



**Universidade de Aveiro**  
**2021**

**Rafael Melo Hirner**    **Uso de sistemas de três fases constituídos por polímeros no pré-tratamento de soro humano**

**Using three-phase systems constituted by polymers in the pretreatment of human serum**





Universidade de Aveiro  
2021

**Rafael Melo Hirner**    **Uso de sistemas de três fases constituídos por polímeros no pré-tratamento de soro humano**

**Using three-phase systems constituted by polymers in the pretreatment of human serum**

Dissertação de mestrado apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia, realizada sob a orientação científica da Doutora Mara Guadalupe Freire Martins, Investigadora Coordenadora do CICECO – Aveiro Institute of Materials, do Departamento de Química, da Universidade de Aveiro e coorientação da Doutora Ana Francisca Osório de Almeida Coelho e Silva, Investigadora Júnior do CICECO – Aveiro Institute of Materials, do Departamento de Química, da Universidade de Aveiro.

Este trabalho foi desenvolvido no âmbito do projeto PTDC/EMD-TLM/3253/2020 (ILSurvive), financiado por fundos nacionais (OE), através da FCT/MCTES.

**FCT**  
Fundação para a Ciência e a Tecnologia  
MINISTÉRIO DA CIÊNCIA, TECNOLOGIA E ENSINO SUPERIOR



**o júri**  
presidente

**Professor Jorge Manuel Alexandre Saraiva**  
Professor Associado, Departamento de Química, Universidade de Aveiro

**Doutora Ana Francisca Osório de Almeida Coelho e Silva**  
Investigadora Júnior, Departamento de Química, Universidade de Aveiro

**Professora Doutora Ana Catarina Almeida Sousa**  
Professora Auxiliar, Departamento de Biologia, Universidade de Évora



## **agradecimentos**

Agradeço à Doutora Mara Freire e à Doutora Francisca Silva pela ajuda e disponibilidade dispensadas para a realização deste trabalho, assim como à Marguerita pela preciosa ajuda no laboratório na realização dos diagramas de fase e nos estudos de depleção de soro. Agradeço também especialmente ao meu pai pela sua perseverança face à sua doença oncológica, doença essa que me levou a optar por este projeto, na expectativa de contribuir para que mais conhecimento seja produzido nesta área e agradeço sobretudo à minha mãe por ter sempre acreditado e nunca desistido de mim.





**palavras-chave**

cancro do pulmão, biomarcadores tumorais, soro humano, depleção, sistemas aquosos bifásicos, sistemas de partição em três fases

**resumo**

Segundo a estimativa realizada pela IARC (Agência internacional para a pesquisa do cancro, do inglês *International Agency for Research on Cancer*) no ano de 2020, o cancro do pulmão mostrou-se como a maior causa de morte oncológica. Isto deve-se ao diagnóstico tardio, e ao risco elevado de reincidência. Face a este cenário, os biomarcadores tumorais séricos podem auxiliar no diagnóstico e contribuir para um melhor método de monitorização e de prognóstico. A identificação destes biomarcadores no soro não só é menos invasiva que biópsias tradicionais, como permite avaliar melhor a capacidade de resposta, de agressividade e de recorrência do cancro em relação ao tipo de terapia. Contudo, o soro humano é uma amostra complexa e com um elevado teor em albumina (HSA, *human serum albumin*) e imunoglobulina G (IgG), as quais podem interferir na deteção dos biomarcadores tumorais. Deste modo, o objetivo desta dissertação é desenvolver sistemas de partição em três fases (SPTFs) a partir de sistemas aquosos bifásicos (SABs) para promover a precipitação das proteínas maioritárias do soro humano e concentrar os biomarcadores do cancro do pulmão numa das fases. Os sistemas estudados foram constituídos por polímeros, nomeadamente polietilenoglicol (PEG) com vários pesos moleculares (600, 1000, 1500 e 2000 g.mol<sup>-1</sup>), polipropilenoglicol (PPG) com um peso molecular de 400 g.mol<sup>-1</sup> e o copolímero de PEG e PPG com um peso molecular de 1900 g.mol<sup>-1</sup> (Pluronic L-35) em combinação com o polieletrólito poliácido de sódio (NaPA) com um peso molecular de 8000 g.mol<sup>-1</sup> e água. Depois da determinação das curvas binodais dos SABs e avaliação do impacto da estrutura e do peso molecular dos polímeros, foi selecionado um ponto de mistura na região bifásica para avaliar o potencial destes sistemas na depleção da HSA e da IgG. Como resultado do efeito hidrofóbico do polímero combinado com o pH do sistema, foi possível obter um rendimento de depleção de 100% para a IgG com o sistema constituído por PEG 1500. Relativamente à depleção simultânea de ambas as proteínas, o sistema mais promissor foi o sistema constituído por Pluronic L-35, alcançando rendimentos de depleção de 42% e de 78% para a HSA e a IgG, respetivamente. Embora sejam necessários estudos adicionais de otimização destes sistemas, bem como a avaliação do comportamento de biomarcadores do cancro do pulmão nos mesmos, é possível concluir que os SABs constituídos por polímeros têm potencial no pré-tratamento de soro humano para fins de diagnóstico.

**keywords**

lung cancer, cancer biomarkers, human serum, depletion, aqueous biphasic systems, three-phase partitioning systems

**Abstract**

According to the estimation made by the IARC (International Agency for Research on Cancer) in the year 2020, lung cancer was shown to be the major cause of death among oncologic diseases. This is due to the late diagnosis, and the high risk of recurrence. Under this scenario, serum tumor biomarkers may help in diagnosis and contribute toward a better method of monitoring and of prognosis. Furthermore, the identification of serum biomarkers is less invasive when compared to typical biopsies and allow to evaluate better the responsiveness, aggressiveness and cancer recurrence in relation to the type of therapy. However, human serum is a complex sample with a high content of albumin (HSA) and immunoglobulin G (IgG), which may interfere with the detection of biomarkers. Thus, the objective of this dissertation is to develop three-phase partitioning systems (TPP) based on aqueous biphasic systems (ABS) to promote the precipitation of the majority of human serum proteins and to concentrate the lung cancer biomarkers in one of the aqueous phases. The systems studied are composed of polymers, namely polyethylene glycol (PEG) bearing several molecular weights (600, 1000, 1500 and 2000 g.mol<sup>-1</sup>), polypropylene glycol (PPG) bearing a molecular weight of 400 g.mol<sup>-1</sup> and the tri-block copolymer composed of PEG and PPG with a molecular weight of 1900 g.mol<sup>-1</sup> (Pluronic L-35), combined with the polyelectrolyte sodium polyacrylate (NaPA) with a molecular weight of 8000 g.mol<sup>-1</sup> and water. After the determination of the ABS binodal curves and the understanding of the impact of both structure and molecular weight of the neutral polymers, a biphasic mixture point that could form an TPP was selected with the aim to evaluate HSA and IgG depletion. As a result of hydrophobic effects caused by the neutral polymer combined with the system pH, a maximum depletion yield of IgG of 100% was achieved with the system formed by PEG 1500. Regarding the simultaneous depletion of both proteins, the most promising system identified was the one composed of Pluronic L-35, which achieved depletion yields of 42% and 78% for HSA and IgG, respectively. Despite the need for additional optimization studies as well as in the evaluation of lung cancer biomarkers behavior in these systems, it is possible to conclude that ABS composed of polymers and polyelectrolytes hold potential in the pretreatment of human serum for diagnostic purposes.

# Índice

1. Introdução Geral .....	1
1.1 Doenças oncológicas e o seu panorama global.....	3
1.2 Cancro do pulmão .....	10
1.2.1. Diagnóstico e prognóstico .....	12
1.2.2. Biomarcadores tumorais .....	13
1.3 Pré-tratamento de amostras biológicas: o caso do soro humano .....	21
1.3.1. Técnicas de pré-tratamento convencionais.....	22
1.3.2. Sistemas aquosos bifásicos e sistemas de partição em três fases .....	26
2. Materiais e métodos.....	30
2.2. Materiais .....	30
2.3. Determinação das curvas binodais.....	30
2.4. Estudos de depleção .....	31
2.5. Quantificação das proteínas .....	31
2.6. Medição do pH das fases dos SABs .....	32
3. Resultados e Discussão.....	33
3.2. Diagramas de fases dos sistemas ternários constituídos por polímero + NaPA + H <sub>2</sub> O	33
3.3. Depleção da HSA e da IgG do soro humano utilizando sistemas constituídos por polímero + NaPA + H <sub>2</sub> O.....	35
4. Conclusão e trabalho futuro.....	38
5. Referências.....	39

## Lista de Figuras

Figura 1 – Representação esquemática da abordagem proposta nesta dissertação relativa à aplicação de SPTFs como potenciais ferramentas para melhorias do diagnóstico do cancro do pulmão.....	3
Figura 2 – Principais características do cancro (adaptado de <sup>25</sup> ). .....	4
Figura 3 - Percentagem de novos casos e mortes associados ao cancro em 2020, em todo o mundo, ambos os sexos, todas as idades. Fonte: Globocan. ....	5
Figura 4 - Percentagem de novos casos e mortes associados ao cancro em 2020, em todo o mundo, homens, todas as idades. Fonte: Globocan.....	6
Figura 5 - Percentagem de novos casos e mortes associados ao cancro em 2020, em todo o mundo, mulheres, todas as idades. Fonte: Globocan.....	6
Figura 6 - Percentagem de novos casos e mortes associados ao cancro em 2020, em Portugal, homens, todas as idades. Fonte: Globocan. ....	7
Figura 7 - Percentagem de novos casos e mortes associados ao cancro em 2020, em Portugal, mulheres, todas as idades. Fonte: Globocan.....	7
Figura 8 – Estratégias de depleção de proteínas maioritárias do soro humano (adaptado <sup>134</sup> ). .....	26
Figura 9– Diagrama de fases para sistemas aquosos bifásicos (adaptado de <sup>171</sup> ). .....	28
Figura 10 – Estruturas químicas e abreviaturas dos polímeros neutros e polieletrólito estudados. ....	30
Figura 11 – Diagramas de fases dos sistemas ternários constituídos por polímero + NaPA 8000 + H <sub>2</sub> O. As linhas correspondem ao ajuste da curva binodal obtido pela equação de Equação 1. ....	35
Figura 12 - Rendimentos de depleção ( $Y_{Prot}$ , %) da IgG e da HSA obtidos utilizando SABs constituídos por diversos polímeros e NaPA 8000.....	36

## Lista de Tabelas

Tabela 1 - Lista de biomarcadores tumorais, o fluído corporal do qual foram extraídos e o cut-off associado ao diagnóstico.( ND= não determinado). .....	15
Tabela 2 - Parâmetros de correlação e respetivos desvios-padrão ( $\sigma$ ) usados para descrever as curvas binodais dos SABs constituídos por polímero + NaPA 8000 obtidas experimentalmente a 25 ° C através da Equação 1.....	34

## Abreviaturas

AKT - Ou proteína quinase B (do inglês, *Protein kinase B*, PKB)

ALK - Quinase do linfoma anaplásico (do inglês, *Anaplastic lymphoma kinase*)

BRICS - Brasil, Rússia, Índia, China e África do Sul (do inglês, Brazil, Russia, India, China, South Africa)

CA125 - Antígeno Cancerígeno-125 (do inglês, *Cancer Antigen 125*)

CB - Azul Cibacron (do inglês, *Cibracon Blue*)

CEA - Antígeno Carcinoembrionário (do inglês, *Carcinoembryonic Antigen*)

CGA - cromogranina A (do inglês, *cromogranine A*)

CNPC - Cancro do pulmão de células não pequenas (do inglês, *Non-Small Lung Cell Lung Cancer*)

COR - Característica de Operação do Receptor

CPC - Cancro do pulmão das células pequenas (do inglês, *Small Lung Cell Lung Cancer*)

CPLL - Biblioteca combinatória de peptídeos ligandos (do inglês, *combinatorial peptide ligand library*)

CRP - Proteína C - reativa (do inglês, *C-reactive protein*)

Cyfra 21-1 – Fragmento da citoqueratina 19 (do inglês, *Cytokeratin Fragmet 21-1*)

DAD - detetor de díodos (do inglês, *diode array detector*)

DALY - Anos de vida ajustados por incapacidade (do inglês *disability-adjusted life years*)

DNA - Ácido Desoxirribonucleico (do inglês, *Deoxyribonucleic Acid*)

DPOC - Doença pulmonar obstrutiva crónica

EGFR - Recetor do fator de crescimento epidérmico (do inglês, *Eepidermal growth factor receptor*)

EML4 - *Echinoderm microtubule-associated protein-like 4*

EUA - Estados Unidos da América

FDA - Administração de medicamentos e alimentos (do inglês, *Food and Drug Administration*)

FISH - hibridização fluorescente *in situ* (do inglês, *fluorescence in situ hybridization*.)

GLOBOCAN - Observatório global do cancro (do inglês, *Global Cancer Observatory*)

HIV - Vírus da Imunodeficiência Humana (do inglês, *Human Immunodeficiency Virus*)

HPLC - Cromatografia líquida de alta eficiência

HSA - Albumina sérica humana (do inglês, *Human Serum Albumin*)

IARC - Agência Internacional para a Investgação do Cancro (do inglês, *International Agency for Research on Cancer*)

IgG - Imunoglobulina G

LC-MS/MS - cromatografia líquida acoplada à espectroscopia de massa em tandem (do inglês, *High-performance Liquid chromatography - mass spectrometry in tandem*)

LDCT - Tomografia computadorizada de baixa intensidade (do inglês, *low dose computed tomography*)

MAPK - Proteína-quinases ativadas por mitógenos (do inglês, *mitogen-activated protein kinase*)

MS - espectrometria de massa (do inglês, *mass spectrometry*)

mTOR - alvo mecanístico da rampicina ou da proteína alvo da rapamicina em mamíferos

NaPA - Poliacrilato de Sódio (do inglês, *sodium polyacrylate*)

NGS - sequenciação da nova geração (do inglês, *Next generation sequencing*.)

NSE - Enolase neuro-específica (do inglês, *Neuron-Specific Enolase*)

OMS - Organização Mundial de Saúde

PEG - Polietilenoglicol

PI3K - Fosfatidilinositol 3-quinase (do inglês, *Phosphoinositide 3-kinase*)

PIB - Produto Interno Bruto

PPG - Polipropilenoglicol

ProGRP - Peptídeo de libertação da Prograstina (do inglês, *Prograstin releasing peptide*.)

PSA - antígeno específico da próstata (do inglês, *Prostate specific antigen*)

PTSD - Stress pós traumático (do inglês, *Post-traumatic stress disorder*)

RAF - Oncogene capaz de transformar fibroblastos em linhas celulares cancerígenas por ação de um Retrovírus (do inglês, *Rapidly Accelerated Fibrosarcoma*)

RAS - Família proteica de GTPases (*Rat sarcoma virus*)

RNA - Ácido Ribonucleico (do inglês, *Ribonucleic Acid*)

RT-PCR - PCR por transcrição reversa (do inglês, *Reverse transcription polymerase chain reaction*)

SABs - Sistemas aquosos bifásicos

SIDA - Síndrome da Imunodeficiência Adquirida

SPTFs - Sistemas de partição em 3 fases

TKI - Inibidor de tirosina quinase (do inglês, *Tyrosine kinase inhibitor*)

## 1. Introdução Geral

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), o cancro é a segunda maior causa de morte a nível mundial <sup>1</sup> e, entre todas as doenças oncológicas, o cancro do pulmão tem-se apresentado como o segundo cancro mais comum (logo a seguir ao da mama) e o mais mortífero, contribuindo para 18,5% do número de mortes por cancro (equivalente a 1.8 milhões de mortes) <sup>2</sup>. Isto deve-se principalmente ao facto de os seus sintomas, nos seus estádios iniciais (e.g., tosse, dispneia, dores no peito, fadiga, hemoptise, perda de peso) serem muito parecidos com algumas doenças respiratórias, tais como a doença pulmonar obstrutiva crónica (DPOC) <sup>3</sup>. Neste sentido, torna-se difícil diagnosticar o cancro do pulmão atempada e corretamente, sendo, na maioria dos casos, apenas identificado em estádios de desenvolvimento mais avançados e dependendo da manifestação de sintomas mais severos <sup>4</sup>. Como consequência, e na maioria dos casos, esta doença só é diagnosticada nos últimos estádios de desenvolvimento, dificultando ou mesmo impossibilitando a remoção cirúrgica do tumor. Ainda, nestas fases, a probabilidade de ocorrência de metástases do carcinoma para outros órgãos mais afastados, como o cérebro e o fígado é maior, o que limita a taxa de sobrevivência dos pacientes <sup>5,6</sup>. Outra das razões que também poderão contribuir para que o diagnóstico seja tão tardio é o facto de este só poder ser realizado de modo definitivo através de biópsia(s). Este método é bastante invasivo e dispendioso e, na maioria das situações, acaba por ser realizado apenas quando o carcinoma já se encontra em estádios muito avançados <sup>4,7,8</sup>.

A deteção e identificação de biomarcadores do cancro do pulmão em fluídos humanos, principalmente em soro, representa uma alternativa viável e menos invasiva para melhorar o diagnóstico e prognóstico <sup>8</sup>. No entanto, devido ao perfil proteico complexo e abundante do soro, a deteção de biomarcadores tumorais proteicos representa um desafio <sup>9</sup>. As proteínas mais abundantes, tais como a albumina do soro humano (HSA) e a imunoglobulina G (IgG), constituem 85% da massa total de proteínas do soro, podendo interferir na deteção e quantificação das proteínas menos abundantes <sup>10</sup>. Neste sentido, é necessário uma etapa de pré-tratamento do soro humano capaz de remover as proteínas mais abundantes e purificar o biomarcador de interesse, permitindo a sua quantificação fidedigna e evitando resultados falsos negativos ou falsos positivos <sup>10-12</sup>. Contudo, as técnicas convencionais de pré-tratamento de soro utilizadas atualmente são limitadas por terem procedimentos complexos, demorados e não padronizados, bem como por serem dispendiosos, ou por terem pouca capacidade de volume de amostra. Além disso, apresentam desvantagens ao nível da

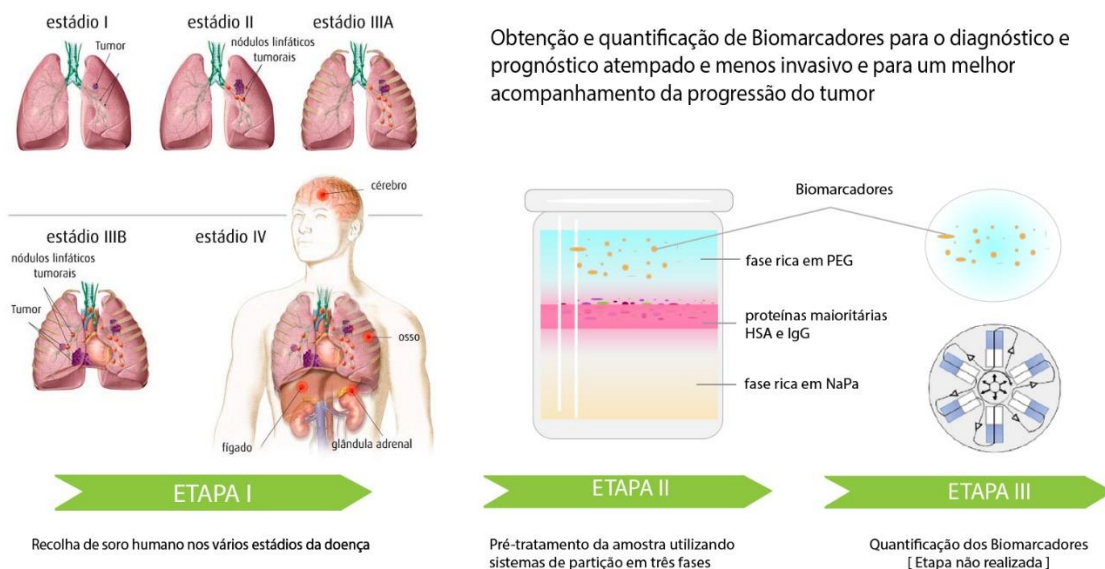


especificidade das interações, o que leva a que existam perdas do biomarcador de interesse e/ou que se altere a sua estabilidade/estrutura/atividade<sup>13-21</sup>.

De forma a melhorar o diagnóstico e prognóstico do cancro do pulmão através da deteção de biomarcadores presentes em fluidos humanos, o objetivo desta dissertação consiste no desenvolvimento de sistemas de partição em três fases (SPTFs) como técnica de pré-tratamento e soro humano. O desenvolvimento destes sistemas terá por base a utilização de sistemas aquosos bifásicos (SABs), nos quais se pretende obter duas fases aquosas, que permitam a concentração do biomarcador de interesse, e uma interfase sólida, onde as proteínas maioritárias são removidas por precipitação. Para a formulação desta técnica de pré-tratamento, serão utilizados componentes de baixo custo e elevada bicompatibilidade, nomeadamente água, polímeros neutros [polietilenoglicol (PEG), polipropilenoglicol (PPG) e copolímero em bloco de PEG e PPG (Pluronic®)] e polieletrólitos [poliacrilato de sódio (NaPA)]. Para cumprir o objetivo proposto, esta dissertação divide-se em três partes:

- I. Revisão bibliográfica das temáticas envolvidas nesta dissertação, explicando o impacto societal da doença, o papel dos biomarcadores proteicos no diagnóstico/prognóstico e as principais técnicas usadas no pré-tratamento da amostra.
- II. Determinação dos diagramas de fase dos SABs formados por PEG, PPG e Pluronic® juntamente com NaPA de forma a identificar misturas que permitam a formação de SAB.
- III. Estudo da capacidade dos vários SABs em formar SPTFs aquando da adição de soro humano, bem como do seu desempenho na precipitação das proteínas abundantes de soro humano comercial (HSA e IgG) na interfase.

O potencial dos sistemas de três fases para melhorar o diagnóstico e prognóstico do cancro do pulmão através da depleção das proteínas maioritárias do soro humano antevisto nesta dissertação encontra-se sumariado na *Figura 1*.



*Figura 1 – Representação esquemática da abordagem proposta nesta dissertação relativa à aplicação de SPTFs como potenciais ferramentas para melhorias do diagnóstico do cancro do pulmão.*

## 1.1 Doenças oncológicas e o seu panorama global

As doenças oncológicas abrangem um grupo diverso e extenso de doenças, sendo que existem mais de 100 tipos de cancro consoante o tipo de célula e tecido onde se desenvolve<sup>22</sup>. Estas doenças compartilham oito características marcantes, tal como apresentado na *Figura 2*: (i) sustentação de vias de sinalização proliferativas; (ii) evasão de supressores de crescimento; (iii) ativação de invasão e metástase; (iv) imortalidade replicativa; (v) capacidade de angiogénese; (vi) de resistência à apoptose; (vii) reprogramação do metabolismo energético; e (viii) evasão da destruição imunológica<sup>23</sup>. O processo de oncogénese resulta do culminar de danos irreversíveis no DNA, acumulados e não reparados ao longo do tempo<sup>24</sup>. Existem duas famílias de genes que determinam tanto o surgimento de tumores como a sua proliferação: os oncogenes, genes que após processos de mutação, promovem a proliferação descontrolado das células e as convertem em células tumorais, e os genes supressores de tumores, como por exemplo, o gene TP53 responsável pela síntese de proteína p53, responsáveis pela regulação da divisão celular e da reparação do DNA e pelo controlo da apoptose celular, que, quando mutados poderão resultar na proliferação descontrolada das células<sup>22</sup>. Estes danos podem ter origem em diferentes fatores, como dieta desequilibrada, estilo de vida sedentário, excesso de exposição à radiação (e.g., UV, Raio-X, Gama, etc.), a poluentes ambientais e ao tabaco ou devido a fatores biológicos como

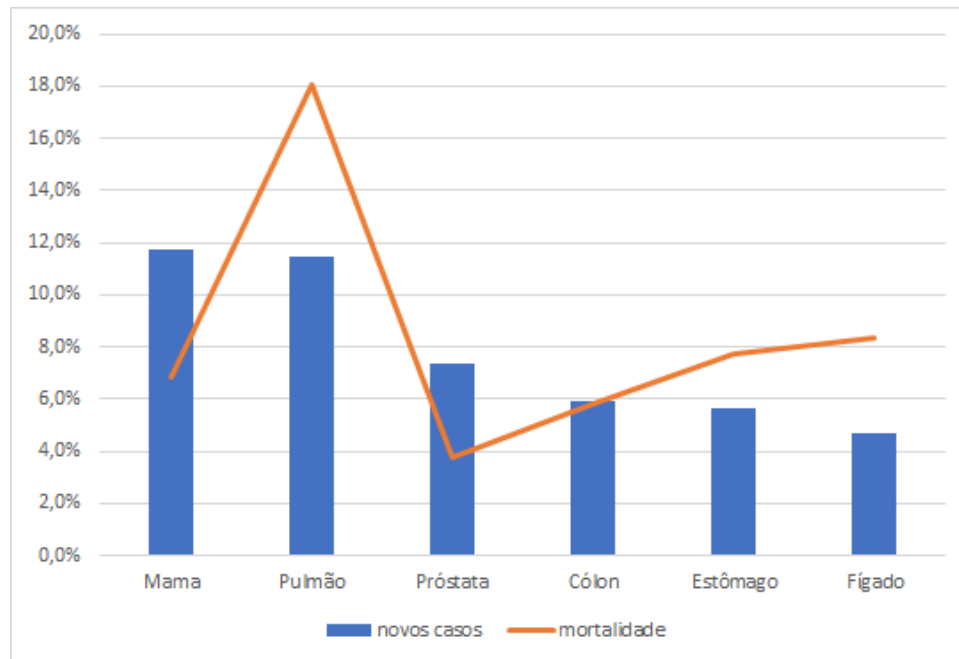
exposição a vírus, bactérias e parasitas, fatores esses geralmente potenciados pelas condições genéticas do indivíduo <sup>24</sup>.



*Figura 2 – Principais características do cancro (adaptado de <sup>23</sup>).*

Segundo vários estudos realizados pela Agência Internacional para a Investigação do Cancro (IARC, do inglês “International Agency for Research on Cancer”), consta que a incidência do cancro tem aumentado ao longo dos anos <sup>25</sup>. A nível mundial, foram registados 12,7 milhões de novos casos e 7,6 milhões de mortes por cancro em 2008 <sup>26</sup>. Em 2012, foram registados 14,1 milhões de novos casos e 8,2 milhões de mortes e, em 2018, registaram-se 18,1 milhões de novos casos e 9,6 milhões de mortes <sup>27</sup>. Em 2020, foram registados 18,0 milhões de novos casos e 9,8 milhões de mortes <sup>2</sup>. Estima-se que estes valores venham a duplicar em 2040 e que este aumento seja mais acentuado nos países de baixo e médio rendimento per capita <sup>25</sup>. De acordo com a estimativa realizada pela IARC para o ano de 2020 (GLOBOCAN 2020), e tal como demonstrado na *Figura 3*, constatou-se que o cancro do pulmão constituiu 11,4 % dos novos casos de cancro a nível global, o que correspondeu ao 2º

cancro com maior nível de incidência. Ainda, o cancro do pulmão apresentou-se como a principal causa de morte devido ao cancro, correspondendo a cerca 18,0% das mortes registadas por cancro em 2020, traduzidas em 1.8 milhões de mortes <sup>2</sup>.



*Figura 3 - Percentagem de novos casos e mortes associados ao cancro em 2020, em todo o mundo, ambos os sexos, todas as idades. Fonte: Globocan.*

Comparando as *Figuras 4 e 5* pode verificar-se que a população masculina foi a mais afetada, com o cancro do pulmão a representar 21,5% do número total de mortes por cancro, enquanto que na população feminina esse valor ficou pelos 13,7% das mortes, abaixo dos 15,5% registado pelo cancro da mama <sup>28</sup>.

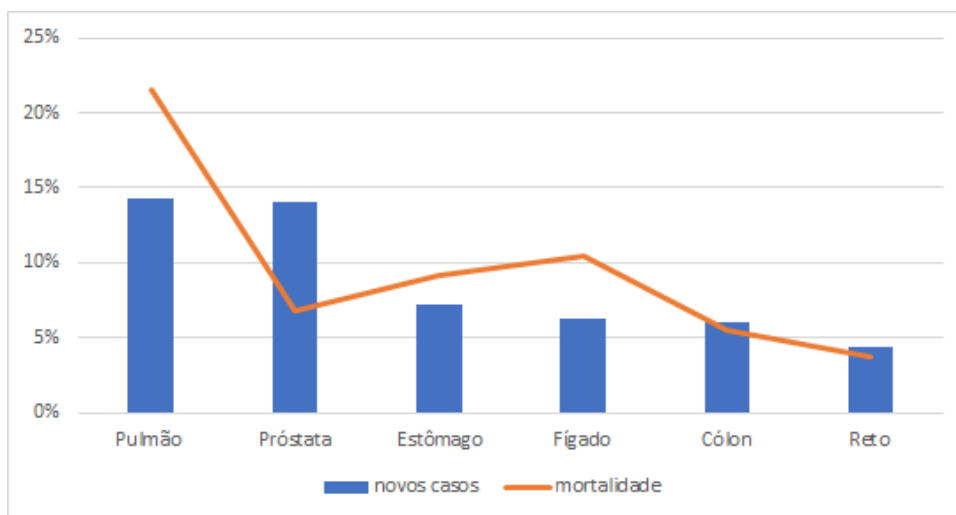


Figura 4 - Percentagem de novos casos e mortes associados ao cancro em 2020, em todo o mundo, homens, todas as idades. Fonte: Globocan.

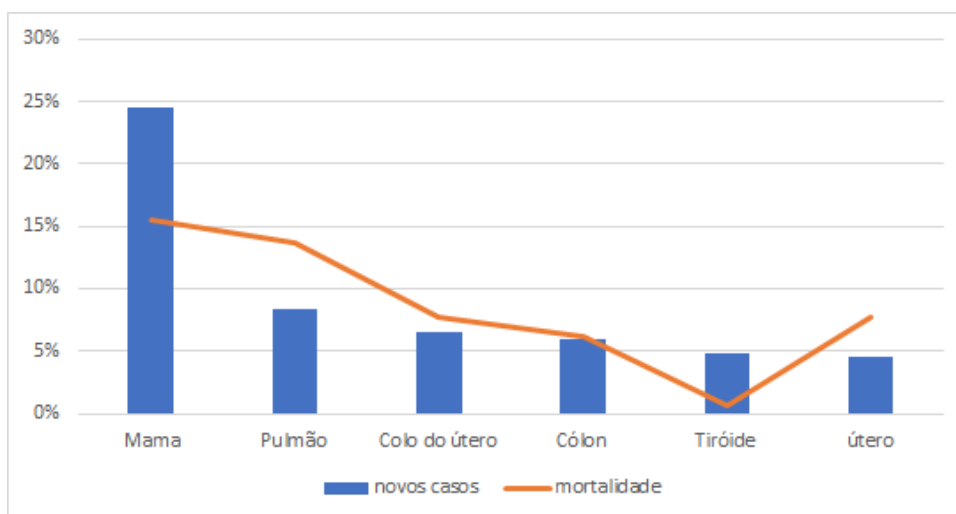


Figura 5 - Percentagem de novos casos e mortes associados ao cancro em 2020, em todo o mundo, mulheres, todas as idades. Fonte: Globocan.

Portugal seguiu esta mesma tendência, como pode ser verificado nas Figuras 6 e 7, com o cancro da próstata e do pulmão a representar o maior número de incidências no homem, sendo o cancro do pulmão muito mais mortífero, com uma taxa de mortalidade de 20%, muito próximo da taxa de mortalidade a nível mundial (21%). Também em Portugal, os homens foram mais afetados do que as mulheres pelo cancro do pulmão, registando o dobro do número de novos casos (12%)<sup>29</sup>.

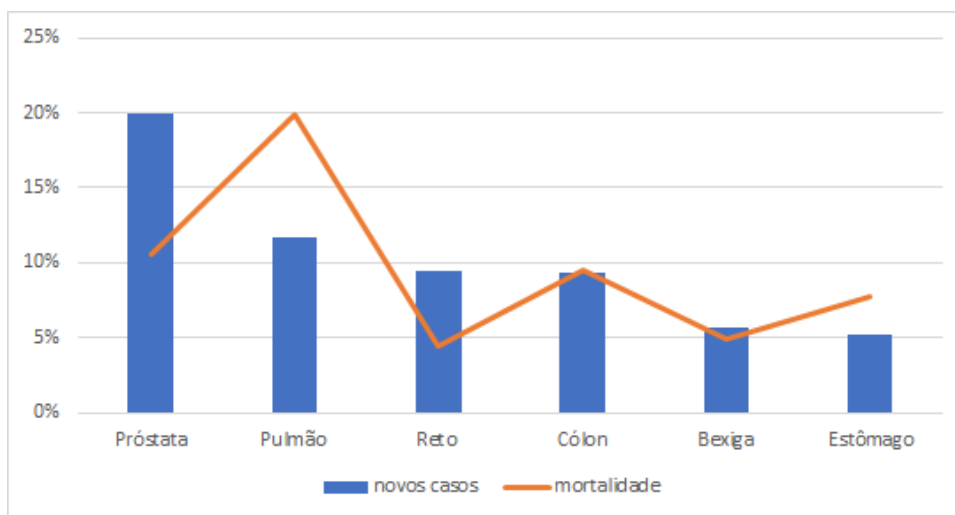


Figura 6 - Percentagem de novos casos e mortes associados ao cancro em 2020, em Portugal, homens, todas as idades. Fonte: Globocan.

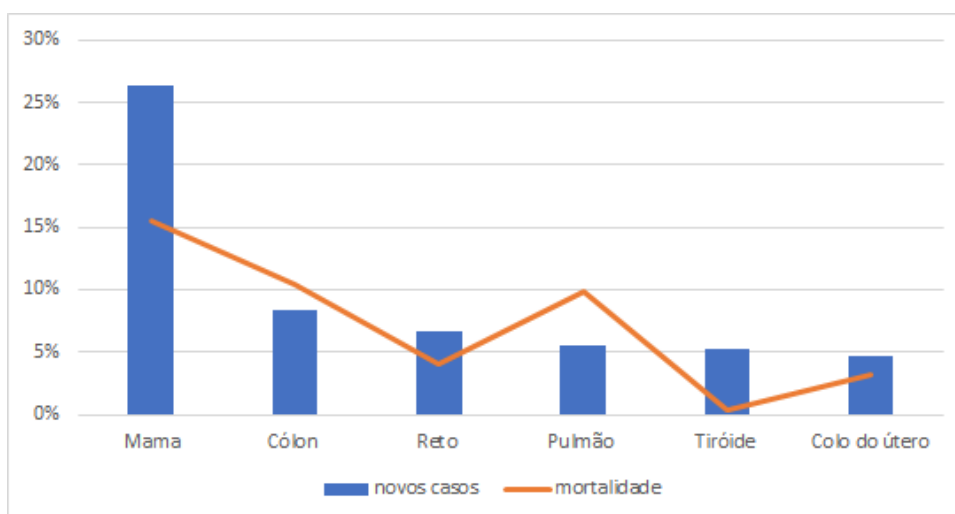


Figura 7 - Percentagem de novos casos e mortes associados ao cancro em 2020, em Portugal, mulheres, todas as idades. Fonte: Globocan.

No total de ambos os sexos, em Portugal o cancro do cólon e reto (17.4%) seguido da mama (11.6%), da próstata (11.2%) e do pulmão (5.6%) ocuparam os primeiros 4 lugares em termos de novos casos. Já na taxa de mortalidade os cancros mais mortíferos foram o do pulmão (15.9%) seguido do cólon e reto (14.3%), do estômago (7.7%) e da próstata (6.4%)<sup>29</sup>.

Segundo um estudo realizado pela American Cancer Society e pela Livestrong Foundation em 2008, as doenças oncológicas mostraram-se não só como uma das principais causas de morte no mundo, como também mostraram ser o grupo de patologias com o maior impacto económico, ultrapassando qualquer outra causa de morte prematura ou debilidade<sup>30</sup>.

Estima-se que em 2008 o cancro tenha tido um custo de 895 mil milhões de dólares, o que corresponde a 1,5% do produto interno bruto (PIB) mundial, sendo que neste valor não foram contabilizados quaisquer custos médicos diretamente associados ao tratamento. Ainda, o custo financeiro associado também não foi distribuído de modo equitativo universalmente <sup>30</sup>. Por exemplo, os Estados Unidos obtiveram a maior perda em termos absolutos, correspondendo a 1,73% do seu PIB, enquanto que noutros países com menor população e menor poder económico, como a Hungria, foi registada uma perda relativa de 3,05% do seu PIB. De salientar que numa análise que englobou 25 dos 188 países pertencentes à OMS foram registadas perdas superiores a 2% do seu PIB <sup>30</sup>. De todos os tipos de cancro analisados nesse estudo, constatou-se que o cancro do pulmão foi o que causou mais danos económicos a nível global, com 180 mil milhões de dólares, constituindo mais do dobro dos custos associados ao cancro do cólon (99 mil milhões de dólares) e da mama (88 mil milhões de dólares)<sup>22,30</sup>. Dois anos mais tarde, estudos relatados no World Cancer Report <sup>31</sup> estimaram que o custo global do cancro fosse na ordem dos 1,16 mil milhões de dólares, o que corresponderia a cerca de 2% do PIB mundial. Neste relatório, estavam considerados tanto o custo económico anual de anos de vida ajustados à deficiência (DALYs, do inglês “Disability-Adjusted Life Year”), bem como os anos de vida saudável perdidos devidos à incapacidade física. Estimou-se um total de 921 mil milhões de dólares perdidos <sup>32</sup>. Ao considerar os custos associados ao tratamento de novas incidências do cancro em si, previu-se um valor de 310 mil milhões de dólares perdidos <sup>33</sup>. Dentro deste custo, estimou-se que o custo de prevenção fosse apenas 7% do custo associado ao tratamento.

Estudos mais recentes, mas com menos países inquiridos, estimaram que os grandes blocos económicos como os BRICS perderam cerca 46,3 mil milhões de dólares (cerca de 0,2 a 0,5% do seu PIB) em 2012 <sup>34</sup>, 80,2 mil milhões de dólares nos EUA em 2015, tornando-se a sexta condição de saúde com maior custo económico, depois de doenças mentais, doenças cardíacas, PTSD e osteoartrite <sup>35</sup>. Finalmente, segundo o Cancer Atlas, que teve como objeto de estudo o ano de 2017, verificou-se que o impacto económico do cancro nos EUA aumentou de 80,2 mil milhões para 161,2 mil milhões de dólares (cerca de 1,8% do PIB) em 2 anos, dos quais 150,7 mil milhões foram atribuídos a questões de morbilidade. Na União Europeia, e de acordo com a mesma fonte, o custo associado à morte por cancro foi de 10,6 mil milhões de euros e à morte prematura foi de 47,9 mil milhões de euros, tendo o total dos custos equivalente a 141,8 mil milhões de euros ou 1,07% do PIB <sup>36</sup>. Além da sua elevada incidência e mortalidade, bem como do elevado impacto económico para a sociedade, o cancro afeta tanto a esperança média de vida, como a qualidade de vida do paciente. A progressão da

doença conduz invariavelmente à redução da esperança de vida, mas os tratamentos habituais, quimioterapia, radioterapia ou cirurgia, podem reduzir consideravelmente a qualidade de vida, deixando o paciente com várias sequelas, muitas vezes interferindo na sua autonomia <sup>37</sup>.

O cancro do pulmão, em particular, está associado a sintomas como a fadiga, perda de peso, falta de ar, tosse persistente e tosse com sangue <sup>38</sup>. Para além disso, independentemente da terapia realizada, seja remoção cirúrgica, radioterapia, quimioterapia ou imunoterapia o paciente sentirá sempre algumas consequências negativas. No caso de remoção cirúrgica, o paciente poderá ficar debilitado para o resto da vida, uma vez que esta poderá resultar na perda considerável de área superficial pulmonar, assim como na perda de tecido ósseo e muscular na zona de remoção <sup>39</sup>. No caso de radioterapia ou quimioterapia, este poderá vir a sofrer desde fadiga, perda de apetite, náuseas e vômitos, perda de cabelo, perda de peso e atrofia muscular <sup>40,41</sup>. Mesmo no caso de imunoterapia, esta abordagem poderá causar fadiga, náuseas, perda de apetite, comichão, tosse e diarreia, e nos casos mais graves febre, erupções cutâneas, ou reações autoimunes, o que poderá resultar em graves danos em outros órgãos do corpo <sup>42</sup>. Para além dos danos físicos associados e anteriormente referidos, o diagnóstico mais tardio faz com que a taxa global de sobrevivência aos 5 anos seja bastante baixa. Em termos de comparação, a taxa de sobrevivência tem tido uma evolução pouco notória, de 13% em 1975 para apenas 16% em 2009. Este valor equivale a um aumento de apenas 1% a cada 10 anos, o que é muito pouco significativo quando comparado a outros tipos de cancros, tais como os da próstata (99%), do testículo (96%), e da mama (89%), bem como na generalidade dos cancros (66%) <sup>43</sup>. Vários problemas de saúde mental podem estar associados ao cancro do pulmão, quer devido a mau prognóstico, quer pela má qualidade de vida antes e depois do tratamento. De facto, o cancro do pulmão está normalmente associado a maiores níveis de ansiedade e depressão, ao ponto de se tornar o tipo de cancro mais propício ao suicídio <sup>44,45</sup>. Para além disso, o impacto financeiro tanto do diagnóstico como da terapia pode ser tremendo: por exemplo, nos EUA, uma cirurgia pode chegar a custar 30 096 dólares, e os custos de uma radioterapia/quimioterapia estão compreendidos entre 4242 e 8287 dólares por mês <sup>46</sup>; já na Europa, a média de custo de tratamento para tumores em estádios mais avançados é de 2644 euros sem contar com o suporte financeiro governamental, à qual soma um total de 5691 euros <sup>47</sup>.



## 1.2 Cancro do pulmão

É classificado como cancro do pulmão qualquer tipo de cancro que tenha o seu início no pulmão e não qualquer cancro que tenha realizado metástase para o pulmão, sendo que existem dois principais tipos de cancro de pulmão à qual são associadas terapias bastante diferentes. Os carcinomas pulmonares podem classificar-se em duas grandes classes, nomeadamente o cancro do pulmão das células não pequenas (CNPC) e o cancro do pulmão das células pequenas (CPC).

O CNPC constitui cerca de 80 a 85% das incidências <sup>48</sup> e é caracterizado por se desenvolver em 4(+2) estádios segundo o sistema de classificação TNM (Tumor, Lymph Node, Metastasis) proposto pela “American Joint Committee on Cancer”. Este sistema de informação baseia-se em três tipos de informação, nomeadamente o tamanho e extensão do tumor em outros tecidos, estruturas ou órgãos (T), o grau de metástase nos gânglios linfáticos (N) e o grau de metástase para outros órgãos mais distantes como o outro pulmão, o cérebro, ossos, glândulas suprarrenais e fígado (M). Os vários tipos de CNPC costumam ser classificadas em conjunto uma vez que partilham o mesmo padrão de desenvolvimento e por terem terapias e prognósticos semelhantes; no entanto, podem dividir-se em três categorias consoante o tamanho, local, tecido ou morfologia, nomeadamente adenocarcinoma, carcinoma das células escamosas e carcinoma das células grandes.

O adenocarcinoma inicia-se normalmente nas células secretoras de substâncias, tais como células acinares, papilares, bronco-alveolares, ou secretoras de muco <sup>39</sup>. Há quatro subcategorias de adenocarcinomas, nomeadamente adenocarcinoma in situ, adenocarcinoma minimamente invasivo, carcinoma invasivo e outras variantes do adenocarcinoma <sup>39</sup>. De todos os subtipos de carcinoma pulmonar das células não pequenas, o adenocarcinoma é o carcinoma mais frequentemente encontrado em não-fumadores, ainda que hábitos tabagísticos sejam a sua maior causa de incidência <sup>39,48</sup>. Os fatores de risco podem estar associados ao histórico familiar do paciente, bem como à exposição a sílica, amianto, radão, metais pesados e fumos <sup>39</sup>. Apesar de ser uma doença bastante heterogénea a nível biológico, histológico e genético, sendo resultado da acumulação de mutações tanto genéticas como epigenéticas, o adenocarcinoma costuma estar relacionado a mutações no gene p53. As mutações ao nível deste gene são responsáveis por cerca dos 52% dos carcinomas pulmonares das células não pequenas registados em não fumadores <sup>49</sup>. A não ser que este carcinoma seja detetado ainda no seu primeiro estágio de desenvolvimento, o adenocarcinoma poderá ter um pior prognóstico do que o carcinoma das células escamosas <sup>39</sup>.

O carcinoma das células escamosas, também conhecido como carcinoma epidermal, começa nas células escamosas situadas nos brônquios<sup>50</sup>. Corresponde a cerca de 30% de todos diagnósticos de câncros pulmonares e é o mais associado a fumadores dentro dos carcinomas das células não pequenas<sup>51</sup>. A etiologia associada a este tipo de carcinoma são, nomeadamente, a exposição ao tabaco, consumo de psicotrópicos, inflamações pulmonares associadas a pneumonia ou tuberculose, exposição a certos químicos como o amianto, pó de talco, gasolina, arsénio e radão<sup>52</sup>. Pelo facto deste carcinoma começar nos brônquios, a propagação para o resto do corpo em comparação com outros tipos de carcinoma torna-se mais difícil. Pelo facto deste estar localizado nos brônquios (e não na parte periférica dos pulmões) onde o tumor pode obstruir as vias respiratórias, o paciente começa a ter sintomas mais cedo, permitindo, então, um diagnóstico mais precoce da doença<sup>50</sup>. Ainda assim, 75% dos casos só são diagnosticados após verificação de metástases<sup>50</sup>.

Ao contrário dos carcinomas mencionados anteriormente, o cancro do pulmão das células grandes (ou indiferenciado) pode aparecer em qualquer parte do pulmão e é caracterizado por ser um neoplasma maligno grande, que ao contrário dos demais carcinomas de células não pequenas, não apresentam diferenciação. Estes são caracterizados por se reproduzirem de uma forma caótica e incontrolável, conduzindo a necroses muito frequentes, originando uma resposta inflamatória mais forte e representam cerca de 10 a 20% de todos os carcinomas pulmonares registados, estando normalmente associados a grupos de maior faixa etária, com uma idade mediana de 60. Tal como os outros carcinomas anteriormente mencionados, está também altamente associado a hábitos de tabagismo. É caracterizado pela ausência de sintomas, aquando do seu surgimento na periferia do pulmão, normalmente anexados à pleura. A partir daí, invadem os órgãos adjacentes, não apresentando grande envolvimento com os brônquios, ao contrário dos carcinomas epidermais anteriormente mencionados<sup>53</sup>.

Por sua vez, os carcinomas das células pequenas correspondem apenas a 10 a 15% dos carcinomas registados<sup>48</sup>, sendo considerado um carcinoma neuroendócrino dado as suas células possuírem características tanto de células neuronais como de células endócrinas. Este tipo de carcinoma tem uma maior capacidade de crescimento e proliferação em relação aos carcinomas das células não pequenas e descritos acima. Por isso, apesar do sistema de classificação TNM poder ser utilizado para descrever a progressão dos seus estádios, o sistema da “Veterans Administration Small Cell Lung Cancer Staging” que considera apenas dois estádios é suficiente na maioria dos casos<sup>54</sup>. No estádio limitado, este carcinoma é caracterizado pelo facto de estar limitado, de tal forma que é possível ser tratado com um único

feixe de radiação <sup>55</sup>. Por outro lado, no estágio extenso, que constitui cerca de 2/3 dos diagnósticos <sup>55,56</sup>, este tipo de tumor é caracterizado por metástases em todo o pulmão, no outro pulmão, bem como em gânglios linfáticos e medula óssea. Desta forma, é normal recorrer-se ao uso combinado da radioterapia e da quimioterapia como tratamento. Apesar deste carcinoma ser bastante sensível tanto à radioterapia como à quimioterapia por causa da sua alta recorrência <sup>57</sup>, tem também uma capacidade de crescimento e proliferação elevada e não provoca sintomas até aos estádios mais tardios <sup>58</sup>. Assim, os carcinomas das células pequenas apresentam taxas de sobrevivência a 5 anos bastante baixas: 27% caso o carcinoma não se tenha espalhado fora do pulmão; 16% caso já se verifiquem metástases; e 3 % caso e verifiquem metástases para órgãos distantes <sup>59</sup>.

Para além dos tipos de cancro previamente apresentados, existem outros tipos de tumores que podem afetar o pulmão. Estes podem resultar de uma metástase de outros cancros, como exemplo, o cancro da mama, do pâncreas, da pele ou do rim, ou de carcinóides pulmonares, que têm como ponto de partida as células neuroendócrinas dos pulmões. Contudo, estes correspondem a apenas 5% dos tumores pulmonares registados, e costumam ter mais dificuldade em metastizar o resto do corpo <sup>60</sup>.

#### 1.2.1. Diagnóstico e prognóstico

Como já foi referido anteriormente, o cancro do pulmão é, na maioria das vezes, diagnosticado em estádios tardios. Por exemplo, a deteção do carcinoma pulmonar das células não pequenas é apenas efetuada nos estádios III e IV em 80% das situações <sup>5</sup>. Isto significa que, na maioria das situações, a taxa de sobrevivência a 5 anos seja entre 0 a 41% <sup>61</sup>. Normalmente, as primeiras evidências da existência de um carcinoma pulmonar são encontradas através de testes imagiológicos <sup>62</sup>. Isto porque estes permitem detetar a localização do (possível) tumor, o seu grau de metástase, e eficácia da terapia <sup>55</sup>. Frequentemente, a primeira triagem é efetuada através de uma radiografia torácica devido ao facto desta ser mais simples, rápida, barata e acessível/disponível <sup>62</sup>. No entanto, existem evidências de que esta técnica já se encontra desatualizada quando comparada com outras técnicas como a tomografia computadorizada de baixa intensidade (LDCT, do inglês “low dose computed tomography”) <sup>11</sup>. A LDCT está associada a uma redução da taxa de mortalidade de 20% <sup>63,64</sup>, uma vez que permite obter uma série de imagens transeccionais, que não só permitem circundar a obstrução de estruturas circundantes aos nódulos pulmonares, como obter um melhor contraste com o parênquima, permitindo assim um diagnóstico mais precoce <sup>55</sup>. Para além disso, devido à obtenção de uma imagem tridimensional do nódulo, a

LDCT permite ainda ter um prognóstico mais preciso <sup>65</sup>. No entanto, existem várias limitações associadas à LDCT, tais como a existência de falsos positivos <sup>11</sup>, devido à dificuldade em distinguir entre tumores malignos e benignos. Consecutivamente, este tipo de resultados conduzem a testes e procedimentos adicionais (normalmente, invasivos e/ou não necessários), aumentando o custo associado e questões de ansiedade <sup>12</sup>. A LDCT pode também conduzir a falsos negativos, que podem atrasar ou até impedir qualquer diagnóstico ou tratamento posterior. Ainda, o sobrediagnóstico, ou seja, diagnóstico de uma doença não perigosa para o paciente, pode originar custos desnecessários e um impacto negativo na qualidade de vida dado a execução de uma terapia desnecessária ou ainda dado à exposição do paciente a radiação desnecessária. Analogamente, a ocorrência de resultados inconclusivos pode também conduzir à necessidade de efetuar testes adicionais e afetar a qualidade de vida <sup>12</sup>.

No entanto, qualquer técnica imagiológica, como a tomografia por emissão de positrões ou por ressonância magnética, ainda que permitam detetar a localização do tumor, o seu grau de metástase e a eficácia da terapia, não fornecem um diagnóstico, pois nenhuma técnica imagiológica permite determinar a natureza do nódulo <sup>66</sup>. Apenas com a análise citológica e bioquímica é possível realizar o diagnóstico e o prognóstico. Estas técnicas permitem, por exemplo, proceder à classificação dos subtipos de carcinomas de células não pequenas através da sua análise ao microscópio. No entanto, certas células do carcinoma de células não pequenas são frequentemente difíceis de distinguir no seu estágio mais indiferenciado ao microscópio (nomeadamente entre as células escamosas e as do adenocarcinoma). Torna-se, assim, necessário integrar a sua análise morfológica com a sua análise bioquímica. A integração destas abordagens ajuda a revelar o subtipo de carcinoma em análise, a identificar o estágio e grau de desenvolvimento e a monitorizar o resultado da terapia e prever a recorrência da doença. No entanto, as técnicas de diagnóstico convencionais para o cancro do pulmão são ainda invasivas, uma vez que requerem no mínimo a recolha de efusão da pleura ou fluído broncoalveolar, realizado através de uma biópsia<sup>67</sup>.

Desta forma, é necessário criar técnicas de rastreio que permitam um diagnóstico mais atempado e menos invasivo do cancro do pulmão, bem como um prognóstico mais correto. Neste sentido, a utilização de biomarcadores tumorais pode ser considerada uma alternativa viável.

### 1.2.2. Biomarcadores tumorais

O conceito de biomarcadores relaciona-se com a análise de biomoléculas (e.g., ácidos nucleicos, proteínas) em tecidos e fluidos humanos (e.g., principalmente sangue) e a relação

dos seus níveis nestas amostras com qualquer doença ou outro processo <sup>68,69</sup>. Estes podem ser usados no contexto clínico para refinar a avaliação do risco de ocorrência de uma dada doença, possibilitar um diagnóstico mais precoce e um prognóstico mais eficaz e ajudar na tomada de decisões médicas.

No contexto do cancro, os biomarcadores são moléculas que resultam do metabolismo e secreção de tecido neoplásico, permitindo distinguir essa perturbação em relação ao metabolismo no estado saudável. Tal como a generalidade dos biomarcadores, os biomarcadores tumorais podem estar presentes em fluídos corporais (e.g., plasma/soro humano, efusão da pleura, esputo, urina, saliva) e podem pertencer a diversas classes de biomoléculas, tais como proteínas (sendo estas o método recomendado pela FDA <sup>70</sup>), cadeias de DNA/DNA metilado, RNA, microRNAs, oligossacarídeos, lípidos e outros metabolitos <sup>71-73</sup>. O carácter promissor dos biomarcadores tumorais reside no fácil acesso aos fluídos corporais e ao facto de permitem diagnósticos e prognósticos mais rápidos, fidedignos e menos invasivos. No caso da análise de biomarcadores tumorais proteicos, os mais comuns são glicoproteínas presentes no sangue. Contudo, com os avanços científicos e tecnológicos na área da proteómica, tornaram possível a descoberta de inúmeras proteínas presentes nos fluidos corporais que poderão servir como biomarcadores novos e promissores para diversos tipos de cancro. Em particular para o cancro do pulmão, têm sido reportados vários biomarcadores promissores, os quais poderão contribuir para um diagnóstico e prognóstico melhor <sup>73</sup>. De salientar que esta diversidade de biomarcadores reportados até ao momento e a possibilidade de serem usados em conjunto pode também ajudar a ultrapassar problemas associados à baixa sensibilidade e especificidade proveniente do uso de apenas um único biomarcador <sup>68,74</sup>.

Os biomarcadores proteicos mais frequentemente reportados no diagnóstico, avaliação de risco de recorrência, prognóstico e auxílio na escolha da terapia do cancro do pulmão são a quinase do linfoma anaplásico (ALK, do inglês “Anaplastic lymphoma kinase”), o recetor do fator de crescimento epidérmico (EGFR, do inglês “epidermal growth factor receptor”), o antígeno carcinoembrionário (CGA, do inglês “carcinoembryonic antigen”), o antígeno de carcinoma de células escamosas (SCCA, do inglês “squamous cell carcinoma antigen”), a enolase neuro-específica (NSE, do inglês “neuron-specific enolase”) e o cyfra 21-1. As principais características de cada um destes biomarcadores encontram-se sumariadas na *Tabela 1*.

Tabela 1 - Lista de biomarcadores tumorais, o fluido corporal do qual foram extraídos e o cut-off associado ao diagnóstico.( ND= não determinado).

Biomarcador	Fluido corporal	Cut-off (ng/mL) a 95% de especificidade
ALK	Sangue	ND
EGFR	Sangue <sup>75</sup> , fluido broncoalveolar <sup>76</sup>	56,87 <sup>75</sup>
CEA	Sangue <sup>75</sup> , efusão pleural <sup>77</sup> , esputo <sup>78</sup> , fluido broncoalveolar <sup>79</sup>	5,0 <sup>80</sup>
SCCA	Sangue <sup>75</sup> , efusão pleural <sup>77</sup> , fluido broncoalveolar <sup>79</sup>	1,50 <sup>80</sup>
NSE	Sangue <sup>75</sup> , efusão pleural <sup>77</sup> , esputo <sup>78</sup> , fluido broncoalveolar <sup>79</sup>	12,50 <sup>80</sup>
Cyfra 21-1	Sangue <sup>75</sup> , efusão pleural <sup>77</sup> , esputo <sup>78</sup> , fluido broncoalveolar <sup>79</sup>	3,3 <sup>80</sup>

A quinase do linfoma anaplásico (ALK) é um recetor de tirosina quinase, membro da superfamília de recetores de insulina. O gene ALK está localizado no braço curto do cromossoma 2 na posição 23<sup>81</sup>. O rearranjo deste gene ALK foi originalmente identificado em células grandes anaplásicas do linfoma<sup>82</sup> e foi subsequentemente descrito num subconjunto de tumores de carcinoma de células não pequenas que abrigam a fusão de genes ALK e de genes semelhantes ao gene EML4 (do inglês “echinoderm microtubule-associated protein-like 4”) <sup>83</sup>. Este rearranjo codifica para uma proteína quimérica com atividade de quinase constitutiva que origina reações a jusante que promovem o crescimento e proliferação de tumores malignos<sup>82</sup>. Esta fusão dos genes EML4-ALK foi detetada em apenas 3,7% a 7% dos carcinomas das células não pequenas geralmente em adenocarcinomas e em pacientes jovens não fumadores<sup>82,84</sup>. Existem várias variantes deste rearranjo, assim como a fusão menos frequente do gene ALK com outros genes sob a forma de oncogenes<sup>81,85</sup>. Por sua vez, a fusão deste gene (ALK) torna a quinase resultante como um alvo preferencial para os inibidores de ALK, tais como o crizotinib, com uma taxa de sucesso de 57 a 74%. O uso deste inibidor por sua vez tem demonstrado uma taxa livre de progressão média significativamente superior a pacientes que tenham recebido apenas quimioterapia<sup>86</sup>, tornando o teste para rearranjos do gene ALK mais recomendado para pacientes que sofram com adenocarcinoma avançado<sup>84,87</sup>. No entanto, apesar do sucesso inicial associado a este inibidor, existe uma fração de pacientes que sofrem mutações secundárias dentro do domínio da quinase EML4-ALK que resultam na resistência a este inibidor<sup>88,89</sup>. Por isso, os inibidores de ALK de segunda geração, tais como a alectinib, a ceritinib e o AP 26133, estão a ser desenvolvidos e avaliados<sup>89</sup>. Entre os métodos de diagnóstico atuais usados para deteção da fusão do gene ALK existe a hibridização fluorescente *in situ* (FISH, do inglês “fluorescence in situ

hybridization”) de ruptura, técnicas imuno-histoquímicas e o uso da RT-PCR (do inglês “real-time polymerase chain reaction”) <sup>89</sup>, tendo sido o primeiro considerado como o método padrão para triagens clínicas <sup>90</sup>. Existem vários relatórios que mostram a concordância entre as técnicas imunohistoquímicas e a técnica FISH, especialmente com o desenvolvimento de anticorpos (clones 5A4 e D5F3) com maior sensibilidade e especificidade (83%-100%)<sup>91,92</sup>. Por isso, a detecção imunohistoquímica da proteína ALK tem já sido considerada como um método adequado para triagem de carcinomas de células não pequenas, ou como um método que tem capacidade para avaliar rearranjos do gene ALK que não conseguem ser interpretados pelo método de hibridização fluorescente *in situ* FISH <sup>93,94</sup>. Não obstante, existem vários estudos que revelam discordâncias significativas, o que sugere a necessidade de usar os dois métodos combinados, de modo a melhorar a detecção <sup>90</sup>. Outros métodos, como o RT-PCR e sequenciação da nova geração estão em uso, mas ainda não foram examinados sistematicamente como o método FISH no que diz respeito à sua capacidade de previsão de respostas de inibição da ALK <sup>95,96</sup>.

O receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR) é também um receptor de tirosina quinase. O gene responsável pela expressão deste recetor está situado no braço curto do cromossoma 7 na posição 12 <sup>96</sup>. Quando o ligando extracelular se liga ao recetor EGFR, este gera uma homo ou heterodimerização do recetor, levando à sua fosforilação de locais na tirosina quinase citoplasmática e ativação de várias vias intracelulares, incluindo a via de sinalização PI3K/AKT/mTOR e RAS/RAF/MAPK, que resultam na sua proliferação celular, metástase e prevenção da apoptose <sup>84</sup>. O EGFR é sobreexpresso em 62% dos carcinomas das células não pequenas registados, e a sua expressão tem sido associada a maus prognósticos <sup>97</sup>. Aproximadamente 10% dos pacientes com adenocarcinoma do pulmão nos EUA e 30% a 50% no Leste Asiático têm tumores associados a mutações do gene deste biomarcador <sup>97</sup>. Estas mutações ocorrem nos exões 18-21, que codificam para uma porção do domínio da quinase EGFR <sup>84</sup>. Aproximadamente 90% destas mutações ocorrem como deleções “in-frame” no exão 19 ou como mutações “missense” no exão 21 (44% e 41% de todas as mutações, respetivamente) <sup>83</sup>. As mutações no domínio da quinase da EGFR desencadeiam a ativação da tirosina quinase independentemente do ligando, o que leva à hiperativação de vias de sinalização antiapoptótica e são encontradas com mais frequência em adenocarcinomas com características lipídicas de mulheres não fumadoras <sup>84</sup>. As altas taxas de sucesso e maior sobrevivência livre de progressão tumoral associadas ao tratamento com inibidores da tirosina quinase (TKIs) (55% -78%), tais como o gefitinibe, erlotinibe e afatinibe, torna o uso destes inibidores como o método padrão de tratamento para pacientes com este tipo de mutações <sup>98</sup>.

Mesmo assim, a maioria desses pacientes desenvolve resistência aos mesmos, originando uma recaída em pouco tempo, normalmente associadas à ocorrência de uma nova mutação no exão 20 do domínio da quinase EGFR (50% dos pacientes), amplificação do oncogene MET (21% dos pacientes), ou mutações do gene PI3KCA<sup>83</sup>. A maioria das mutações do gene EGFR são identificadas através do uso de técnicas de sequenciação genética e RT-PCR, com elevado desempenho e sensibilidade na detecção<sup>99</sup>. Níveis da proteína EGFR solúvel superiores a 57 ng/mL no soro humano, após tratamento com inibidor erlotinib, estão associados a uma maior taxa de sobrevivência em carcinomas de células não pequenas<sup>75</sup>. Adicionalmente, a concentração da proteína EGFR solúvel antes do tratamento com inibidor de tirosina quinase erlotinibe também se tem apresentado como um fator de prognóstico independente<sup>75</sup>.

O antígeno carcinoembrionário (CEA) é uma proteína codificada no gene localizado no cromossoma 19, na posição 13<sup>100</sup>. Apresenta-se como uma proteína oncofetal, que está principalmente envolvida na adesão celular, sendo normalmente produzida no tecido gastrointestinal durante o desenvolvimento fetal, não sendo tipicamente expressa em tecidos adultos. Portanto, o aumento dos níveis de CEA no soro adulto pode assim ser usado como biomarcador tumoral, dado que é sobreexpresso em algumas células do cancro do pulmão por desrepressão de genes que codificam a CEA<sup>80</sup>. No cancro do pulmão, os níveis de CEA no sangue são inversamente correlacionados com a resposta à terapia. Por essa razão, este marcador é usado para detetar a recorrência do cancro e está normalmente associado a uma baixa taxa de sobrevivência<sup>101</sup>. No entanto, deve notar-se que um nível elevado de CEA (>2,5 ng/mL) não está apenas associado ao cancro do pulmão. Pode também dever-se à presença de outros cancros (e.g., colorretal, gástrico, pancreático, da mama e da tiróide), bem como a algumas condições não neoplásicas (e.g., pancreatite, cirrose, colite ulcerativa<sup>102</sup>, doença de Crohn, doença pulmonar obstrutiva crónica e hipotireoidismo<sup>103</sup>) e a hábitos de tabagismo<sup>104</sup>. Portanto, o exame da quantidade de CEA no sangue apresenta limitações na confiança do diagnóstico quer para fins de triagem, como para a detecção precoce de cancro de pulmão. É importante notar que a CEA também é usada principalmente para monitorizar o tratamento do cancro colorretal e detetar recorrências e metástases de cancro e para a identificação do estágio dos cancros colorretais<sup>73</sup>. Ainda assim, a redução do nível de CEA no soro poderá servir como um método para avaliar a progressão da quimioterapia. Foi demonstrado que ocorreram diminuições de CEA de até 56% em relação ao valor basal após dois ciclos de quimioterapia em pacientes com carcinoma pulmonares das células não pequenas avançado com níveis de CEA elevados no início do estudo<sup>105</sup>. Este método demonstrou alcançar sensibilidade de 90% e especificidade de 90%<sup>105</sup>.



A enolase neuro-específica (NSE) também conhecida como enolase 2 ou  $\gamma$ -enolase, é um isômero das enolases glicolíticas e encontra-se codificada no gene ENO2 no braço curto cromossoma 12, na posição 13<sup>106</sup>. Esta isoenzima consiste em duas cadeias peptídicas ( $\alpha/\gamma$  e  $\gamma/\gamma$ ), ambas com 39kDa, e foi encontrada pela primeira vez em células neuronais e posteriormente mostrou estar presente nas células com diferenciação neuroendócrina. Dentro do cancro do pulmão, estima-se que os CPC possam ter origem neuroendócrina e, portanto, esta enolase é frequentemente encontrada em elevadas quantidades no soro de pacientes com este tipo de carcinoma<sup>80</sup>. A sensibilidade registada desta enolase para a deteção de CPC foi de 74%<sup>107</sup>. Num estudo recente com cerca de 200 pacientes com cancro de pulmão, juntamente com 90 benignos e 150 indivíduos saudáveis, este biomarcador sozinho mostrou 23% de sensibilidade e 98% de especificidade. No entanto, como seria de esperar, a taxa de deteção positiva foi mais alta para carcinomas das células pequenas<sup>108</sup>. Vários estudos que incluíram 3500 pacientes com carcinomas de células pequenas e 3340 indivíduos saudáveis demonstraram que a taxa de risco associada a níveis altos de NSE na taxa de sobrevivência total foi 1,74 vezes maior em relação a níveis mais baixos do que os valores de cut-off estabelecidos<sup>109</sup>. Por outro lado, outros estudos revelaram que os níveis de NSE no soro não apresentaram nenhuma significância no prognóstico de carcinomas de células não pequenas<sup>109</sup>. Além do NSE, existem 2 outros marcadores neuroendócrinos, como a cromogranina A (CGA) e o peptídeo libertador de progestina (ProGRP, do inglês Pro-Gastrin-Releasing-Peptide) com impacto no prognóstico de carcinomas das células pequenas. Foram identificados tempos de sobrevivências mais curtos em pacientes com níveis de CGA superiores a 56 ng/mL, níveis de ProGRP superiores a 58 pg/mL e com níveis de NSE superiores a 19 ng/mL<sup>109</sup>.

O antígeno de carcinoma de células escamosas (SCCA) é uma proteína de 48 kDa<sup>110</sup> com forte homologia com a família de inibidores de protéase de serina<sup>111</sup>. É um antígeno associado a tumores cuja concentração em circulação no sangue pode ser elevada em carcinomas das células escamosas envolvendo o colo uterino, cabeça, pescoço, esófago e os pulmões. Subcelularmente, o SCCA está presente no citoplasma e é considerado uma proteína estrutural que reflete o grau de diferenciação dos carcinomas de células escamosas<sup>112</sup>. Foram encontrados níveis elevados de SCCA em pacientes com psoríase e eczema e em pacientes com doenças de pele hiperqueratóticas associadas a um componente inflamatório<sup>113</sup>. A dependência de idade, sexo, hábitos de tabagismo (presentes ou passados) não foi evidente neste marcador<sup>114</sup>. A sensibilidade em CNPC poderá variar de 15% a 55%<sup>115</sup>. Outro estudo dedicado à avaliação do uso combinado de SCCA, NSE e o antígeno cancerígeno 125

(CA125, do inglês cancer antigen 125) no prognóstico de CNPC operável mostrou que a taxa de sobrevivência total foi significativamente menor em pacientes com níveis elevados de SCCA do que em pacientes com carcinoma das células escamosas <sup>116</sup>.

Por fim, o cyfra 21-1 é um fragmento da citoqueratina 19, uma proteína com 36 kDa que está codificada no gene KRT19 localizado no braço longo do cromossoma 17 na posição 21,2. Esta, por sua vez, faz parte do grupo das citoqueratinas do tipo I, que são citoqueratinas constituintes do citoesqueleto das células de epiteliais em mamíferos. A maioria das citoqueratinas do tipo I são caracterizadas por serem proteínas acídicas e terem um baixo peso molecular (entre 40 kDa, no caso da citoqueratina 19 referida, e 64 kDa, no caso da citoqueratina 9). In vivo estão organizadas em pares heterotípicos, conjugando-se normalmente com as citoqueratinas do tipo II, sendo estas caracterizadas por serem básicas ou neutras e expressas em simultâneo durante a diferenciação de tecidos epiteliais simples e estratificados. A citoqueratina 19 constitui uma exceção a esta família, uma vez que esta não se emparelha com citoqueratinas básicas em células epiteliais, estando situada na periderme, a camada que se encontra por dentro da própria epiderme <sup>117-119</sup>. No caso do cancro do pulmão, o cyfra 21-1 está associado ao aparecimento de carcinomas das células escamosas ainda que possa ser encontrado em outros tipos histológicos de carcinomas <sup>73</sup>. Estes fragmentos constituem a fração solúvel que permanece em circulação no sangue, surgindo por consequência da fragmentação da citoqueratina 19 durante o processo de lise e necrose celular <sup>109</sup> e da ação de enzimas proteolíticas <sup>80</sup>. A principal vantagem deste biomarcador consiste no seu alto poder de diagnóstico e prognóstico quando comparado a outros biomarcadores como o CEA, SCCA e a NSE. Neste contexto, Kulpa et al. <sup>120</sup> realizaram um estudo englobando 200 pacientes com carcinomas pulmonares de células escamosas, e um grupo de controlo de 220 indivíduos, entre os quais 124 saudáveis e 96 portadoras de carcinomas pulmonares não-malignos. O cyfra 21-1 demonstrou o maior nível de sensibilidade diagnóstica, com uma área sob a curva COR (Característica de Operação do Receptor) de 0,87 em comparação com uma área sob a curva COR do CEA de 0,74. Ainda, demonstrou, tal como o CEA, ter a sua concentração dependente de acordo com o estágio do carcinoma, ao ponto de estes mostrarem diferenças significativas na sua concentração entre pacientes operáveis (I-IIIa) e não operáveis (IIIa-IV). Noutro estudo, Okamura et al. <sup>121</sup> englobaram 655 pacientes portadores de cancro do pulmão e 237 pacientes com doença pulmonar benigna e analisaram os níveis séricos de cyfra 21-1 e CEA. O cyfra 21-1 apresentou menores níveis de sensibilidade, com apenas 43% (em comparação com os 69% da CEA) com cut-off ligeiramente superior (de 3,5 ng/mL, em relação ao cut-off da CEA de 3,3 ng/mL).

Contudo, o cyfra 21-1 apresentou uma especificidade de 89%, superior ao valor de especificidade de 68% do CEA. Considerando o dobro do valor de cut-off de cada um dos biomarcadores, os valores registados de sensibilidade e de especificidade foram de 41% e 95%, respetivamente, para o CEA, e de 18% e 98%, respetivamente, para o cyfra 21-1. Assim, foi demonstrada a menor probabilidade de o cyfra 21-1 de apresentar falsos negativos do que o CEA (4 versus 25 pacientes).

Para além disso, o cyfra 21-1 mostrou-se capaz de conduzir a um prognóstico mais fidedigno, já que este permite determinar melhor o estágio, tamanho, extensão e metástase para os gânglios linfáticos e/ou outros órgãos e a sua diferenciação (código TNM) <sup>122</sup>. Este facto é relevante, uma vez que existe sempre a probabilidade de recorrência no cancro do pulmão depois de uma remoção cirúrgica. Por exemplo, segundo uma meta-análise realizada por Xiu et al. <sup>123</sup>, que considerou 31 estudos englobando 6394 pacientes com cancro do pulmão, um nível mais elevado de cyfra 21-1 demonstrou mau prognóstico geral em relação ao paciente, quer este tivesse o tumor ou não. Tal verificou-se em pacientes que tenham sofrido de uma cirurgia, com uma proporção de risco de 1,94 em comparação aos pacientes que não sofreram de nenhuma cirurgia, que registaram uma proporção menor do que 1,24. Por outro lado, esse mesmo estudo também demonstrou que na ocorrência de uma alta concentração de cyfra 21-1 no soro, leva a um mau prognóstico para pacientes que tenham sido tratados com inibidores de tirosina para a EGFR ou com quimioterapia à base de platina. Deste modo, o cyfra 21-1 mostrou-se assim um biomarcador promissor para detetar mutações no gene EGFR, servindo como um indicador para sua deteção, sem precisar de uma análise genética complexa e dispendiosa <sup>123</sup>.

Num estudo de comparação recente, que testou 6 marcadores tumorais (CA125, CA19.9, NSE, CEA, cyfra 21-1 e SCCA) em 164 pacientes no estágio I em CNPC, o nível sérico do cyfra 21-1 mostrou ser um fator prognóstico independente de taxa de sobrevivência a 5 anos, mas os outros 5 marcadores, incluindo SCCA, não mostraram significância <sup>124</sup>. Outro estudo também mostrou que níveis elevados de SCCA e cyfra 21-1 foram encontrados em 30% e 59% dos pacientes com CNPC, respetivamente. Em pacientes metastáticos, a sensibilidade do SCCA foi de apenas 13%, enquanto a sensibilidade do cyfra 21-1 foi de 74% <sup>125</sup>. Portanto, devido a essa baixa sensibilidade, a medição do SCCA no soro é uma ferramenta de diagnóstico ou de prognóstico para pacientes com CNPC menos eficiente do que a deteção do cyfra 21-1.

Uma vez que os biomarcadores CA125, CEA e cyfra 21-1 são antigénios, estes podem ser detetados e quantificados através do uso de anticorpos NY-ESO-1. Segundo o trabalho de

Doseeva et al.<sup>126</sup>, o uso combinado dos três biomarcadores anteriormente mencionados permitiu a detecção precoce de CNPCs com uma sensibilidade de 77% e uma especificidade de 80%. Também o cyfra 21-1, em conjunto com a proteína reativa-C (CRP), permitiu distinguir entre nódulos benignos e malignos em pacientes que foram alvo de rastreio com LDCT, tendo sido possível detetar 24% falsos positivos; esta abordagem demonstrou uma área sob a curva COR de 0,86 e uma especificidade de 92%<sup>127</sup>.

### **1.3 Pré-tratamento de amostras biológicas: o caso do soro humano**

Apesar do papel fundamental dos biomarcadores proteicos no contexto clínico, existem várias limitações associadas ao seu uso, as quais se podem traduzir em resultados pouco precisos<sup>121</sup>. Em primeira análise, os biomarcadores proteicos são moléculas sensíveis a alterações do meio e que estão presentes em baixas concentrações nos fluidos humanos, levando à ocorrência de dificuldades a nível técnico, nomeadamente ao nível do pré-tratamento da amostra, bem como na detecção e quantificação<sup>128</sup>. Em segunda análise, o soro e o plasma sanguíneo, que poderão ser fontes de biomarcadores e ferramentas menos invasivas de diagnóstico/prognóstico, são amostras bastante complexas. As proteínas presentes no soro ou plasma estão em concentrações bastante desiguais, sendo que apenas a HSA pode chegar a contribuir para cerca de 55% da massa total de proteínas do soro e que juntamente com outras proteínas maioritárias (e.g., imunoglobulinas G) contribui para quase 85% do proteoma total<sup>129</sup>. Esta elevada concentração das proteínas maioritárias pode interferir ou mesmo mascarar o sinal das proteínas de menor abundância (onde se incluem os biomarcadores), afetando negativamente a etapa de detecção/quantificação<sup>130</sup>. De notar que, segundo alguns estudos, o processo de colheita da amostra tem uma grande influência no perfil proteico, maior até do que o manuseamento e as condições de armazenamento<sup>13</sup>. Ainda, em relação à utilização do soro ou plasma como objeto de análise, a principal vantagem do soro reside na ausência de anticoagulantes, que por sua vez poderão interferir com o próprio resultado; contudo, o plasma tem a vantagem de ser mais estável a nível de preservação<sup>14</sup>.

Por estas razões, as técnicas de quantificação de biomarcadores atualmente usadas precisam de atingir limites de detecção bastante reduzidos, muitas vezes na ordem de ng/mL, bem como ultrapassar os problemas associados à colheita, armazenamento e manuseamento das amostras<sup>131</sup>. Para tal, são necessários infraestruturas, equipamentos e reagentes dispendiosos e específicos, profissionais altamente qualificados e protocolos longos e complexos. De modo a melhorar e simplificar os métodos atuais de detecção de biomarcadores em soro humano, existe a necessidade de implementar etapas de pré-tratamento de amostra

que permitam depletar as proteínas maioritárias e purificar/concentrar o biomarcador de interesse. Técnicas de pré-tratamento convencionais

O pré-tratamento de soro humano representa uma das etapas mais importantes da detecção de biomarcadores tumorais e pode recorrer a pelo menos uma das seguintes estratégias: fracionamento, depleção e enriquecimento. Contudo, este processo é ainda bastante moroso, complexo e propenso a erros analíticos devido a possíveis perdas de biomarcador ou interferências na sua atividade/estabilidade/estrutura<sup>130</sup>. Este facto torna o desenvolvimento de técnicas padrão de preparação de amostras de soro/plasma crucial para quantificar corretamente os biomarcadores<sup>14</sup>, uma vez que pequenas mudanças no procedimento podem levar a perfis proteicos bastante diferentes<sup>132</sup>.

As estratégias de fracionamento de proteínas têm por base as suas propriedades físico-químicas e recorrem a técnicas de separação, como por exemplo, a eletroforese e técnicas cromatográficas<sup>124,125</sup>. No entanto, estas técnicas não são suficientes para que haja uma depleção completa das proteínas abundantes. Por sua vez, as técnicas de depleção têm como objetivo remover de proteínas de maior abundância, de forma a ser possível detetar proteínas menos abundantes. Estas são ainda capazes de acoplar a etapa de enriquecimento que visa a concentração de proteínas de interesse na amostra simultaneamente num único passo<sup>133</sup>. As técnicas de depleção mais utilizadas no momento são baseadas em extração em fase sólida, tais como cromatografia por afinidade ao ligando-corante, cromatografia por ligandos proteicos, imunodepleção e combinação de ligandos peptídicos, bem como em técnicas de precipitação química<sup>133</sup>.

A técnica de cromatografia por afinidade ligando-corante tem sido largamente utilizada para a depleção da albumina, tendo como princípio a alta afinidade entre um corante, azul cibacron (cibracon blue, CB), e a albumina<sup>134,135</sup>. Este método é dos mais recorrentes a nível clínico, dado o seu preço reduzido e elevada eficiência de ligação, bem como acesso e operação fáceis<sup>136-138</sup>. A ligação propriamente dita é realizada através de uma combinação de interações eletrostáticas, efeitos hidrofóbicos e pontes de hidrogénio e é dependente do tipo de proteína, do pH e da concentração salina da amostra<sup>139</sup>. Por sua vez, várias matrizes (onde o CB fica imobilizado) têm sido já desenvolvidas com diferentes níveis de eficiências de depleção. Por exemplo, com a matriz de Sefarose desenvolvida pela HiTrapBlue® é possível alcançar eficiências de depleção de cerca de 98% da HSA<sup>140</sup>. Todavia, este método de depleção pode também remover outras proteínas de abundância reduzida, tendo, portanto, uma especificidade reduzida<sup>141</sup>.

A cromatografia por ligandos proteicos tem um funcionamento análogo ao da técnica cromatográfica anteriormente mencionada, mas direcionado à depleção de diferentes imunoglobulinas. De forma geral, a cromatografia por ligandos proteicos recorre a duas proteínas, nomeadamente a proteína A e G. Estas são normalmente produzidas por bactérias, estando a proteína A localizada nas paredes celulares <sup>142</sup> e a proteína G localizada na superfície celular <sup>16</sup>. Como estas proteínas apresentam especificidade e de afinidade particulares para diferentes imunoglobulinas, normalmente recorre-se a uma proteína quimérica, uma combinação das duas, de modo a alcançar a depleção de um leque maior de imunoglobulinas <sup>17</sup>. No entanto, tal como na cromatografia por afinidade HSA-CB, devido à existência de interações não específicas, outras proteínas, incluindo os biomarcadores de interesse, podem ser adsorvidas nas resinas <sup>17,143</sup>.

A imunodepleção constitui uma das técnicas mais utilizadas devido ao facto de recorrer ao estabelecimento de diferentes interações específicas entre anticorpos e as suas proteínas alvo. A maioria dos kits de imunodepleção é concebida no formato de coluna, estando os anticorpos imobilizados em resinas de alta afinidade, de modo que as proteínas mais abundantes fiquem retidas na coluna e as menos abundantes permaneçam em solução (no eluente) <sup>133</sup>. Normalmente, estas colunas apresentam eficiências de depleção superiores a 90% e reprodutibilidade elevada, bem como capacidade para melhorar a etapa de deteção de proteínas-alvo em comparação com amostras não tratadas <sup>144-147</sup>. Neste contexto, foi demonstrado que a introdução de uma etapa de depleção pode resultar num aumento compreendido entre 1,47 e 1,89 vezes do número de proteínas identificadas por cromatografia líquida com deteção por espectrometria de massa em tandem (LC-MS/MS), até um máximo de 301 proteínas <sup>148</sup>. Ainda, o uso combinado de imunodepleção com outras técnicas de pré-tratamento pode aumentar o número de proteínas identificadas por LC-MS/MS no soro até cerca de uma ordem de magnitude <sup>18</sup>. No entanto, existem várias desvantagens associadas a este método devido ao seu elevado custo, à baixa capacidade de volume de amostra, ao número limitado de sítios de ligação específicos, e à incapacidade dos anticorpos distinguirem várias isoformas de uma proteína <sup>149</sup>.

O uso de bibliotecas combinatórias de ligandos peptídicos (CPLL, do inglês “combinatorial peptide ligand library”) sustenta-se na interação específica (e.g., interações eletrostáticas, efeitos hidrofóbicos, pontes de hidrogénio e forças de van der Waals) e na saturação entre cada proteína e seus ligandos peptídicos. Sob condições específicas de pH e composição do eluente que permitam maximizar o desempenho da etapa de pré-tratamento, os ligandos das proteínas mais abundantes atingem a saturação e conseqüente remoção

primeiro, enquanto que as proteínas menos abundantes não saturam os seus ligandos, ligando-se de acordo com a sua concentração na amostra <sup>137-141</sup>. O ProteoMiner é um kit de CPLL constituído por uma matriz de vários ligandos hexapeptídicos imobilizados em resinas cromatográficas e específicos para vários tipos de proteínas. Este tem revelado melhor desempenho do que métodos de imunodepleção, depleção baseada em ligandos e precipitação química com recurso a solventes orgânicos convencionais <sup>19,150,151</sup>. Contudo, as CPLL não são aplicáveis para proteínas que não possuam ligandos peptídicos correspondentes aos das resinas, conduzindo à sua perda <sup>21</sup>. Por outro lado, a CPLL é limitada por ligações não específicas e pela eluição incompleta das proteínas capturadas <sup>152</sup>. No âmbito de estudos dedicados à descoberta de biomarcadores do cancro de pulmão para um diagnóstico precoce, os kits ProteoMiner mostraram ser uma ferramenta mais poderosa do que a estratégia de marcação isobárica, permitindo aumentar para o dobro o número de proteínas identificadas em amostras de plasma de indivíduos ex-fumadores, fumadores e não fumadores por MS <sup>20,153</sup>. Foi, ainda, possível relacionar os níveis plasmáticos de apolipoproteína E com a metaplasia de carcinomas de células escamosas, desvendando a potencialidade da apolipoproteína E como biomarcador preditivo para o cancro de pulmão <sup>20</sup>.

Os métodos de precipitação química têm como princípio a solubilidade distinta de proteínas em diferentes soluções, tais como sais inorgânicos <sup>154</sup>, solventes orgânicos <sup>155</sup>, polímeros não iónicos <sup>156</sup> e agentes redutores <sup>157</sup>. Em relação aos sais inorgânicos, a solução saturada de sulfato de amónio a 35% permite a depleção de proteínas de alta abundância como as Igs, enquanto que uma saturação de 55% induz a precipitação da HSA <sup>158</sup>. No que diz respeito ao uso de solventes orgânicos, o etanol <sup>159</sup> e o acetonitrilo <sup>160</sup> ou até misturas de ácido tricloroacético e acetona <sup>161</sup> representam exemplos de agentes indutores de precipitação de proteínas. Enquanto que o uso de etanol pode conduzir à precipitação das Igs ( $\approx$  150 kDa no caso da IgG) e parte da HSA (67 kDa) e recuperação das proteínas de baixo peso molecular no sobrenadante <sup>162</sup>, o acetonitrilo demonstrou capacidade para remover proteínas acima de 75 kDa, particularmente apolipoproteínas <sup>163</sup>. Já as misturas de ácido tricloroacético e acetona permitem a depleção da HSA e outras proteínas de alta abundância <sup>161</sup>. Relativamente aos polímeros, o polímero neutro polietilenoglicol (PEG) é o mais utilizado para efetuar a precipitação de proteínas em matrizes biológicas já que permite a precipitação diferencial de complexos de fibronectina-fibrinogénio, IgG e HSA. Através da alteração das concentrações de PEG entre 4%, 12% e 30% é possível alcançar a depleção seletiva de complexos de fibronectina-fibrinogénio, IgG e HSA, respetivamente, revelando ser um método não desnaturante, mais rápido e eficiente do que a precipitação induzida por soluções de sulfato

de amónio ou etanol <sup>156</sup>. Quanto ao uso de agentes redutores, a precipitação da HSA pode ser alcançada, demonstrando desempenhos comparáveis àqueles obtidos com resinas funcionalizadas com CB ou imunodepleção <sup>164</sup>. As técnicas de precipitação de proteínas têm como principal vantagem o facto de serem economicamente viáveis e de terem procedimentos simples. No entanto, o procedimento é moroso e os seus mecanismos de depleção ainda não se encontram, dificultando o desenvolvimento de técnicas de depleção por precipitação seletivas. Além disso, apresentam limitação ao nível da especificidade, risco de perdas de proteínas e impacto ao nível da estrutura e estabilidade proteica. No caso do uso de solventes orgânicos, estes poderão ser nefastos para o ambiente <sup>133</sup>.

De modo a ultrapassar os inconvenientes das técnicas de depleção convencionais, a procura por técnicas alternativas de pré-tratamento tem aumentado. Estas técnicas têm sido desenvolvidas de modo a aumentarem a capacidade de remoção de proteínas abundantes, a proporcionarem condições de extração mais biocompatíveis e a diminuírem o custo da análise. De acordo com Lee et al. <sup>133</sup>, entre os exemplos mais promissores encontra-se a aplicação de nanomateriais como resinas alternativas, tais como a celulose bacteriana, polímeros com impressão molecular e criogeis <sup>133</sup>. Na *Figura 8* é apresentado um resumo comparativo das técnicas convencionais acima referidas e de novas metodologias propostas mais recentemente face às suas características, vantagens e inconvenientes, adaptado de uma análise efetuada por Lee et al. <sup>133</sup>. Adicionalmente, são incluídas na *Figura 8* duas classes de métodos alternativos, nomeadamente os sistemas aquosos bifásicos (SABs) <sup>165</sup> e os sistemas de partição em três fases, SPTFs). Estas, dadas as suas características vantajosas, serão foco da presente dissertação e abordadas em mais detalhe de seguida.



	<p><b>Depleção por afinidade ao ligando-corante</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Custo relativamente baixo, robusto, amplamente disponível, imobilização simples, alta capacidade de ligação</li> <li>• Falta de especificidade, eficiência variável</li> </ul>
	<p><b>Depleção de imunoglobulinas com base na interação com a proteína A, G ou A / G</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Alta seletividade, rendimento e pureza</li> <li>• Pode ocorrer ligação não específica devido à co-absorção de outras proteínas</li> </ul>
	<p><b>imunodepleção</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Alta especificidade, kits comerciais estão prontamente disponíveis</li> <li>• Alto custo, carregamento de amostra limitado, problema com ligação não específica</li> </ul>
	<p><b>Métodos de precipitação química</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Simples, barato</li> <li>• Baixa especificidade, risco de perdas de proteína, difícil resolubilização, consumo de tempo</li> </ul>
	<p><b>Biblioteca combinatória de ligandos peptídicos</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Útil para normalizar a abundância global de proteínas</li> <li>• Pode ocorrer ligação não específica, perda de proteína devido à ligação ineficiente ou eluição incompleta</li> </ul>
	<p><b>Nanomateriais e polímeros</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Alta especificidade, custo relativamente baixo, reutilizável,</li> <li>• Alta estabilidade, robustez física, facilidade de preparação</li> <li>• Reactividade cruzada e maior capacidade de volume de amostra</li> </ul>
	<p><b>Sistemas aquosos bifásicos e sistemas de partição em três fases</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Teor em água elevado (ambiente adequado para a extração de proteínas)</li> <li>• Fácil e rápida execução</li> <li>• Versatilidade estrutural elevada</li> <li>• Aplicação para fins de depleção ainda pouco explorada</li> </ul>

Figura 8 – Estratégias de depleção de proteínas majoritárias do soro humano (adaptado <sup>133</sup>).

### 1.3.2. Sistemas aquosos bifásicos e sistemas de partição em três fases

Os SABs constituem um tipo específico de extração líquido-líquido que, ao contrário dos métodos de extração convencionais, não utilizam solventes orgânicos <sup>166</sup>. Esta técnica é caracterizada por ser constituída por duas fases aquosas que se apresentam imiscíveis entre si, sendo vulgarmente formada por pares de polímero-polímero, polímero-sal ou sal-sal. Esta imiscibilidade ocorre acima de determinadas concentrações dos componentes do sistema, sob condições específicas de temperatura e pH, onde uma das fases aquosas é enriquecida com um dos solutos enquanto na outra fase estará prevalecente o segundo componente <sup>167</sup>.

A formação de SABs é conhecida desde o final do século XIX, quando Beijerinck <sup>168</sup> observou que soluções aquosas de gelatina e de agar, ou de gelatina e de amido formavam misturas turvas que em repouso se separavam espontaneamente em duas fases líquidas e límpidas. A fase mais densa era enriquecida em agar (ou amido) e a fase menos densa era enriquecida em gelatina, sendo que a água é componente maioritário em ambas as fases. Posteriormente, foi reportado que o amido proveniente de diferentes origens (e.g., arroz, milho) e, portanto constituído por diferentes frações de amilose e amilopectina, dava origem a diferentes diagramas de fase <sup>169</sup>. Estes resultados mostraram que pequenas alterações nas interações intermoleculares tinham uma grande influência sobre as composições das fases em equilíbrio para uma dada mistura inicial <sup>169,170</sup>. Contudo, os SABs como técnica de extração e separação apenas ganharam importância em 1955 com o trabalho de Albertsson <sup>171</sup>. Este autor demonstrou que uma solução contendo determinadas concentrações de polímero, como o PEG, e de sal inorgânico, como o fosfato de potássio ( $K_2HPO_4$ ), formava duas fases líquidas, onde a maioria do PEG ficava contida na fase superior, enquanto a maioria do sal ficava contida na fase inferior <sup>88,172</sup>. Devido ao facto dos SABs serem compostos maioritariamente por água, foi demonstrado ao longo dos anos que estes são excelentes sistemas de extração e purificação de proteínas, tais como os biomarcadores, uma vez que estas conseguem conservar a sua atividade biológica, estabilidade e estrutura <sup>173,174</sup>.

Sendo na sua grande maioria sistemas ternários, os SABs têm um diagrama de fases único que pode ser influenciado pelo pH e a temperatura. Existem inúmeras informações contidas nos diagramas de fase, nomeadamente a possibilidade de identificar as composições globais em que o sistema é monofásico ou bifásico, sendo estas demarcadas por uma curva binodal. Deste modo, é possível determinar as concentrações necessárias para formar o sistema líquido-líquido, o que se revela crucial no desenvolvimento de processos de extração e purificação de biomoléculas. Na *Figura 9*, é apresentado um diagrama ortogonal onde a composição da água é omitida. Além disso, também estão representadas as linhas de equilíbrio (*tie-lines*), que são linhas retas que ligam os pontos do diagrama representativos da composição de cada uma das fases em equilíbrio para um determinado ponto da mistura <sup>170</sup>.

O comprimento da linhas de equilíbrio é um parâmetro termodinâmico importante, sendo geralmente utilizado como variável determinante nos processos de partição dos solutos nos SABs <sup>170</sup>.

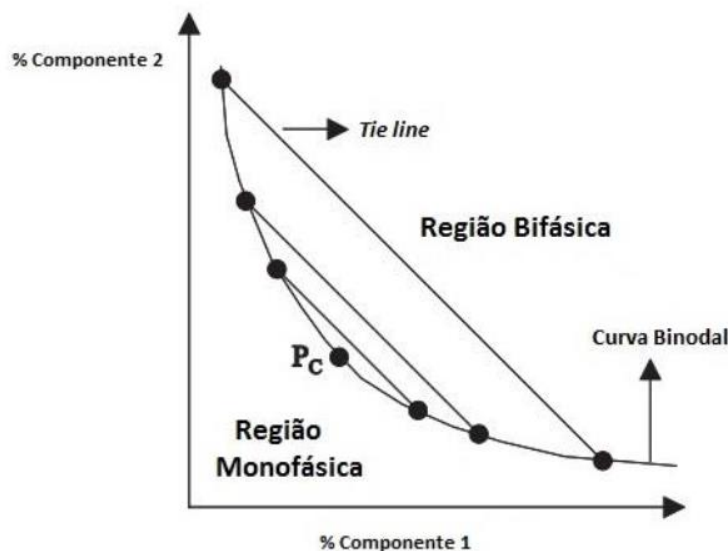


Figura 9– Diagrama de fases para sistemas aquosos bifásicos (adaptado de <sup>170</sup>).

Outra característica vantajosa dos SABs é que, aquando da adição de algumas moléculas ou matrizes complexas acima de determinadas concentrações, permitem a formação de sistemas de partição de três fases (SPTFs)<sup>174</sup>. SPTF é uma técnica de extração adequada a várias biomoléculas, em particular proteínas, que utiliza principalmente t-butanol e soluções aquosas de sulfato de amónia para induzir a precipitação de compostos (de interesse ou contaminantes) na interfase do sistema, ao passo que outros compostos podem migrar entre as duas fases líquidas <sup>175</sup>. Ao juntar os conceitos de SABs e SPTFs é possível eliminar a utilização de solventes orgânicos e criar SPTFs mais biocompatíveis, eficientes e seletivos <sup>176</sup>. Este tipo de sistemas baseados em SABs e SPTFs foram usados no contexto de diagnóstico no trabalho de Raymond et al. <sup>177</sup>, onde o PEG e o dextrano foram usados para a separação seletiva da fosfatase alcalina das suas isoformas, demonstrando maior eficiência do que a imunodepleção. Pela utilização de sistemas constituídos por combinação de dois sais, um dos quais um líquido iónico, Pereira et al. <sup>178</sup> demonstrou com sucesso a depleção completa de HSA e da IgG do soro humano, permitindo a concentração de duas proteínas menos abundantes e com potencial como biomarcadores de várias doenças, nomeadamente a transferrina e a lactato desidrogenase. Ao alcançar a depleção das duas proteínas maioritárias do soro humano na interfase do sistema, ao mesmo tempo que as proteínas menos abundantes migraram para a fase rica em líquido iónico, foi possível detetar as proteínas menos abundantes recorrendo a um cromatógrafo líquido de alta eficiência acoplado a um detetor de díodos (HPLC-DAD).

Tendo em conta as vantagens dos SABs, a dissertação de mestrado proposta pretende criar novos SPTFs que possam ser utilizados como técnicas de pré-tratamento de soro humano. Serão utilizados sistemas constituídos por PEG, PPG ou Pluronic® e poliacrilato de sódio (NaPA), os quais demonstram elevada biocompatibilidade e seletividade na extração de várias biomoléculas <sup>179,180</sup>. Estes já foram descritos para a purificação de desidrogenase glucose-6-fosfato, hemoglobina e lisozima <sup>181</sup>, proteína fluorescente verde <sup>182</sup> e ácido clavulânico <sup>183</sup>, com recuperações de 60-90% e purezas de 70%.

## 2. Materiais e métodos

### 2.1. Materiais

Os sistemas aquosos bifásicos neste trabalho foram formados com recurso aos homopolímeros polietilenoglicol (PEG) de pesos moleculares 600, 1000, 1500 e 2000 g.mol<sup>-1</sup> (abreviados como PEG 600, PEG 1000, PEG 1500 e PEG 2000, respetivamente) e polipropilenoglicol (PPG) de peso molecular 400 g.mol<sup>-1</sup> (abreviado como PPG 400), bem como o copolímero em bloco constituído por PEG-PPG-PEG de peso molecular 1900 g.mol<sup>-1</sup> (abreviado como Pluronic L35). Todos os PEGs foram obtidos a partir da Alfa Aesar, enquanto os polímeros PPG 400 e Pluronic L-35 foram fornecidos pela Sigma-Aldrich. O polieletrólito usado foi o poliácido de sódio (NaPA) com um peso molecular de 8000 g.mol<sup>-1</sup>, obtido da Sigma-Aldrich® sob a forma de uma solução aquosa a 45 % (m/m). As estruturas químicas dos polímeros estudados encontram-se representadas na *Figura 10*.

O soro humano utilizado foi obtido através da Sigma-Aldrich® e mantido a -20°C até ser usado. Na preparação das curvas de calibração, foi utilizada IgG humana purificada (29,4 mg/mL; armazenada a -80 °C até utilização) adquirida a partir da Innovative Research, Inc. e a HSA liofilizada (pureza ≥ 96%) obtida através da Alfa Aesar.

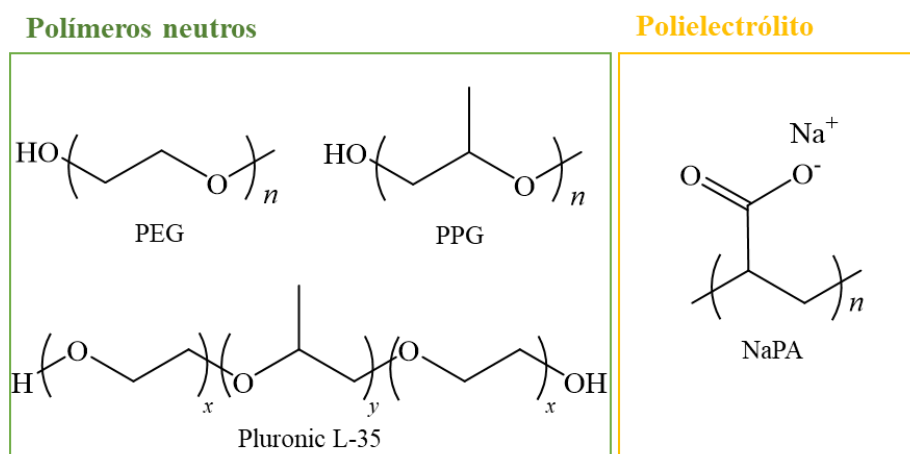


Figura 10 – Estruturas químicas e abreviaturas dos polímeros neutros e polieletrólito estudados.

### 2.2. Determinação das curvas binodais

As curvas binodais de cada sistema ternário (PEGs/PPG/Pluronic L-35 + NaPA 8000 + H<sub>2</sub>O) foram determinadas através do método do *cloud point* (ponto de turvação)<sup>184</sup> a 25 °C à pressão atmosférica. Para determinação das curvas binodais foram preparadas previamente diferentes soluções aquosas dos diferentes polímeros neutros e do polieletrólito a concentração conhecida: PEGs e Pluronic L35 a 60% (m/m), PPG 400 a 70% (m/m) e NaPA

8000 a 22,5% (m/m). Adicionou-se gota-a-gota da solução de NaPA 8000 à solução de polímero neutro, ou vice-versa, até a solução ficar turva e se atingir a região bifásica. Posteriormente, adicionou-se água gota-a-gota até a solução ficar límpida e se atingir a região monofásica. Estas adições foram repetidas alternadamente e sob agitação constante. A composição da mistura foi determinada pela quantificação da massa de todos os componentes adicionados com uma incerteza de  $\pm 10^{-4}$  g após a solução adotar um aspeto turvo e um aspeto límpido. As curvas binodais obtidas experimentalmente foram ajustadas usando a Equação 1, proposta por Merchuk *et al.*<sup>184</sup>, através do software TPDTL 2017.

$$[\text{polímero neutro}] = A \exp[(B[\text{NaPA 8000}]^{0.5}) - (C[\text{NaPA 8000}]^3)] \quad (1)$$

onde, [polímero neutro] e [NaPA 8000] são, respectivamente, as percentagens mássicas dos polímeros neutros estudados e do NaPA 8000. Na Equação 1, os parâmetros obtidos pela regressão são denotados por A, B e C.

### 2.3. Estudos de depleção

Para os estudos de depleção, foi escolhido um ponto de mistura capaz de formar SPTFs pela precipitação das proteínas na interfase aquando da adição de soro aos componentes dos SABs. A composição do ponto de mistura foi determinada tendo por base a composição dos sistemas ternário (polímero neutro + NaPA 8000 + H<sub>2</sub>O), mas substituindo parte da água por soro. As massas pesadas (incerteza de  $\pm 10^{-4}$  g) de cada um dos componentes foram tais que a composição final da mistura resultou em 10 % (m/m) polímero neutro + 13,5 % (m/m) NaPA 8000 + 20 % (m/m) soro + 56,5 % (m/m) H<sub>2</sub>O para um volume total de 1 g. Foram preparadas 3 réplicas para cada sistema. De seguida centrifugou-se cada uma das misturas a 3.500 rpm durante 10 minutos. Depois, as fases rica em polímero neutro e rica em NaPA 8000 foram recolhidas e pesadas com recurso a seringas. Nos SABs estudados, a fase superior corresponde à fase aquosa rica em polímero neutro, enquanto a fase inferior é maioritariamente composta por NaPA 8000. A interfase foi recuperada por centrifugação a 10.000 rpm durante 5 minutos para remoção do sobrenadante. O precipitado foi ressuscitado em 1 mL de uma solução tampão fosfato salina (PBS, do inglês *phosphate saline buffer*).

### 2.4. Quantificação das proteínas

Ambas as fases aquosas e interfase ressuscitada foram diluídas em tampão fosfato de 50 mM de tampão fosfato de sódio + 0,3 M de NaCl a pH 7,4, a qual funcionou também como fase móvel do método cromatográfico baseado em cromatografia de alta eficiência de exclusão molecular (SE-HPLC). Foi utilizado um cromatógrafo Chromaster (Hitachi, VWR)

acoplado com um detector de díodos (DAD) e uma coluna analítica de exclusão molecular Shodex KW-802.5 (8 mm × 300 mm). As temperaturas do forno da coluna e do amostrador automático foram mantidas constantes a 25 °C e a 10 °C, respectivamente. O volume de injeção foi de 25 µL e o comprimento de onda foi fixado a 280 nm. As curvas de calibração utilizadas para a quantificação de cada uma das proteínas, IgG e HSA, foram previamente estabelecidas, com um coeficiente de correlação de 0,9980 e 0,9993, respectivamente (Apêndice A – Figuras A1 e A2). Os cromatogramas obtidos foram analisados com o programa PeakFit v4 (PF4).

Uma vez que foi verificada interferência dos componentes de fase na quantificação da proteína nas fases aquosas, principalmente do NaPA 8000 na fase de fundo, os rendimentos de depleção das proteínas,  $Y_{Prot}$  (%), foram determinados a partir da relação entre a massa de proteína na interfase ( $m_{Prot}^{interfase}$ ) e a massa de proteína ( $m_{Prot}^{soro}$ ) introduzida no sistema pela adição de soro, de acordo com a Equação 2. Na Equação 2, “Prot” corresponde a HSA ou a IgG dependendo da proteína em análise.

$$Y_{Prot}(\%) = \frac{m_{Prot}^{interfase}}{m_{Prot}^{soro}} \times 100 \quad (2)$$

## 2.5. Medição do pH das fases dos SABs

De modo a averiguar o pH das fases coexistentes dos SABs, da fase rica em polímero neutro (superior) e da fase rica em NaPA 8000 (inferior), utilizou-se um medidor de pH/conduvímetero da Metrohm devidamente calibrado com dois tampões de pH = 4.00 e pH = 7.00 provenientes da mesma empresa. Os valores de pH foram medidos a 25 °C e com uma incerteza de ±0.02.

### 3. Resultados e Discussão

Nesta dissertação, foram estudados sistemas formados por polímeros neutros e um polieletrólito (NaPA 8000). Os polímeros neutros estudados foram o PPG 400, PEG 600, PEG 1000, PEG 1500, PEG 2000 e Pluronic L-35. Os componentes de fase estudados foram escolhidos dada a sua elevada biocompatibilidade e seletividade na extração de várias biomoléculas<sup>179,180</sup>, embora não tenham sido ainda aplicados no contexto de pré-tratamento do soro humano. Além disso, estes sistemas têm a tendência de se separarem relativamente rápido devido à sua baixa viscosidade, em contraste a outros SABs do tipo polímero-polímero.

#### 3.1. Diagramas de fases dos sistemas ternários constituídos por polímero + NaPA + H<sub>2</sub>O

Os diagramas de fase ternários para os sistemas constituídos por polímeros neutros + NaPA 8000 + H<sub>2</sub>O foram determinados a 25 °C e à pressão atmosférica pelo método de *cloud point*. As frações mássicas obtidas experimentalmente para a determinação dos diagramas de fase encontram-se detalhadas no Apêndice B, nas *Tabelas B1 a B6*, e apresentadas na *Figura 11*. Os dados experimentais das curvas binodais foram ajustados pela relação empírica descrita pela Equação 1. Os parâmetros da regressão A, B e C, determinados pelo método dos mínimos quadrados, os seus desvios-padrão ( $\sigma$ ) e os coeficientes de correlação ( $R^2$ ) estão apresentados na *Tabela 2*. Em geral, foram obtidos coeficientes de correlação para todos os sistemas superiores a 0,99, o que indica que estes ajustes podem ser utilizados para prever dados de uma determinada região do diagrama de fases em que não se encontrem disponíveis resultados experimentais.



*Tabela 2 - Parâmetros de correlação e respetivos desvios-padrão ( $\sigma$ ) usados para descrever as curvas binodais dos SABs constituídos por polímero + NaPA 8000 obtidas experimentalmente a 25 °C através da Equação 1.*

<b>Polímero</b>	<b>A <math>\pm</math> <math>\sigma</math></b>	<b>B <math>\pm</math> <math>\sigma</math></b>	<b>10<sup>-5</sup> (C <math>\pm</math> <math>\sigma</math>)</b>	<b>R<sup>2</sup></b>
PEG 600	45,84 $\pm$ 1,49	-0,392 $\pm$ 0,016	10,75 $\pm$ 1,16	0,9964
PEG 1000	53,24 $\pm$ 1,31	-0,536 $\pm$ 0,013	11,72 $\pm$ 2,07	0,9994
PEG 1500	52,12 $\pm$ 0,55	-0,521 $\pm$ 0,014	22,00 $\pm$ 1,20	0,9998
PEG 2000	179,57 $\pm$ 4,36	-1,003 $\pm$ 0,532	4,30 $\pm$ 40,68	0,9925
PPG 400	60,88 $\pm$ 6,52	-0,306 $\pm$ 0,046	13,21 $\pm$ 2,82	0,9987
Pluronic L35	65,37 $\pm$ 4,50	-0,646 $\pm$ 0,016	43,80 $\pm$ 6,02	0,9995

Na *Figura 11* encontram-se representadas as curvas binodais de cada SAB. Nos diagramas de fase apresentados, a região bifásica encontra-se localizada acima da curva binodal. Quanto maior é esta região, maior é a capacidade de se originar uma separação líquido-líquido na presença dos polímeros neutros e polieletrólito em meio aquoso, que por sua vez aumenta com o aumento da hidrofobicidade do polímero.

Os polímeros neutros estudados em conjunto com o NaPA 8000 para formação de SABs permitem analisar o impacto dos seus monómeros constituintes (etilenoglicol, propilenoglicol ou ambos) e do seu peso molecular (PEG 600 – PEG 2000). Assim, é possível investigar o impacto da hidrofobicidade do polímero ao nível da formação de SABs. Em geral, a capacidade do polímero para se formar um SAB na presença de NaPA aumenta na seguinte ordem: PPG 400 < PEG 600 < PEG 1000  $\approx$  PEG 1500 < PEG 2000 < Pluronic L35. Para PEGs de peso molecular superiores, a separação das fases tende a ocorrer mais facilmente, sendo necessárias concentrações mais baixas de NAPA 8000 e de PEG. Foi observada uma tendência semelhante para outros SABs constituídos por PEG-NaPA-sal<sup>185–187</sup> e por PEG-sal<sup>176,188–190</sup>. Este comportamento deve-se ao facto de que a hidrofobicidade do polímero aumenta com a sua massa molecular, o que leva que haja uma menor interação com o NAPA e a água, e são por isso mais facilmente excluídos para uma segunda fase aquosa<sup>191</sup>. O Pluronic L-35, com peso molecular de 1900 g.mol<sup>-1</sup>, por apresentar na sua constituição monómeros de etilenoglicol (mais hidrofílico) e propileno glicol (mais hidrofóbico), é o polímero que apresenta a maior região bifásica. Apesar do PPG ser um polímero mais hidrofóbico do que o PEG, este apresenta uma região bifásica mais reduzida, o que pode

dever-se ao seu peso molecular inferior. Contudo é difícil obter uma conclusão direta, uma vez que quer a estrutura do monómero constituinte, quer o peso molecular não são comparáveis.

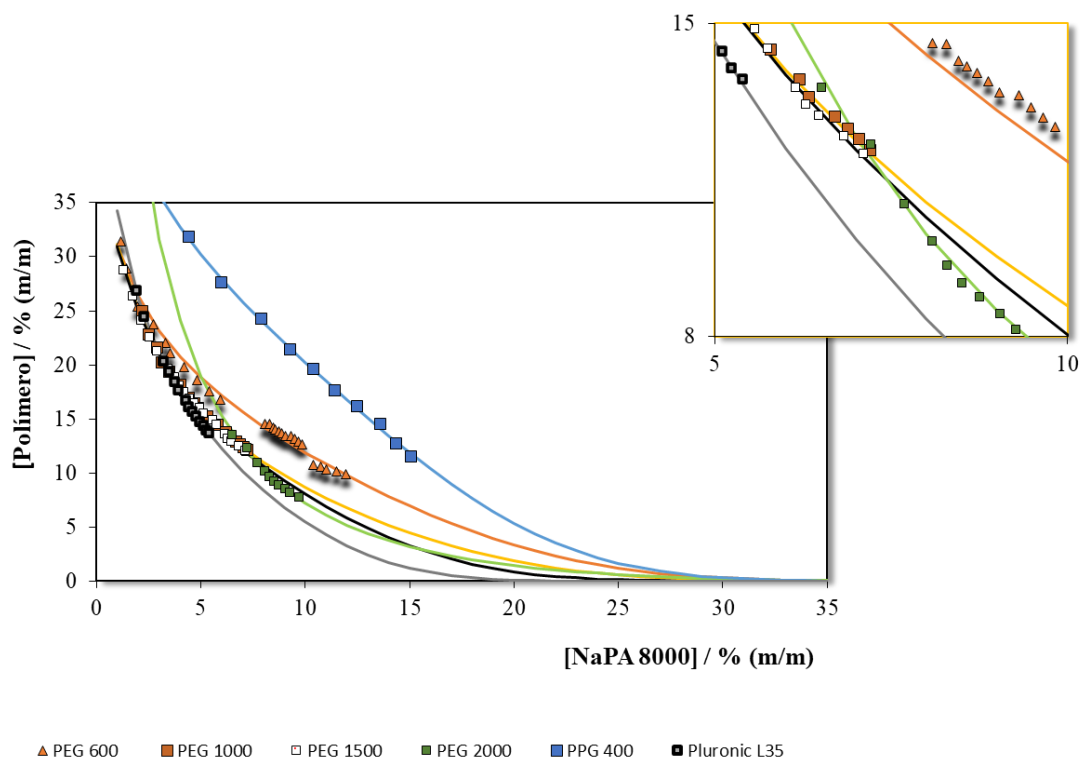


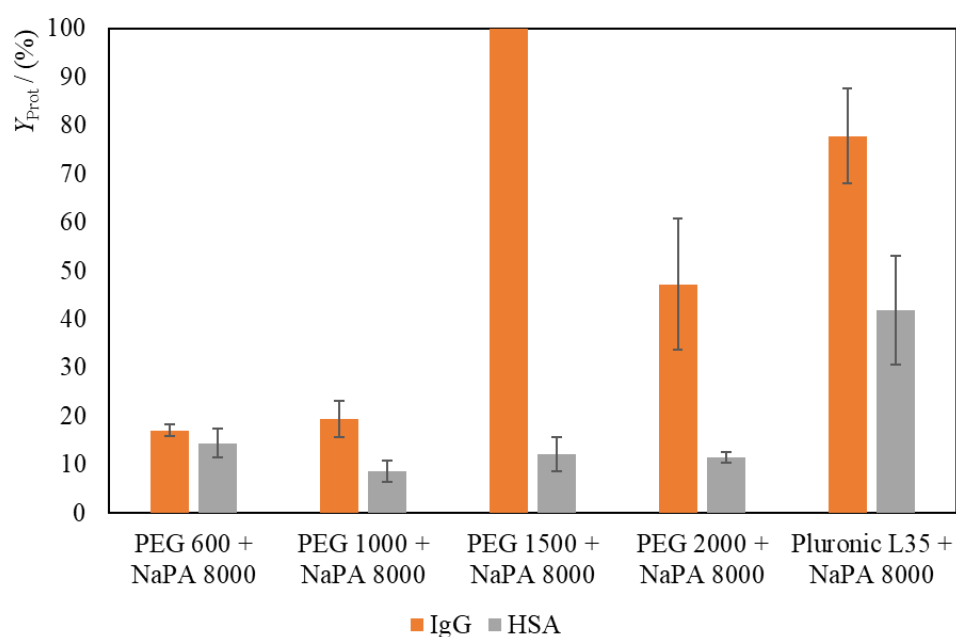
Figura 11 – Diagramas de fases dos sistemas ternários constituídos por polímero + NaPA 8000 + H<sub>2</sub>O. As linhas correspondem ao ajuste da curva binodal obtido pela equação de Equação 1.

### 3.2. Depleção da HSA e da IgG do soro humano utilizando sistemas constituídos por polímero + NaPA + H<sub>2</sub>O

Dos sistemas determinados anteriormente, aqueles formados por PEGs e Pluronic L-35 foram adotados nos estudos de depleção, uma vez que permitem abranger hidrofobicidades distintas através do uso de polímeros com propriedades comparáveis. A partir da análise das curvas binodais acima apresentadas (*Figura 11*), foi selecionado um ponto de mistura bifásico e comum a todos os sistemas: 10 %(m/m) polímero neutro + 13,5 %(m/m) NaPA 8000 + 20 %(m/m) Soro + 56,5 %(m/m) H<sub>2</sub>O. Nesta fase não se apresentam os resultados do SAB constituído por PPG 400 porque o ponto de mistura selecionado cai na região monofásica, sendo este um sistema que requer uma maior quantidade de polímeros para se formarem duas fases e sendo, portanto, menos sustentável.

As amostras dos diferentes SPTFs foram posteriormente analisadas por SE-HPLC-DAD de modo a ser possível quantificar a quantidade de cada proteína precipitada na

interfase. Para determinação dos rendimentos de depleção das proteínas na interfase, foram analisadas amostras de soro diluído em solução aquosa, cujo cromatograma revelou a presença de três picos (Apêndice C - *Figura C1*). Estes picos indicam a presença de agregados, IgG e HSA, com tempos de retenção de aproximadamente 11, 13 e 16 minutos, respetivamente. Os diferentes pesos moleculares ditam a ordem de eluição de cada proteína, sendo a IgG maior (150 kDa) do que a HSA (66 kDa), eluindo primeiro. Os valores de rendimento médio da interfase obtidos para cada um dos SAB acima mencionados encontram-se representados na *Figura 12* e os valores numéricos detalhados no Apêndice D – *Tabela D1*, juntamente com o pH das fases dos sistemas.



*Figura 12 - Rendimentos de depleção ( $Y_{Prot}$ , %) da IgG e da HSA obtidos utilizando SABs constituídos por diversos polímeros e NaPA 8000.*

Nos SPTFs estudados, os rendimentos de depleção obtidos variam entre  $17,06 \pm 1,16\%$  e  $100\%$  no caso da IgG, e entre  $8,58 \pm 2,24\%$  e  $41,49 \pm 11,24\%$  no caso da HSA. Com a exceção do PEG 1500, pode verificar-se um aumento gradual do rendimento de depleção da IgG na interfase à medida que o peso molecular do PEG aumenta entre 600 e 2000  $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$  e que a hidrofobicidade do polímero aumenta pela introdução de monómeros de propilenoglicol (Pluronic L-35). No caso da HSA, os rendimentos de depleção não variaram significativamente com o aumento do peso molecular do PEG. Por sua vez, no SPTF constituído por Pluronic L-35 foi obtido o maior rendimento de depleção da HSA. Desta

forma, pode concluir-se que o aumento da hidrofobicidade do polímero neutro é benéfico para o processo de depleção de ambas as proteínas. No caso do polímero PEG 1500, este registou valores de rendimento de depleção da IgG de 100%, indicando que podem existir interações específicas com este polímero que potenciam a precipitação.

Além dos efeitos hidrofóbicos induzidos pelo polímero neutro, também as interações eletrostáticas podem influenciar a precipitação das proteínas do soro. Na *Tabela D1* (Apêndice D) encontram-se indicados os pH das fases dos SABs correspondentes aos SPTFs aqui estudados. Os valores de pH dos sistemas variam entre 7,85 e 8,07. Sendo que o ponto isoelétrico da HSA é 4,7<sup>192</sup> e o da IgG é 6,5-9,5<sup>193</sup>, conclui-se que a HSA se encontra carregada negativamente e a IgG se encontra na sua forma não carregada. Os rendimentos de depleção superiores da IgG em comparação com a HSA podem ser justificados com base nos seus pontos isoelétricos, uma vez as proteínas são mais facilmente precipitadas no seu ponto isoelétrico, ao contrário das proteínas carregadas negativamente que têm uma solubilidade superior.

#### 4. Conclusão e trabalho futuro

Numa tentativa de desenvolver sistemas alternativos de pré-tratamento de soro humano que possam vir a melhorar a detecção de biomarcadores do cancro do pulmão, esta dissertação propõe a aplicação de SABs formados por dois polímeros, i.e., um polímero neutro e um polieletrólito, na depleção da HSA e da IgG (proteínas maioritárias do soro).

Numa primeira etapa, foram desenvolvidos SABs constituídos por seis polímeros neutros (PEG 600, PEG 1000, PEG 1500, PEG 2000, PPG 400 e Pluronic L35), NaPA 8000 e água através da determinação dos seus diagramas de fases. A determinação dos diagramas de fases permitiu avaliar o impacto da estrutura dos monómeros constituintes e do peso molecular dos polímeros neutros na formação de SABs com NaPA 8000. Verificou-se que quanto maior o peso molecular e a hidrofobicidade do polímero, maior é a capacidade de formação de SABs.

Após a identificação de misturas capazes de formar duas fases pela análise das curvas binodais, os SABs foram utilizados para desenvolver SPTFs pela adição de soro aos polímeros neutros, NaPA 8000 e água. A formação de um SPTF dá-se pela precipitação das proteínas maioritárias do soro na interfase do SAB, constituindo uma abordagem adequada para efetuar o pré-tratamento da amostra. Os estudos de depleção da IgG e da HSA presentes no soro revelaram que é possível obter rendimentos de depleção máximos de 100% e de 42%, respetivamente, como resultado do efeito hidrofóbico do polímero combinado com o pH do sistema. Os sistemas mais promissores foram aqueles contendo polímeros mais hidrofóbicos ou de maior peso molecular: no caso da precipitação simultânea de ambas as proteínas, os rendimentos de depleção mais elevados foram obtidos com o SAB formado por Pluronic L-35, ao passo que no caso da precipitação da IgG foi possível alcançar uma depleção completa com o SAB constituído por PEG 1500.

Os SABs constituídos por polímeros neutros e polieletrólito aqui propostos revelaram ser estratégias potenciais no pré-tratamento do soro humano, embora seja necessário otimizar outros parâmetros operacionais para maximizar a depleção simultânea de ambas as proteínas. Por exemplo, o ponto de mistura, o peso molecular dos polímeros neutros e do polieletrólito, bem como a presença de sais ou de líquidos iónicos (LIs) podem ser variáveis processuais de interesse. Ainda, é necessário avançar com estudos de extração e purificação de biomarcadores de cancro do pulmão de interesse, por exemplo, o cyfra 21-1 para avaliar a capacidade destes sistemas promoverem a precipitação das proteínas maioritárias na interfase e a purificação do biomarcador numa das fases aquosas.

## 5. Referências

- (1) McCormick, P. J. Cancer Tsunami: Emerging Trends, Economic Burden, and Perioperative Implications. *Current Anesthesiology Reports*. Springer December 1, 2018, pp 348–354. <https://doi.org/10.1007/s40140-018-0294-1>.
- (2) Sung, H.; Ferlay, J.; Siegel, R. L.; Laversanne, M.; Soerjomataram, I.; Jemal, A.; Bray, F. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA. Cancer J. Clin.* **2021**, *71* (3), 209–249. <https://doi.org/10.3322/caac.21660>.
- (3) Ellis, P. M.; Vandermeer, R. Delays in the Diagnosis of Lung Cancer. *J. Thorac. Dis.* **2011**, *3* (3), 183–188. <https://doi.org/10.3978/j.issn.2072-1439.2011.01.01>.
- (4) Bourzac, K. Diagnosis: Early Warning System. *Nature* **2014**, *513* (7517), S4–S6. <https://doi.org/10.1038/513S4a>.
- (5) Sotto-Mayor, R. Mortalidade Por Cancro Do Pulmão. *Acta Med. Port.* **2014**, *27* (1), 9. <https://doi.org/10.20344/amp.4876>.
- (6) Lung Cancer - Non-Small Cell: Stages | Cancer.Net <https://www.cancer.net/cancer-types/lung-cancer-non-small-cell/stages> (accessed Jan 12, 2021).
- (7) Corner, J.; Hopkinson, J.; Fitzsimmons, D.; Barclay, S.; Muers, M. Is Late Diagnosis of Lung Cancer Inevitable? Interview Study of Patients’ Recollections of Symptoms before Diagnosis. *Thorax* **2005**, *60* (4), 314–319. <https://doi.org/10.1136/thx.2004.029264>.
- (8) Guibert, N.; Pradines, A.; Mazieres, J.; Favre, G. Current and Future Applications of Liquid Biopsy in Nonsmall Cell Lung Cancer from Early to Advanced Stages. *Eur. Respir. Rev.* **2020**, *29* (155), 1, 2. <https://doi.org/10.1183/16000617.0052-2019>.
- (9) Sallam, R. M. Proteomics in Cancer Biomarkers Discovery: Challenges and Applications. *Disease Markers*. 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/321370>.
- (10) Zolotarjova, N.; Martosella, J.; Nicol, G.; Bailey, J.; Boyes, B. E.; Barrett, W. C. Differences among Techniques for High-Abundant Protein Depletion. *Proteomics* **2005**, *5* (13), 3304–3313. <https://doi.org/10.1002/pmic.200402021>.
- (11) Aberle, D. R.; Abtin, F.; Brown, K. Computed Tomography Screening for Lung Cancer: Has It Finally Arrived? Implications of the National Lung Screening Trial. *J. Clin. Oncol.* **2013**, *31* (8), 1002–1008. <https://doi.org/10.1200/JCO.2012.43.3110>.
- (12) Bach, P. B.; Mirkin, J. N.; Oliver, T. K.; Azzoli, C. G.; Berry, D. A.; Brawley, O. W.; Byers, T.; Colditz, G. A.; Gould, M. K.; Jett, J. R.; Sabichi, A. L.; Smith-Bindman,

- R.; Wood, D. E.; Qaseem, A.; Detterbeck, F. C. Benefits and Harms of CT Screening for Lung Cancer: A Systematic Review. *JAMA - J. Am. Med. Assoc.* **2012**, *307* (22), 2418–2429. <https://doi.org/10.1001/jama.2012.5521>.
- (13) Hsieh, S. Y.; Chen, R. K.; Pan, Y. H.; Lee, H. L. Systematical Evaluation of the Effects of Sample Collection Procedures on Low-Molecular-Weight Serum/Plasma Proteome Profiling. *Proteomics* **2006**, *6* (10), 3189–3198. <https://doi.org/10.1002/pmic.200500535>.
- (14) Luque-Garcia, J. L.; Neubert, T. A. Sample Preparation for Serum/Plasma Profiling and Biomarker Identification by Mass Spectrometry. *J. Chromatogr. A* **2007**, *1153* (1–2), 259–276. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2006.11.054>.
- (15) Andaç, M. Cibacron Blue Immobilized Poly(Glycidyl-Methacrylate) Nanobeads for Albumin Removal in Proteome Studies. *Artif. cells, nanomedicine, Biotechnol.* **2015**, *43* (2), 133–139. <https://doi.org/10.3109/21691401.2013.852102>.
- (16) Sjöbring, U.; Björck, L.; Kastern, W. Protein G Genes: Structure and Distribution of IgG-Binding and Albumin-Binding Domains. *Mol. Microbiol.* **1989**, *3* (3), 319–327. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1989.tb00177.x>.
- (17) Ma, Z.; Ramakrishna, S. Electrospun Regenerated Cellulose Nanofiber Affinity Membrane Functionalized with Protein A/G for IgG Purification. *J. Membr. Sci. - J Membr. SCI* **2008**, *319*, 23–28. <https://doi.org/10.1016/j.memsci.2008.03.045>.
- (18) Keshishian, H.; Burgess, M. W.; Specht, H.; Wallace, L.; Clauser, K. R.; Gillette, M. A.; Carr, S. A. Quantitative, Multiplexed Workflow for Deep Analysis of Human Blood Plasma and Biomarker Discovery by Mass Spectrometry. *Nat. Protoc.* **2017**, *12* (8), 1683–1701. <https://doi.org/10.1038/nprot.2017.054>.
- (19) de Jesus, J. R.; Galazzi, R. M.; de Lima, T. B.; Banzato, C. E. M.; de Almeida Lima E Silva, L. F.; de Rosalmeida Dantas, C.; Gozzo, F. C.; Arruda, M. A. Z. Simplifying the Human Serum Proteome for Discriminating Patients with Bipolar Disorder of Other Psychiatry Conditions. *Clin. Biochem.* **2017**, *50* (18), 1118–1125. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2017.06.009>.
- (20) Rice, S. J.; Liu, X.; Miller, B.; Joshi, M.; Zhu, J.; Caruso, C.; Gilbert, C.; Toth, J.; Reed, M.; Rassaei, N.; Das, A.; Barochia, A.; El-Bayoumy, K.; Belani, C. P. Proteomic Profiling of Human Plasma Identifies Apolipoprotein E as Being Associated with Smoking and a Marker for Squamous Metaplasia of the Lung. *Proteomics* **2015**, *15* (18), 3267–3277. <https://doi.org/10.1002/pmic.201500029>.
- (21) Thulasiraman, V.; Lin, S.; Gheorghiu, L.; Lathrop, J.; Lomas, L.; Hammond, D.;

- Boschetti, E. Reduction of the Concentration Difference of Proteins in Biological Liquids Using a Library of Combinatorial Ligands. *Electrophoresis* **2005**, *26* (18), 3561–3571. <https://doi.org/10.1002/elps.200500147>.
- (22) Beaulieu, N.; Bloom, D. E.; Bloom, L. R.; Stein, R. M. *Breakaway: The Global Burden of Cancer -Challenges and Opportunities. A Report from the Economist Intelligence Unit*; 2009.
- (23) Hanahan, D.; Weinberg, R. A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* **2011**, *144* (5), 646–674. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>.
- (24) Cancer <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer> (accessed Jan 21, 2021).
- (25) Latest Global Cancer Data given by IARC Global Cancer Observatory, Press Release N° 292. Lyon, France December 15, 2020, pp 1, 2.
- (26) Ferlay, J.; Shin, H. R.; Bray, F.; Forman, D.; Mathers, C.; Parkin, D. M. Estimates of Worldwide Burden of Cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int. J. Cancer* **2010**, *127* (12), 2893–2917. <https://doi.org/10.1002/ijc.25516>.
- (27) Ferlay, J.; Colombet, M.; Soerjomataram, I.; Mathers, C.; Parkin, D. M.; Piñeros, M.; Znaor, A.; Bray, F. Estimating the Global Cancer Incidence and Mortality in 2018: GLOBOCAN Sources and Methods. *Int. J. Cancer* **2019**, *144* (8), 1941–1953. <https://doi.org/10.1002/ijc.31937>.
- (28) Akaza, H. International Agency for Research on Cancer (IARC). *Choice Rev. Online* **2000**, *37* (06), 37-3382-37–3382. <https://doi.org/10.5860/CHOICE.37-3382>.
- (29) GLOBOCAN. Number of new cases in 2020, both sexes, all ages World Health Organization <https://gco.iarc.fr/today> (accessed Jan 17, 2021).
- (30) M. John, D. R.; Ross, D. H. *The Global Economic Cost of Cancer*; 2011.
- (31) McGuire, S. World Cancer Report 2014. Geneva, Switzerland: World Health Organization, International Agency for Research on Cancer, WHO Press, 2015. *Adv. Nutr.* **2016**, *7* (2), 418–419. <https://doi.org/10.3945/an.116.012211>.
- (32) Brown, D. W. Economic Value of Disability-Adjusted Life Years Lost to Violence: Estimates for WHO Member States. *Rev. Panam. Salud Publica* **2008**, *24* (3), 203–209. <https://doi.org/10.1590/s1020-49892008000900007>.
- (33) Nikolic, I. A.; Stanciole, A. E.; July, M. Z. Health, Nutrition and Population (HNP) Discussion Paper Chronic Emergency: Why NCDs Matter. **2011**, No. July.
- (34) Pearce, A.; Sharp, L.; Hanly, P.; Barchuk, A.; Bray, F.; de Camargo Cancela, M.; Gupta, P.; Meheus, F.; Qiao, Y.-L.; Sitas, F.; Wang, S.-M.; Soerjomataram, I.



- Productivity Losses Due to Premature Mortality from Cancer in Brazil, Russia, India, China, and South Africa (BRICS): A Population-Based Comparison. *Cancer Epidemiol.* **2018**, *53*, 27–34.  
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.canep.2017.12.013>.
- (35) U.S. Dept of Health. MEPS summary tables  
[https://meps.ahrq.gov/mepstrends/hc\\_cond/](https://meps.ahrq.gov/mepstrends/hc_cond/) (accessed Jan 22, 2021).
- (36) Society, A. C. The Economic Burden of Cancer | The Cancer Atlas  
<https://canceratlas.cancer.org/taking-action/economic-burden/> (accessed Jan 22, 2021).
- (37) Shrestha, A.; Martin, C.; Burton, M.; Walters, S.; Collins, K.; Wyld, L. Quality of Life versus Length of Life Considerations in Cancer Patients: A Systematic Literature Review. *Psychooncology.* **2019**, *28* (7), 1367–1380.  
<https://doi.org/10.1002/pon.5054>.
- (38) The American Cancer Society medical and editorial content team. Lung Cancer Early Detection, Diagnosis, and Staging. *Am. Cancer Soc.* **2019**.
- (39) Myers, D. J.; Wallen, J. M. Lung Adenocarcinoma.; Treasure Island (FL), 2020.
- (40) American Society of Clinical Oncology. Side Effects of Chemotherapy | Cancer.Net  
<https://www.cancer.net/navigating-cancer-care/how-cancer-treated/chemotherapy/side-effects-chemotherapy> (accessed Jan 22, 2021).
- (41) American Society of Clinical Oncology. Side Effects of Radiation Therapy | Cancer.Net  
<https://www.cancer.net/navigating-cancer-care/how-cancer-treated/radiation-therapy/side-effects-radiation-therapy> (accessed Jan 22, 2021).
- (42) American Society of Clinical Oncology. Side Effects of Immunotherapy | Cancer.Net  
<https://www.cancer.net/navigating-cancer-care/how-cancer-treated/immunotherapy-and-vaccines/side-effects-immunotherapy> (accessed Jan 22, 2021).
- (43) Petrelli, N. J.; Winer, E. P.; Brahmer, J.; Dubey, S.; Smith, S.; Thomas, C.; Vahdat, L. T.; Obel, J.; Vogelzang, N.; Markman, M.; Sweetenham, J. W.; Pfister, D.; Kris, M. G.; Schuchter, L. M.; Sawaya, R.; Raghavan, D.; Ganz, P. A.; Kramer, B. Clinical Cancer Advances 2009: Major Research Advances in Cancer Treatment, Prevention, and Screening—A Report From the American Society of Clinical Oncology. *J. Clin. Oncol.* **2009**, *27* (35), 6052–6069. <https://doi.org/10.1200/JCO.2009.26.6171>.
- (44) Chambers, S. K.; Morris, B. A.; Clutton, S.; Foley, E.; Giles, L.; Schofield, P.; O’Connell, D.; Dunn, J. Psychological Wellness and Health-Related Stigma: A Pilot Study of an Acceptance-Focused Cognitive Behavioural Intervention for People with

- Lung Cancer. *Eur. J. Cancer Care (Engl)*. **2015**, 24 (1), 60–70.  
<https://doi.org/10.1111/ecc.12221>.
- (45) Wang, B.; Hao, N.; Zhang, X. Factors Influencing the Psychology and Quality of Life in Lung Cancer Patients. *Saudi Med. J.* **2017**, 38 (9), 948–951.  
<https://doi.org/10.15537/smj.2017.9.18532>.
- (46) Sheehan, D. F.; Criss, S. D.; Chen, Y.; Eckel, A.; Palazzo, L.; Tramontano, A. C.; Hur, C.; Cipriano, L. E.; Kong, C. Y. Lung Cancer Costs by Treatment Strategy and Phase of Care among Patients Enrolled in Medicare. *Cancer Med.* **2019**, 8 (1), 94–103. <https://doi.org/10.1002/cam4.1896>.
- (47) Wood, R.; Taylor-Stokes, G. Cost Burden Associated with Advanced Non-Small Cell Lung Cancer in Europe and Influence of Disease Stage. *BMC Cancer* **2019**, 19 (1). <https://doi.org/10.1186/s12885-019-5428-4>.
- (48) Lukeman, J. M. What Is Lung Cancer? *Perspect. Lung Cancer* **2015**, 30–40.  
<https://doi.org/10.1159/000400400>.
- (49) Hwang, S. J.; Cheng, L. S. C.; Lozano, G.; Amos, C. I.; Gu, X.; Strong, L. C. Lung Cancer Risk in Germline P53 Mutation Carriers: Association between an Inherited Cancer Predisposition, Cigarette Smoking, and Cancer Risk. *Hum. Genet.* **2003**, 113 (3), 238–243. <https://doi.org/10.1007/s00439-003-0968-7>.
- (50) Squamous Cell Carcinoma of the Lungs: Symptoms and Treatment  
<https://www.verywellhealth.com/squamous-cell-carcinoma-of-the-lungs-in-depth-2249367> (accessed Jan 22, 2021).
- (51) Zappa, C.; Mousa, S. A. Non-Small Cell Lung Cancer: Current Treatment and Future Advances. *Transl. Lung Cancer Res.* **2016**, 5 (3), 288–300.  
<https://doi.org/10.21037/tlcr.2016.06.07>.
- (52) Squamous Cell Carcinoma of the Lung - Harvard Health  
<https://www.health.harvard.edu/cancer/squamous-cell-carcinoma-of-the-lung>  
 (accessed Jan 23, 2021).
- (53) Kini, S. R. Large Cell Undifferentiated Carcinoma. In *Color Atlas of Pulmonary Cytopathology*; Springer New York, 2002; pp 117–122. [https://doi.org/10.1007/978-0-387-21641-6\\_9](https://doi.org/10.1007/978-0-387-21641-6_9).
- (54) Mirkovic, N.; Nagda, S. Chapter 9 - Small Cell Lung Cancer. In *PET-CT in Radiotherapy Treatment Planning*; Paulino, A. C., Teh, B. S., Eds.; Elsevier: Philadelphia, 2008; pp 153–159. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-1-4160-3224-3.50012-8>.

- (55) The American Cancer Society. Can Lung Cancer Be Found Early ?  
<https://www.cancer.org/cancer/lung-cancer/detection-diagnosis-staging.html>.
- (56) Lung Cancer - Small Cell: Stages | Cancer.Net <https://www.cancer.net/cancer-types/lung-cancer-small-cell/stages> (accessed Jan 23, 2021).
- (57) Jin, Y.-J.; Zheng, C.; Ji, H.-B. 20 - Molecular and Cellular Characteristics of Small Cell Lung Cancer: Implications for Molecular-Targeted Cancer Therapy. In *Recent Advances in Cancer Research and Therapy*; Liu, X.-Y., Pestka, S., Shi, Y.-F., Eds.; Elsevier: Oxford, 2012; pp 597–616. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-397833-2.00020-0>.
- (58) Herndon, J.; Cirino, E. Small Cell Lung Cancer: Stages, Symptoms, Causes, and More <https://www.healthline.com/health/lung-cancer-small-cell> (accessed Jan 23, 2021).
- (59) Lung Cancer - Small Cell: Statistics | Cancer.Net <https://www.cancer.net/cancer-types/lung-cancer-small-cell/statistics> (accessed Jan 23, 2021).
- (60) American Cancer Society. What Is Lung Cancer? | Types of Lung Cancer <https://www.cancer.org/cancer/lung-cancer/about/what-is.html> (accessed Nov 27, 2021).
- (61) Mazzone PJ, Gould MK, Arenberg DA, Chen AC, Choi HK, D. F. Lung Cancer Survival Rates: Find Rates by Stages & Types <https://www.webmd.com/lung-cancer/lung-cancer-survival-rates> (accessed Jan 24, 2021).
- (62) Fauci, A. S.; Harrison, T. R. *Harrison's Principles of Internal Medicine*; McGraw-Hill, Health Professions Division, 1998.
- (63) Aberle, D. R.; Berg, C. D.; Black, W. C.; Church, T. R.; Fagerstrom, R. M.; Galen, B.; Gareen, I. F.; Gatsonis, C.; Goldin, J.; Gohagan, J. K.; Hillman, B.; Jaffe, C.; Kramer, B. S.; Lynch, D.; Marcus, P. M.; Schnall, M.; Sullivan, D. C.; Sullivan, D.; Zylak, C. J. The National Lung Screening Trial: Overview and Study Design. *Radiology* **2011**, 258 (1), 243–253. <https://doi.org/10.1148/radiol.10091808>.
- (64) Aberle, D. R.; Adams, A. M.; Berg, C. D.; Black, W. C.; Clapp, J. D.; Fagerstrom, R. M.; Gareen, I. F.; Gatsonis, C.; Marcus, P. M.; Sicks, J. D. Reduced Lung-Cancer Mortality with Low-Dose Computed Tomographic Screening. *N. Engl. J. Med.* **2011**, 365 (5), 395–409. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1102873>.
- (65) Dhopeswarkar, M. R.; Roberts, H. C.; Paul, N. S.; Dong, Z.; Tsao, M.; Menezes, R. J. Screen-Detected Lung Cancer: A Retrospective Analysis of CT Appearance. *Acad. Radiol.* **2011**, 18 (10), 1270–1276. <https://doi.org/10.1016/j.acra.2011.06.005>.

- (66) Sozzi, G.; Boeri, M. Potential Biomarkers for Lung Cancer Screening. *Translational Lung Cancer Research*. 2014, pp 139–148. <https://doi.org/10.3978/j.issn.2218-6751.2014.06.04>.
- (67) Villalobos, P.; Wistuba, I. I. Lung Cancer Biomarkers. *Hematology/Oncology Clinics of North America*. 2017, pp 13–29. <https://doi.org/10.1016/j.hoc.2016.08.006>.
- (68) Cho, J.-Y.; Sung, H.-J. Proteomic Approaches in Lung Cancer Biomarker Development. *Expert Rev. Proteomics* **2009**, *6* (1), 27–42. <https://doi.org/10.1586/14789450.6.1.27>.
- (69) Sung, H. J.; Cho, J. Y. Biomarkers for the Lung Cancer Diagnosis and Their Advances in Proteomics. *J. Biochem. Mol. Biol.* **2008**, *41* (9), 615–625. <https://doi.org/10.5483/bmbrep.2008.41.9.615>.
- (70) Kikuchi, T.; Carbone, D. P. Proteomics Analysis in Lung Cancer: Challenges and Opportunities. *Respirology* **2007**, *12* (1), 22–28. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1843.2006.00957.x>.
- (71) Lu, Y.; Li, S.; Zhu, S.; Gong, Y.; Shi, J.; Xu, L. L. Methylated DNA/RNA in Body Fluids as Biomarkers for Lung Cancer. *Biol. Proced. Online* **2017**, *19* (1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/s12575-017-0051-8>.
- (72) Kim, J.; Xu, Z.; Marignani, P. A. Single-Cell RNA Sequencing for the Identification of Early-Stage Lung Cancer Biomarkers from Circulating Blood. *npj Genomic Med.* **2021**, *6* (1). <https://doi.org/10.1038/s41525-021-00248-y>.
- (73) Hoseok, I.; Cho, J. Y. Lung Cancer Biomarkers. In *Advances in Clinical Chemistry*; 2015; Vol. 72, pp 107–170. <https://doi.org/10.1016/bs.acc.2015.07.003>.
- (74) Cho, W. C.-S. Potentially Useful Biomarkers for the Diagnosis, Treatment and Prognosis of Lung Cancer. *Biomed. Pharmacother.* **2007**, *61* (9), 515–519. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2007.08.005>.
- (75) Romero-Ventosa, E. Y.; Blanco-Prieto, S.; González-Piñeiro, A. L.; Rodríguez-Berrocal, F. J.; Piñeiro-Corrales, G.; Páez de la Cadena, M. Pretreatment Levels of the Serum Biomarkers CEA, CYFRA 21–1, SCC and the Soluble EGFR and Its Ligands EGF, TGF-Alpha, HB-EGF in the Prediction of Outcome in Erlotinib Treated Non-Small-Cell Lung Cancer Patients. *Springerplus* **2015**, *4* (1). <https://doi.org/10.1186/s40064-015-0891-0>.
- (76) Himmier, A.; O'Brien, M. E.; Lynch, V.; Clynes, M.; Morgan, R.; Dowling, P. Proteomic Analysis of Bronchoalveolar Lavage Fluid (BALF) from Lung Cancer Patients Using Label-Free Mass Spectrometry. *BBA Clin.* **2017**, *7*, 97–104.

- <https://doi.org/10.1016/j.bbaci.2017.03.001>.
- (77) Zhang, H.; Li, C.; Hu, F.; Zhang, X.; Shen, Y.; Chen, Y.; Li, F. Auxiliary Diagnostic Value of Tumor Biomarkers in Pleural Fluid for Lung Cancer-Associated Malignant Pleural Effusion. *Respir. Res.* **2020**, *21* (1), 1–7. <https://doi.org/10.1186/s12931-020-01557-z>.
- (78) Kalomenidis, I.; Dimakou, K.; Kolintza, A.; Vlami, K.; Papadakis, M.; Sotiropoulou, C.; Orphanidou, D.; Roussos, C.; Papiris, S. Sputum Carcinoembryonic Antigen, Neuron-Specific Enolase and Cytokeratin Fragment 19 Levels in Lung Cancer Diagnosis. *Respirology* **2004**, *9* (1), 54–59. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1843.2003.00536.x>.
- (79) Li, J.; Chen, P.; Mao, C.-M.; Tang, X.-P.; Zhu, L.-R. Evaluation of Diagnostic Value of Four Tumor Markers in Bronchoalveolar Lavage Fluid of Peripheral Lung Cancer. *Asia. Pac. J. Clin. Oncol.* **2014**, *10* (2), 141–148. <https://doi.org/10.1111/ajco.12066>.
- (80) Schneider, J. Tumor Markers in Detection of Lung Cancer. In *Advances in clinical chemistry*; 2006; Vol. 42, pp 1–41. [https://doi.org/10.1016/S0065-2423\(06\)42001-1](https://doi.org/10.1016/S0065-2423(06)42001-1).
- (81) Zhao, Z.; Verma, V.; Zhang, M. Anaplastic Lymphoma Kinase: Role in Cancer and Therapy Perspective. *Cancer Biol. Ther.* **2015**, *16* (12), 1691–1701. <https://doi.org/10.1080/15384047.2015.1095407>.
- (82) Chatziandreou, I.; Tsioli, P.; Sakellariou, S.; Mourkioti, I.; Giannopoulou, I.; Levidou, G.; Korkolopoulou, P.; Patsouris, E.; Saetta, A. A. Comprehensive Molecular Analysis of NSCLC; Clinicopathological Associations. *PLoS One* **2015**, *10* (7). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0133859>.
- (83) Fujimoto, J.; Wistuba, I. I. Current Concepts on the Molecular Pathology of Non-Small Cell Lung Carcinoma. *Semin. Diagn. Pathol.* **2014**, *31* (4), 306–313. <https://doi.org/10.1053/j.semdp.2014.06.008>.
- (84) Sholl, L. M. Biomarkers in Lung Adenocarcinoma: A Decade of Progress. *Arch. Pathol. Lab. Med.* **2015**, *139* (4), 469–480. <https://doi.org/10.5858/arpa.2014-0128-RA>.
- (85) Fang, D. D.; Zhang, B.; Gu, Q.; Lira, M.; Xu, Q.; Sun, H.; Qian, M.; Sheng, W.; Ozeck, M.; Wang, Z.; Zhang, C.; Chen, X.; Chen, K. X.; Li, J.; Chen, S. H.; Christensen, J.; Mao, M.; Chan, C. C. HIP1-ALK, a Novel ALK Fusion Variant That Responds to Crizotinib. *J. Thorac. Oncol.* **2014**, *9* (3), 285–294. <https://doi.org/10.1097/JTO.0000000000000087>.
- (86) enjamin J. Solomon, M.B., B.S., Ph.D., Tony Mok, M.D., Dong-Wan Kim, M.D.,

- Ph.D., Yi-Long Wu, M.D., Kazuhiko Nakagawa, M.D., Ph.D., Tarek Mekhail, M.D., Enriqueta Felip, M.D., Ph.D., Federico Cappuzzo, M.D., Jolanda Paolini, B.Sc., Tiziana Usari, B.Sc., S, and F. B. No TFirst-Line Crizotinib versus Chemotherapy in ALK-Positive Lung Cancer. *N. Engl. J. Med.* **2014**.  
<https://doi.org/10.1056/NEJMoa1408440>.
- (87) Kerr, K. M.; Bubendorf, L.; Edelman, M. J.; Marchetti, A.; Mok, T.; Novello, S.; O’Byrne, K.; Stahel, R.; Peters, S.; Felip, E.; Besse, B.; Vansteenkiste, J.; Eberhardt, W.; Baas, P.; Reck, M.; Syrigos, K.; Paz-Ares, L.; Smit, E. F.; Meldgaard, P.; Adjei, A.; Nicolson, M.; Crinò, L.; Schil, P. Van; Senan, S.; Faivre-Finn, C.; Rocco, G.; Veronesi, G.; Douillard, J. Y.; Lim, E.; Doooms, C.; Weder, W.; de Ruyscher, D.; Le Pechoux, C.; de Leyn, P.; Westeel, V. Second ESMO Consensus Conference on Lung Cancer: Pathology and Molecular Biomarkers for Non-Small-Cell Lung Cancer. *Ann. Oncol.* **2014**, *25* (9), 1681–1690. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdu145>.
- (88) Choi, Y. L.; Soda, M.; Yamashita, Y.; Ueno, T.; Takashima, J.; Nakajima, T.; Yatabe, Y.; Takeuchi, K.; Hamada, T.; Haruta, H.; Ishikawa, Y.; Kimura, H.; Mitsudomi, T.; Tanio, Y.; Mano, H. E 1734. **2010**.
- (89) Sasaki, T.; Okuda, K.; Zheng, W.; Butrynski, J.; Capelletti, M.; Wang, L.; Gray, N. S.; Wilner, K.; Christensen, J. G.; Demetri, G.; Shapiro, G. I.; Rodig, S. J.; Eck, M. J.; Jänne, P. A. The Neuroblastoma-Associated F1174L ALK Mutation Causes Resistance to an ALK Kinase Inhibitor in ALK-Translocated Cancers. *Cancer Res.* **2010**, *70* (24), 10038–10043. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-2956>.
- (90) Cabillic, F.; Gros, A.; Dugay, F.; Begueret, H.; Mesturoux, L.; Chiforeanu, D. C.; Dufrenot, L.; Jauffret, V.; Dachary, D.; Corre, R.; Lespagnol, A.; Soler, G.; Dagher, J.; Catros, V.; Le Calve, M.; Merlio, J. P.; Belaud-Rotureau, M. A. Parallel FISH and Immunohistochemical Studies of ALK Status in 3244 Non-Small-Cell Lung Cancers Reveal Major Discordances. *J. Thorac. Oncol.* **2014**, *9* (3), 295–306.  
<https://doi.org/10.1097/JTO.0000000000000072>.
- (91) Martinez, P.; Hernández-Losa, J.; Montero, M. Á.; Cedrés, S.; Castellví, J.; Martínez-Martí, A.; Tallada, N.; Murtra-Garrell, N.; Navarro-Mendivill, A.; Rodríguez-Freixinos, V.; Canela, M.; Ramon y Cajal, S.; Felip, E. Fluorescence In Situ Hybridization and Immunohistochemistry as Diagnostic Methods for ALK Positive Non-Small Cell Lung Cancer Patients. *PLoS One* **2013**, *8* (1), 1–6.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0052261>.
- (92) Sholl, L. M.; Weremowicz, S.; Gray, S. W.; Wong, K. K.; Chirieac, L. R.; Lindeman,

- N. I.; Hornick, J. L. Combined Use of ALK Immunohistochemistry and FISH for Optimal Detection of ALK-Rearranged Lung Adenocarcinomas. *J. Thorac. Oncol.* **2013**, 8 (3), 322–328. <https://doi.org/10.1097/JTO.0b013e31827db604>.
- (93) Yi, E. S.; Boland, J. M.; Maleszewski, J. J.; Roden, A. C.; Oliveira, A. M.; Aubry, M. C.; Erickson-Johnson, M. R.; Caron, B. L.; Li, Y.; Tang, H.; Stoddard, S.; Wampfler, J.; Kulig, K.; Yang, P. Correlation of IHC and FISH for ALK Gene Rearrangement in Non-Small Cell Lung Carcinoma: IHC Score Algorithm for FISH. *J. Thorac. Oncol.* **2011**, 6 (3), 459–465. <https://doi.org/10.1097/JTO.0b013e318209edb9>.
- (94) Cell, N.; Cancer, L. Screening of Anaplastic Lymphoma Kinase Rearrangement. *J. Thorac. Oncol.* **2011**, 6 (3), 466–472.
- (95) Wallander, M. L.; Geiersbach, K. B.; Tripp, S. R.; Layfield, L. J. Comparison of Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction, Immunohistochemistry, and Fluorescence in Situ Hybridization Methodologies for Detection of Echinoderm Microtubule-Associated Proteinlike 4-Anaplastic Lymphoma Kinase Fusion-Positive Non-Small. *Arch. Pathol. Lab. Med.* **2012**, 136 (7), 796–803. <https://doi.org/10.5858/arpa.2011-0321-OA>.
- (96) Pekar-Zlotin, M.; Hirsch, F. R.; Soussan-Gutman, L.; Ilouze, M.; Dvir, A.; Boyle, T.; Wynes, M.; Miller, V. A.; Lipson, D.; Palmer, G. A.; Ali, S. M.; Dekel, S.; Brenner, R.; Bunn, P. A.; Peled, N. Fluorescence In Situ Hybridization, Immunohistochemistry, and Next-Generation Sequencing for Detection of EML4-ALK Rearrangement in Lung Cancer. *Oncologist* **2015**, 20 (3), 316–322. <https://doi.org/10.1634/theoncologist.2014-0389>.
- (97) Sharma, S. V.; Bell, D. W.; Settleman, J.; Haber, D. A. Epidermal Growth Factor Receptor Mutations in Lung Cancer. *Nat. Rev. Cancer* **2007**, 7 (3), 169–181. <https://doi.org/10.1038/nrc2088>.
- (98) Mok, T. S. K. Personalized Medicine in Lung Cancer: What We Need to Know. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **2011**, 8 (11), 661–668. <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2011.126>.
- (99) Villalobos, P.; Wistuba, I. I. Lung Cancer Biomarkers. *Hematol. Oncol. Clin. North Am.* **2017**, 31 (1), 13–29. <https://doi.org/10.1016/j.hoc.2016.08.006>.
- (100) Gold, P.; Goldberg, N. The Carcinoembryonic Antigen (CEA): Past, Present, and Future. *McGill J. Med.* **2020**, 3 (1), 46–66. <https://doi.org/10.26443/mjm.v3i1.472>.
- (101) Okada, M.; Nishio, W.; Sakamoto, T.; Uchino, K.; Yuki, T.; Nakagawa, A.; Tsubota, N. Prognostic Significance of Perioperative Serum Carcinoembryonic Antigen in Non-Small Cell Lung Cancer: Analysis of 1,000 Consecutive Resections for Clinical

- Stage I Disease. *Ann. Thorac. Surg.* **2004**, 78 (1), 216–221.  
<https://doi.org/10.1016/j.athoracsur.2004.02.009>.
- (102) Maestranzi, S.; Przemioslo, R.; Mitchell, H.; Sherwood, R. A. *Annals of Clinical Biochemistry : An International Journal of Biochemistry in Medicine.* **1998**.  
<https://doi.org/10.1177/000456329803500113>.
- (103) Duffy, M. J.; Van Dalen, A.; Haglund, C.; Hansson, L.; Klapdor, R.; Lamerz, R.; Nilsson, O.; Sturgeon, C.; Topolcan, O. Clinical Utility of Biochemical Markers in Colorectal Cancer: European Group on Tumour Markers (EGTM) Guidelines. *Eur. J. Cancer* **2003**, 39 (6), 718–727. [https://doi.org/10.1016/S0959-8049\(02\)00811-0](https://doi.org/10.1016/S0959-8049(02)00811-0).
- (104) Fukuda, I.; Yamakado, M.; Kiyose, H. Influence of Smoking on Serum Carcinoembryonic Antigen Levels in Subjects Who Underwent Multiphasic Health Testing and Services. *J. Med. Syst.* **1998**, 22 (2), 89–93.  
<https://doi.org/10.1023/a:1022643102208>.
- (105) Miura, N.; Nakamura, H.; Sato, R.; Tsukamoto, T.; Harada, T.; Takahashi, S.; Adachi, Y.; Shomori, K.; Sano, A.; Kishimoto, Y.; Ito, H.; Hasegawa, J.; Shiota, G. Clinical Usefulness of Serum Telomerase Reverse Transcriptase (HTERT) mRNA and Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) mRNA as a Novel Tumor Marker for Lung Cancer. *Cancer Sci.* **2006**, 97 (12), 1366–1373.  
<https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2006.00342.x>.
- (106) Craig, S. P.; Day, I. N. M.; Thompson, R. J.; Craig, I. W. Localisation of Neurone-Specific Enolase (ENO2) to 12p13. *Cytogenet. Genome Res.* **1990**, 54 (1–2), 71–73.  
<https://doi.org/10.1159/000132960>.
- (107) Ferrigno, D.; Buccheri, G.; Giordano, C. Neuron-Specific Enolase Is an Effective Tumour Marker in Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC). *Lung Cancer* **2003**, 41 (3), 311–320. [https://doi.org/10.1016/S0169-5002\(03\)00232-0](https://doi.org/10.1016/S0169-5002(03)00232-0).
- (108) Wang, B.; He, Y.-J.; Tian, Y.-X.; Yang, R.-N.; Zhu, Y.-R.; Qiu, H. Clinical Utility of Haptoglobin in Combination with CEA, NSE and CYFRA21-1 for Diagnosis of Lung Cancer. *Asian Pac. J. Cancer Prev.* **2014**, 15 (22), 9611–9614.  
<https://doi.org/10.7314/apjcp.2014.15.22.9611>.
- (109) Wang, B.; He, Y.-J.; Tian, Y.-X.; Yang, R.-N.; Zhu, Y.-R.; Qiu, H. Clinical Utility of Haptoglobin in Combination with CEA, NSE and CYFRA21-1 for Diagnosis of Lung Cancer. *Asian Pac. J. Cancer Prev.* **2014**, 15 (22), 9611–9614.  
<https://doi.org/10.7314/apjcp.2014.15.22.9611>.
- (110) John, R.; Christofides, N.; Spencer, C. A.; Wild, D. Thyroid. In *The Immunoassay*



- Handbook*; Elsevier Ltd, 2013; Vol. 1, pp 673–693. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-097037-0.00056-7>.
- (111) Suminami, Y.; Kishi, F.; Sekiguchi, K.; Kato, H. Squamous Cell Carcinoma Antigen Is a New Member of the Serine Protease Inhibitors. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1991**, *181* (1), 51–58. [https://doi.org/10.1016/S0006-291X\(05\)81380-4](https://doi.org/10.1016/S0006-291X(05)81380-4).
- (112) Yang, D.; Wang, J.; Zhang, L. *Serum SCCA Levels in Patients Suffering Cancers or Other Diseases*, 1st ed.; Elsevier Inc., 2019; Vol. 162. <https://doi.org/10.1016/bs.pmbts.2018.12.004>.
- (113) Duk, J. M.; van Voorst Vader, P. C.; ten Hoor, K. A.; Hollema, H.; Doeglas, H. M.; de Bruijn, H. W. Elevated Levels of Squamous Cell Carcinoma Antigen in Patients with a Benign Disease of the Skin. *Cancer* **1989**, *64* (8), 1652–1656. [https://doi.org/10.1002/1097-0142\(19891015\)64:8<1652::aid-cncr2820640816>3.0.co;2-m](https://doi.org/10.1002/1097-0142(19891015)64:8<1652::aid-cncr2820640816>3.0.co;2-m).
- (114) Body, J. J.; Sculier, J. P.; Raymakers, N.; Paesmans, M.; Ravez, P.; Libert, P.; Richez, M.; Dabouis, G.; Lacroix, H.; Bureau, G.; Thiriaux, J.; Lecomte, J.; Brohée, D.; Mommen, P.; Frühling, J.; Klastersky, J. Evaluation of Squamous Cell Carcinoma Antigen as a New Marker for Lung Cancer. *Cancer* **1990**, *65* (7), 1552–1556. [https://doi.org/10.1002/1097-0142\(19900401\)65:7<1552::AID-CNCR2820650717>3.0.CO;2-D](https://doi.org/10.1002/1097-0142(19900401)65:7<1552::AID-CNCR2820650717>3.0.CO;2-D).
- (115) Greenberg, A. K.; Lee, M. S. Biomarkers for Lung Cancer: Clinical Uses. *Curr. Opin. Pulm. Med.* **2007**, *13* (4), 249–255. <https://doi.org/10.1097/MCP.0b013e32819f8f06>.
- (116) Yu, D.; Du, K.; Liu, T.; Chen, G. Prognostic Value of Tumor Markers, NSE, CA125 and SCC, in Operable NSCLC Patients. *Int. J. Mol. Sci.* **2013**, *14* (6), 11145–11156. <https://doi.org/10.3390/ijms140611145>.
- (117) Medizin, S. R. *Lexikon Der Medizinischen Laboratoriums - Diagnostik*.
- (118) KRT19 keratin 19 [Homo sapiens (human)] - Gene - NCBI <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene?Db=gene&Cmd=ShowDetailView&TermToSearch=3880> (accessed Nov 29, 2021).
- (119) KRT19 protein | CYFRA 21-1 Protein-P08727.4 <https://www.mybiosource.com/krt19-protein/cyfra-21-1/173529> (accessed Nov 29, 2021).
- (120) Kulpa, J.; Wójcik, E.; Reinfuss, M.; Kołodziejcki, L. Carcinoembryonic Antigen, Squamous Cell Carcinoma Antigen, CYFRA 21-1, and Neuron-Specific Enolase in

- Squamous Cell Lung Cancer Patients. *Clin. Chem.* **2002**, *48* (11), 1931–1937.  
<https://doi.org/10.1093/clinchem/48.11.1931>.
- (121) Okamura, K.; Takayama, K.; Izumi, M.; Harada, T.; Furuyama, K.; Nakanishi, Y. Diagnostic Value of CEA and CYFRA 21-1 Tumor Markers in Primary Lung Cancer. *Lung Cancer* **2013**, *80* (1), 45–49. <https://doi.org/10.1016/j.lungcan.2013.01.002>.
- (122) Buccheri, G.; Ferrigno, D. Lung Tumor Markers of Cytokeratin Origin: An Overview. *Lung Cancer* **2001**, *34*, S65–S69. [https://doi.org/10.1016/S0169-5002\(01\)00347-6](https://doi.org/10.1016/S0169-5002(01)00347-6).
- (123) Xu, Y.; Xu, L.; Qiu, M.; Wang, J.; Zhou, Q.; Xu, L.; Wang, J.; Yin, R. Prognostic Value of Serum Cytokeratin 19 Fragments (Cyfra 21-1) in Patients with Non-Small Cell Lung Cancer. *Sci. Rep.* **2015**, *5*, 1–10. <https://doi.org/10.1038/srep09444>.
- (124) Ma, S.; Shen, L.; Qian, N.; Chen, K. The Prognostic Values of CA125, CA19.9, NSE, AND SCC for Stage I NSCLC Are Limited. *Cancer Biomark.* *10* (3–4), 155–162. <https://doi.org/10.3233/CBM-2012-0246>.
- (125) Kagohashi, K.; Satoh, H.; Ishikawa, H.; Ohtsuka, M.; Sekizawa, K. A Re-Evaluation of Squamous Cell Carcinoma Antigen (SCC) as a Serum Marker for Non-Small Cell Lung Cancer. *Med. Oncol.* **2008**, *25* (2), 187–189. <https://doi.org/10.1007/s12032-007-9021-3>.
- (126) Doseeva, V.; Colpitts, T.; Gao, G.; Woodcock, J.; Knezevic, V. Performance of a Multiplexed Dual Analyte Immunoassay for the Early Detection of Non-Small Cell Lung Cancer. *J. Transl. Med.* **2015**, *13* (1), 1–15. <https://doi.org/10.1186/s12967-015-0419-y>.
- (127) Ajona, D.; Ramirez, A.; Sainz, C.; Bertolo, C.; Gonzalez, A.; Varo, N.; Lozano, M. D.; Zulueta, J. J.; Mesa-Guzman, M.; C Martin, A.; Perez-Palacios, R.; Perez-Gracia, J. L.; Massion, P. P.; Montuenga, L. M.; Pio, R. A Model Based on the Quantification of Complement C4c, CYFRA 21-1 and CRP Exhibits High Specificity for the Early Diagnosis of Lung Cancer. *Transl. Res.* **2021**, *233*, 77–91. <https://doi.org/10.1016/j.trsl.2021.02.009>.
- (128) Lathrop, J. T.; Hayes, T. K.; Carrick, K.; Hammond, D. J. Rarity Gives a Charm: Evaluation of Trace Proteins in Plasma and Serum. *Expert Rev. Proteomics* **2005**, *2* (3), 393–406. <https://doi.org/10.1586/14789450.2.3.393>.
- (129) Zolotarjova, N.; Martosella, J.; Nicol, G.; Bailey, J.; Boyes, B. E.; Barrett, W. C. Differences among Techniques for High-Abundant Protein Depletion. *Proteomics* **2005**, *5* (13), 3304–3313. <https://doi.org/10.1002/pmic.200402021>.

- (130) Bylda, C.; Thiele, R.; Kobold, U.; Volmer, D. A. Recent Advances in Sample Preparation Techniques to Overcome Difficulties Encountered during Quantitative Analysis of Small Molecules from Biofluids Using LC-MS/MS. *Analyst* **2014**, *139* (10), 2265–2276. <https://doi.org/10.1039/c4an00094c>.
- (131) Luque-Garcia, J. L.; Neubert, T. A. Sample Preparation for Serum/Plasma Profiling and Biomarker Identification by Mass Spectrometry. *J. Chromatogr. A* **2007**, *1153* (1–2), 259–276. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2006.11.054>.
- (132) Villanueva, J.; Philip, J.; Entenberg, D.; Chaparro, C. A.; Tanwar, M. K.; Holland, E. C.; Tempst, P.; Lancet, L. Serum Peptide Profiling by Magnetic Particle-Assisted , Automated Sample Processing and MALDI-TOF Mass Spectrometry. **2004**, *76* (6), 1560–1570.
- (133) Lee, P. Y.; Osman, J.; Low, T. Y.; Jamal, R. Plasma/Serum Proteomics: Depletion Strategies for Reducing High-Abundance Proteins for Biomarker Discovery. *Bioanalysis* **2019**, *11* (19), 1799–1812. <https://doi.org/10.4155/bio-2019-0145>.
- (134) Graça, V.; Sousa, F.; Santos, P.; Almeida, P. Chapter 2 Protein Purification by Aminosquarylium Cyanine Dye-Affinity Chromatography; 2015; pp 22–33.
- (135) Dean, P. D. G.; Watson, D. H. Protein Purification Using Immobilised Triazine Dyes. *J. Chromatogr. A* **1979**, *165* (3), 301–319. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(00\)88187-X](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0021-9673(00)88187-X).
- (136) Leatherbarrow, R. J.; Deant, P. D. G. *Studies on the Mechanism of Binding of Serum Albumins to Immobilized Cibacron Blue F3G A*; 1980.
- (137) Di Girolamo, F.; Righetti, P. G. Plasma Proteomics for Biomarker Discovery: A Study in Blue. *Electrophoresis* **2011**, *32* (24), 3638–3644. <https://doi.org/10.1002/elps.201100307>.
- (138) Li, Z.; Rodriguez, E.; Azaria, S.; Pekarek, A.; Hage, D. S. Affinity Monolith Chromatography: A Review of General Principles and Applications. *Electrophoresis* **2017**, *38* (22–23), 2837–2850. <https://doi.org/10.1002/elps.201700101>.
- (139) Liang-Schenkelberg, J.; Fieg, G.; Waluga, T. Molecular Insight into Affinity Interaction between Cibacron Blue and Proteins. *Ind. Eng. Chem. Res.* **2017**, *56* (34), 9691–9697. <https://doi.org/10.1021/acs.iecr.7b01556>.
- (140) Liang-Schenkelberg, J.; Fieg, G.; Waluga, T. Molecular Insight into Affinity Interaction between Cibacron Blue and Proteins. *Ind. Eng. Chem. Res.* **2017**, *56* (34), 9691–9697. <https://doi.org/10.1021/acs.iecr.7b01556>.
- (141) Andac, C. A.; Andac, M.; Denizli, A. Predicting the Binding Properties of Cibacron

- Blue F3GA in Affinity Separation Systems. *Int. J. Biol. Macromol.* **2007**, *41* (4), 430–438. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2007.06.008>.
- (142) MOKS, T.; ABRAHMSÉN, L.; NILSSON, B.; HELLMAN, U.; SJÖQUIST, J.; UHLÉN, M. Staphylococcal Protein A Consists of Five IgG-Binding Domains. *Eur. J. Biochem.* **1986**, *156* (3), 637–643. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1986.tb09625.x>.
- (143) Polaskova, V.; Kapur, A.; Khan, A.; Molloy, M. P.; Baker, M. S. High-Abundance Protein Depletion: Comparison of Methods for Human Plasma Biomarker Discovery. *Electrophoresis* **2010**, *31* (3), 471–482. <https://doi.org/10.1002/elps.200900286>.
- (144) Garcia, S.; Baldasso, P. A.; Guest, P. C.; Martins-de-Souza, D. Depletion of Highly Abundant Proteins of the Human Blood Plasma: Applications in Proteomics Studies of Psychiatric Disorders. *Methods Mol. Biol.* **2017**, *1546*, 195–204. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6730-8\\_16](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6730-8_16).
- (145) Wewer Albrechtsen, N. J.; Geyer, P. E.; Doll, S.; Treit, P. V.; Bojsen-Møller, K. N.; Martinussen, C.; Jørgensen, N. B.; Torekov, S. S.; Meier, F.; Niu, L.; Santos, A.; Keilhauer, E. C.; Holst, J. J.; Madsbad, S.; Mann, M. Plasma Proteome Profiling Reveals Dynamics of Inflammatory and Lipid Homeostasis Markers after Roux-En-Y Gastric Bypass Surgery. *Cell Syst.* **2018**, *7* (6), 601—612.e3. <https://doi.org/10.1016/j.cels.2018.10.012>.
- (146) Lan, J.; Núñez Galindo, A.; Doecke, J.; Fowler, C.; Martins, R. N.; Rainey-Smith, S. R.; Cominetti, O.; Dayon, L. Systematic Evaluation of the Use of Human Plasma and Serum for Mass-Spectrometry-Based Shotgun Proteomics. *J. Proteome Res.* **2018**, *17* (4), 1426–1435. <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.7b00788>.
- (147) Kitamura, Y.; Usami, R.; Ichihara, S.; Kida, H.; Satoh, M.; Tomimoto, H.; Murata, M.; Oikawa, S. Plasma Protein Profiling for Potential Biomarkers in the Early Diagnosis of Alzheimer's Disease. *Neurol. Res.* **2017**, *39* (3), 231–238. <https://doi.org/10.1080/01616412.2017.1281195>.
- (148) Smith, M. P. W.; Wood, S. L.; Zougman, A.; Ho, J. T. C.; Peng, J.; Jackson, D.; Cairns, D. A.; Lewington, A. J. P.; Selby, P. J.; Banks, R. E. A Systematic Analysis of the Effects of Increasing Degrees of Serum Immunodepletion in Terms of Depth of Coverage and Other Key Aspects in Top-down and Bottom-up Proteomic Analyses. *Proteomics* **2011**, *11* (11), 2222–2235. <https://doi.org/10.1002/pmic.201100005>.

- (149) Beer, L. A.; Ky, B.; Barnhart, K. T.; Speicher, D. W. In-Depth, Reproducible Analysis of Human Plasma Using IgY 14 and SuperMix Immunodepletion. *Methods Mol. Biol.* **2017**, *1619*, 81–101. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7057-5\\_7](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7057-5_7).
- (150) Pisanu, S.; Biossa, G.; Carcangiu, L.; Uzzau, S.; Pagnozzi, D. Comparative Evaluation of Seven Commercial Products for Human Serum Enrichment/Depletion by Shotgun Proteomics. *Talanta* **2018**, *185*, 213–220. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2018.03.086>.
- (151) Di Girolamo, F.; Righetti, P. G.; Soste, M.; Feng, Y.; Picotti, P. Reproducibility of Combinatorial Peptide Ligand Libraries for Proteome Capture Evaluated by Selected Reaction Monitoring. *J. Proteomics* **2013**, *89*, 215–226. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2013.05.037>.
- (152) Candiano, G.; Santucci, L.; Bruschi, M.; Petretto, A.; D’Ambrosio, C.; Scaloni, A.; Righetti, P. G.; Ghiggeri, G. M. “Cheek-to-Cheek” Urinary Proteome Profiling via Combinatorial Peptide Ligand Libraries: A Novel, Unexpected Elution System. *J. Proteomics* **2012**, *75* (3), 796–805. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2011.09.018>.
- (153) Bortner, J. D. J.; Richie, J. P. J.; Das, A.; Liao, J.; Umstead, T. M.; Stanley, A.; Stanley, B. A.; Belani, C. P.; El-Bayoumy, K. Proteomic Profiling of Human Plasma by ITRAQ Reveals Down-Regulation of ITI-HC3 and VDBP by Cigarette Smoking. *J. Proteome Res.* **2011**, *10* (3), 1151–1159. <https://doi.org/10.1021/pr100925p>.
- (154) Mahn, A.; Ismail, M. Depletion of Highly Abundant Proteins in Blood Plasma by Ammonium Sulfate Precipitation for 2D-PAGE Analysis. *J. Chromatogr. B, Anal. Technol. Biomed. life Sci.* **2011**, *879* (30), 3645–3648. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2011.09.024>.
- (155) Liu, G.; Zhao, Y.; Angeles, A.; Hamuro, L. L.; Arnold, M. E.; Shen, J. X. A Novel and Cost Effective Method of Removing Excess Albumin from Plasma/Serum Samples and Its Impacts on LC-MS/MS Bioanalysis of Therapeutic Proteins. *Anal. Chem.* **2014**, *86* (16), 8336–8343. <https://doi.org/10.1021/ac501837t>.
- (156) Liu, Z.; Fan, S.; Liu, H.; Yu, J.; Qiao, R.; Zhou, M.; Yang, Y.; Zhou, J.; Xie, P. Enhanced Detection of Low-Abundance Human Plasma Proteins by Integrating Polyethylene Glycol Fractionation and Immunoaffinity Depletion. *PLoS One* **2016**, *11* (11). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0166306>.
- (157) Warder, S. E.; Tucker, L. A.; Strelitzer, T. J.; McKeegan, E. M.; Meuth, J. L.; Jung, P. M.; Saraf, A.; Singh, B.; Lai-Zhang, J.; Gagne, G.; Rogers, J. C. Reducing Agent-Mediated Precipitation of High-Abundance Plasma Proteins. *Anal. Biochem.* **2009**,

- 387 (2), 184–193. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2009.01.013>.
- (158) Bollineni, R. C.; Guldvik, I. J.; Grönberg, H.; Wiklund, F.; Mills, I. G.; Thiede, B. A. Differential Protein Solubility Approach for the Depletion of Highly Abundant Proteins in Plasma Using Ammonium Sulfate. *Analyst* **2015**, *140* (24), 8109–8117. <https://doi.org/10.1039/c5an01560j>.
- (159) Colantonio, D. A.; Dunkinson, C.; Bovenkamp, D. E.; Van Eyk, J. E. Effective Removal of Albumin from Serum. *Proteomics* **2005**, *5* (15), 3831–3835. <https://doi.org/10.1002/pmic.200401235>.
- (160) Fernández, C.; Santos, H. M.; Ruíz-Romero, C.; Blanco, F. J.; Capelo-Martínez, J. L. A Comparison of Depletion versus Equalization for Reducing High-Abundance Proteins in Human Serum. *Electrophoresis* **2011**, *32* (21), 2966–2974. <https://doi.org/10.1002/elps.201100183>.
- (161) Chen, Y.-Y.; Lin, S.-Y.; Yeh, Y.-Y.; Hsiao, H.-H.; Wu, C.-Y.; Chen, S.-T.; Wang, A. H.-J. A Modified Protein Precipitation Procedure for Efficient Removal of Albumin from Serum. *Electrophoresis* **2005**, *26* (11), 2117–2127. <https://doi.org/10.1002/elps.200410381>.
- (162) Mehrani, H.; Ghanei, M.; Aslani, J.; Tabatabaei, Z. Plasma Proteomic Profile of Sulfur Mustard Exposed Lung Diseases Patients Using 2-Dimensional Gel Electrophoresis. *Clin. Proteomics* **2011**, *8* (1), 2. <https://doi.org/10.1186/1559-0275-8-2>.
- (163) Fernández, C.; Santos, H. M.; Ruíz-Romero, C.; Blanco, F. J.; Capelo-Martínez, J.-L. A Comparison of Depletion versus Equalization for Reducing High-Abundance Proteins in Human Serum. *Electrophoresis* **2011**, *32* (21), 2966–2974. <https://doi.org/10.1002/elps.201100183>.
- (164) Liu, Z.; Fan, S.; Liu, H.; Yu, J.; Qiao, R.; Zhou, M.; Yang, Y.; Zhou, J.; Xie, P. Enhanced Detection of Low-Abundance Human Plasma Proteins by Integrating Polyethylene Glycol Fractionation and Immunoaffinity Depletion. *PLoS One* **2016**, *11* (11), 1–17. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0166306>.
- (165) Magalhães, F. F.; Tavares, A. P. M.; Freire, M. G. Advances in Aqueous Biphasic Systems for Biotechnology Applications. *Curr. Opin. Green Sustain. Chem.* **2021**, *27*, 100417. <https://doi.org/10.1016/j.cogsc.2020.100417>.
- (166) Albertsson, P.-A. Partition of Cell Particles and Macromolecules: Separation and Purification of Biomolecules, Cell Organelles, Membranes and Cells in Aqueous Polymer Two Phase Systems and Their Use in Biochemical Analysis and

- Biotechnology. *Cell Biochem. Funct.* **1987**, 5, 233–234.
- (167) Freire, M. G.; Cláudio, A. F. M.; Araújo, J. M. M.; Coutinho, J. A. P.; Marrucho, I. M.; Canongia Lopes, J. N.; Rebelo, L. P. N. Aqueous Biphasic Systems: A Boost Brought about by Using Ionic Liquids. *Chem. Soc. Rev.* **2012**, 41 (14), 4966–4995. <https://doi.org/10.1039/c2cs35151j>.
- (168) Beijerinck, M. W. Über Eine Eigentümlichkeit Der Löslichen Stärke. *Cent. f. Bakteriol. 2. Abt.* **1896**, 2, 697–699.
- (169) Kulaguin-Chicaroux, A.; Zeiner, T. Novel Aqueous Two-Phase System Based on a Hyperbranched Polymer. *Fluid Phase Equilib.* **2014**, 362, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.fluid.2013.07.059>.
- (170) Silva, L. H. M. da; Loh, W. Sistemas Aquosos Bifásicos: Fundamentos e Aplicações Para Partição/Purificação de Proteínas. *Quim. Nova* **2006**, 29 (6), 1345–1351. <https://doi.org/10.1590/s0100-40422006000600033>.
- (171) ALBERTSSON, P.-Å. Partition of Proteins in Liquid Polymer–Polymer Two-Phase Systems. *Nature* **1958**, 182 (4637), 709–711. <https://doi.org/10.1038/182709a0>.
- (172) Rosa, P. A. J.; Ferreira, I. F.; Azevedo, A. M.; Aires-Barros, M. R. Aqueous Two-Phase Systems: A Viable Platform in the Manufacturing of Biopharmaceuticals. *J. Chromatogr. A* **2010**, 1217 (16), 2296–2305. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2009.11.034>.
- (173) Iqbal, M.; Tao, Y.; Xie, S.; Zhu, Y.; Chen, D.; Wang, X.; Huang, L.; Peng, D.; Sattar, A.; Shabbir, M. A. B.; Hussain, H. I.; Ahmed, S.; Yuan, Z. Aqueous Two-Phase System (ATPS): An Overview and Advances in Its Applications. *Biol. Proced. Online* **2016**, 18 (1), 1–18. <https://doi.org/10.1186/s12575-016-0048-8>.
- (174) Pereira, J. F. B.; Freire, M. G.; Coutinho, J. A. P. Aqueous Two-Phase Systems: Towards Novel and More Disruptive Applications. *Fluid Phase Equilib.* **2020**, 505, 112341. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.fluid.2019.112341>.
- (175) Chew, K. W.; Ling, T. C.; Show, P. L. Recent Developments and Applications of Three-Phase Partitioning for the Recovery of Proteins. *Sep. Purif. Rev.* **2019**, 48 (1), 52–64. <https://doi.org/10.1080/15422119.2018.1427596>.
- (176) Belchior, D. C. V.; Freire, M. G. Simultaneous Separation of Egg White Proteins Using Aqueous Three-Phase Partitioning Systems. *J. Mol. Liq.* **2021**, 336, 116245. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2021.116245>.
- (177) Raymond, F. D.; Moss, D. W.; Fisher, D. Separation of Alkaline Phosphatase Isoforms with and without Intact Glycan-Phosphatidylinositol Anchors in Aqueous

- Polymer Phase Systems. *Clin. Chim. Acta* **1994**, 227 (1–2), 111–120.  
[https://doi.org/10.1016/0009-8981\(94\)90140-6](https://doi.org/10.1016/0009-8981(94)90140-6).
- (178) Pereira, M. Sistemas Aquosos Bifásicos Constituídos Por Líquidos Iônicos Para Concentração e Purificação de Biomarcadores Tumorais. Tese de Doutorado. Universidade de Aveiro. **2017**, 1–42.
- (179) Santos, J. H. P. M.; Silva, F. A. e; Coutinho, J. A. P.; Ventura, S. P. M.; Pessoa Junior, A. Ionic Liquids as a Novel Class of Electrolytes in Polymeric Aqueous Biphasic Systems. *Process Biochem.* **2015**.  
<https://doi.org/10.1016/j.procbio.2015.02.001>.
- (180) Santos, J. H. P. M.; Martins, M.; Silvestre, A. J. D.; Coutinho, J. A. P.; Ventura, S. P. M. Fractionation of Phenolic Compounds from Lignin Depolymerisation Using Polymeric Aqueous Biphasic Systems with Ionic Surfactants as Electrolytes. *Green Chem.* **2016**, 18 (20), 5569–5579. <https://doi.org/10.1039/c6gc01440b>.
- (181) Johansson, H. O.; Magaldi, F. M.; Feitosa, E.; Pessoa, A. Protein Partitioning in Poly(Ethylene Glycol)/Sodium Polyacrylate Aqueous Two-Phase Systems. *J. Chromatogr. A* **2008**, 1178 (1–2), 145–153.  
<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2007.11.071>.
- (182) Johansson, H. O.; Ishii, M.; Minaguti, M.; Feitosa, E.; Penna, T. C. V.; Pessoa, A. Separation and Partitioning of Green Fluorescent Protein from Escherichia Coli Homogenate in Poly(Ethylene Glycol)/Sodium-Poly(Acrylate) Aqueous Two-Phase Systems. *Sep. Purif. Technol.* **2008**, 62 (1), 166–174.  
<https://doi.org/10.1016/j.seppur.2008.01.017>.
- (183) Pereira, J. F. B.; Santos, V. C.; Johansson, H. O.; Teixeira, J. A. C.; Pessoa, A. A Stable Liquid-Liquid Extraction System for Clavulanic Acid Using Polymer-Based Aqueous Two-Phase Systems. *Sep. Purif. Technol.* **2012**, 98, 441–450.  
<https://doi.org/10.1016/j.seppur.2012.08.008>.
- (184) Merchuk, J. C.; Andrews, B. A.; Asenjo, J. A. Aqueous Two-Phase Systems for Protein Separation. Studies on Phase Inversion. *J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. Appl.* **1998**, 711 (1–2), 285–293. [https://doi.org/10.1016/s0378-4347\(97\)00594-x](https://doi.org/10.1016/s0378-4347(97)00594-x).
- (185) Johansson, H.-O.; Feitosa, E.; Junior, A. P. Phase Diagrams of the Aqueous Two-Phase Systems of Poly(Ethylene Glycol)/Sodium Polyacrylate/Salts. *Polymers (Basel)*. **2011**, 3 (1), 587–601. <https://doi.org/10.3390/polym3010587>.
- (186) Saravanan, S.; Rao, J. R.; Nair, B. U.; Ramasami, T. Aqueous Two-Phase Poly(Ethylene Glycol)-Poly(Acrylic Acid) System for Protein Partitioning: Influence



- of Molecular Weight, PH and Temperature. *Process Biochem.* **2008**, *43* (9), 905–911. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2008.04.011>.
- (187) Barros, K. V. G.; Souza, P. M.; Freitas, M. M.; Filho, E. X. F.; Junior, A. P.; Magalhães, P. O. PEG/NaPA Aqueous Two-Phase Systems for the Purification of Proteases Expressed by *Penicillium Restrictum* from Brazilian Savanna. *Process Biochem.* **2014**, *49* (12), 2305–2312. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2014.09.022>.
- (188) Azevedo, A. M.; Gomes, A. G.; Rosa, P. A. J.; Ferreira, I. F.; Pisco, A. M. M. O.; Aires-Barros, M. R. Partitioning of Human Antibodies in Polyethylene Glycol-Sodium Citrate Aqueous Two-Phase Systems. *Sep. Purif. Technol.* **2009**, *65* (1), 14–21. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2007.12.010>.
- (189) Almeida, M. R.; Passos, H.; Pereira, M. M.; Lima, Á. S.; Coutinho, J. A. P.; Freire, M. G. Ionic Liquids as Additives to Enhance the Extraction of Antioxidants in Aqueous Two-Phase Systems. *Sep. Purif. Technol.* **2014**, *128*, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2014.03.004>.
- (190) Ferreira, A. M.; Faustino, V. F. M.; Mondal, D.; Coutinho, J. A. P.; Freire, M. G. Improving the Extraction and Purification of Immunoglobulin G by the Use of Ionic Liquids as Adjuvants in Aqueous Biphasic Systems. *J. Biotechnol.* **2016**, *236*, 166–175. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2016.08.015>.
- (191) Freire, M. G.; Pereira, J. F. B.; Francisco, M.; Rodríguez, H.; Rebelo, L. P. N.; Rogers, R. D.; Coutinho, J. A. P. Insight into the Interactions That Control the Phase Behaviour of New Aqueous Biphasic Systems Composed of Polyethylene Glycol Polymers and Ionic Liquids. *Chem. - A Eur. J.* **2012**, *18* (6), 1831–1839. <https://doi.org/10.1002/chem.201101780>.
- (192) Sigma-Aldrich. Albumin from Human Serum. No. 8590.
- (193) Chiodi, F.; Sidén, Å.; Ösby, E. Isoelectric Focusing of Monoclonal Immunoglobulin G, A and M Followed by Detection with the Avidin-biotin System. *Electrophoresis* **1985**, *6* (3), 124–128. <https://doi.org/10.1002/elps.1150060305>.

## Apêndices

### Apêndice A - Curvas de calibração para a determinação da quantidade de proteínas

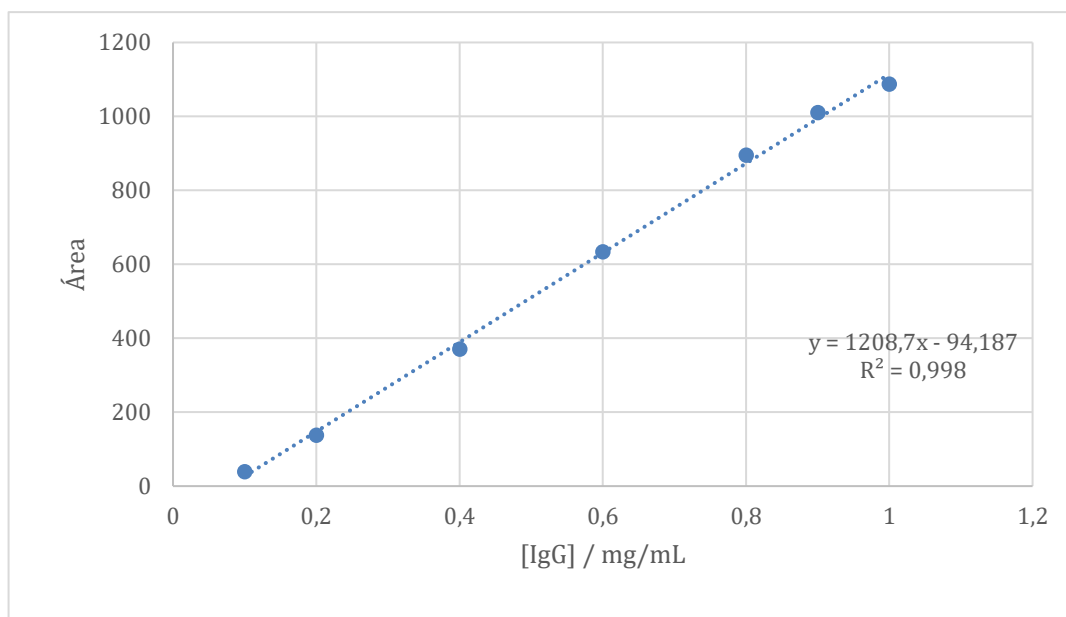


Figura A 1 - Curva de calibração usada para a quantificação da IgG por SE-HPLC-DAD ( $\lambda = 280$  nm).

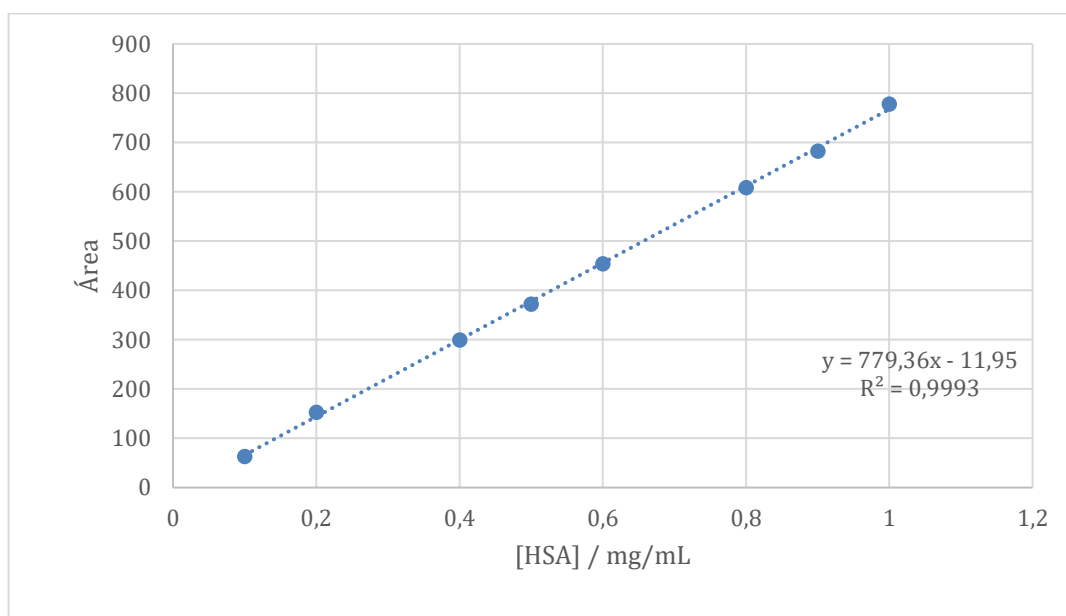


Figura A 2 - Curva de calibração usada para a quantificação da HSA por SE-HPLC-DAD ( $\lambda = 280$  nm).

**Apêndice B - Dados experimentais das curvas binodais dos sistemas ternários compostos por polímero + NaPA + H<sub>2</sub>O**

*Tabela B1 – Frações mássicas obtidas experimentalmente para os SABs constituídos por PEG 600 (1) e NaPA 8000 (2) a 25 °C e pressão atmosférica.*

<b>PEG 600</b>			
<b>% (m/m) (1)</b>	<b>% (m/m) (2)</b>	<b>% (m/m) (1)</b>	<b>% (m/m) (2)</b>
31,4388	1,1544	9,4518	12,2651
28,9241	1,4312	9,0489	12,5722
25,4027	1,9714	8,7480	13,1415
23,7821	2,7180	8,2900	13,5142
22,0672	3,3104	7,8056	13,9034
21,0817	3,5327	7,3485	14,5568
19,7680	4,1801	6,6774	14,9974
18,6309	4,8220	6,4497	15,5219
17,5708	5,4132	6,2398	15,7765
16,7570	5,9279	6,0087	15,8732
14,5549	8,0841	5,6048	16,4884
14,5460	8,2816	5,7353	16,6084
14,1551	8,4539	5,2639	17,0478
14,0422	8,5790	5,0230	17,5363
13,8846	8,7258	4,7913	17,6757
13,7160	8,8768	4,2923	18,2215
13,4639	9,0394	4,2973	18,4153
13,3875	9,3075	3,7570	19,2925
13,1304	9,4853	3,5913	19,3488
12,8917	9,6566	3,1251	20,5453
12,6889	9,8338	2,8616	20,9530
10,7500	10,3950	2,4427	21,9824
10,6106	10,7485	1,9672	23,3916
10,2858	10,9882	1,7241	24,3929
10,1265	11,5023	1,0079	25,1347
9,8557	11,9638	0,8779	26,9228

*Tabela B2 – Frações mássicas obtidas experimentalmente para os SABs constituídos por PEG 1000 (1) e NaPA 8000 (2) a 25 °C e pressão atmosférica.*

<b>PEG 1000</b>			
<b>% (m/m) (1)</b>	<b>% (m/m) (2)</b>	<b>% (m/m) (1)</b>	<b>% (m/m) (2)</b>
48,3391	3,1066	11,9381	7,3006
24,9508	2,1801	11,6022	7,5652
22,8191	2,5201	11,3713	7,7267
21,5605	2,8895	11,1414	7,8513
20,2179	3,1465	10,7662	8,1592
19,3684	3,4768	10,6691	8,1922
18,1669	4,0283	10,3114	8,5573
16,9433	4,4056	10,0321	8,8076
16,4248	4,6680	9,7621	9,0489
15,9777	4,8574	9,5554	9,2244
15,2413	5,3131	9,2876	9,4711
14,4217	5,7860	9,1421	9,5834
13,7445	6,1961	8,9504	9,7658
13,3606	6,3272	8,6670	10,0437
12,9136	6,7007	8,4959	10,1682
12,6365	6,8836	8,2462	10,4296
12,4089	7,0389	8,0753	10,5749
12,1606	7,2056	7,9798	10,6414

*Tabela B3 – Frações mássicas obtidas experimentalmente para os SABs constituídos por PEG 1500 (1) e NaPA 8000 (2) a 25 °C e pressão atmosférica.*

<b>PEG 1500</b>			
<b>% (m/m) (1)</b>	<b>% (m/m) (2)</b>	<b>% (m/m) (1)</b>	<b>% (m/m) (2)</b>
55,7000	1,5293	11,8486	7,1837
28,7329	1,3030	11,5739	7,4398
26,3644	1,7445	11,2587	7,6605
24,1061	2,1677	10,8980	7,8723
22,5141	2,5507	10,5241	8,1606
21,2909	2,9170	10,1928	8,3616
20,3087	3,1568	10,0415	8,4508
19,5854	3,4582	9,8009	8,6512
18,8501	3,7332	9,5526	8,8133
18,0875	3,9707	9,3350	9,0168
17,4999	4,1865	9,1224	9,1161
16,9052	4,4817	8,9408	9,2769
16,4006	4,6843	8,7674	9,4321
16,0115	4,9455	8,5299	9,6018
15,5135	5,1363	8,3425	9,7196
14,8625	5,5712	8,1947	9,8625
14,4283	5,7467	8,1045	9,9136
13,5569	6,1514	7,9634	10,0438
13,1929	6,2965	7,8757	10,0856
12,9269	6,4836	7,7603	10,1856
12,4870	6,8340	7,6379	10,2950
12,0846	7,1120	7,5234	10,3949

*Tabela B4 – Frações mássicas obtidas experimentalmente para os SABs constituídos por PEG 2000 (1) e NaPA 8000 (2) a 25 °C e pressão atmosférica.*

<b>PEG 2000</b>	
<b>% (m/m) (1)</b>	<b>% (m/m) (2)</b>
42,2100	8,1232
16,6328	6,4042
13,5505	6,5119
12,2848	7,2174
10,9595	7,6925
10,1316	8,0835
9,5935	8,3020
9,2007	8,5091
8,8869	8,7583
8,5045	9,0518
8,1430	9,2796
7,7474	9,6998

*Tabela B5 – Frações mássicas obtidas experimentalmente para os SABs constituídos por PPG 400 (1) e NaPA 8000 (2) a 25 °C e pressão atmosférica.*

<b>PPG 400</b>	
<b>% (m/m) (1)</b>	<b>% (m/m) (2)</b>
64,6053	1,4243
31,8073	4,4104
27,6083	5,9880
24,2943	7,8895
21,3877	9,2886
19,5795	10,3704
17,6738	11,4270
16,1740	12,4705
14,5239	13,5947
12,7542	14,3340
11,4976	15,0755

*Tabela B6 – Frações mássicas obtidas experimentalmente para os SABs constituídos por Pluronic L35 (1) e NaPA 8000 (2) a 25 °C e pressão atmosférica.*

<b>Pluronic L35</b>			
<b>% (m/m) (1)</b>	<b>% (m/m) (2)</b>	<b>% (m/m) (1)</b>	<b>% (m/m) (2)</b>
26,9217	1,8849	12,7322	5,7627
24,4838	2,2588	12,5244	5,9010
20,3637	3,1830	12,2484	5,9996
19,3847	3,4388	12,0067	6,1130
18,4785	3,7111	11,7638	6,2019
17,6688	3,9205	11,5688	6,3370
16,7571	4,2670	11,3342	6,4057
16,1614	4,3863	11,1574	6,5361
15,6846	4,5655	10,9257	6,6182
15,2464	4,7657	10,7662	6,7145
14,7933	4,9454	10,6619	6,6495
14,3915	5,1044	12,7322	5,7627
14,0057	5,2348	12,5244	5,9010
13,7537	5,3933		



### Apêndice C – Perfil cromatográfico do soro humano

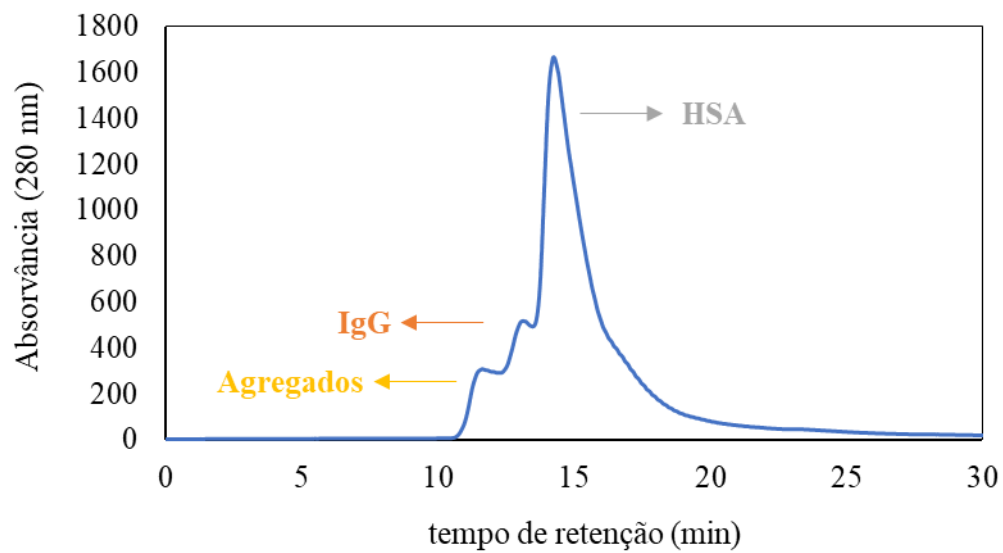


Figura C1 – Exemplo de um cromatograma de soro humano diluído em solução aquosa obtido por SE-HPLC-DAD.

## Apêndice D – Rendimentos de depleção

*Tabela D1 – Rendimentos de depleção da IgG ( $Y_{IgG}$ , %) e da HSA ( $Y_{HSA}$ , %) e respectivos desvios-padrão ( $\sigma$ ) obtidos por aplicação dos SABs constituídos por polímero e NaPA 8000, assim como pH dos sistemas.*

SAB	$Y_{IgG} \pm \sigma$ (%)	$Y_{HSA} \pm \sigma$ (%)	pH ( $\pm 0.02$ )	
			Fase rica em polímero neutro	Fase rica em NaPA 8000
PEG 600 + NaPA 8000	17,06 $\pm$ 1,16	14,45 $\pm$ 3,02	7,99	7,99
PEG 1000 + NaPA 8000	19,43 $\pm$ 3,74	8,58 $\pm$ 2,24	8,02	7,98
PEG 1500 + NaPA 8000	100	12,26 $\pm$ 3,53	7,97	7,85
PEG 2000 + NaPA 8000	47,22 $\pm$ 13,53	11,51 $\pm$ 1,02	8,01	7,96
Pluronic L35 + NaPA 8000	77,78 $\pm$ 9,83	41,89 $\pm$ 11,24	8,07	7,47