1462
- [62] E. F. Burgess, A. J. L. Ham, D. L. Tabb, D. Billheimer, B. J. Roth, S. S. Chang, M. S. Cookson, T. J. Hinton, K. L. Cheek, S. Hill, and J. A. Pietenpol, “Prostate cancer serum biomarker discovery through proteomic analysis of alpha-2 macroglobulin protein complexes”, *Proteomics - Clin. Appl.*, vol. 2, no. 9, pp. 1223–1233, 2008, doi.org/10.1002/prca.200780073
- [63] S. Suman, T. Basak, P. Gupta, S. Mishra, V. Kumar, S. Sengupta, and Y. Shukla, “Quantitative proteomics revealed novel proteins associated with molecular subtypes of breast cancer”, *J. Proteomics*, vol. 148, pp. 183–193, 2016, doi.org/10.1016/j.jprot.2016.07.033
- [64] W. S. Orr, L. H. Malkas, R. J. Hickey, and J. A. Sandoval, “Acute Phase Proteins as Cancer Biomarkers”, no. October, 2011, pp. 1–21, doi.org/10.5772/25181
- [65] W. W. Pang, P. S. Abdul-Rahman, W. I. Wan-Ibrahim, and O. H. Hashim, “Can the acute-phase reactant proteins be used as cancer biomarkers?”, *Int. J. Biol. Markers*, vol. 25, no. 1, pp. 1–11, 2010, doi.org/10.1177/172460081002500101
- [66] N. Dehghan-Nayeri, M. Rezaei-Tavirani, & Mir, D. Omrani, A. Gharehbaghian, & Kourosh, G. Pour, P. Eshghi, G. A. Ir, K. Goudarzi, and P. K. G. A. Ir, “Identification of potential predictive markers of dexamethasone

resistance in childhood acute lymphoblastic leukemia”, J. Cell Commun. Signal, vol. 11, pp. 137–145, 2017, doi.org/10.1007/s12079-016-0357-3

- [67] M. Braoudaki, G. I. Lambrou, K. Vougas, K. Karamolegou, G. T. Tsangaris, and F. Tzortzatou-Stathopoulou, “Protein biomarkers distinguish between high- and low-risk pediatric acute lymphoblastic leukemia in a tissue specific manner”, J. Hematol. Oncol., vol. 6, no. 1, p. 52, 2013, doi: 10.1186/1756-8722-6-52