

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

ANDREA CORAZZI PELOSI

**ANÁLISE METABOLÔMICA PARA INVESTIGAÇÃO DO
SECRETOMA TUMORAL EM MODELO DE CO CULTURA 3D**

Bragança Paulista
2022

ANDREA CORAZZI PELOSI – R.A. 001201909044

**ANÁLISE METABOLÔMICA PARA INVESTIGAÇÃO DO
SECRETOMA TUMORAL EM MODELO DE CO CULTURA 3D**

Tese apresentada no Programa de Pós graduação
Stricto Sensu em Ciências da Saúde da
Universidade São Francisco como requisito para
obtenção do título de Doutor em Ciências da
Saúde.

Área de Concentração: Biologia Molecular e
Celular

Orientador: Prof. Dr. Leonardo Henrique
Dalcheco Messias

Bragança Paulista
2022

WI 529 P448a

Pelosi, Andrea Corazzi

Análise metabólica para investigação do secretoma

tumoral em modelo de Co-cultura 3D / Andrea Corazzi Pelosi. -- Bragança Paulista, 2022.

40 p.

Dissertação (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências da Saúde da Universidade São Francisco.

Orientação de: Leonardo Henrique Dalcheco Messias

1. Espectrometria de massas. 2. Cultura de células 3D 3. Neoplasia Colônica.
4. Biomarcadores. I. Messias, Leonardo Henrique Dalcheco. II. Título.



PELOSI, Andrea Corazzi. “Análise metabolômica para investigação do secretoma tumoral em modelo de co-cultura 3D”. Tese defendida e aprovada no programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências da Saúde da Universidade São Francisco em 07 de novembro de 2022 pela Banca examinadora constituída pelos membros:

Prof. Dr. Leonardo Henrique Dalcheco Messias - Orientador e
Presidente
Universidade São
Francisco

Prof. Dr. Carlos Afonso
Clara
Fundação Pio
XII

Prof. Dr. Fábio Henrique da
Silva
Universidade São
Francisco

Profa. Dra. Raquel
Girardello
Universidade São
Francisco

Prof. Dr. Pedro Paulo Menezes
Scariot
Faculdade de Ciências
Aplicadas

Agradecimentos

À minha família, especialmente ao marido, Marcos Pelosi que me apoiou todos os dias em todas as horas e quem me ajuda e divide comigo as alegrias e desafios da vida.

Ao meu filho Marcelo pelo apoio e palavras certas nas horas certas. Aos meus pais sempre presentes.

Ao meu orientador Leonardo Dalcheco Messias que me acolheu no meio do caminho sem hesitar e possibilitou a concretização dessa jornada.

À professora Denise Gonçalves Priolli que começou essa jornada comigo, por todo o apoio e oportunidade.

À Professora Andreia M. Porcari

Aos colaboradores Anna Maria Fernandes e Àlex Rossini Silva.

Ao Professor e amigo Guilherme Chohfi de Miguel.

Aos alunos de iniciação científica Leonardo Maciel, Rafael Bredariol, Giulia Carli Mendes, Lívia Silva.

Às amigas alunas “guerreiras” Luisa Forti Bueno e Jéssica Kaoru Yamamoto Palma, companheiras de bancada, mas mais que isso, amigas da vida! Aos meus alunos, minha inspiração.

À Universidade São Francisco que foi parte integral no meu desenvolvimento como docente e pós graduando.

Epígrafe:

Caminhos percorridos e desistências

Ao terminar o doutorado, algo instantaneamente fez sentido: os caminhos da vida e como são percorridos!

Sou uma pessoa que aceita desafios e na minha jornada desisti de alguns caminhos. Aquela sensação de não terminar sempre ficou no meu pensamento, porém agora ao finalizar essa etapa, percebi que trilhamos até o fim os caminhos que verdadeiramente nos pertencem, e que somos corajosos até mesmo desistindo de alguns!

Siga sua bússola interna e pise firme em direção ao fim dos caminhos certos, assim você sentirá, enfim, que foi bem-sucedido.

RESUMO

O número de pacientes com câncer colorretal (CCR) está aumentando mundialmente. Evidências crescentes têm mostrado que o microambiente tumoral desempenha um papel importante no desenvolvimento e progressão do CCR. Embora acessar o microambiente tumoral possa ser uma abordagem terapêutica promissora, os mecanismos pelos quais as células inflamatórias promovem a tumorigênese do CCR não são bem conhecidos. As tecnologias de culturas de células tridimensionais (3D), que melhor mimetizam o microambiente complexo dos tecidos, estão sendo crescentemente avaliadas como uma ferramenta para a triagem pré-clínica de novas moléculas clinicamente promissoras e para o estudo do metabolismo tecidual. Estudos de metabólitos excretados no espaço extracelular (secretoma) permitem o entendimento da dinâmica do metabolismo de tecidos, mudanças causadas pelo desenvolvimento tumoral e intervenções terapêuticas. Embora bem avançados no campo da proteômica, estudos do secretoma de metabólitos de baixo peso molecular (< 1500 Da) ainda são muito escassos. Este estudo apresenta um protocolo de metabolômica não direcionada baseada na técnica híbrida de cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas de alta resolução para a análise de metabólitos de baixo peso molecular excretados nos meios de cultura 3D e co-culturas (modelo de secretoma). Para tanto, foram analisadas células de carcinoma de cólon humano HT-29 e pré-adipócitos 3T3-L1 em monocultura 3D e co-cultura 3D. A identificação putativa de metabólitos identificou um conjunto de metabólitos, entre os quais, ácido araquidônico, ácido glicérico, ácido docosapentaenóico e beta-alanina, os quais estão relacionados ao câncer e obesidade. Este protocolo representa uma possibilidade de catalogar metabólitos excretados no meio extracelular de uma maneira compreensiva e não direcionada, abrindo caminho para a geração de hipóteses metabólicas que certamente contribuirão para o entendimento do metabolismo tecidual, interação de tecido com tecido e respostas metabólicas para as mais variadas intervenções. Além disso, traz potencial para a determinação de novas vias metabólicas e identificar de forma com precisão biomarcadores tumorais e de outras doenças. Os metabólitos indicados no nosso estudo, tem uma relação íntima com o microambiente tumoral de acordo com a revisão da literatura.

Palavras chaves: Espectrometria de Massas. Cultura de Células 3D. Neoplasia Colônica. Biomarcadores.

ABSTRACT

The number of colorectal cancer (CRC) patients is increasing worldwide. Accumulating evidence has shown that the tumor microenvironment (TME) plays an important role in the development and progression of CRC. Although targeting the TME could be a promising therapeutic approach, the mechanisms by which inflammatory cells promote CRC tumorigenesis are not well understood. Three-dimensional (3D) cell culture technologies, which more closely mimic the complex microenvironment of tissue, are being increasingly evaluated as a tool for the preclinical screening of clinically promising new molecules, and for the study of tissue metabolism. Studies of metabolites released into the extracellular space (secretome) allow understanding the metabolic dynamics of tissues and changes caused by tumor development and therapeutic interventions. Although quite advanced in the field of proteomics, studies on the secretome of low molecular weight metabolites (< 1500 Da) are still very scarce. This study presents an untargeted metabolomic protocol based on the hybrid technique of liquid-chromatography coupled with high-resolution mass spectrometry for the analysis of low-molecular-weight metabolites released into the culture medium by 3D cultures and coculture (secretoma model). For that, HT-29 human colon carcinoma cells and 3T3-L1 preadipocytes were analyzed in 3D-monoculture and 3D-coculture. The putative identification of the metabolites indicated a sort of metabolites, among them arachidonic acid, glyceric acid, docosapentaenoic acid and beta-Alanine which are related to cancer and obesity. This protocol represents a possibility to list metabolites released in the extracellular environment in a comprehensive and untargeted manner, opening the way for the generation of metabolic hypotheses that will certainly contribute to the understanding of tissue metabolism, tissue-tissue interactions, and metabolic responses to the most varied interventions. Moreover, it brings potential to determine novel pathways and accurately identify biomarkers in cancer and other diseases. The metabolites indicated in our study have a close relationship with the tumor microenvironment in accordance with the literature review.

Keywords: *Mass Spectrometry. 3D cell culture. Colonic Neoplasm. Biomarkers.*

LISTA DE SIGLAS

2D – bidimensional

3D - tridimensional

3T3-11 – linhagem celular de fibroblasto murino

AA – ácido araquidônico

AG – ácido graxo

APC – polipose adenomatosa coli

CA 19-9 – antígeno carboidrato 19-9

CCR – câncer colorretal

CEA – antígeno carcinoembrionário

Da – Dalton

DNA – ácido esoxirribonucleico

EET - ácidopoxieicosatretranoico

ERA – espécie reativa de nitrogênio

ERO – espécie reativa de oxigênio

FGF – fator de crescimento de fibroblastos

HT-29 – linhagem celular de câncer de cólon humano

IGF-1 – fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1

K-ras – oncogene homólogo viral de sarcoma de rato Kirsten

MEC – matriz extracelular

PG2 – prostaglandina 2

PG2 – prostaglandina 2

TGF- β – fator de transformação do crescimento beta

TP53 – gene supressor de tumor

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Número estimado de mortes em 2020 em decorrência do câncer, incluindo todos os tipos, ambos os sexos e todas as idades. Fonte: GLOBOCAN, (2022).

Figura 2. Último levantamento realizado pela *Global Cancer Observatory* (GLOBOCAN) em 2012 atribuindo o elevado índice de massa corporal a cânceres em diferentes sítios no organismo, independentemente do sexo. Fonte: Adaptado de GLOBOCAN, (2022).

Figura 3. Representação esquemática dos biomarcadores relacionados com a carcinogênese e obesidade. IMC – Índice de Massa Corporal. CCR – Câncer Colorretal. CEA - Antígeno Carcinoembrionário. CA 19.9 - Antígeno de Carboidrato 19-9.

Figura 4. Comparação entre técnicas para cultura de célula em duas (**A**) e três dimensões (**B**). Fonte: SAYDÉ et al., (2021, Nanomaterials).

Figura 5. Síntese dos processos que envolvem a análise de metabólitos celulares via espectrometria de massas.

Figura 6. A cultura de célula 3D aliada á análise metabolômica possibilita a identificação de potenciais biomarcadores associados à obesidade e o câncer colorretal (CCR).

Figura 7. Avanços alcançados pelo presente estudo e perspectivas futuras a partir dos resultados obtidos.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	11
2. OBJETIVOS.....	21
2. 1. Objetivo geral.....	21
2. 2. Objetivos Específicos.....	21
3. CAPÍTULOS.....	22
3.1. Capítulo 1 - Liquid chromatography coupled to high resolution mass spectrometry metabolomics: A useful tool for investigating tumor secretome based on a three-dimensional co- culture model.....	23
4. CONCLUSÃO GERAL.....	31
REFERÊNCIAS	

1. INTRODUÇÃO

O câncer é uma doença que lidera as causas de morte no mundo, sendo aproximadamente 10 milhões de mortes em 2020, ou um em cada seis no total de desfechos letais (Figura 1). Estima-se, no mesmo período, de acordo com a Agência Internacional de Pesquisa do Câncer 19.3 milhões de novos casos de câncer em todo o mundo. Dentre os tipos mais diagnosticados destacam-se os cânceres de mama (2.3 milhões de casos novos, 11,7%), pulmão (11,4%), cólon e reto (10,0%) próstata (7,3%) e estômago (5,6%) sendo, portanto, o câncer colorretal (CCR) o terceiro tipo mais incidente. De acordo com a última estimativa global, é o segundo mais letal, responsável por 9,4% das mortes pela doença, ficando atrás apenas do câncer de pulmão e o número de casos está aumentando globalmente (GLOBOCAN, 2022). Particularmente, pacientes em estágio 4 de CCR, tem 10% de taxa de sobrevivência em 5 anos (SCHMITT; GRETEN, 2021).

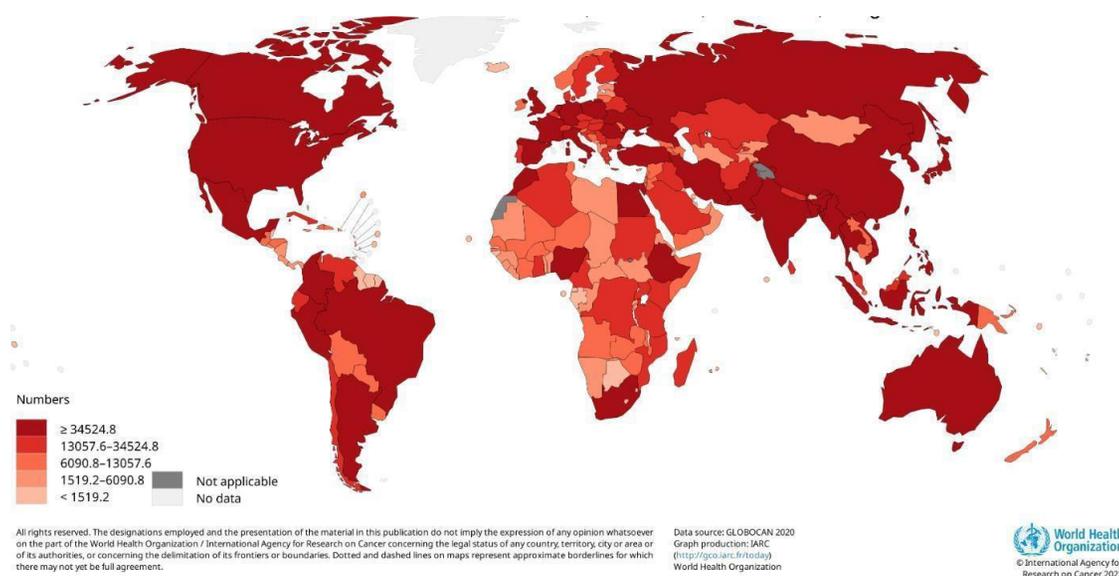


FIGURA 1. Número estimado de mortes em 2020 em decorrência do câncer, incluindo todos os tipos, ambos os sexos e todas as idades. Fonte: GLOBOCAN, 2022.

Idade, presença de pólipos colorretais, história familiar de câncer colorretal, algumas variações genéticas, consumo excessivo de álcool, obesidade, inatividade física, tabagismo, assim como história de doença inflamatória intestinal são destacados como fatores de risco para o CCR (NHI, 2022; SCHMITT; GRETEN, 2021; SOLTANI et al., 2019). Nesse cenário, é notório que a carcinogênese CCR detém ampla complexidade, além de resultar da interação entre fatores

genéticos e ambientais (LI; LAI, 2009). A fim de compreender o processo de carcinogênese colorretal, Fearon e Vogelstein (1990) descreveram o modelo adenoma-carcinoma, elucidando a transição do adenoma polipóide para o carcinoma colorretal (FEARON; VOGELSTEIN, 1990; SABISTON; TOWNSEND, 2002), envolvendo o acúmulo de mutações em oncogenes, a exemplo do K-ras e β -Catenina, e inativação de genes de supressão tumoral, como APC e TP53 (FRATTINI et al., 2004. MARTINEZ et al., 2011; SCALISE et al., 2016). Entretanto, a carcinogênese do CCR é um ótimo exemplo da dependência da interação da presença de diversas mutações essenciais com o microambiente tumoral para a evolução do tumor (SCHMITT; GRETEN, 2021).

Pacientes com doença inflamatória do intestino têm risco maior de desenvolver CCR. O estresse oxidativo é um fator importante no estágio inicial da carcinogênese, podendo ser induzido por dano no DNA causado por espécies reativas de oxigênio (EROs) e nitrogênio (ERAs) produzidas pelo infiltrado de células imunes e outros mutagênicos. De acordo com um número crescente de evidências, o microambiente tumoral, particularmente composto por células inflamatórias do sistema imunológico como macrófagos, desempenha um papel importante no desenvolvimento e progressão do CCR. Os mecanismos pelos quais as células inflamatórias promovem a carcinogênese não são amplamente conhecidos e o estudo do microambiente tumoral pode ser uma abordagem terapêutica promissora (MIZUNO; KAWADA; SAKAI, 2019).

Citocinas liberadas do infiltrado inflamatório também podem aumentar o número de EROs e ERAs nas células epiteliais pré-malignas, podendo alterar a modificação epigenética dos genes supressores do tumor resultando na promoção da tumorigênese. Nos estágios tardios da formação do tumor as citocinas e as quimiocinas, podem apoiar o crescimento tumoral promovendo angiogênese e suprimindo a resposta imune anti-tumoral (MIZUNO; KAWADA; SAKAI, 2019). Outros fatores no intestino como a microbiota e componentes da dieta podem influenciar no desenvolvimento do câncer (LUCAS; BARNICH; NGUYEN, 2017). A inflamação persistente facilita a promoção do tumor ativando a proliferação de propriedades anti apoptóticas das células tumorais (SCHMITT; GRETEN, 2021).

A obesidade, uma epidemia global que afeta adultos e crianças, é um estado de inflamação crônica lenta que pode ser causada por uma alteração do metabolismo lipídico, influenciada por lipídeos como ácidos graxos (AGs) e seus metabólitos secundários (JAIN; AUSTIN; FENTON,

2019). Muitos mediadores destes lipídeos servem como moléculas de sinalização potentes da inflamação, as quais podem posteriormente alterar o metabolismo lipídico e levar à carcinogênese, e o entendimento desta relação pode ser vital para prevenção e tratamento do CCR (PAKIET et al., 2019). Com base no último levantamento realizado pela GLOBOCAN em 2012, o câncer de colon figura na terceira colocação quando associado ao elevado índice de massa corporal no mundo, independentemente do sexo (Figura 2).

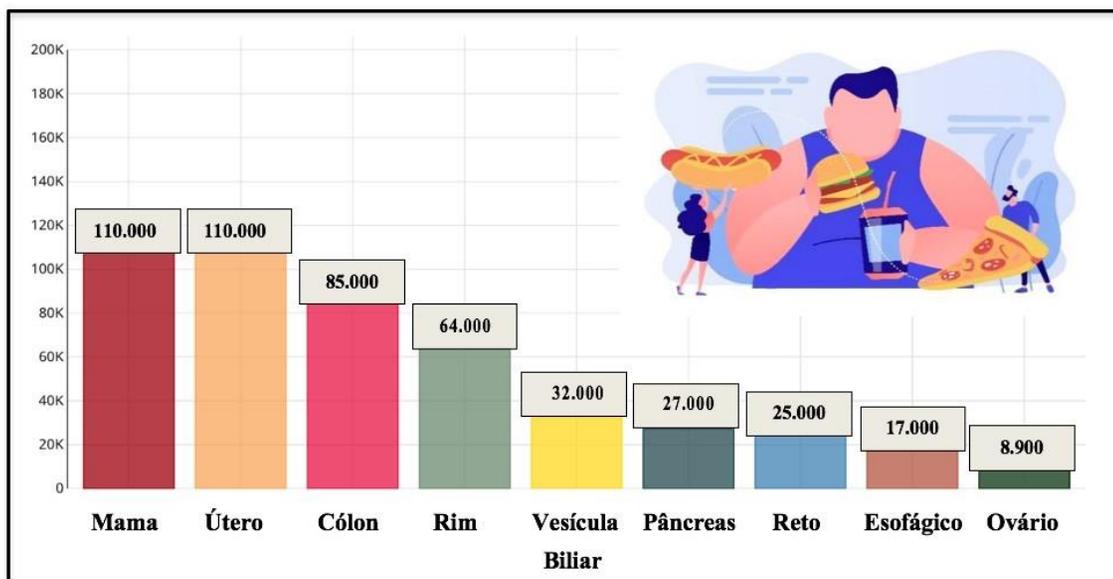


FIGURA 2. Último levantamento realizado pela Global Cancer Observatory (GLOBOCAN) em 2012 atribuindo o elevado índice de massa corporal a cânceres em diferentes sítios no organismo, independentemente do sexo. O eixo y corresponde a incidência de pessoas diagnosticadas com o respectivo câncer destacado no eixo x. Fonte: figura adaptada de GLOBOCAN, 2022.

Sabe-se que células cancerosas apresentam alterações no metabolismo lipídico, que podem levar a mudanças estruturais nas suas membranas, quebra da homeostase de energia, sinalização celular, expressão gênica e distribuição de energia afetando numerosas funções, entre elas o modo de ação das drogas para tratamento (PAKIET et al., 2019). Por exemplo, ativação da ciclooxigenase-2 nas células endoteliais resulta na conversão do ácido araquidônico (AA) a prostaglandina E2 (PGE2), regulando múltiplas funções das células imunes e promovendo o crescimento das células de câncer de cólon. Muitas destas descobertas são recentes e seu mecanismos não são completamente conhecidos nos levando a um novo capítulo da pesquisa da lipidômica (JAIN; PICKENS; FENTON, 2018).

Entre 30 e 50% dos cânceres podem ser prevenidos evitando-se os fatores de risco e implementando-se estratégias de prevenção. O peso desta enfermidade sobre os sistemas de saúde também pode ser minimizado através da detecção precoce e tratamento apropriado. Portanto para redução da mortalidade pela doença podemos contar com o diagnóstico precoce e triagem. Os métodos de triagem objetivam identificar indivíduos com achados sugestivos de um câncer específico ou de uma condição pré-maligna antes que o paciente desenvolva sintomas (GLOBOCAN 2022). O diagnóstico precoce está diretamente relacionado ao tempo de sobrevivência (BRUERA et al., 2010; EISENHARDT, 2013; RAWLA; SUNKARA; BARSOUK, 2019). A maioria dos casos de CCR são diagnosticados em estágio avançado, são tratados com quimioterapia e radioterapia e tem prognóstico reservado (BERGER et al., 2010; GRABENBAUER; HOLGER, 2016). O diagnóstico precoce conta, atualmente, com exames invasivos, como a sigmoidoscopia e colonoscopia, que são pouco aceitos pela população em geral, portanto não são amplamente realizados (ISSA; NOUREDDINE, 2017). Nesse sentido, o diagnóstico precoce poderia ser implementado caso fosse possível identificar biomarcadores de diagnóstico específicos para o CCR.

Biomarcadores são substâncias ou estruturas que podem ser medidas e que possuem a capacidade de prever, diagnosticar, dar prognóstico e estadiamento do curso de uma doença (BIOMARKERS DEFINITIONS WORKING GROUP, 2021). Em oncologia, existem os biomarcadores de diagnóstico, prognóstico e de previsão. Os marcadores de diagnósticos definem se o paciente possui a doença, os de prognóstico fornecem informações em relação à evolução e desfecho de uma determinada doença e, por fim, os de previsão fornecem uma resposta prévia sobre o benefício de determinada terapêutica, (DE ROOCK et al., 2009; MOLINA et al., 2019).

Com relação ao CCR, muitos estudos têm buscado identificar marcadores séricos de diagnóstico, porém, até o momento, os disponíveis são o antígeno carcinoembrionário (CEA), que é o mais utilizado e serve para acompanhamento e o antígeno de carboidrato 19-9 (CA 19-9) (DE ROOCK et al., 2009; GONZALEZ-PONS; CRUZ-CORREA, 2015). Contudo, este último não possui como o CEA, especificidade para o CCR. O CA 19-9 é menos sensível e menos específico tem maior importância em afecções pancreatobiliares e evolução de pacientes em pós-operatório (HUNDT; HAUG; BRENNER, 2007; YU et al., 2021).

O CEA é uma glicoproteína de alto peso molecular e tem seu valor como biomarcador de

prognóstico e monitoramento, uma vez que níveis aumentados estão relacionados com a evolução do câncer e determinam mau prognóstico. Porém, esses altos níveis de CEA no sangue não são específicos para o CCR, pois também estão presentes em outras doenças como neoplasias de pâncreas, pulmão, ovário, doença inflamatória intestinal, patologias hepáticas, pancreatite e tabagismo (GONZALEZ-PONS; CRUZ-CORREA, 2015; HOSKOVEC et al., 2012). Evidencia-se assim, a importância de investigar um biomarcador diagnóstico específico para o CCR (Figura 3).

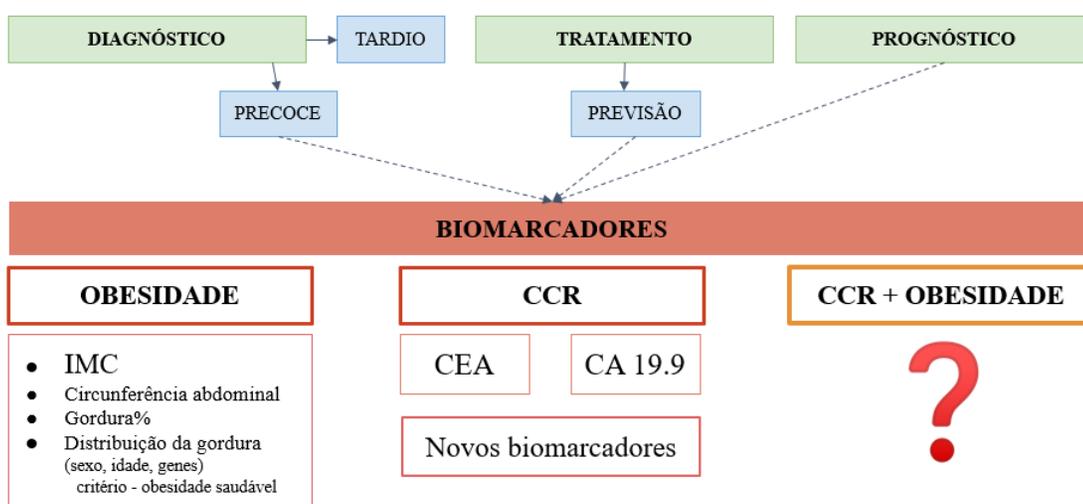


FIGURA 3. Representação esquemática dos biomarcadores relacionados com a carcinogênese e obesidade. IMC – Índice de Massa Corporal. CCR – Câncer Colorretal. CEA - Antígeno Carcinoembrionário. CA 19.9 - Antígeno de Carboidrato 19-9.

Para isto os modelos in vitro podem ser adequados, desde que técnicas mais aprimoradas como as culturas tridimensionais (3D) sejam utilizadas para minimizar as limitações das culturas em monocamada (CALEFFI et al., 2021). Tradicionalmente, as avaliações pré-clínicas são feitas com cultura monocamada de linhagens celulares em duas dimensões (2D). Embora esse tipo de cultura de células tenha sido amplamente usada no passado, a falta de complexidade e arquitetura estrutural deste modelo, é um dos motivos pelos quais o modelo é falho ao informar o verdadeiro processo biológico que ocorre in vivo onde o crescimento celular é tridimensional e independente e existe também, a tendência da cultura 2D de superestimar a atividade tumoral (IMAMURA et al., 2015; SAYDÉ et al., 2021; TATULLO et al., 2020).

Além das culturas, modelos animais podem ser utilizados na pesquisa para reproduzir o

desenvolvimento do processo da doença em humanos. Dos modelos existentes, os mais comumente utilizados são animais com tumores induzidos por agentes químicos e animais geneticamente modificados (DE-SOUZA; COSTA-CASAGRANDE, 2018).

Por outro lado, modelos de câncer de cólon em animais obesos só podem ser obtidos com tumores murinos, no microambiente do animal, o que traz distanciamento dos mecanismos que ocorrem em humanos. Xenoenxerto de tumor de cólon é possível e está muito bem descrito na literatura, entretanto não se pode esperar, em animal imunossuprimido, onde este crescimento tumoral ocorrerá, respostas mediadas por células envolvidas na inflamação de forma confiável. Algumas outras desvantagens da utilização destes modelos são: mutações advindas da dieta ainda não foram descritas, pois os animais não desenvolvem neoplasia ao longo do tempo necessário, alguns agentes indutores promovem toxicidade hepática, nas mutações dos genes APC, os animais morrem em 120 dias, e as outras mutações tem que ser combinadas com mutações dos genes APC (DE-SOUZA et al., 2018). Assim, os sistemas de cultura de células 3D baseados em levitação magnética são uma boa alternativa em relação ao modelo animal e à cultura convencional (Figura 4).

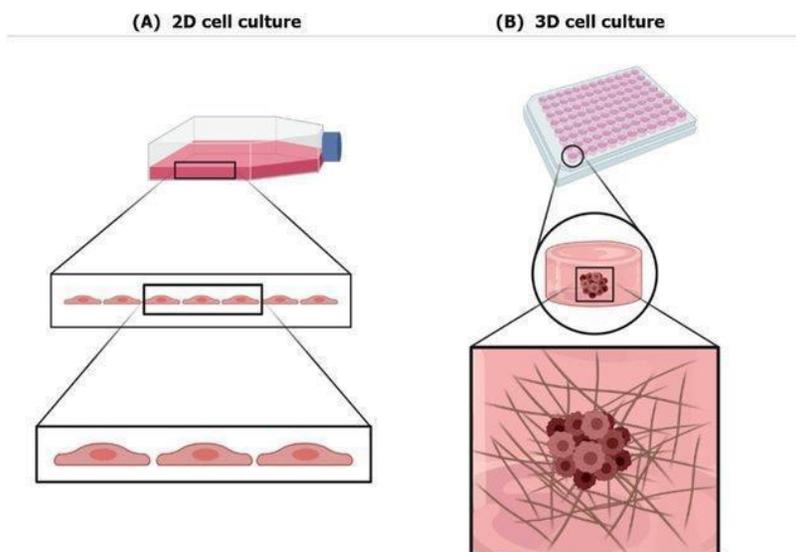


FIGURA 4. Comparação entre técnicas para cultura de célula em duas (A) e três dimensões (B). Fonte: SAYDÉ et al., 2021.

Avanços recentes na tecnologia de organóides revolucionaram as ferramentas de cultura *in vitro* para a pesquisa criando modelos de cultura 3D que recapitulam a heterogeneidade celular, estrutura e funções dos tecidos primários. Essa tecnologia permite aos pesquisadores recriar

órgãos e doenças humanas em uma placa, trazendo assim grandes promessas para muitas aplicações translacionais como medicina regenerativa, desenvolvimento de drogas e medicina de precisão (DAQUINAG; SOUZA; KOLONIN, 2013).

O sistema de cultura 3D é estabelecido pela suspensão da cultura para evitar o contato físico direto com a placa plástica, o que pode ser obtido através de técnicas com e sem andaimes. Embora estes modelos 3D sejam eficientes para diversas áreas de pesquisa, existem diferenças consideráveis entre as diversas técnicas existentes com relação à elaboração e custo. A cultura de células 3D magnética, consiste em magnetizar células usando um conjunto de nanopartículas de ouro e óxido de ferro cruzadas ("reticuladas") com nanopartículas de poli-l lisina, para promover absorção de células e então a formação de culturas 3D em placas especiais com a assistência de magnetos para levitação ou bioimpressão (CALEFFI et al., 2021). Uma unidade magnética é colocada imediatamente acima da cultura para levar e guiar magneticamente as células para promover a agregação em horas de levitação. Essas células levitam bem abaixo do menisco no centro do poço, onde se auto-modelam em esferóides (DAQUINAG; SOUZA; KOLONIN, 2013).

Constata-se que as interações celulares entre componentes da matriz extracelular (MEC) e as células neoplásicas são favoráveis ao processo de carcinogênese. O componente estromal consiste basicamente em células não tumorais do próprio tecido, células do sistema imune (macrófagos, neutrófilos e linfócitos), fibroblastos e células endoteliais, que são responsáveis pela indução da neoangiogênese (BALKWILL; CAPASSO; HAGEMANN, 2012) e pela produção de fatores de crescimento (IGF-1 e FGFs) e substâncias pró-tumorais (TGF- β) (CHEN; SONG, 2019; ERIN et al., 2020), além de componentes da matriz extracelular, vasos sanguíneos, linfáticos e nervos. Todos esses componentes, celulares ou não, formam o microambiente tumoral (AREF; BARBIE, 2017; GUPTA; DUTTA, 2020; MBEUNKUI; JOHANN, 2009). Sabe-se hoje que a cultura tridimensional (3D) é capaz de contornar as desvantagens da cultura 2D por permitir estruturação celular tridimensional semelhante aos tecidos naturais, interações e adesões intercelulares, simulação de características tumorais in vivo, como hipóxia, necrose, invasão, metástase, anti-apoptose e resistência à fármacos (ALTUNBEK et al., 2019; BENIEN; SWAMI, 2014; BRESLIN; O'DRISCOLL, 2013; LEE; CHAUDHURI, 2021; MEIER-HUBBERTEN; SANDERSON, 2019). Dessa forma, um ambiente in vitro projetado adequadamente em cultura 3D pode permitir a pesquisa de biomarcadores pela semelhança com a biologia tumoral in vivo.

A metabolômica - técnica que envolve o perfilamento dos metabólitos endógenos de um sistema biológico - tem demonstrado grande potencial para uso no diagnóstico precoce e tratamento personalizado de vários cânceres, incluindo o CCR. Aplicando técnicas analíticas avançadas e ferramentas de bioinformática, a metabolômica é explorada para biomarcadores que estão associados com a carcinogênese e prognóstico (DAQUINAG; SOUZA; KOLONIN, 2013).

O metaboloma é um conjunto de moléculas abaixo de 1.5 kDa que são produzidas em resposta a fatores intrínsecos biológicos e ambientais. A espectrometria de massas de alta resolução, tipicamente usando cromatografia líquida, tem sido utilizada para detecção desses metabólitos (NICHOLSON; LINDON, 2008). Estudos que utilizam esta técnica, provêm uma análise abrangente do metaboloma e revolucionaram o estudo de moléculas pequenas. A metabolômica baseada na espectrometria de massas de alta resolução acoplada à cromatografia líquida pode ser dividida em categorias, como (i) com alvo definido a qual é uma abordagem analítica quantitativa pré-estabelecida de uma lista de metabólitos conhecidos e (ii) sem alvo definido a qual é caracterizada pela medida simultânea de muitos metabólitos de cada amostra, normalmente sem conhecimento prévio dos seus constituintes e suas mudanças. A principal vantagem da análise sem alvo definido é a descoberta de novos metabólitos com relação ao contexto do estudo (NALBANTOGLU, 2019).

Estudos recentes têm utilizado a espectrometria de massas não apenas em pesquisas clínicas, mas também em modelos de cultura (BOZZI et al., 2017; MESSIAS et al., 2018), apresentando resultados promissores na pesquisa de metabólitos celulares, extracelulares e na busca de marcadores tumorais e possíveis alvos terapêuticos (Figura 5).

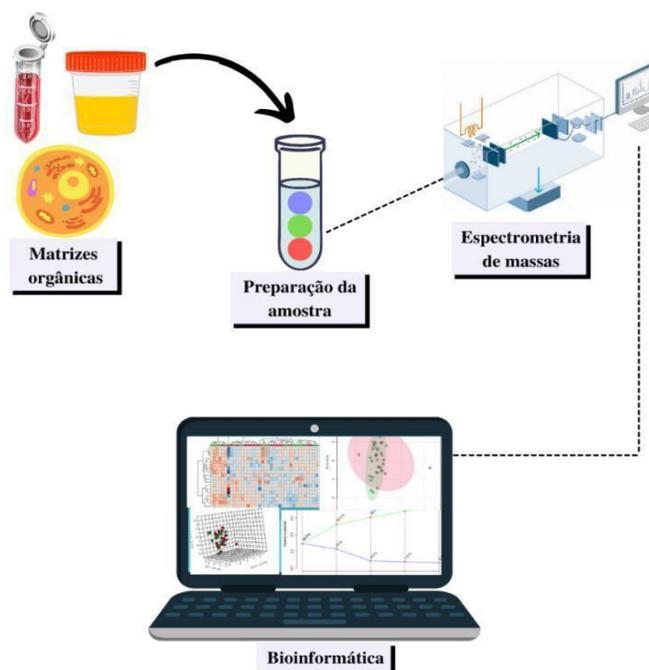


FIGURA 5. Síntese dos processos que envolvem a análise de metabólitos celulares via espectrometria de massas.

O secretoma do câncer parece atuar um papel importante nas principais características dos cânceres, como proliferação excessiva, invasão, metástase, apoptose reduzida, invasão imunológica, angiogênese, alteração do metabolismo energético e desenvolvimento de resistência à terapia anti-câncer. As células cancerosas são capazes de modificar sua expressão proteica e assim levar à alteração de proteínas secretoras e outras moléculas. A alteração do câncer secretoma e do microambiente tumoral têm sido reconhecidos como um dos principais fatores que influenciam a biologia dos tumores (JIN et al., 2020; LIN; ZHANG; LUO, 2020).

Portanto, a análise do secretoma do câncer representa uma ferramenta crucial para descobrir novos biomarcadores tumorais. O desenvolvimento e aprimoramento da espectrometria de massas fornece ferramenta adequada para estudar o secretoma tumoral em culturas de células. Considerando o aumento da incidência do CCR, o aumento concomitante da obesidade globalmente e, portanto, do estado inflamatório que propicia o desenvolvimento do câncer, também que a maioria dos casos de CCR são diagnosticados em estágio avançado, e, portanto, com pior prognóstico, além da ausência de biomarcadores específicos e sensíveis ao desenvolvimento do CCR, justifica-se a pesquisa de novos biomarcadores para desenvolvimento, evolução e prognóstico do CCR (Figura 6).

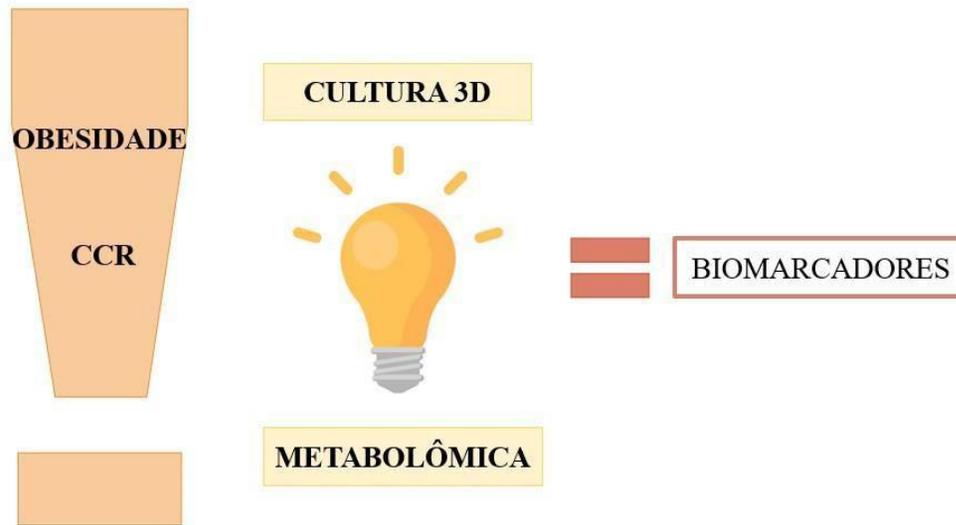


FIGURA 6. A cultura de célula 3D aliada á análise metabolômica possibilita a identificação de potenciais biomarcadores associados á obesidade e o câncer colorretal (CCR).

2. OBJETIVOS

2. 1. Objetivo geral

Realizar screening de potenciais biomarcadores em modelo tumoral *in vitro* de cultura tridimensional (3D) de câncer de cólon e analisar a possível influência do tecido adiposo no screening destes marcadores quando as células cancerosas são co-cultivadas com adipócitos.

2. 2. Objetivos Específicos

- Desenvolver modelo tumoral *in vitro* de cultura 3D de adenocarcinoma colorretal humano (tumoroide).
- Desenvolver um modelo *in vitro* de co-cultura 3D para estudo do secretoma de células de adenocarcinoma colorretal humano na presença de células adiposas.
- Estudar as possíveis interações das células adiposas e as células de adenocarcinoma colorretal humano através da análise do secretoma da co-cultura destas células por espectrometria de massas.
- Identificar potenciais biomarcadores no adenocarcinoma colorretal humano por espectrometria de massas.

3. CAPÍTULOS

3.1. CAPÍTULO 1: Artigo publicado na revista PLOS ONE, na área de protocolos e editoração da Professora Emily Chenette.

Liquid chromatography coupled to high resolution mass spectrometry metabolomics: A useful tool for investigating tumor secretome based on a three-dimensional co- culture model.

LAB PROTOCOL

Liquid chromatography coupled to high-resolution mass spectrometry metabolomics: A useful tool for investigating tumor secretome based on a three-dimensional co-culture model

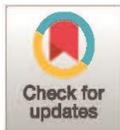
Andrea C. Pelosi¹✉, Anna Maria A. P. Fernandes^{1,2}✉, Leonardo F. Maciel³, Alex A. R. Silva², Giulia C. Mendes³, Luísa F. Bueno³, Lívia Maria F. Silva³, Rafael F. Bredariol³, Maycon G. Santana⁴, Andreia M. Porcari², Denise G. Priolli^{1*}

1 Health Sciences Postgraduate Program, São Francisco University, Bragança Paulista, São Paulo, Brazil, **2** MS4Life Laboratory of Mass Spectrometry, Health Sciences Postgraduate Program, São Francisco University, Bragança Paulista, São Paulo, Brazil, **3** Multidisciplinary Laboratory, Medical School, Sao Francisco University, Bragança Paulista, São Paulo, Brazil, **4** Multiprofessional Nursing Residency Program in Oncology, A.C. Camargo Cancer Center, São Paulo, Brazil

✉ These authors contributed equally to this work.

✉ ACP and AMAPF are share first authorship on this work.

* depriolli@gmail.com



OPEN ACCESS

Citation: Pelosi AC, Fernandes AMAP, Maciel LF, Silva AAR, Mendes GC, Bueno LF, et al. (2022) Liquid chromatography coupled to high-resolution mass spectrometry metabolomics: A useful tool for investigating tumor secretome based on a three-dimensional co-culture model. *PLoS ONE* 17(9): e0274623. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0274623>

Editor: Tommaso Lomonaco, University of Pisa, ITALY

Received: March 1, 2022

Accepted: August 31, 2022

Published: September 21, 2022

Peer Review History: PLOS recognizes the benefits of transparency in the peer review process; therefore, we enable the publication of all of the content of peer review and author responses alongside final, published articles. The editorial history of this article is available here: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0274623>

Copyright: © 2022 Pelosi et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All metabolomics data are available via Metabolights with identifier

Abstract

Three-dimensional (3D) cell culture technologies, which more closely mimic the complex microenvironment of tissue, are being increasingly evaluated as a tool for the preclinical screening of clinically promising new molecules, and studying of tissue metabolism. Studies of metabolites released into the extracellular space (secretome) allow understanding the metabolic dynamics of tissues and changes caused by therapeutic interventions. Although quite advanced in the field of proteomics, studies on the secretome of low molecular weight metabolites (< 1500 Da) are still very scarce. We present an untargeted metabolomic protocol based on the hybrid technique of liquid chromatography coupled with high-resolution mass spectrometry for the analysis of low-molecular-weight metabolites released into the culture medium by 3D cultures and co-culture (secretome model). For that we analyzed HT-29 human colon carcinoma cells and 3T3-L1 preadipocytes in 3D-monoculture and 3D-co-culture. The putative identification of the metabolites indicated a sort of metabolites, among them arachidonic acid, glyceric acid, docosapentaenoic acid and beta-Alanine which are related to cancer and obesity. This protocol represents a possibility to list metabolites released in the extracellular environment in a comprehensive and untargeted manner, opening the way for the generation of metabolic hypotheses that will certainly contribute to the understanding of tissue metabolism, tissue-tissue interactions, and metabolic responses to the most varied interventions. Moreover, it brings the potential to determine novel pathways and accurately identify biomarkers in cancer and other diseases. The metabolites indicated in our study have a close relationship with the tumor microenvironment in accordance with the literature review.

MTBLS5375 and <http://www.ebi.ac.uk/metabolights/MTBLS5375>.

Funding: A. A. R. S. is supported by the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES, www.capes.gov.br, grant #88887.511153/2020-00). A. M. A. P. F. is supported by the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES, www.capes.gov.br - grant #001). A. M. P. is supported by São Paulo Research Foundation (FAPESP, <https://fapesp.br/>, Grant #2019/04314-6). M. G. S. is supported by São Paulo Research Foundation (FAPESP, <https://fapesp.br/>, Grant #18/21906-1). D. G. P. is supported by São Paulo Research Foundation (FAPESP, <https://fapesp.br/>, Grant #18/21471-5 and #19/23592-7). No. The funders had and will not have a role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

Introduction

Colorectal cancer (CRC) is the third most common cancer in the world and the second most deadly. Every year 1,8 million people are diagnosed and about 900,000 patients die from CRC [1]. It is usually diagnosed at advanced stages due to the limitations of current screening methods used in the clinic [2–4]. Only two blood-based biomarkers are available to monitor CRC patients: carcinoembryonic antigen (CEA) and carbohydrate antigen 19–9 (CA19-9). CEA, is a high molecular weight glycoprotein, found in embryonic tissue and colorectal malignancies. However, high levels of this compound in the blood are not specific for CRC and elevated levels of CEA are found in advanced stages of a fraction of CRC patients. The CA19-9 antigen, compared to CEA, is less sensitive and specific for CRC [5]. There is an urgent need to develop new biomarkers and modalities to detect, diagnose, and monitor the disease.

Pre-clinical *in vitro* evaluation is traditionally carried out in two-dimensional (2D) cell monoculture representing an easy and well-established methodology. The growth in 2D surface results in cell and cytoskeleton's flattening and remodeling, changing important factors in the tumor microenvironment *in vivo* such as nuclear form, protein and lipid synthesis, biochemical responses, and signaling cascades. It is widely held that 2D culture is unable to simulate the original tumor microenvironment, which grows three-dimensionally (3D) [6, 7]. This is why many compounds and drugs are active in 2D culture models but are not successful in subsequent preclinical tests [8, 9].

The 3D culture systems have received attention to avoid certain disadvantages of 2D-culture models [10, 11]. Three-D spheroids are formed by cell aggregation mediated by the interaction between integrin and extracellular matrix with subsequent compaction by transmembrane protein interactions such as E-cadherin [12, 13]. This allows three-dimensional cell cultures to structure similar to natural tissues, to present intercellular interactions and adhesions, and simulate *in vivo* tumor characteristics such as hypoxia, necrosis, invasion, metastasis, anti-apoptosis and drug resistance [14–18].

Metabolomics, an approach targeted at comprehensive profiling of the metabolites in a biological system, has demonstrated its great potential for use in the early diagnosis and personalized treatment of various cancers including CRC [19, 20]. By applying advanced analytical techniques and bioinformatics tools, the metabolome can be mined for biomarkers associated with carcinogenesis and prognosis [4].

The metabolome is the set of molecules below 1.5 kDa produced in response to intrinsic biological and environmental factors [21]. It is the net result of the integration of systemic metabolic processes and reveals the metabolite-enzyme relationships that regulate these processes. Thus, the metabolome, in contrast to genome or proteome, has been considered a more instantaneous representation of the phenotype, since its changes occur more quickly than changes in genes or proteins, and may indicate, in a time closer to the real one, current biological events. Additionally, several drug target a specific metabolite by inhibiting its enzyme or receptor, which are proteins and not genetic sequences. In this context, metabolomics studies seem more promising for discovering new molecules and metabolic pathways for potential therapeutic targets. Thus, recognizing that metabolites play significant and dynamic roles in biological processes has made metabolomics a key area in studies of systemic profiles in diseases and medicine in general [22].

Metabolomic studies that use liquid chromatography coupled to mass spectrometry (LC-MS) as an analytical technique, provide a comprehensive analysis of the metabolome and revolutionize the study of small molecules. LC-MS-based metabolomics can be categorized into (i) targeted analysis which is a pre-established quantitative analytical approach to a list of known metabolites and (ii) untargeted metabolomics which is characterized by the

simultaneous measurement of a large number of metabolites of each sample, usually without prior knowledge of the constituents and changes in them. The main advantage of untargeted metabolomics is the discovery of new metabolites in relation to the study context; therefore, it is considered a hypothesis-generating approach [23].

Two approaches are considered when performing metabolomic studies of cultured cell lines. Those focused on intracellular metabolites of isolated cells and those focused on the secretome or extracellular metabolites released (ERM) by cells in the culture medium. The analysis of ERM provides a picture of the metabolites resulting from the exchange carried out between the cells and the culture medium. This approach has the following advantages: ensuring little (or non-existent) handling of cells, which avoids the production of artifacts, allowing the monitoring of metabolic activity in response to experimental disturbances without cell disruption, enabling the monitoring of metabolic changes over time within the same culture and avoid carrying out long and multiple extraction procedures, which also enable the production of technical artifacts that can lead to concealment or unwanted manipulation of biological results [24]. However, the disadvantages of working with the secretome include matrix effects related to the salty media composition, which is rich in sugars, lipids, proteins, and water and might interfere in the analysis. The dilution of the metabolites of interest in the media also impacts the detection sensitivity [25].

Here we present a liquid chromatography coupled with high-resolution mass spectrometry metabolomic based protocol for the analyses of ERM. For the development of the protocol, culture medium from monoculture spheroids and co-culture (from HT-29 and 3T3-L1 cells) were analyzed. The putative identification of relevant molecular features for each spheroid type and those influenced by co-culture demonstrate the applicability of the method to the study of the metabolism of these spheroids and their tissue-tissue interactions with a focus on discovering new therapeutic targets, biomarkers and their associated metabolic pathways.

Material and methods

The protocol described in this peer-reviewed article is published on protocols.io, [doi.org/10.17504/protocols.io.b24vqgw6] and is included for printing as [S1 File](#) with this article.

Expected results

For this protocol, we used untargeted ultra-performance liquid chromatography coupled to electrospray ionization quadrupole time-of-flight mass spectrometry (UPLC-QTOF) operating in high energy collision spectral acquisition mode (MS^E) mode approach to investigate differences between extracellular metabolomic profiles of HT-29 and those of 3T3-L1 spheroids. The presence of adipose tissue can influence the development of CRC in vivo [26]. To better understand this influence in vitro, we used a model of HT-29 cell line as cancer cells and 3T3-L1 as adipocytes [27]. These cell lines were cultured separately and co-cultured, and their secretome was used to investigate the tumor microenvironment and the interaction between cancer cells and the adipocyte tissue.

CSH (charged surface hybrid) particles were designed to enable sample loading and improve peak symmetry when using low ionic strength mobile phases, as instructed by the manufacturer. Reversed-phase columns, such as the chosen CSH C18, are broadly used for metabolomics investigation in different matrices such as plasma [20], serum [28], urine [29], tissue [30], and cell cultures [31], as chromatographic columns of this type generally result in the detection of more features [32]. The ERM obtained after the co-cultivation of both cell types was investigated. In the beginning, a total of 2658 molecular features were detected in the positive ionization mode and 3521 features were detected in the negative ionization mode.

Supporting information

S1 File. Protocol to secretome investigation of tumor 3D co-culture model.
(PDF)

Author Contributions

Conceptualization: Andrea C. Pelosi, Denise G. Priolli.

Data curation: Anna Maria A. P. Fernandes, Alex A. R. Silva.

Formal analysis: Andrea C. Pelosi, Anna Maria A. P. Fernandes, Leonardo F. Maciel, Alex A. R. Silva, Denise G. Priolli.

Funding acquisition: Anna Maria A. P. Fernandes, Alex A. R. Silva, Maycon G. Santana, Andreia M. Porcari, Denise G. Priolli.

Investigation: Leonardo F. Maciel, Luisa F. Bueno, Livia Maria F. Silva, Rafael F. Bredariol.

Methodology: Andrea C. Pelosi, Anna Maria A. P. Fernandes, Alex A. R. Silva, Giulia C. Mendes, Maycon G. Santana.

Project administration: Andreia M. Porcari, Denise G. Priolli.

Supervision: Denise G. Priolli.

Visualization: Andrea C. Pelosi, Leonardo F. Maciel.

Writing – original draft: Andrea C. Pelosi, Anna Maria A. P. Fernandes.

Writing – review & editing: Andreia M. Porcari, Denise G. Priolli.

References

1. International Agency for Research on Cancer. Globocan 2018: Cancer Fact Sheets—Colorectal Cancer. IARC http://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/cancers/10_8_9-Colorectum-fact-sheet.pdf (2018).
2. Grabenbauer GG, Holger G. Management of radiation and chemotherapy related acute toxicity in gastrointestinal cancer. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 2016; 30(4):655–64. <https://doi.org/10.1016/j.bpg.2016.06.001> PMID: 27644912
3. Berger AM, Grem JL, Visovsky C, Marunda HA, Yurkovich JM. Fatigue and other variables during adjuvant chemotherapy for colon and rectal cancer. *Oncol Nurs Forum.* 2010; 37(6):E359–69. <https://doi.org/10.1188/10.ONF.E359-E369> PMID: 21059569
4. Ni Y, Xie G, Jia W. Metabonomics of human colorectal cancer: new approaches for early diagnosis and biomarker discovery. *J Proteome Res.* 2014; 13(9):3857–70. <https://doi.org/10.1021/pr500443c> PMID: 25105552
5. Gonzalez-Pons M, Cruz-Correa M. Colorectal Cancer Biomarkers: Where Are We Now? *Biomed Res Int.* 2015; 2015:149014. <https://doi.org/10.1155/2015/149014> PMID: 26106599
6. Souza AG, Silva IBB, Campos-Fernandez E, Barcelos LS, Souza JB, Marangoni K, et al. Comparative Assay of 2D and 3D Cell Culture Models: Proliferation, Gene Expression and Anticancer Drug Response. *Curr Pharm Des.* 2018; 24(15):1689–94. <https://doi.org/10.2174/1381612824666180404152304> PMID: 29623827
7. Knight E, Przyborski S. Advances in 3D cell culture technologies enabling tissue-like structures to be created in vitro. *J Anat.* 2015; 227(6):746–56. <https://doi.org/10.1111/joa.12257> PMID: 25411113
8. Wilding JL, Bodmer WF. Cancer cell lines for drug discovery and development. *Cancer Res.* 2014; 74(9):2377–84. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-13-2971> PMID: 24717177
9. Kapałczyńska M, Kolenda T, Przybyła W, Zajączkowska M, Teresiak A, Filas V, et al. 2D and 3D cell cultures—a comparison of different types of cancer cell cultures. *Archives of medical science: AMS.* 2018; 14(4):910–9. <https://doi.org/10.5114/aoms.2016.63743> PMID: 30002710
10. Azzarelli R. Organoid Models of Glioblastoma to Study Brain Tumor Stem Cells. *Frontiers in cell and developmental biology.* 2020; 8:220-. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.00220> PMID: 32373607

These features retain the information of retention time and mass-to-charge ratio ($tR_{m/z}$) of each metabolite elucidated after the LC-MS runs.

Volcano plot statistical analysis of all cultured conditions compared with the blank samples (cultured medium only) provide the number of characteristic metabolites of each spheroid as reported in [Table 1](#).

Only molecular features with $\log_2(FC) > 0$ were considered because they represent an increase of the metabolite abundance in the medium due to the contact with the organoids. The statistical comparison (volcano plot) of all three different conditions was also performed and returned some relevant metabolites of each cell type as depicted in [Table 2](#). Although [Table 2](#) brings a small number of metabolites when compared to the detected ones, these metabolites were the ones that met the statistical criteria of relevance, as well as the annotation criteria based on MS/MS and isotopic pattern recognition. Indeed, in untargeted metabolomics, linking chemical structures to the data obtained by mass spectrometry remains a significant challenge. The vast majority of information collected by metabolomics is the so-called "dark matter," i.e., chemical signatures that remain uncharacterized [33].

Arachidonic acid (ARA), 5-HETE, and dihomo- γ -linolenic acid (DGLA) stood out among the listed metabolites. Studies have related ARA in the colorectal cancer carcinogenesis process, with the influence of the inflammatory process on tumor growth and progression through the interaction of inflammatory cytokines and chemokines with tumor cells [34–36]. Cajal cells and F2d fibroblasts, mesenchymal components of colonic tissue related to CCR, have already demonstrated high concentrations of ARA metabolism genes [37, 38]. Therefore, ARA was studied as a therapeutic target due to its direct involvement in the process of inflammation and carcinogenesis of colorectal cancer. Corroborating to these data, the use of ibuprofen and aspirin by adult patients reduced the risk of progressing to cancer for premalignant and advanced-stage lesions, as well as for recurrent adenomas [39, 40], suggesting that ARA inhibition may indeed play an important role in colorectal carcinogenesis. [Fig 1](#) shows the increase of some metabolites, ARA included, which were positively or negatively impacted by the CRC spheroid in the presence of adipocytes. Furthermore, studies demonstrate the increase of 5-lipoxygenase (5-LOX), part of the ARA pathway, and its metabolite, 5-HETE, in tumor tissues of the prostate, pancreas, colon, stomach and cervix [41–46].

DGLA is related to linoleic acid metabolism, an unsaturated fatty acid found in omega-6, which is associated with increased tumor growth, size, and metastatic potential [47]. Diets rich in omega-6 would be related to pro-inflammatory effects in the body, which may predispose to CRC development in long-term exposure [47, 48]. Also noteworthy are γ -glutamyltyrosine and γ -glutamylisoleucine as glutathione metabolites, a potential biomarker of tumorigenesis, beta-alanine, an indicator of tumor protein metabolism reprogramming, and histidinal, a metabolite of histidine, which is involved in several biological responses related to tumor growth [49–52]. The biological findings point to relevant aspects of tumor metabolism and highlight the potential of the protocol described here as a valuable tool in the metabolism study of *in vitro* model CCR based on 3D culture and co-culture cells.

Table 1. Molecular features of 3D cultured cells.

Cell Type	Negative Mode	Positive Mode
HT-29	191 features	3 features
3T3-L1	329 features	267 features
HT-29 + 3T3-L1	129 features	14 features

a. characteristic metabolites of each spheroid after comparison with the blank samples (cultured media only).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0274623.t001>

Table 2. Representative secretome from 3D culture or 3D co-cultured spheroids.

Feature Code ^a tR_m/z	Log2 (FC) ^b	Putative assignment	Identifiers ^c		Comparative abundances ^d		
					HT-29	3T3-L1	HT-29 + 3T3-L1
8.49_303.2320m/z	1.5	Arachidonic Acid	C00219	HMDB0001043	✓	NA	DOWN
0.75_151.0247m/z	3.2	Glyceric Acid	C00258	HMDB0000139	✓	DOWN	DOWN
8.59_329.2473m/z	1.1	Docosapentaenoic Acid ^e	C16513	HMDB0001976	✓	DOWN	DOWN
0.61_134.0460m/z	4.0	Beta Alanine	C00099	HMDB0000056	✓	DOWN	UP
1.67_291.0973m/z	9.3	γ-Glutamyltyrosine	C03363	HMDB0011741	✓	NA	NS
3.52_241.1184m/z	6.8	γ-Glutamylisoleucine	C03363	HMDB0011170	✓	NA	NS
8.13_301.2162m/z	3.5	5-HETE	C04805	HMDB0011134	✓	NA	NS
9.00_305.2475m/z	2.5	Dihomo-γ-linolenic acid	C03242	HMDB0002925	✓	NA	NS
0.77_153.0402m/z	4.8	Xanthine	C00385	HMDB0000292	✓	NA	NS
0.54_139.0743n	1.5	Histidinal	C01929	HMDB0012234	NA	NA	✓
0.56_251.1008n	2.6	Deoxyadenosine	C00559	HMDB0000101	NA	NA	✓
4.58_245.0920m/z	15.5	Formyl-N-acetyl-5-methoxykynurenamine	C05642	HMDB0004259	NA	✓	NS
0.54_802.6697m/z	11.5	PC(o-38:0)	C00958	HMDB0013408	NA	✓	NS
0.61_232.0824m/z	8.4	2-Keto-6-acetamidocaproate	C05548	HMDB0012150	NA	✓	NS
4.43_407.1214m/z	7.9	2-S-glutathionyl acetate	C14862	HMDB0062198	NA	✓	NS
1.39_298.0970m/z	7.7	5'-Methylthioadenosine	C00170	HMDB0001173	NA	✓	NS
0.65_152.0566m/z	7.6	Guanine	C00242	HMDB0000132	NA	✓	NS
0.50_364.2445m/z	7.0	MAG(14:1)	C01885	HMDB0011531	NA	✓	NS

a. tR = retention time; m/z = mass to charge ratio.
 b. Compared to blank samples (culture media only).
 c. HMDBXXXXXXX, metabolites described in the Human Metabolome Database (HMDB—<https://hmdb.ca/>); CXXXXX, described in the Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes database (KEGG—<https://www.genome.jp/kegg/>).
 d. ✓ = presence; NA = absence; UP and DOWN = more or less abundant respectively, when compared with HT-29 culture; NS = not significantly impacted when compared with HT-29 culture.
 * Annotated by exact mass only.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0274623.t002>

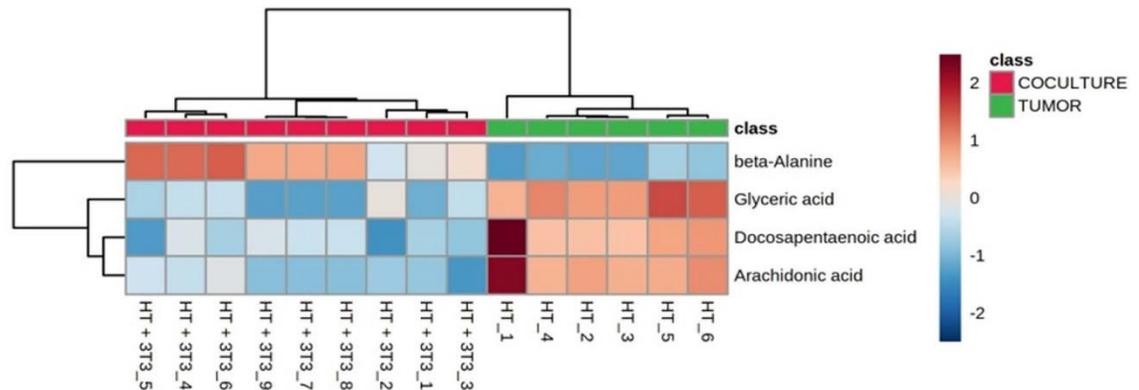


Fig 1. Heatmap of the metabolites from HT spheroids impacted by the co-culture with 3T3 adipocytes. The colors are normalized to the relative abundance of each metabolite. Samples (vertical axis) and metabolites (horizontal axis) are separated by Ward's algorithm and the dendrogram was scaled using Pearson's correlation. The clusters containing tumor spheroid alone and co-culture with tumor and adipocyte spheroids are highlighted in green and red, respectively.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0274623.g001>

11. Liu Q, Yang C, Wang S, Shi D, Wei C, Song J, et al. Wnt5a-induced M2 polarization of tumor-associated macrophages via IL-10 promotes colorectal cancer progression. *Cell Commun Signal*. 2020; 18(1):51. <https://doi.org/10.1186/s12964-020-00557-2> PMID: 32228612
12. Drost J, Clevers H. Organoids in cancer research. *Nat Rev Cancer*. 2018; 18(7):407–18. <https://doi.org/10.1038/s41568-018-0007-6> PMID: 29692415
13. Lin RZ, Chang HY. Recent advances in three-dimensional multicellular spheroid culture for biomedical research. *Biotechnol J*. 2008; 3(9–10):1172–84. <https://doi.org/10.1002/biot.200700228> PMID: 18566957
14. Altunbek M, Çetin D, Suludere Z, Çulha M. Surface-enhanced Raman spectroscopy based 3D spheroid culture for drug discovery studies. *Talanta*. 2019; 191:390–9. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2018.08.087> PMID: 30262075
15. Benien P, Swami A. 3D tumor models: history, advances and future perspectives. *Future Oncol*. 2014; 10(7):1311–27. <https://doi.org/10.2217/fo.13.274> PMID: 24947267
16. Breslin S O'Driscoll L. Three-dimensional cell culture: the missing link in drug discovery. *Drug Discov Today*. 2013; 18(5–6):240–9.
17. Lee JY, Chaudhuri O. Modeling the tumor immune microenvironment for drug discovery using 3D culture. *APL Bioeng*. 2021; 5(1):010903. <https://doi.org/10.1063/5.0030693> PMID: 33564739
18. Meier-Hubberten JC, Sanderson MP. Establishment and Analysis of a 3D Co-Culture Spheroid Model of Pancreatic Adenocarcinoma for Application in Drug Discovery. *Methods Mol Biol*. 2019; 1953:163–79. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9145-7_11 PMID: 30912022
19. Messias MCF, Mecatti GC, Priolli DG, de Oliveira Carvalho P. Plasmalogen lipids: functional mechanism and their involvement in gastrointestinal cancer. *Lipids in Health and Disease*. 2018; 17(1):41. <https://doi.org/10.1186/s12944-018-0685-9> PMID: 29514688
20. Silva AAR, Cardoso MR, Rezende LM, Lin JQ, Guimaraes F, Silva GRP, et al. Multiplatform Investigation of Plasma and Tissue Lipid Signatures of Breast Cancer Using Mass Spectrometry Tools. *Int J Mol Sci*. 2020; 21(10). <https://doi.org/10.3390/ijms21103611> PMID: 32443844
21. Nicholson JK, Lindon JC. Systems biology: Metabonomics. *Nature*. 455. England 2008. p. 1054–6. <https://doi.org/10.1038/4551054a> PMID: 18948945
22. Cui L, Lu H, Lee YH. Challenges and emergent solutions for LC-MS/MS based untargeted metabolomics in diseases. *Mass Spectrom Rev*. 2018; 37(6):772–92. <https://doi.org/10.1002/mas.21562> PMID: 29486047
23. Nalbantoglu S. Metabolomics: Basic Principles and Strategies. In: Nalbantoglu S., Amri H., editors. *Molecular Medicine* [Internet].
24. Campanella B, Colombaioni L, Nieri R, Benedetti E, Onor M, Bramanti E. Unraveling the Extracellular Metabolism of Immortalized Hippocampal Neurons Under Normal Growth Conditions. *Frontiers in chemistry*. 2021; 9:621548-. <https://doi.org/10.3389/fchem.2021.621548> PMID: 33937186
25. Pinu FR, Villas-Boas SG. Extracellular Microbial Metabolomics: The State of the Art. *Metabolites*. 2017; 7(3). <https://doi.org/10.3390/metabo7030043> PMID: 28829385
26. Jochem C, Leitzmann M. Obesity and Colorectal Cancer. *Recent Results Cancer Res*. 2016; 208:17–41. https://doi.org/10.1007/978-3-319-42542-9_2 PMID: 27909900
27. Zebisch K, Voigt V, Wabitsch M, Brandsch M. Protocol for effective differentiation of 3T3-L1 cells to adipocytes. *Anal Biochem*. 2012; 425(1):88–90. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2012.03.005> PMID: 22425542
28. Zardini Buzatto A, Tatlay J, Bajwa B, Mung D, Camicioli R, Dixon RA, et al. Comprehensive Serum Lipidomics for Detecting Incipient Dementia in Parkinson's Disease. *J Proteome Res*. 2021; 20(8):4053–67. <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.1c00374> PMID: 34251208
29. Struck-Lewicka W, Kordalewska M, Bujak R, Yumba Mpanga A, Markuszewski M, Jacyna J, et al. Urine metabolic fingerprinting using LC-MS and GC-MS reveals metabolite changes in prostate cancer: A pilot study. *J Pharm Biomed Anal*. 2015; 111:351–61. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2014.12.026> PMID: 25684700
30. Al-Sari N, Suvitaival T, Mattila I, Ali A, Ahonen L, Trost K, et al. Lipidomics of human adipose tissue reveals diversity between body areas. *PLoS One*. 2020; 15(6):e0228521. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0228521> PMID: 32544198
31. Ali AS, Raju R, Ray S, Kshirsagar R, Gilbert A, Zang L, et al. Lipidomics of CHO Cell Bioprocessing: Relation to Cell Growth and Specific Productivity of a Monoclonal Antibody. *Biotechnol J*. 2018; 13(10):e1700745. <https://doi.org/10.1002/biot.201700745> PMID: 29521466
32. Yanes O, Tautenhahn R, Patti GJ, Siuzdak G. Expanding coverage of the metabolome for global metabolite profiling. *Anal Chem*. 2011; 83(6):2152–61. <https://doi.org/10.1021/ac102981k> PMID: 21329365

33. Silva RR, Dorrestein PC, Quinn RA. Illuminating the dark matter in metabolomics. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015; 112(41):12549–50. <https://doi.org/10.1073/pnas.1516878112> PMID: 26430243
34. Mizuno R, Kawada K, Itatani Y, Ogawa R, Kiyasu Y, Sakai Y. The Role of Tumor-Associated Neutrophils in Colorectal Cancer. *Int J Mol Sci*. 2019; 20(3). <https://doi.org/10.3390/ijms20030529> PMID: 30691207
35. Marmol I, Sánchez-de-Diego C, Pradilla Dieste A, Cerrada E, Rodríguez Yoldi MJ. Colorectal Carcinoma: A General Overview and Future Perspectives in Colorectal Cancer. *Int J Mol Sci*. 2017; 18(1). <https://doi.org/10.3390/ijms18010197> PMID: 28106626
36. Yang Y, Tang LQ, Wei W. Prostanoids receptors signaling in different diseases/cancers progression. *J Recept Signal Transduct Res*. 2013; 33(1):14–27. <https://doi.org/10.3109/10799893.2012.752003> PMID: 23327583
37. Roulis M, Kaklamanos A, Scherthanner M, Bielecki P, Zhao J, Kaffe E, et al. Paracrine orchestration of intestinal tumorigenesis by a mesenchymal niche. *Nature*. 2020; 580(7804):524–9. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2166-3> PMID: 32322056
38. Smyth EM, Grosser T, Wang M, Yu Y, FitzGerald GA. Prostanoids in health and disease. *J Lipid Res*. 2009; 50 Suppl(Suppl):S423–8. <https://doi.org/10.1194/jlr.R800094-JLR200> PMID: 19095631
39. Chudy-Onwugaje K, Huang WY, Su LJ, Purdue MP, Johnson CC, Wang L, et al. Aspirin, ibuprofen, and reduced risk of advanced colorectal adenoma incidence and recurrence and colorectal cancer in the PLCO Cancer Screening Trial. *Cancer*. 2021; 127(17):3145–55. <https://doi.org/10.1002/cncr.33623> PMID: 33974712
40. Chang J, Tang N, Fang Q, Zhu K, Liu L, Xiong X, et al. Inhibition of COX-2 and 5-LOX regulates the progression of colorectal cancer by promoting PTEN and suppressing PI3K/AKT pathway. *Biochem Biophys Res Commun*. 2019; 517(1):1–7. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.01.061> PMID: 29339153
41. Tang J, Zhang C, Lin J, Duan P, Long J, Zhu H. ALOX5-5-HETE promotes gastric cancer growth and alleviates chemotherapy toxicity via MEK/ERK activation. *Cancer Med*. 2021; 10(15):5246–55. <https://doi.org/10.1002/cam4.4066> PMID: 34121352
42. Li L, Xiao Y, Xu Z, Wang S. Zileuton inhibits arachidonate-5-lipoxygenase to exert antitumor effects in preclinical cervical cancer models. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2021; 88(6):953–80. <https://doi.org/10.1007/s00280-021-04343-w> PMID: 34477945
43. Sarveswaran S, Thamilselvan V, Brodie C, Ghosh J. Inhibition of 5-lipoxygenase triggers apoptosis in prostate cancer cells via down-regulation of protein kinase C-epsilon. *Biochim Biophys Acta*. 2011; 1813(12):2108–17. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2011.07.015> PMID: 21824498
44. Wasilewicz MP, Kolodziej B, Bojulko T, Kaczmarczyk M, Sulzyc-Bielicka V, Bielicki D, et al. Overexpression of 5-lipoxygenase in sporadic colonic adenomas and a possible new aspect of colon carcinogenesis. *International journal of colorectal disease*. 2010; 25(9):1079–85. <https://doi.org/10.1007/s00384-010-0980-z> PMID: 20549218
45. Sarveswaran S, Chakraborty D, Chitale D, Sears R, Ghosh J. Inhibition of 5-lipoxygenase selectively triggers disruption of c-Myc signaling in prostate cancer cells. *The Journal of biological chemistry*. 2015; 290(8):4994–5006. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.599035> PMID: 25540201
46. Hennig R, Ding X-Z, Tong W-G, Schneider MB, Standop J, Friess H, et al. 5-Lipoxygenase and leukotriene B(4) receptor are expressed in human pancreatic cancers but not in pancreatic ducts in normal tissue. *The American journal of pathology*. 2002; 161(2):421–8. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)64198-3](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)64198-3) PMID: 12163367
47. Nixon DW. Cancer, cancer cachexia, and diet: lessons from clinical research. *Nutrition*. 1996; 12(1 Suppl):S52–6.
48. D'Angelo S, Motti ML, Meccariello R. ω -3 and ω -6 Polyunsaturated Fatty Acids, Obesity and Cancer. *Nutrients*. 2020; 12(9):2751. <https://doi.org/10.3390/nu12092751> PMID: 32927614
49. Huang J, Mondul AM, Weinstein SJ, Derkach A, Moore SC, Sampson JN, et al. Prospective serum metabolomic profiling of lethal prostate cancer. *Int J Cancer*. 2019; 145(12):3231–43. <https://doi.org/10.1002/ijc.32218> PMID: 30779128
50. Wang Y, Jacobs EJ, Carter BD, Gapstur SM, Stevens VL. Plasma Metabolomic Profiles and Risk of Advanced and Fatal Prostate Cancer. *Eur Urol Oncol*. 2021; 4(1):56–65. <https://doi.org/10.1016/j.euo.2019.07.005> PMID: 31378665
51. Tan J, Wang HL, Yang J, Liu QQ, Li CM, Wang YQ, et al. JMJD2B-induced amino acid alterations enhance the survival of colorectal cancer cells under glucose-deprivation via autophagy. *Theranostics*. 2020; 10(13):5763–77. <https://doi.org/10.7150/thno.38087> PMID: 32483417
52. Medina VA, Rivera ES. Histamine receptors and cancer pharmacology. *British journal of pharmacology*. 2010; 161(4):755–67. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2010.00961.x> PMID: 20636392

4. CONCLUSÃO GERAL

31

Os modelos de cultura e co-cultura 3D desenvolvidos serviram para a pesquisa de metabólitos que poderão auxiliar na busca de biomarcadores para o CCR, através da análise do secretoma tumoral, representado pelos meios de culturas das células. Os metabólitos encontrados estão relacionados à carcinogênese e, portanto, esse modelo de estudo abre caminhos para a futura pesquisa de biomarcadores tumorais (Figura 7).

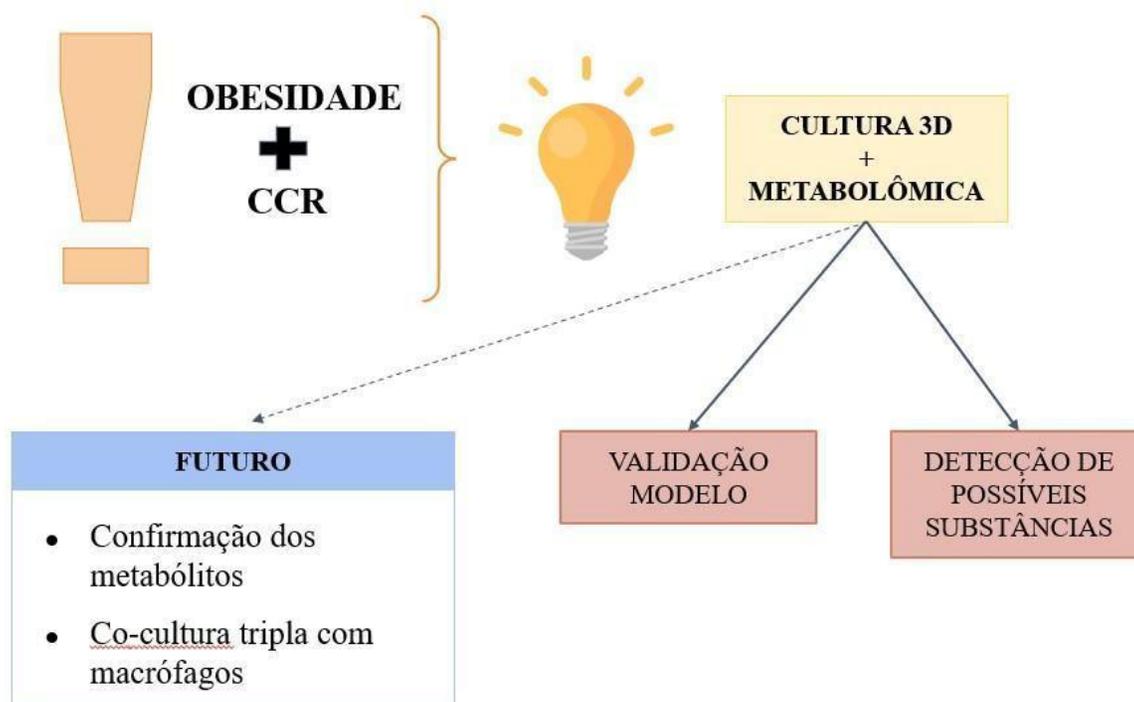


FIGURA 7. Avanços alcançados pelo presente estudo e perspectivas futuras a partir dos resultados obtidos.

5. REFERÊNCIAS

32

- ALTUNBEK, M.; ÇETIN, D.; SULUDERE, Z.; ÇULHA, M. Surface-enhanced Raman spectroscopy based 3D spheroid culture for drug discovery studies. **Talanta**, v. 191, p. 390-399. 2019.
- AREF, A.R.; BARBIE, D. **Ex Vivo Engineering of the Tumor Microenvironment**. Springer International Publishing; 2017.
- BALKWILL, F.R.; CAPASSO, M.; HAGEMANN, T. The tumor microenvironment at a glance. **J. Cell. Sci.** v. 125, p. 5591-5596, 2012
- BENIEN, P.; SWAMI, A. 3D tumor models: history, advances and future perspectives. **Future Oncol.** v. 10, n. 7, p. 1311-1327, 2014.
- BERGER, A.M.; GREM, J.L.; VISOVSKY, C.; MARUNDA, H.A.; YURKOVICH, J.M. Fatigue and other variables during adjuvant chemotherapy for colon and rectal cancer. **Oncol. Nurs. Forum.** v.37, n. 6, p. 359-369, 2010.
- BIOMARKERS DEFINITIONS WORKING GROUP. Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. **Clin. Phar. Ther.** v. 69, n. 3, p. 89-95, 2001.
- BOZZI, F.; MOGAVERO, A.; VARINELLI, L.; BELFIORE, A.; MANENTI, G.; CACCIA, C. MIF/CD74 axis is a target for novel therapies in colon carcinomatosis. **J. Exp. Clin. Cancer Res.** v. 36 n. 1 p. 16, 2017.
- BRESLIN, S.; O'DRISCOLL, L. Three-dimensional cell culture: the missing link in drug discovery. **Drug. Discov. Today.** v.18, n. 5, p. 240-249, 2018.
- BRUERA, G.; SANTOMAGGIO, A.; CANNITA, K.; BALDI, P.L.; TUDINI, M.; DE GALITIIS, F. "Poker" association of weekly alternating 5-fluorouracil, irinotecan, bevacizumab and oxaliplatin (FIR-B/FOx) in first line treatment of metastatic colorectal cancer: a phase II study. **BMC Cancer.** v.10, n. 1, p. 567, 2010.
- CALEFFI, J.T.; AAL, M.C.E.; GALLINDO, H.O.M.; CAXALI, G.H.; CRULHAS, B.P.; RIBEIRO, A.O. Magnetic 3D cell culture: State of the art and current advances. **Life. Sci.** v. 286 p. 120028, 2021.
- Cancer [Internet]. [cited 2022 Mar 20]. Available from: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>.
- Cancer of the Colon and Rectum - Cancer Stat Facts.: <<https://seer.cancer.gov/statfacts/html/colorect.html>>. Acesso em 19 de Janeiro de 2022.
- CHEN, X.; SONG, E. Turning foes to friends: targeting cancer-associated fibroblasts. **Nat. Rev. Drug. Discov.** v. 18, n. 2, p. 99-115, 2019.

DAQUINAG, A.C.; SOUZA, G.R.; KOLONIN, M.G. Adipose tissue engineering in three-dimensional levitation tissue culture system based on magnetic nanoparticles. **Tissue. Eng. Part. C. Methods.** v. 19, n. 5, p.336-344, 2013. 33

DE ROOCK, W.; BIESMANS. B.; DE SCHUTTER. J.; TEJPAR, S. Clinical biomarkers in oncology: focus on colorectal cancer. **Mol. Diagn. Ther.** v. 13, n. 2, p. 103-114, 2009.

DE-SOUZA, A.S.C.; COSTA-CASAGRANDE, T.A. Animal models for colorectal cancer. **Arq. Bras. Cir. Dig.** v. 31, p. 1369, 2018.

EISENHARDT, M. Avaliação das características clínicas e epidemiológicas e sobrevida global de pacientes portadores de câncer colorretal. **Ver. Epidemiol. Controle. Infecç.** v. 3, n. 4, p. 112-116, 2013.

ERIN, N.; GRAHOVAC, J.; BROZOVIC, A.; EFFERTH, T. Tumor microenvironment and epithelial mesenchymal transition as targets to overcome tumor multidrug resistance. **Drug. Resist. Updat.** v. 53, p.1007-1015, 2020.

FEARON, E.R.; VOGELSTEIN, B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. **Cell.** v. 61, p. 759-767, 1990

FRATTINI, M.; BALESTRA, D.; SUARDI, S.; OGGIONNI, M.; ALBERICI, P.; RADICE, P. Different genetic features associated with colon and rectal carcinogenesis. **Clin. Cancer. Res.** v. 10, n.12, p. 4015-4021, 2004.

Global Cancer Observatory (GLOBOCAN). Disponível em: <<https://www.https://gco.iarc.fr/>>. Acesso em 03 de outubro de 2022.

GONZALEZ-PONS, M.; CRUZ-CORREA, M. Colorectal Cancer Biomarkers: Where Are We Now? **Biomed. Res. Int.** p.149014, 2015

GRABENBAUER, G.G.; HOLGER, G. Management of radiation and chemotherapy related acute toxicity in gastrointestinal cancer. **Best. Pract. Res. Clin. Gastroenterol.** v. 30 n. 4, p.655-664, 2016.

GUPTA, S.P.; DUTTA, GUPTA, S. Chapter 1 - Cancer-leading proteases: An introduction. In: Gupta SP, editor. *Cancer-Leading Proteases*: Academic Press; 2020. p. 1-11.

HOSKOVEC, D.; SCIENCES, C.U.O.L.; VARGA, J.; KONEČNÁ, E.; SCIENCES, C.U.O.L.; ANTOŠ, F. Levels of CEA and Ca 19 - 9 in the sera and peritoneal cavity in patients with gastric and pancreatic cancers. **Acta. Cirúrgica. Bras.** v. 27. P. 410-416, 2012.

HUNDT, S.; HAUG, U.; BRENNER, H. Blood markers for early detection of colorectal cancer: a systematic review. **Cancer. Epidemiol. Biomarkers. Prev.** v.16, n.10,;1935-1953, 2007

IMAMURA, Y; MUKOHARA, T.; SHIMONO, Y; FUNAKOSHI, Y; CHAYAHARA, N.; TOYODA, M. Comparison of 2D- and 3D-culture models as drug-testing platforms in breast cancer. **Oncol. Rep.** v. 33. n. 4, p.1837-1843, 2015.

ISSA, I.A.; NOUREDDINE, M. Colorectal cancer screening: An updated review of the available options. **World. J. Gastroenterol**, v. 23, n. 28, p. 5086, 2017. 34

JAIN, R.; PICKENS, A.C.; FENTON, J.I. The role of the lipidome in obesity-mediated colon cancer risk. **J. Nutr. Biochem**. v. 59, p. 1-9, 2018.

JIN, K.; REN, C.; LIU, Y.; LAN, H.; WANG, Z. An update on colorectal cancer microenvironment, epigenetic and immunotherapy. **Int. Immunopharmacol**. v. 89, p. 107041, 2020.

LEE, J.Y.; CHAUDHURI, O. Modeling the tumor immune microenvironment for drug discovery using 3D culture. **APL. Bioeng**. v. 5, n. 1, p.010903, 2021.

LI, F.Y.; LAI, M. Colorectal cancer, one entity or three. **Journal of Zhejiang University Science B**. v. 10, p. 219–29, 2009.

LIN, A.; ZHANG, J.; LUO, P. Crosstalk Between the MSI Status and Tumor Microenvironment in Colorectal Cancer. **Front. Immunol**. v.11, p. 2039, 2020.

LUCAS, C.; BARNICH, N.; NGUYEN, H.T.T. Microbiota, Inflammation and Colorectal Cancer. **Int. J. Mol. Sci**. v. 18, n. 6, 2017.

MARTINEZ, N.P.; KANNO, D.T.; PEREIRA, J.A.; CARDINALI, I.A.; PRIOLLI, D.G. Beta-catenin and E-cadherin tissue “content” as prognostic markers in left-side colorectal cancer. **Cancer. Biomarkers**. v. 8, p. 129–35, 2011

MBEUNKUI, F.; JOHANN, D.J. Cancer and the tumor microenvironment: a review of an essential relationship. **Cancer. Chemother. Pharmacol**. v. 63, n. 4, p. 571-582, 2009.

MEIER-HUBBERTEN, J.C.; SANDERSON, M.P. Establishment and Analysis of a 3D Co-Culture Spheroid Model of Pancreatic Adenocarcinoma for Application in Drug Discovery. **Methods. Mol. Biol**. v. 1953, p. 163-179, 2019.

MESSIAS, M.C.F.; MECATTI, G.C.; PRIOLLI, D.G.; CARVALHO, P.O. Plasmalogen lipids: functional mechanism and their involvement in gastrointestinal cancer. **Lip. Health. Dis**. v. 17, n. 1, p. 41, 2018.

MIZUNO, R.; KAWADA, K.; SAKAI, Y. Prostaglandin E2/EP Signaling in the Tumor Microenvironment of Colorectal Cancer. **Int. J. Mol. Sci**. v. 20, n. 24, 2019.

ROMERO M.M.; MENDIETA, E.J.L.; SÁNCHEZ, G.M.V.; ALONSO-CEREZO, M.C.; CLEMENTE, M.O. Oncología personalizada: principales biomarcadores en el pronóstico y tratamiento de tumores sólidos. **Rev. Lab. Clínico**. v. 12, n. 3, p. 1-8, 2019.

NALBANTOGLU, S. Metabolomics: Basic Principles and Strategies. In: Nalbantoglu, S., Amri, H. , editors. **Mol. Med**. London: IntechOpen; 2019.

NICHOLSON, J.K.; LINDON, J.C. Systems biology: Metabonomics. **Nature**. p. 1054-1056,

PAKIET, A.; KOBIELA, J.; STEPNOWSKI, P.; SLEDZINSKI, T.; MIKA, A. Changes in lipids composition and metabolism in colorectal cancer: a review. **Lip. Health. Dis.** v. 18, n. 1, p. 29, 2019.

RAWLA, P.; SUNKARA, T.; BARSOUK, A. Epidemiology of colorectal cancer: incidence, mortality, survival, and risk factors. **Prz. Gastroenterol.** v.14, n. 2, p. 89-103, 2019.

SABISTON, D.C.; TOWNSEND, M.C. **Sabiston Tratado de Cirurgia.** A base biologicas da prática cirúrgica moderna. 20. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 1896, 2002.

SAYDÉ, T.; EL HAMOUI, O.; ALIES, B.; GAUDIN, K.; LESPE, G.; BATTU, S. Biomaterials for three-dimensional cell culture: From applications in oncology to nanotechnology. **Nanomaterials.** v. 11, n. 2, p.481-510, 2021.

SCALISE, J.R.; POÇAS, R.C.G.; CANELOI, T.P.; LOPES, C.O.; KANNO, D.T.; MARQUES, M.G. DNA Damage Is a Potential Marker for TP53 Mutation in Colorectal Carcinogenesis. **J. Gastrointest. Cancer.** v. 47, n. 4, p. 409-416, 2016.

SCHMITT, M.; GRETEN, F.R. The inflammatory pathogenesis of colorectal cancer. **Nat. Rev.Immun.** v. 21, n. 10, p. 653-667, 2021.

SOLTANI, G.; POURSHAIKHANI, A.; YASSI, M.; HAYATBAKHS, A.; KERACHIAN, M.; KERACHIAN, M.A. Obesity, diabetes and the risk of colorectal adenoma and cancer. **BMC. Endocr. Disord.** v. 19, n. 1, p. 113, 2019.

TATULLO, M.; MARRELLI, B.; BENINCASA, C.; AIELLO, E.; MAKEEVA, I.; ZAVAN, B. Organoids in Translational Oncology. **J. Clin. Med.** v. 9, n. 9, 2020.

YU, C., HUANG, X.; NIAN, H.. A weighted log-rank test and associated effect estimator for cancer trials with delayed treatment effect. **Pharm. Stat.** v. 20, n. 3, p. 528-550, 2021.