



UnB

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA – UnB
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA MOLECULAR
LABORATÓRIO DE BIOQUÍMICA E QUÍMICA DE PROTEÍNAS

RAPHAELA MENEZES DE OLIVEIRA

**Análise Multiômica de Plasma de
Pacientes com Carcinoma Hepatocelular
por Espectrometria de Massas**

BRASÍLIA, DF

2018



UnB

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA – UnB
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA MOLECULAR
LABORATÓRIO DE BIOQUÍMICA E QUÍMICA DE PROTEÍNAS

RAPHAELA MENEZES DE OLIVEIRA

**Análise Multiômica de Plasma de Pacientes com Carcinoma
Hepatocelular por Espectrometria de Massas**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Molecular da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Carlos André Ornelas Ricart
Coorientadora: Profa. Dra. Aline Maria Araújo Martins

Brasília, DF
Maio de 2018

AGRADECIMENTOS

A espiritualidade, por me guiar pelos caminhos edificantes e me amparar nos momentos de dificuldade para continuar sempre perseverante.

Meu sincero agradecimento ao professor Carlos André, por me acolher como aluna e me dar a oportunidade de cursar uma pós-graduação de qualidade.

À minha co-orientadora, Aline, mais que uma mãe científica, pela oportunidade de ingressar na pesquisa e pela confiança. Agradeço pelo zelo, pelos ensinamentos e por tantas batalhas enfrentadas.

Ao grupo de medicina translacional, pela confiança em mim depositada e pela contribuição nos experimentos.

Aos colegas e professores do Laboratório de Bioquímica e Química de Proteínas, agradeço pela convivência diária, momentos de descontração e ajuda. Um agradecimento especial ao Arthur e ao professor Wagner Fontes por todo o aprendizado.

Agradeço ao Laboratório Thomson de Espectrometria de Massas, em nome do professor Marcos Eberlin e equipe, pelo uso de equipamento e pela oportunidade de explorar novas áreas e técnicas.

À equipe do Centro de Transplante de Fígado do Hospital Universitário Walter Cantídeo pelo apoio e contribuição na pesquisa, em nome do professor Huygens Garcia, meu obrigado.

À minha família, que a sua maneira sempre me deu exemplo, me apoiou e encorajou. À minha mãe, que sempre batalhou muito para que eu pudesse ter escolha e ir além do que ela já pode ir. Stephanie, Rui, Luiz e Janeide, minha eterna gratidão.

Meus agradecimentos a UnB, CAPES e todas as pessoas que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

*“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda
pensou sobre aquilo que todo mundo vê.”*

(Arthur Schopenhauer)

RESUMO

O carcinoma hepatocelular (CHC) é a mais importante complicação tardia de processos degenerativos crônicos do fígado derivados de uma hepatopatia primária. A baixa acurácia dos métodos laboratoriais e radiológicos atualmente preconizados contribuem para o diagnóstico em estágios avançados da doença e consequente limitação das opções de tratamento e expectativa de vida dos pacientes. Nesses casos, o transplante de fígado torna-se a única opção curativa para o CHC, portanto, a caracterização de um painel molecular específico pode contribuir para o prognóstico e monitoramento de estágios patológicos de forma a auxiliar em decisões clínico-terapêuticas. No presente estudo, a espectrometria de massas (MS) sob abordagem translacional-multiômica foi aplicada para avaliação dos perfis globais de proteínas (*label-free* LC-MS/MS) e lipídeos (MALDI-TOF) em plasma de 9 (nove) pacientes com CHC, submetidos ao transplante de fígado, e 9 (nove) pacientes não patológicos (doadores). Variações de *Fold Change* (≥ 5) e *VIP score* (PLS-DA, *imp. features* $p < 0,05$) demonstraram alteração na expressão e contribuição de 17 (dezesete) proteínas candidatas ao estudo de prospecção de biomarcadores no CHC. Lipídeos de alta contribuição para caracterização dos cenários (*VIP score* > 0.8) revelaram desequilíbrio na síntese glicerofosfolipídeos, com alteração na razão fosfatidilcolina/ fosfatidiletanolamina (PC/PE) na presença da hepatopatia. Os resultados, avaliados individualmente ou em conjunto, demonstraram não só perfis proteômico e lipidômico distintos entre as condições patológicas *versus* controle, como revelaram possíveis candidatos a marcadores diagnósticos em um método não invasivo para o CHC e outras doenças do fígado.

Palavras chave: Espectrometria de massas, carcinoma hepatocelular, multiomics, biomarcadores, câncer.

ABSTRACT

Hepatocellular carcinoma (HCC) is the most important late complication of chronic degenerative processes of the liver, derived from a primary liver disease. The low accuracy of the currently recommended laboratory and radiological methods contribute to diagnosis in advanced stages of the disease and consequent limitation of treatment options and life expectancy of patients. In these cases, liver transplantation becomes the only curative option for HCC, therefore featuring a specific molecular panel can contribute to the prognosis and monitoring of pathological stages in order to assist in clinical therapeutic decisions. In this study, mass spectrometry under a translational-multiomic-approach was applied to evaluated plasma global profile of proteins (label-free LC-MS/MS) and lipids (MALDI-TOF) of 9 (nine) patients with HCC, submitted to liver transplant, and 9 (nine) non-pathological patients (donors). Fold Change (≥ 5) and VIP score (PLS-DA imp. features, $p < 0.05$) variations demonstrated alteration in expression and contribution of 17 (seventeen) proteins candidates to HCC biomarkers prospecting study. Lipids with high contribution to scenarios characterization (VIP score > 0.8) revealed an imbalance in glycerophospholipid synthesis, with alteration of phosphatidylcholine/ phosphatidylethanolamine (PC / PE) ratio in the presence of liver disease. Results, assessed individually or together, displayed not only distinct proteomic and lipidomic profiles within pathological conditions versus control, as revealed possible candidates for diagnostic markers in a noninvasive method for HCC and other liver diseases.

Keywords: Mass spectrometry, hepatocellular carcinoma, multiomics, biomarkers, cancer.

SUMÁRIO

| | |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| AGRADECIMENTOS..... | 2 |
| RESUMO..... | 4 |
| ABSTRACT..... | 5 |
| SUMÁRIO..... | 6 |
| LISTA DE FIGURAS..... | 9 |
| LISTA DE QUADROS..... | 13 |
| LISTA DE TABELAS..... | 14 |
| LISTA DE ABREVIACÕES E SIGLAS..... | 15 |
| CAPÍTULO 1: Considerações Gerais..... | 19 |
| 1.INTRODUÇÃO..... | 20 |
| 1.1.Carcinoma Hepatocelular no Mundo e no Brasil..... | 20 |
| 1.2.Processos Moleculares Envolvidos no Carcinoma Hepatocelular..... | 24 |
| 1.3.Classificação Molecular do Carcinoma Hepatocelular..... | 27 |
| 1.4.Uso da Abordagem Multiômica nos Estudos de Prospecção de Biomarcadores no Carcinoma Hepatocelular..... | 31 |
| 2.OBJETIVOS..... | 36 |
| 2.1.Objetivo Geral..... | 36 |
| 2.2.Objetivos Específicos..... | 36 |
| 3.JUSTIFICATIVA..... | 37 |
| 4.PACIENTES HEPATOPATAS TERMINAIS..... | 38 |
| 4.1.Critérios de Inclusão..... | 38 |
| 4.2.Critérios de Exclusão..... | 38 |
| 5.PACIENTES DOADORES (GRUPO CONTROLE)..... | 40 |
| 5.1.Critérios de Inclusão..... | 40 |
| 5.2.Critérios de Exclusão..... | 41 |
| 6.POPULAÇÃO DE PESQUISA..... | 42 |
| 6.1.Dados Clínicos..... | 42 |
| 7.REFERÊNCIAS..... | 46 |
| CAPÍTULO 2: Análise Proteômica..... | 51 |
| 1.USO DA PROTEÔMICA NOS ESTUDOS DE PROSPECÇÃO DE BIOMARCADORES NO CARCINOMA HEPATOCELULAR..... | 52 |
| 2.MÉTODOS..... | 54 |

| | |
|------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| 2.1. Princípio da Técnica LC-MS/MS..... | 54 |
| 2.2.Preparação de Amostras..... | 55 |
| 2.3.Quantificação de Proteínas e Peptídeos..... | 56 |
| 2.4.Digestão Triptica de Proteínas em Solução (Clássica)..... | 57 |
| 2.5.Dessalinização de Peptídeos..... | 58 |
| 2.6.Análise <i>Label-Free</i> por LC-MS/MS..... | 58 |
| 2.7.Análise de Dados e Quimiometria..... | 59 |
| 2.7.1.Progenesis QI..... | 60 |
| 2.7.2.MetaboAnalyst..... | 60 |
| 2.8.Anotações Funcionais..... | 61 |
| 3.RESULTADOS..... | 62 |
| 3.1.Caracterização do Perfil de Proteínas..... | 62 |
| 3.2.Proteômica de Descoberta de Possíveis Biomarcadores..... | 76 |
| 4.DISCUSSÃO..... | 83 |
| 5.CONCLUSÃO..... | 92 |
| 6.REFERÊNCIAS..... | 93 |
| CAPÍTULO 3: Análise Lipidômica..... | 98 |
| 1.USO DA LIPIDÔMICA NOS ESTUDOS DE PROSPECÇÃO DE BIOMARCADORES NO CARCINOMA HEPATOCELULAR..... | 99 |
| 2.MÉTODOS..... | 101 |
| 2.1.Princípio da Técnica MALDI-TOF/TOF..... | 101 |
| 2.2.Preparação de Amostras..... | 102 |
| 2.3.Análise por MALDI-TOF/TOF..... | 103 |
| 2.4.Quimiometria..... | 103 |
| 2.5.Identificação das <i>Molecular Features</i> | 104 |
| 3.RESULTADOS..... | 106 |
| 3.1.Caracterização do Perfil de Lipídeos..... | 106 |
| 3.2.Lipidômica de Descoberta de Possíveis Biomarcadores..... | 118 |
| 4.DISCUSSÃO..... | 130 |
| 5.CONCLUSÃO..... | 134 |
| 6.REFERÊNCIAS..... | 135 |
| CAPÍTULO 4: Considerações Finais, Apêndices e Anexos..... | 139 |
| 1.CONCLUSÕES..... | 140 |
| 2.PERSPECTIVAS..... | 141 |

| | |
|----------------|-----|
| APÊNDICES..... | 143 |
| ANEXOS..... | 169 |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1: Incidência e mortalidade dos principais tipos de câncer registrados no mundo em 2012 em ambos os sexos..... | 21 |
| Figura 2: Estimativa de novos casos de câncer de fígado em 2020 para todas as idades no Brasil..... | 22 |
| Figura 3: Carcinoma hepatocelular (seta branca) localizado em fígado cirrótico..... | 23 |
| Figura 4: Capacidades adquiridas pelas células tumorais durante a carcinogênese..... | 25 |
| Figura 5: Interações estabelecidas entre células neoplásicas e microambiente tumoral durante a progressão maligna..... | 27 |
| Figura 6: Principais componentes de um espectrômetro de massas..... | 33 |
| Figura 7: Estratégias para prospecção de biomarcadores por meio de tecnologias emergentes..... | 35 |
| Figura 8: Média e desvio padrão para alfa-fetoproteína em plasma de pacientes com CHC submetidos ao transplante de fígado..... | 45 |
| Figura 9: Média e desvio padrão para o volume total do tumor avaliado no explante de pacientes com CHC submetidos ao transplante de fígado..... | 45 |
| Figura 10: Fluxograma do método de análise proteômica..... | 54 |
| Figura 11: Quantificação por Qubit..... | 57 |
| Figura 12: Gradiente de eluição dos peptídeos trípticos fracionados em sistema LC-MS/MS..... | 59 |
| Figura 13: Potência estatística do conjunto de dados proteômicos (<0.8)..... | 62 |
| Figura 14: Estado de regulação das proteínas discriminantes em pacientes com CHC..... | 63 |
| Figura 15: Análise PCA apresentando os <i>scores plot</i> das proteínas reguladas em plasma de pacientes com CHC e pacientes controle pelo <i>software</i> MetaboAnalyst ($p < 0.05$)..... | 64 |
| Figura 16: Análise PCA apresentando os <i>loadings plot</i> das proteínas reguladas em plasma de pacientes com CHC e pacientes controle pelo <i>software</i> MetaboAnalyst ($p < 0.05$)..... | 65 |

| | |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 17: Análise PCA apresentando os <i>scores plot</i> das proteínas reguladas em plasma de pacientes com CHC e pacientes controle pelo <i>software</i> Progenesis Q1 ($p < 0.05$)..... | 65 |
| Figura 18: Análise PLS-DA apresentando os <i>scores plot</i> das proteínas reguladas em plasma de pacientes com CHC e pacientes controle pelo <i>software</i> MetaboAnalyst ($p < 0.05$)..... | 66 |
| Figura 19: Análise PLS-DA apresentando os <i>loadings plot</i> das proteínas reguladas em plasma de pacientes com CHC e pacientes controle pelo <i>software</i> MetaboAnalyst ($p < 0.05$)..... | 67 |
| Figura 20: Análise por validação cruzada do método PLS-DA para perfil proteômico no <i>software</i> MetaboAnalyst..... | 68 |
| Figura 21: Análise por Orthogonal PLS-DA apresentando os <i>scores plot</i> das proteínas reguladas em plasma de pacientes com CHC e pacientes controle pelo <i>software</i> MetaboAnalyst ($p < 0.05$)..... | 69 |
| Figura 22: Análise por Orthogonal PLS-DA apresentando os <i>loadings S-plot</i> das proteínas reguladas em plasma de pacientes com CHC e pacientes controle pelo <i>software</i> MetaboAnalyst ($p < 0.05$)..... | 70 |
| Figura 23: Anotações GO quanto ao processo biológico para proteínas reguladas em plasma de pacientes com CHC e pacientes controle (<i>software</i> Strap)..... | 71 |
| Figura 24: Anotações GO quanto ao processo biológico para proteínas reguladas em plasma de pacientes com CHC e pacientes controle (<i>software</i> Blast2go)..... | 72 |
| Figura 25: Anotações GO quanto ao componente celular para proteínas reguladas em plasma de pacientes com CHC e pacientes controle (<i>software</i> Strap)..... | 72 |
| Figura 26: Anotações GO quanto ao componente celular para proteínas reguladas em plasma de pacientes com CHC e pacientes controle (<i>software</i> Blast2go)..... | 73 |
| Figura 27: Análise HCA por agrupamento dos dados proteômicos em dendograma no <i>software</i> Progenesis Q1 ($p < 0.05$)..... | 73 |
| Figura 28: Análise HCA por agrupamento dos dados proteômicos em dendograma no <i>software</i> MetaboAnalyst ($p < 0.05$)..... | 74 |
| Figura 29: Agrupamento K-means dos dados proteômicos ($p < 0.05$)..... | 75 |
| Figura 30: Classificação Random Forest do conjunto de dados proteômicos..... | 76 |
| Figura 31: Potenciais <i>outliers</i> detectados por Random Forest na análise proteômica..... | 76 |

| | |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Figura 32: Anotações GO quanto à função molecular para proteínas reguladas em plasma de pacientes com CHC e pacientes controle (<i>software</i> Strap)..... | 77 |
| Figura 33: Anotações GO quanto à função molecular para proteínas reguladas em plasma de pacientes com CHC e pacientes controle (<i>software</i> Blast2go)..... | 77 |
| Figura 34: Anotações Enzyme Code para proteínas reguladas em plasma de pacientes com CHC e pacientes controle..... | 78 |
| Figura 35: Anotações Enzyme Code para hidrolases em plasma de pacientes com CHC e pacientes controle..... | 79 |
| Figura 36: <i>VIP scores</i> das proteínas reguladas em plasma de pacientes com CHC e pacientes controle (PLS-DA <i>imp. features</i> , $p < 0.05$)..... | 80 |
| Figura 37: Análise HCA por agrupamento em <i>heatmap</i> das proteínas discriminantes indicadas pela análise PLS-DA (<i>imp. features</i> , $p < 0.05$)..... | 81 |
| Figura 38: Fluxograma do método de análise lipidômica..... | 101 |
| Figura 39: Análise PCA apresentando os <i>scores plot</i> dos lipídeos avaliados em plasma de pacientes com CHC e pacientes controle ($p < 0.05$)..... | 106 |
| Figura 40: Análise PCA apresentando os <i>loadings plot</i> dos lipídeos avaliados em plasma de pacientes com CHC e pacientes controle ($p < 0.05$)..... | 107 |
| Figura 41: Análise por PLS-DA apresentando os <i>scores plot</i> dos lipídeos avaliados em plasma de pacientes com CHC e pacientes controle ($p < 0.05$)..... | 108 |
| Figura 42: Análise PLS-DA apresentando os <i>loadings plot</i> dos lipídeos avaliados em plasma de pacientes com CHC e pacientes controle ($p < 0.05$)..... | 109 |
| Figura 43: Análise por validação cruzada do método PLS-DA para perfil lipídico..... | 110 |
| Figura 44: Análise Orthogonal PLS-DA apresentando os <i>scores plot</i> dos lipídeos avaliados em plasma de pacientes com CHC e pacientes controle ($p < 0.05$)..... | 111 |
| Figura 45: Análise por Orthogonal PLS-DA apresentando os <i>loadings S-plot</i> dos lipídeos avaliados em plasma de pacientes com CHC e pacientes controle ($p < 0.05$)..... | 112 |
| Figura 46: <i>VIP scores</i> dos lipídeos avaliados em plasma de pacientes com CHC e pacientes controle (PLS-DA <i>imp. features</i> , $p < 0.05$)..... | 113 |
| Figura 47: <i>Box plot</i> dos íons discriminantes de <i>VIP score</i> $\geq 0,8$ por teste T-student não paramétrico ($p < 0.05$)..... | 114 |
| Figura 48: Análise HCA por agrupamento em <i>heatmap</i> dos íons discriminantes indicados pela análise PLS-DA (<i>imp. features</i> , $p < 0.05$)..... | 115 |

| | |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Figura 49: Análise HCA por agrupamento dos dados lipidômicos em dendograma..... | 116 |
| Figura 50: Agrupamento K-means dos dados lipidômicos..... | 117 |
| Figura 51: Classificação Random Forest do conjunto de dados lipidômicos..... | 118 |
| Figura 52: Potenciais <i>outliers</i> detectados por Random Forest na análise lipidômica..... | 118 |
| Figura 53: Espectro de massas da fragmentação MS/MS do íon precursor 650.4988 <i>m/z</i> por energia de CID..... | 119 |
| Figura 54: Espectro de massas da fragmentação MS/MS do íon precursor 659.33305 <i>m/z</i> por energia de CID..... | 120 |
| Figura 55: Espectro de massas da fragmentação MS/MS do íon precursor 672.4805 <i>m/z</i> por energia de CID..... | 121 |
| Figura 56: Espectro de massas da fragmentação MS/MS do íon precursor 760.6331 <i>m/z</i> por energia de CID..... | 122 |
| Figura 57: Espectro de massas da fragmentação MS/MS do íon precursor 881.8321 <i>m/z</i> por energia de CID..... | 123 |
| Figura 58: Espectro de massas da fragmentação MS/MS do íon precursor 758.61035 <i>m/z</i> por energia de CID..... | 124 |
| Figura 59: Espectro de massas da fragmentação MS/MS do íon precursor 804.58785 <i>m/z</i> por energia de CID..... | 125 |
| Figura 60: Espectro de massas da fragmentação MS/MS do íon precursor 782.6076 <i>m/z</i> por energia de CID..... | 126 |
| Figura 61: Espectro de massas da fragmentação MS/MS do íon precursor 683.10435 <i>m/z</i> por energia de CID..... | 127 |
| Figura 62: Espectro de massas da fragmentação MS/MS do íon precursor 810.6404 <i>m/z</i> por energia de CID..... | 128 |
| Figura 63: Identificação das <i>molecular features</i> de <i>VIP score</i> $\geq 0,8$ em plasma de pacientes com CHC e pacientes controle..... | 129 |

LISTA DE QUADROS

| | |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Quadro 1: Critérios de Barcelona utilizados para o diagnóstico do CHC..... | 28 |
| Quadro 2: Diretrizes preconizadas pela <i>EASL</i> e <i>AASLD</i> para tratamento do CHC..... | 29 |
| Quadro 3: Critérios de elegibilidade utilizados para o transplante hepático no tratamento do CHC no Brasil..... | 31 |
| Quadro 4: Características de um biomarcador ideal..... | 32 |
| Quadro 5: Proteínas classificadas para prospecção de biomarcadores em plasma de pacientes com CHC..... | 81 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabela 1: Dados clínicos dos pacientes com carcinoma hepatocelular submetidos ao transplante de fígado..... | 43 |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AFP – Alfa-fetoproteína

Alb – Albumina

ANOVA – *Analysis of Variance* (Análise de Variância)

AUC – *Area Under the Curve* (Área Sob a Curva)

AVC – Acidente Vascular Cerebral

Cer – *Ceramide* (Ceramida)

CHC – Carcinoma Hepatocelular

CID – *Collision-induced Dissociation* (Dissociação Induzida por Colisão)

COMP – *Cartilage Oligomeric Matrix Protein* (Proteína Oligomérica da Matriz da Cartilagem)

DDA – *Data Dependent Acquisition* (Aquisição Dependente de Dados)

DHB – *2,5-Dihydroxybenzoic Acid* (Ácido 2,5-diidroxibenzóico)

DNA – Deoxyribonucleic Acid (Ácido Desoxirribonucleico)

DPPC – *Dipalmitoylphosphatidylcholine* (Dipalmitoilfosfatidilcolina)

DTT – Ditioneitol

EBI – *European Bioinformatics Institute* (Instituto Europeu de Bioinformática)

EC – *Enzyme Codes* (Código de Enzimas)

EDTA – *Ethylenediamine Tetra Acetic Acid* (Ácido Etilenodiamino Tetra-acético)

ELSD – *Evaporative Light Scattering Detection* (Detector de Espalhamento de Luz Evaporativo)

EMT – *Epithelial-mesenchymal Transition* (Transição Epitelial-mesenquimal)

ERK1/2 – Extracellular Signal-regulated Kinases (Quinase 1 e 2 Reguladas por Sinalização Extracelular)

ESI – *Electrospray Ionization* (Ionização por Eletropulverização)

FDR – *False Discovery Rate* (Taxa de Falsas Descobertas)

FPLC – *Fast Protein Liquid Chromatography* (Cromatografia Líquida de Proteína Rápida)

FTICR – *Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance* (Transformada de Fourier e Ressonância Ciclotrônica de Íons)

GO – *Gene Ontology* (Ontologia Gênica)

HCA – *Hierarchical Cluster Analysis* (Análise de Agrupamentos Hierárquicos)

HCD – *Higher Energy Collisional Dissociation* (Dissociação Induzida por Colisão de Alta Energia)

HGFL – *Hepatocyte Growth Factor-like Protein* (Proteína Similar ao Fator de Crescimento de Hepatócitos)

HPLC – *High Performance Liquid Chromatographic* (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência)

IAA – Iodoacetoamida

IFN – Interferon

IgA – Imunoglobulina A

IgG – Imunoglobulina G

IgM – Imunoglobulina M

IMS – *Imaging Mass Spectrometry* (Imageamento por Espectrometria de Massas)

IT – *Ion Trap* (Armadilha de Íons)

JAK-STAT – *Janus Kinase/Signal Transducers and Activators of Transcription* (Janus Quinase/Transdutor de Sinal e Ativador da Transcrição)

LC – *Liquid Chromatography* (Cromatografia Líquida)

LPC – *Lysophosphatidylcholine* (Lisofosfatidilcolina)

LTQ – *Linear Trap Quadrupole* (Armadilha de Íons Linear)

m/z – *Mass-to-charge* (Massa/Carga)

MALDI – *Matrix Assisted Laser Desorption Ionization* (Ionização e Dessorção a Laser Assistida por Matriz)

MeOH – Metanol

MRM – *Multiple Reaction Monitoring* (Monitoramento de Reações Múltiplas)

MS – *Mass Spectrometry* (Espectrometria de Massas)

MS/MS – *Tandem Mass Spectrometry* (Espectrometria de Massas em Sequência)

NCBI – *National Center for Biotechnology Information* (Centro Nacional de Informações Biotecnológicas)

NR – *Non Redundat* (Não redundante)

PA – *Phosphatidic acid* (Ácido Fosfatídico)

PAI-1 – *Plasminogen Activator Inhibitor-1* (Inibidor do Ativador de Plasminogênio-1)

PC – *Phosphatidylcholine* (Fosfatidilcolina)

PCA – *Principal Component Analysis* (Análise dos Componentes Principais)

PE – *Phosphatidyletanolamine* (Fosfatidiletanolamina)

PI – *Phosphatidylinositol* (Fosfatidilinositol)

PIR – *Protein Information Resource* (Recurso de Informação de Proteínas)

PLS-DA – *Partial Least Square Discriminant Analysis* (Análise Discriminante por Mínimos Quadrados Parciais)

PS – *Phosphatidylserine* (Fosfatidilserina)

QTOF – *Quadrupole Time-of-flight* (Quadrupolo – Tempo de Voo)

REIMS – *Rapid Evaporative Ionization Mass Spectrometry* (Espectrometria de Massa por Ionização Evaporativa Rápida)

RNA – *Ribonucleic Acid* (Ácido Ribonucleico)

ROC – *Receiver Operating Characteristic* (Características Operacionais do Receptor)

RON – *Recepteur D'origine Nantais* (Receptor Tirosina Quinase RON)

RT-PCR – *Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction* (Reação em Cadeia da Polimerase via Transcriptase Reversa)

S/N – *Signal-to-noise* (Sinal/Ruído)

SELDI – *Surface-enhanced Laser Desorption/Ionization* (Ionização por Dessorção de Superfície Estimulada por Laser)

SM – *Sphingomyelin* (Esfingomielina)

STAT – *Signal Transducer and Activator of Transcription* (Transdutores de Sinal e Ativadores de Transcrição)

SWATH-MS – *Sequential Window Acquisition of all Theoretical Mass Spectra* (Aquisição Sequencial de Todos os Espectros de Massa Teórica)

TAG – Triacilglicerídeo

TEAB – Bicarbonato de Trietilamônio

TFA – Ácido Trifluoroacético

TGF – *Transforming Growth Factor* (Fator de Transformação do Crescimento)

TNF – *Tumor Necrosis Factor* (Fator de Necrose Tumoral)

TNM – Tumor-nódulo-metástase

TOF – *Time-of-flight* (Tempo de voo)

TOF/TOF – *Tandem Time-of-flight* (Tempo de Voo em Sequência)

TUNEL – *Terminal Deoxynucleotidyl Transferase Uracil Nick End Labeling* (Marcação de Terminações Uracil Mediada por Desoxinucleotidil Transferase Terminal)

UFLC – *Ultra Fast Liquid Chromatography* (Cromatografia Líquida Ultra-Rápida)

UPLC – *Ultrapformance Liquid Chromatography* (Cromatografia Líquida de Ultra Performance)

v/v – Volume/Volume

VHB – Vírus da Hepatite B

VHC – Vírus da Hepatite C

VIP score – *Variable Importance in Projection Score* (Escore de Variáveis Importantes na Projeção)

XIC – *Extracted Ion Chromatogram* (Cromatograma de Íons Extraídos)

CAPÍTULO 1

Considerações Gerais

“Aqueles que se sentem satisfeitos sentam-se e nada fazem. Os insatisfeitos são os únicos benfeitores do mundo.”
(Walter S. Landor)

1. INTRODUÇÃO

5.2. CARCINOMA HEPATOCELULAR NO MUNDO E NO BRASIL

O câncer é umas das principais causas de morbidade e mortalidade no mundo, com registros em 2012 de aproximadamente 14.1 milhões de novos casos, 8.2 milhões de mortes e 32.6 milhões de casos prevalentes com 5 anos de diagnóstico (INTERNACIONAL AGENCY FOR RESEACH ON CANCER; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2012a; TORRE et al., 2015). A Figura 1 apresenta os principais tipos de neoplasia responsáveis pelos índices de morbidade e mortalidade, com destaque para câncer de pulmão (1.59 milhões de mortes), mama (522 mil mortes), fígado (745 mil mortes), estômago (723 mil mortes) e colorretal (694 mil mortes).

Considerando que em 2012 houve registro de aproximadamente 790 mil novos casos de câncer de fígado, classificando-se entre os 5 tipos de câncer mais frequentes em homens (FERLAY et al., 2015; INTERNACIONAL AGENCY FOR RESEACH ON CANCER; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2012a), a razão entre a incidência e a mortalidade do câncer de fígado em registros mundiais expressa a necessidade de prevenção e controle da doença.

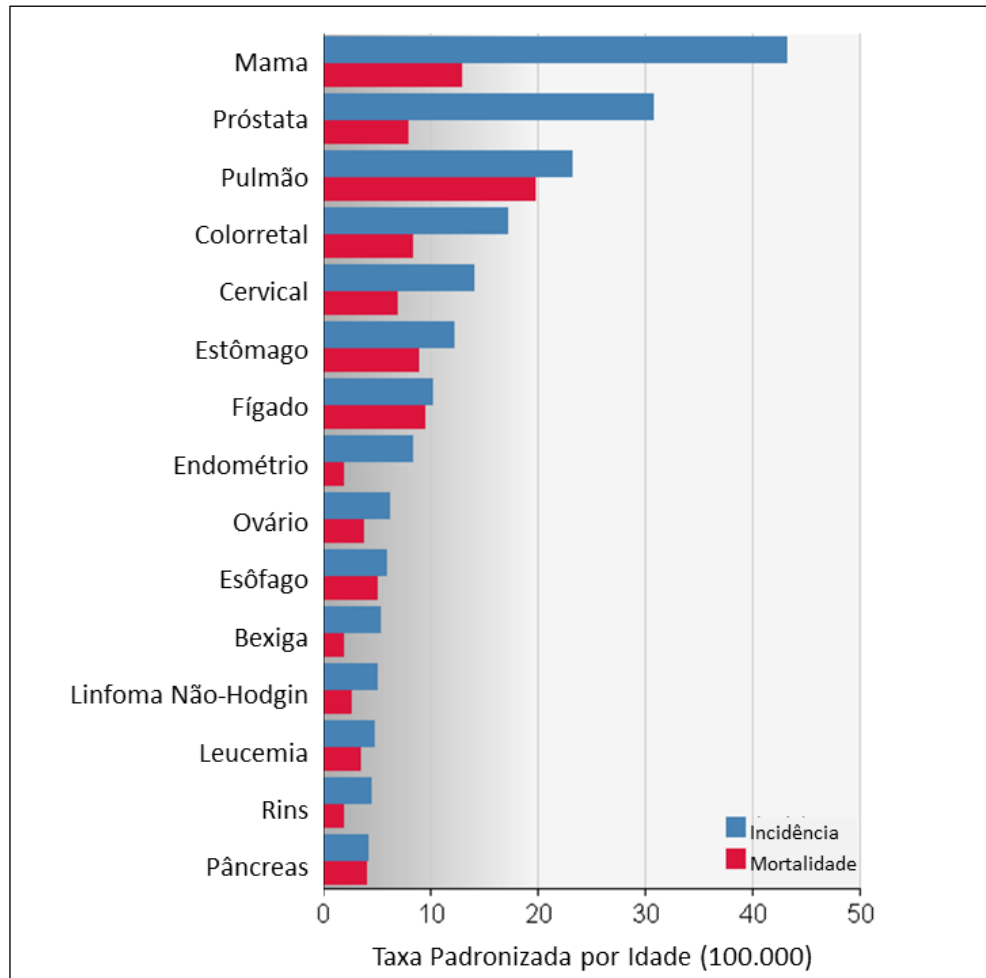


Figura 1: Incidência e mortalidade dos principais tipos de câncer registrados no mundo em 2012 em ambos os sexos. Os dados são padronizados por idade e correspondentes a 100.000 pessoas. Fonte: adaptado de Internacional Agency For Reseach On Cancer e World Health Organization (2012a).

Apesar dos números mundiais alarmantes, o câncer de fígado no Brasil foi responsável por aproximadamente 4,5% das 225 mil mortes por câncer em 2012 (INTERNACIONAL AGENCY FOR RESEACH ON CANCER; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2012a). Segundo estimativas para o biênio 2018-2019, 420 mil casos novos de câncer serão detectados no Brasil em cada ano, sem considerar o câncer de pele não melanoma (cerca de 170 mil casos novos) (MINISTÉRIO DA SAÚDE; INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA, 2017).

O câncer de fígado ainda não é contabilizado nas estatísticas oficiais do Instituto Nacional de Câncer (INCA), no entanto, com tal previsão de aumento da incidência de novos casos de câncer no Brasil, podemos acreditar que a detecção desse tipo de neoplasia também irá aumentar. A Figura 2 apresenta a estimativa de novos casos de câncer de fígado em 2020 no Brasil.

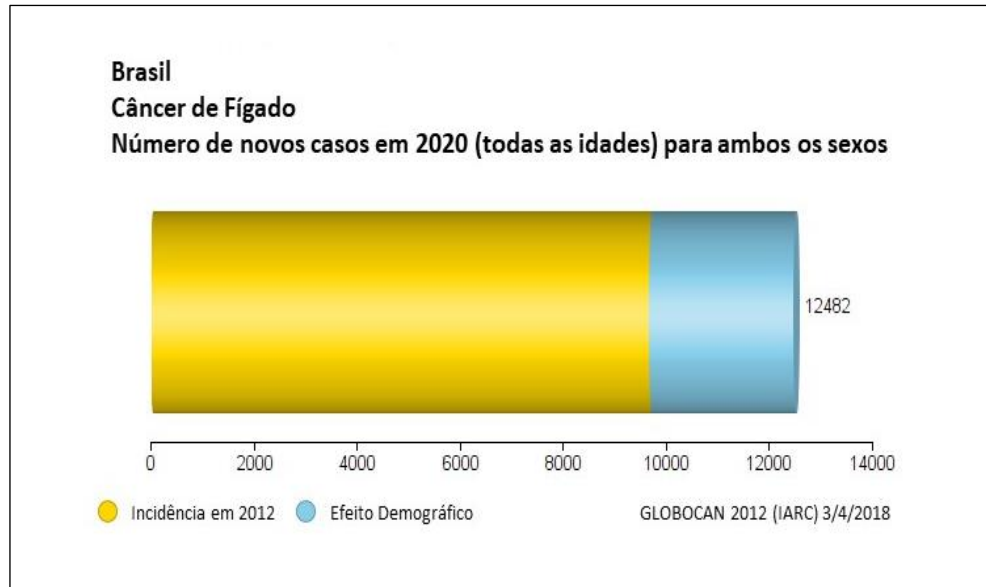


Figura 2: Estimativa de novos casos de câncer de fígado em 2020 para todas as idades no Brasil.
Fonte: adaptado de Internacional Agency For Reseach On Cancer e World Health Organization (2012b).

O carcinoma hepatocelular (CHC) é a mais importante complicação tardia de processos degenerativos crônicos do fígado derivados de uma hepatopatia primária (Figura 3) (EUROPEAN ASSOCIATION FOR THE STUDY OF THE LIVER; EUROPEAN ORGANISATION FOR RESEARCH AND TREATMENT OF CANCER, 2012; LLOVET et al., 2016). Considerado o tumor maligno primário mais frequente no fígado, corresponde a aproximadamente 90% dos casos e compreende a grande maioria dos dados epidemiológicos coletados (EUROPEAN ASSOCIATION FOR THE STUDY OF THE LIVER; EUROPEAN ORGANISATION FOR RESEARCH AND TREATMENT OF CANCER, 2012; TORRE et al., 2015). Outros tipos de tumor são classificados como colangiocarcinomas, angiossarcomas ou hepatoblastomas.



Figura 3: Carcinoma hepatocelular (seta branca) localizado em fígado cirrótico. Fonte: foto cedida gentilmente pelo Dr. José Huygens P. Garcia, FAMED/UFC.

Os fatores de risco para o desenvolvimento de CHC estão bem definidos na literatura atual e entre eles, a cirrose desempenha um importante papel, juntamente com a infecção pelo vírus da hepatite B (VHB) e pelo vírus da hepatite C (VHC) (BRUIX et al., 2006; EUROPEAN ASSOCIATION FOR THE STUDY OF THE LIVER; EUROPEAN ORGANISATION FOR RESEARCH AND TREATMENT OF CANCER, 2012; LLOVET et al., 2016). Dentre a totalidade de casos de câncer relacionados à infecções, majoritariamente câncer de fígado, o VHB e o VHC compreendem cerca de 32% dos registros em países subdesenvolvidos e 19% em países desenvolvidos (DE MARTEL et al., 2012; TORRE et al., 2015). Atualmente, a progressão ao CHC em casos de infecção pelo VHC é considerada mais agressiva pois, ao contrário do VHB cujo mecanismo corresponde à transmissão de DNA viral já genotipado, o VHC promove modificações pós-transcricionais pela ação de seu RNA viral de alta capacidade mutagênica e consequente habilidade de escape à resposta imunológica do hospedeiro (LOPES; SCHINONI, 2011; SARVARI et al., 2013; STRAUSS, 2001).

Medidas de saúde pública, como vacinação contra o VHB e práticas médico-sanitárias, podem auxiliar na redução da incidência de CHC. Embora não haja vacina contra o VHC disponível, a triagem de materiais biológicos e controle em exames pré-operatórios representam medidas preventivas contra a infecção, e no caso de

indivíduos já acometidos em fase aguda, terapias antivirais podem prevenir a progressão ao estágio de inflamação crônica e futuras complicações (TORRE et al., 2015). Outras estratégias envolvem a redução do uso abusivo de bebidas alcoólicas e o controle de síndromes metabólicas, como diabetes, uma vez que estes fatores de risco também contribuem de forma relevante para o desenvolvimento da doença (EUROPEAN ASSOCIATION FOR THE STUDY OF THE LIVER; EUROPEAN ORGANISATION FOR RESEARCH AND TREATMENT OF CANCER, 2012; LLOVET et al., 2016).

5.2. PROCESSOS MOLECULARES ENVOLVIDOS NO CÂNCER

O desenvolvimento e a progressão do câncer dependem do potencial de malignidade celular e do microambiente tumoral (AHMAD et al., 2002; HANAHAN; WEINBERG, 2011; LIOTTA; KOHN, 2001; PALUCKA; COUSSENS, 2016). Hanahan e Weiberg (2000) sugeriram que o desenvolvimento maligno é ditado por seis principais alterações fisiológicas adquiridas pelas células cancerígenas na evasão bem sucedida de mecanismos de defesa antitumorais, são elas: (i) auto-suficiência em sinais de crescimento; (ii) insensibilidade a sinais de inibição de crescimento; (iii) evasão da apoptose; (iv) potencial de replicação ilimitado; (v) angiogênese sustentada; (vi) capacidade de invadir tecidos e criar metástases (Figura 4).

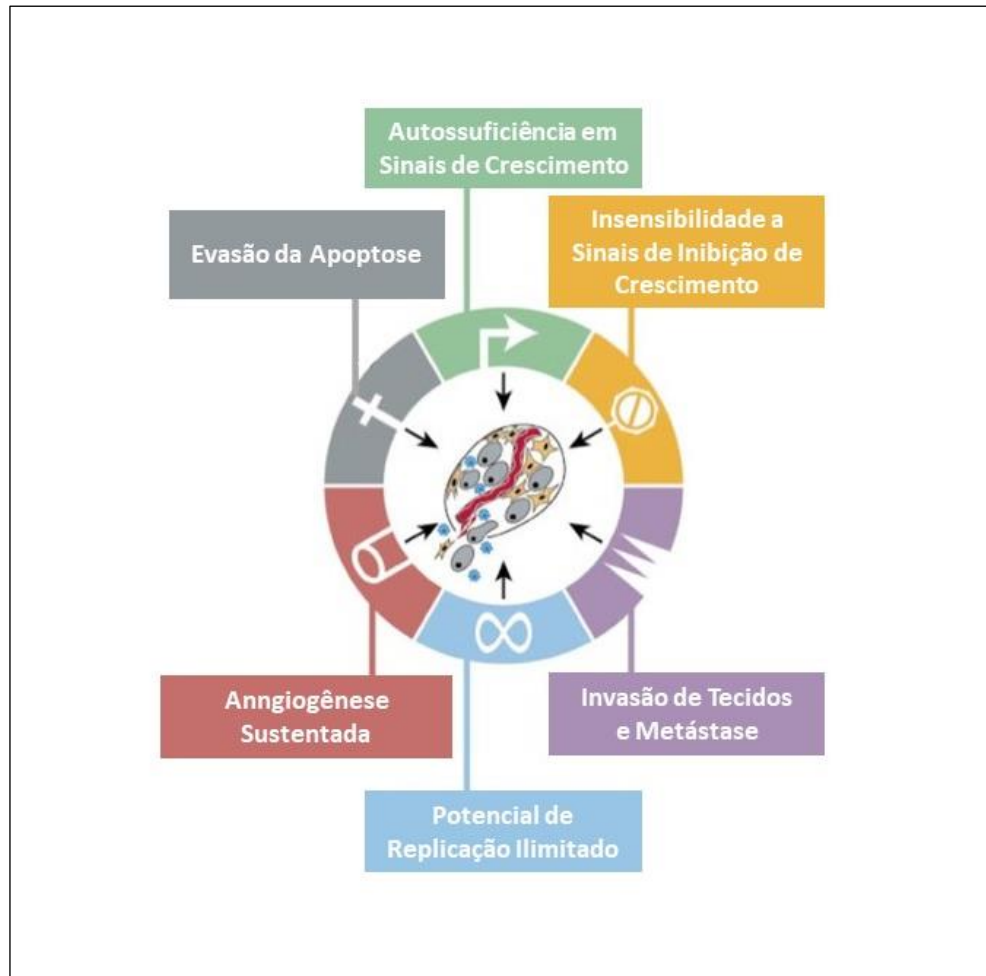


Figura 4: Capacidades adquiridas pelas células tumorais durante a carcinogênese. Fonte: adaptado de Hanahan e Weinberg (2000).

Em células não cancerígenas (i), a síntese e secreção de fatores de crescimento exercem controle externo sobre o ciclo celular de células vizinhas, desencadeando a proliferação de células antes em estado quiescente. Em células tumorais, oncogenes (proto-oncogenes que sofreram mutações ou aumento de expressão gênica) frequentemente atuam reduzindo a dependência de estímulos do microambiente a partir da mimetização de moléculas e componentes necessários à proliferação celular. Mesmo após o estabelecimento de autonomia na produção de sinais de crescimento (DI FIORE et al., 1987; GIANCOTTI; RUOSLAHTI, 1999), (ii) sinais inibitórios podem bloquear a proliferação por meio da indução do retorno ao estado quiescente ou da diferenciação irreversível em estado pós-mitose. Para evadir desses mecanismos, células tumorais modificam a cascata de sinalização de genes supressores de tumor, como o retinoblastoma (FYNAN; REISS, 1993; WEINBERG, 1995).

O potencial de inativar genes supressores (iii) de tumor proporciona ainda uma característica presente em quase todos os tipos de câncer, a evasão da morte celular programada. A perda de função do gene supressor de tumor p53 atribui às células refúgio de mecanismos sensoriais e/ou executores da apoptose (HARRIS, 1996; SYMONDS et al., 1994). Estas três habilidades adquiridas garantem o desarranjo entre a capacidade proliferativa e os sinais internos ou externos às células, no entanto, (iv) para garantir o potencial replicativo ilimitado, as células devem ainda contornar a senescência, processo atribuído à atividade regular dos genes já citados, como retinoblastoma e p53 (HAYFLICK, 1997).

Induzir a formação de vasos (v) para nutrição e oxigenação das células neoplásicas, bem como favorecer a retirada de metabólitos secundários provenientes do alto metabolismo do nicho neoplásico, são fatores essenciais para a sobrevivência do tumor durante a replicação acentuada (BOUCK; STELLMACH; HSU, 1996; HANAHAN; FOLKMAN, 1996). (vi) A última habilidade adquirida, a invasão tecidual e metástase, é responsável por cerca de 90% das mortes por câncer e compreende mecanismos intercelulares heterotípicos dependes principalmente da interação com o tecido vizinho, característica posteriormente inserida como sétima aquisição molecular por Mantovani (2009). Estas 6 características adquiridas, de acordo com os autores, são essenciais e comuns às transformações e progressões neoplásicas (HANAHAN; WEINBERG, 2000). A reprogramação do metabolismo energético celular e a evasão do ataque de células do sistema imune foram posteriormente reconhecidas pelos autores como alterações fisiológicas igualmente adquiridas pelas células tumorais durante a carcinogênese (HANAHAN; WEINBERG, 2011). Características como instabilidade genômica e inflamação foram destacadas pelos autores em virtude da capacidade de facilitar a aquisição das habilidades celulares associadas ao câncer.

Embora a modulação de propriedades físico-químicas de células não cancerígenas seja a base para o processo de malignização, a oncogênese depende ainda do estabelecimento de interações colaborativas com o microambiente tumoral (HANAHAN; COUSSENS, 2012; HANAHAN; WEINBERG, 2011). Por meio da secreção de fatores de crescimento e de citocinas, as células tumorais recrutam células acessórias – definidas como células do sistema imune de linhagem mielóide e linfóide; células da vasculatura linfática e hematogênea; e células mesenquimais específicas do tecido – que interagem com a matriz extracelular (fonte de fatores necessários à motilidade, crescimento, sobrevivência e angiogênese) e assim

fornece suporte à carcinogênese (Figura 5) (HANAHAN; COUSSENS, 2012; LAI et al., 2011).

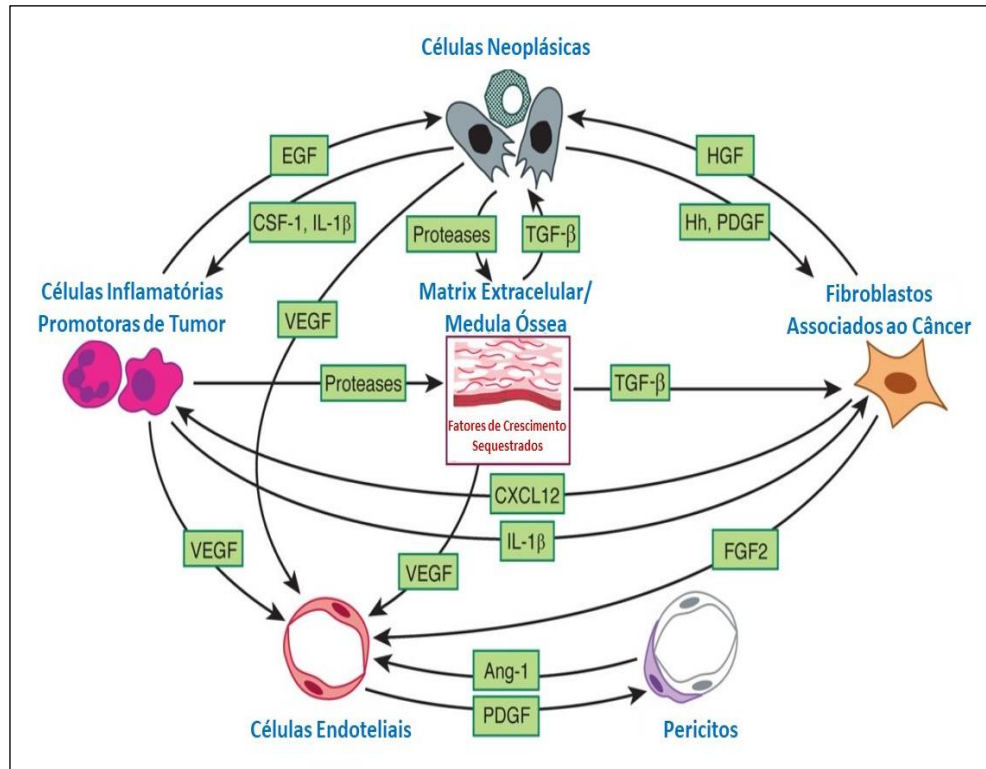


Figura 5: Interações estabelecidas entre células neoplásicas e microambiente tumoral durante a progressão maligna. Principais tipos celulares envolvidos na sinalização heterotípica recíproca observada entre células tumorais e seu microambiente. Fonte: adaptado de Hanahan e Weinberg (2011).

Além disso, para suprir a exigência metabólica durante a proliferação e divisão celular acentuadas, células tumorais apresentam alterações típicas como o aumento da síntese de intermediários para produção de proteínas, lipídeos, ácidos nucleicos e o uso da conversão de glicose em lactato como principal fonte energética mesmo na presença abundante de oxigênio (glicólise aeróbica), denominado efeito de Warburg (BAENKE et al., 2013; WARBURG, 1925). Essas alterações dependem diretamente da sinalização de fatores de crescimento para aumento do fluxo de nutrientes – especialmente glicose e glutamina – por glicólise e metabolismo mitocondrial (WARD; THOMPSON, 2012).

5.2. CLASSIFICAÇÃO MOLECULAR DO CARCINOMA HEPATOCELULAR

Historicamente, o diagnóstico do CHC ocorre de forma tardia, quando a doença já se encontra em estágio avançado, com perda de funcionalidade do órgão, culminando em limitação das opções de tratamento e da expectativa de vida (BRUIX; SHERMAN, 2005). Atualmente, a biópsia e o diagnóstico por imagem, preconizados pelos Critérios de Barcelona, são os métodos mais confiáveis para detecção da doença (Quadro 1). No entanto, a biópsia hepática não é um procedimento recomendável para os pacientes com CHC, uma vez que possibilita metástase física do tumor. Os exames de imagem e os marcadores séricos utilizados, como a alfa-fetoproteína (AFP), des- γ -carboxiprotrombina e a fração L3 da AFP, não possuem sensibilidade suficiente para detectar o CHC em estágios iniciais.

| <i>Critério Citohistológico</i> | <i>Método de Detecção</i> |
|----------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <i>Critério Radiológico</i> | Duas técnicas de imageamento coincidentes ⁽¹⁾ - Lesão focal > 2 cm com hipervascularização arterial. |
| <i>Critério Combinado</i> | Uma técnica de imageamento associada aos níveis de AFP - Lesão focal > 2 cm com hipervascularização arterial; - AFP > 400ng/ml. |
| <i>Biópsia do Nódulo</i> | Pacientes não cirróticos e/ou tumores < 2 cm. |

Quadro 1: Critérios de Barcelona utilizados para o diagnóstico do CHC. ⁽¹⁾ São consideradas as técnicas de ultrassonografia, tomografia computadorizada espiral, ressonância nuclear magnética e angiografia. Fonte: adaptado de Bruix et al. (2001).

O prognóstico de pacientes com CHC apresenta taxa de apenas 18% de sobrevivência em cinco anos, em parte atribuída ao diagnóstico em estágios avançados da doença (PADHYA; MARRERO; SINGAL, 2013). Outros fatores envolvem o grau da doença hepática primária, os sistemas de classificação e estadiamento utilizados, e as opções de tratamento viáveis.

O sistema convencional de classificação por extensão anatômica TNM, da União Internacional Contra o Câncer (2004), não considera medidas clínicas de função hepática essenciais para a definição do tipo de tratamento a ser realizado. O

Quadro 2 apresenta os recursos terapêuticos recomendados pelas diretrizes da *European Association for the Study of the Liver (EASL)* e da *American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD)* para o tratamento do CHC.

| Categoria | Tratamento | Critério de Elegibilidade |
|---------------------------------|-----------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <i>Tratamento cirúrgico</i> | Ressecção | Pacientes com tumor único e função hepática bem preservada (bilirrubina normal com gradiente de pressão venosa hepática $\leq 10\text{mm Hg}$ ou contagem plaquetária $\geq 100.000/\text{mm}^3$) |
| | Transplante de fígado | Pacientes com tumor único $\leq 5\text{ cm}$ ou até 3 nódulos $\leq 3\text{ cm}$ (Critério de Milão ⁽¹⁾) que não são elegíveis para ressecção |
| <i>Tratamento locorregional</i> | Ablação | Radiofrequência ou injeção percutânea de etanol para pacientes tumor único $\leq 5\text{ cm}$ ou até 3 nódulos $\leq 3\text{ cm}$ que não são elegíveis para cirurgias ⁽²⁾ |
| | Quimioembolização | Pacientes com tumor multinodular assintomático sem invasão vascular ou acometimento extra hepático |
| <i>Tratamento sistêmico</i> | Sorafenib | Pacientes com função hepática bem preservada – Child–Pugh A ⁽³⁾ – com tumor sintomático avançado e/ou característica invasiva; ou progressão tumoral após terapias locorregionais |
| <i>Tratamento paliativo</i> | Suporte paliativo | Pacientes em estágios teminais devem receber tratamento para dor e suporte nutricional e psicológico |

Quadro 2: Diretrizes preconizadas pela EASL e AASLD para tratamento do CHC. ⁽¹⁾ Critério especial utilizado para inclusão de pacientes que apresentam tumores irresssecáveis em estágios considerados iniciais. ⁽²⁾ Pacientes que apresentam função hepática alterada e doenças associadas. ⁽³⁾ Índice baseado em cinco medidas clínicas – bilirrubina total, albumina sérica, tempo de protrombina, ascite e encefalopatia hepática – utilizada para classificar pacientes em 3 grupos (A, B e C) de predição de sobrevivência. Fonte: adaptado de Llovet et al. (2016).

Um dos últimos recursos curativos para o CHC é o transplante do órgão, cuja recorrência atinge 10% a 20% dos receptores, apesar do uso de critérios rígidos na seleção de candidatos (VIVARELLI; RISALITI, 2011). Uma vez que o sistema TNM é ainda insuficiente, principalmente por ser uma classificação fenotípica, para prever a recorrência do tumor após a cirurgia devido a heterogeneidade entre pacientes do

mesmo estágio da doença (DRAGANI, 2010), outros sistemas de classificação, como Okuda et al. (1985), CLIP (*Cancer of the Liver Italian Program*), CUPI (*Chinese University Prognostic Index*), Child-Pugh e MELD (*Model for End-stage Liver Disease*), foram desenvolvidos em complemento para avaliação mais apurada da severidade da insuficiência hepática e sobrevida dos pacientes com CHC (DONATO et al., 1997; KAMATH et al., 2001; OKUDA et al., 1985; PUGH et al., 1973).

No Brasil, os critérios de elegibilidade para o transplante de fígado em adultos e adolescentes maiores de 12 anos consideram no presente, além do diagnóstico por Critérios de Barcelona, os Critérios de Milão (MAZZAFERRO et al., 1996) e o índice MELD (Quadro 3). O modelo matemático MELD, cujo cálculo logarítmico é representado por

$$MELD = 0,957 \times \text{Log } e (\text{creatinina mg/dl}) + 0,378 \times \text{Log } e (\text{bilirrubina mg/dl}) \\ + 1,120 \times \text{Log } e (\text{INR}) + 0,643 \times 10,$$

determina o grau de disfunção hepática baseado nos valores de bilirrubina sérica, creatinina e índice internacional normalizado para o tempo de protrombina (INR) (FREEMAN et al., 2002; KAMATH et al., 2001). Segundo o preditor de mortalidade e avaliação prognóstica pré-operatória, quanto mais próximo à 40, menor a chance de sobrevivência do hepatopata em três meses (KAMATH et al., 2001).

Inicialmente o escore foi considerado inadequado para avaliação de pacientes com CHC devido ao maior potencial de progressão tumoral se comparado ao risco de morte atribuído à complicações relacionadas ao processo cirrótico, no entanto, a recomendação de pontuações prioritárias (MELD corrigido) proporcionou equilíbrio entre o risco de morte e o risco de progressão indicados pelo preditor (GUERRINI et al., 2018). Atualmente, o modelo tem sido utilizado para avaliar a urgência de transplante do órgão, uma vez que considera somente variáveis objetivas para a predição da sobrevida de pacientes portadores de hepatopatias (CLAUDIA et al., 2017; FREEMAN et al., 2002; GUERRINI et al., 2018; LLOVET et al., 2016; VÉGSŐ et al., 2012).

O índice de Child-Pugh é utilizado complementarmente na prática clínica para classificar os pacientes de acordo com a contraindicação para procedimentos cirúrgicos. Preconizado até 2009, considera as medidas clínicas bilirrubina total,

albumina sérica, tempo de protrombina, ascite e encefalopatia hepática (PUGH et al., 1973).

| Critérios | Parâmetro Preconizado |
|---------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <i>Critérios de Milão</i> | Paciente cirrótico com: - Tumor único ≤ 5 cm; - Até três nódulos ≤ 3 cm; - Ausência de trombose neoplásica do sistema porta; - Ausência de lesões extra-hepáticas. |
| <i>Gravidade clínica</i> | Lista de priorização ⁽¹⁾ : - MELD mínimo = 11; - Pontuação = (MELD x 1.000) + (0,33 x número de dias em lista de espera. |
| | Situações consideradas especiais: - MELD mínimo = 20. |
| | Para pacientes não transplantados em até 3 meses: - MELD corrigido = 24. |
| | Para pacientes não transplantados em até 6 meses: - MELD corrigido = 29. |

Quadro 3: Critérios de elegibilidade utilizados para o transplante hepático no tratamento do CHC no Brasil. ⁽¹⁾ Exceto em casos de urgência e necessidade de retransplante. Fonte: adaptado da Portaria MS-GM nº 2.600, de 21 de outubro de 2009.

Apesar dos avanços na elucidação da biopatologia do CHC, ainda não há o estabelecimento de uma classificação molecular específica. No entanto, a integração de biomarcadores discriminativos poderia auxiliar na sobrevivência dos pacientes e melhorar a estratificação prognóstica dos mesmos (KASEB et al., 2011). Ademais, em doenças complexas como o câncer é improvável que apenas um biomarcador seja suficiente para monitorar estágios patológicos. Um painel molecular passível de reprodução na prática clínica e não invasivo apresenta maior potencial em termos de sensibilidade e especificidade.

5.2. USO DA ABORDAGEM MULTIÔMICA NOS ESTUDOS DE PROSPECÇÃO DE BIOMARCADORES NO CARCINOMA HEPATOCELULAR

Um dos seguimentos de maior impacto na prática clínica oncológica é a descoberta de biomarcadores, onde a assinatura molecular ideal permitiria um exame não invasivo simples capaz de auxiliar nas decisões clínicas quanto ao risco de desenvolver a doença, diagnóstico precoce, estágio da doença e eficácia do tratamento (Quadro 4). Para o CHC, descobertas como esta poderiam contribuir de forma exponencial na detecção de estágios precoces, em complemento à dados clínicos, testes bioquímicos e/ou diagnóstico por imagem, considerando que este tumor primário é um dos mais agressivos do mundo, com uma razão de 0.93 entre incidência/mortalidade (LLOVET et al., 2016).

| Característica | Descrição |
|-------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <i>Precoce</i> | Deve ser visível antes das alterações histopatológicas e indicativo após danos ativos |
| <i>Específico</i> | Deve ser capaz de identificar verdadeiros negativos e correlacionar-se com a gravidade dos danos |
| <i>Sensível</i> | Deve ser capaz de identificar verdadeiros positivos e correlacionar-se com a gravidade dos danos |
| <i>Preditivo</i> | Deve ser capaz de estimar a ocorrência de danos |
| <i>Estável</i> | Deve ser analiticamente estável no tecido para que possa ser avaliado em diferentes momentos |
| <i>Translacional</i> | Deve ser capaz de auxiliar em decisões clínicas |
| <i>Robusto</i> | Deve ser rápido, simples, acurado e de baixo custo |
| <i>Associado a um mecanismo conhecido</i> | Deve correlacionar-se a ocorrência de eventos moleculares conhecidos |
| <i>Não invasivo</i> | Deve permitir o acesso por vias minimamente invasivas |

Quadro 4: Características de um biomarcador ideal. Fonte: adaptado de Institute Of Medicine (US) e Forum On Drug Discovery, Development and Translation (2008).

A plataforma “omics” compreende basicamente as áreas de genômica, transcriptômica, epigenômica, micrômica, proteômica e metabolômica, com o objetivo de caracterizar grupos de moléculas envolvidas em processos celulares em múltiplos níveis. O ganho da capacidade de detectar macromoléculas em análises biológicas pela técnica de espectrometria de massas (MS) ampliou o entendimento das mais diversas afecções, com destaque para o estudo do proteoma e metaboloma de fluidos

biológicos não invasivos, principalmente soro e plasma (FENN et al., 1989; NIE et al., 2016; PARKER; BORCHERS, 2014).

A MS é uma técnica instrumental capaz de identificar, quantificar e elucidar propriedades físico-químicas de compostos e moléculas a partir da conversão em íons em fase gasosa e separação de acordo com a razão massa/carga (m/z) do analito. Os espectrômetros de massas – basicamente constituídos por uma fonte de íons, um sistema de alto vácuo, um analisador de massas, um detector e um sistema de aquisição de dados (Figura 6) – geram gráficos (espectro de massas) em sinais da abundância *versus* razão m/z de cada íon. Dessa forma, a condição inicial para a aquisição dos dados por MS é a capacidade de converter as moléculas de interesse em íons em fase gasosa.

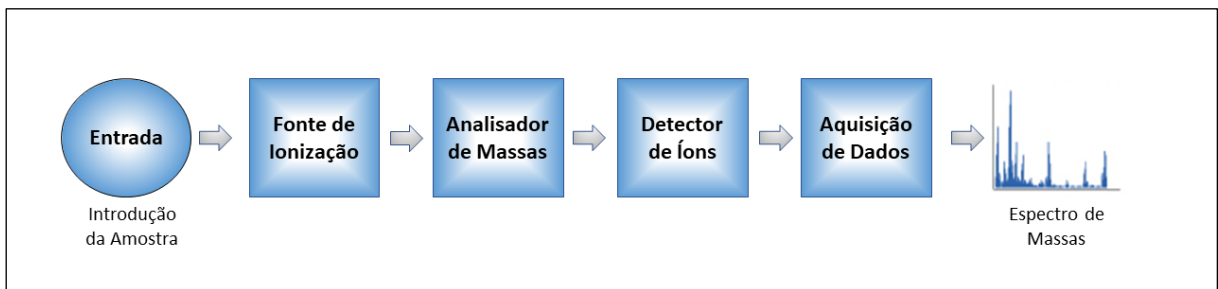


Figura 6: Principais componentes de um espectrômetro de massas. Fonte: adaptado de Premier Biosoft©.

A técnica revolucionou a compreensão da complexidade de peptídeos e proteínas, suas modificações e regulação, portanto, dado o importante papel dessas macromoléculas, a técnica tem sido amplamente aplicada no estudo de neoplasias para prospecção de biomarcadores proteicos (FENG; WANG; CHEN, 2010; GAO et al., 2017; SARVARI et al., 2014; TALEB et al., 2017). Wang et al. (2017) utilizaram LC-MS/MS para comparar o perfil global de proteínas expresso em tumores primários de CHC de diferentes tamanhos e tecido hepático adjacente não tumoral. Os autores foram capazes de identificar mais de 60 proteínas diferenciais em cada cenário e associaram 2 vias de sinalização (ERK1/2 e AKT) ao processo de carcinogênese em todos os subtipos. Lai et al. (2011), também aplicaram LC-MS/MS para descrever as alterações na regulação de proteínas associadas a matriz extracelular, importante constituinte do microambiente tumoral, durante a transição fibrose/esteatose – CHC.

Além disso, a MS é considerada uma tecnologia emergente em estudos metabolômicos, correlacionando-se aos avanços observados na identificação e

compreensão da estrutura e biossíntese de biomoléculas como glicanos e lipídeos. Serna et al. (2015) combinando HPLC-ELSD e MALDI-TOF/MS quantificaram cerca de 500 espécies de lipoproteínas e 157 espécies de lipídeos em plasma de voluntários cujos lipidogramas não apresentavam alterações, comprovando que a técnica de MS é uma importante ferramenta na identificação de assinaturas moleculares em amostras complexas. Li et al. (2017) utilizaram tanto UPLC-ESI-QTOF-MS quanto MALDI-FTICR-MS para avaliar tecido com CHC e tecido hepático adjacente ao tumor. Os achados demonstraram que quanto mais grave a doença, maior a concentração de cadeias saturadas de triacilglicerídeos (TAG), bem como revelaram alterações na regulação de fosfatidilcolina (PC), fosfatidiletanolamina (PE), fosfatidilinositol (PI), esfingomiéline (SM) e ceramida (Cer).

Atualmente, a avaliação laboratorial de fluidos biológicos para diagnóstico do CHC utiliza ensaios imunoenzimáticos passíveis de resultados falsos positivos ou negativos na presença de possíveis interferentes como o descrito por Zhu et al. (2014). Métodos baseados em espectrometria de massas (MS) para detecção direta de biomarcadores podem superar essas ambiguidades e enriquecer a compreensão e assinatura molecular de doenças complexas como o câncer (KIMHOFER et al., 2015; NIE et al., 2016).

Recentemente, a MS foi também utilizada em tempo real para detecção de tumores como uma alternativa ao diagnóstico histológico. Em geral, o equipamento padrão e a preparação de amostras, essenciais para aquisição de dados por MS, são muito elaborados e dispendiosos para uso clínico. Desde que a espectrometria de massas por ionização evaporativa rápida (REIMS) foi aplicada a um instrumento cirúrgico (iKnife) para reconhecimento e diferenciação do perfil lipídico de tecido mamário não patológico e tumoral, outras adaptações à sala de operação também simplificaram a estrutura física e reduziram a necessidade de especialistas, fornecendo suporte ao propósito clínico (BALOG et al., 2013; ST JOHN et al., 2017). A análise de lipídeos e metabólitos a partir de MS, por sua vez, já foi implementada não apenas na prática clínica, mas também no centro cirúrgico por meio da tecnologia MasSpec Pen (EBERLIN et al., 2012; ST JOHN et al., 2017; ZHANG et al., 2016, 2017).

Dentre as estratégias para prospecção de biomarcadores (Figura 7), a MS destaca-se pelo potencial multidisciplinar e compatibilidade a multiplataformas, uma vez que permitem a avaliação dos dados adquiridos de forma individual, em um nível

de informação somente, ou em conjunto, como em análise multiômicas, numa abordagem próxima a de Biologia de Sistemas. A verificação de biomarcadores em um único nível gênico tem sido substituída por análises multiparamétricas de genes, proteínas e metabólitos para abranger diferentes vias e níveis celulares, bem como atingir maior especificidade (NIE et al., 2016; RESSOM et al., 2016). Assim sendo, a análise por MS é uma estratégia atraente para estudos multiômicos e extensão futura na prática clínica.

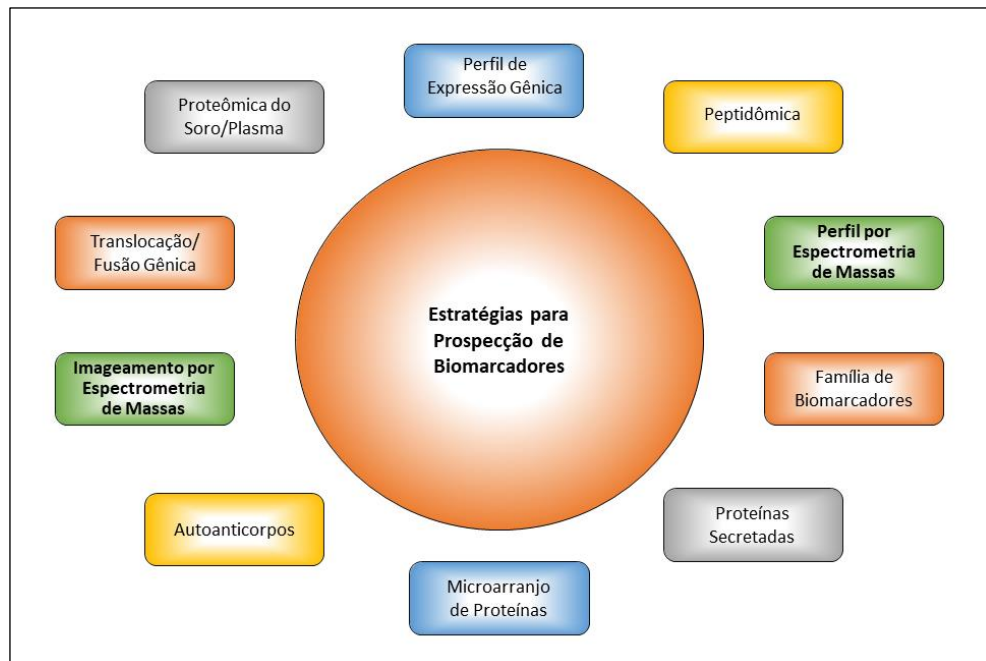


Figura 7: Estratégias para prospecção de biomarcadores por meio de tecnologias emergentes. A espectrometria de massas destaca-se como uma técnica abrangente e adequada à plataforma "omics". Fonte: adaptado de Kulasingam e Diamandis (2008).

2. OBJETIVOS

5.2. OBJETIVO GERAL

- ✓ Caracterizar o perfil de proteínas e lipídeos em plasma de pacientes com CHC por espectrometria de massas, correlacionando-os com dados clínicos dos pacientes para o estabelecimento de potenciais biomarcadores moleculares.

5.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Caracterizar diferentes classes de proteínas e lipídeos presentes em amostras de pacientes patológicos (CHC) e não patológicos (doadores), na busca de possíveis marcadores de diferenciação de fenótipos patológicos;
- ✓ Correlacionar diferentes técnicas e métodos utilizados na espectrometria de massas na busca de possíveis biomarcadores em biopsias líquidas, não invasivas;
- ✓ Correlacionar os achados deste estudo com àqueles descritos na literatura internacional.

3. JUSTIFICATIVA

Um dos obstáculos proeminentes no CHC é o diagnóstico tardio, quando o processo neoplásico apresenta-se em estágios avançados. A baixa acurácia de métodos laboratoriais e radiológicos, bem como a característica invasiva do exame histopatológico, preconizados pelos critérios de diagnóstico para o CHC, contribuem para o mau prognóstico dos pacientes.

Atualmente, os recursos utilizados no tratamento do CHC avançado são o transplante de fígado e a quimioterapia. A quimioterapia apresenta pouco sucesso devido à resistência do órgão à maioria das drogas, exibindo uma única droga ativa (Sorafenib) capaz de aumentar o tempo médio de sobrevivência e progressão radiológica em somente 3 meses (LLOVET et al., 2008; PADHYA; MARRERO; SINGAL, 2013). Dessa forma, em estágios avançados da doença, o transplante de fígado torna-se a única opção curativa para àqueles que se encaixam nos critérios, havendo taxa de 10% a 20% de recorrência do tumor após a intervenção cirúrgica (VIVARELLI; RISALITI, 2011). Por conseguinte, observa-se urgência na caracterização molecular da doença para prognóstico e monitoramento de estágios patológicos, diagnóstico precoce e busca por novos sítios de tratamento primário ou adjuntivo.

A emergência de pesquisas com dados acerca da caracterização de macromoléculas em amostras patológicas e não patológicas pode não só tornar-se complementar na busca do entendimento sobre a patogênese molecular do CHC como possibilitar avaliação, isolada ou em conjunto, de possíveis marcadores de diagnóstico diferencialmente expressos e não invasivos capazes de auxiliar em decisões clínico-terapêuticas.

4. PACIENTES HEPATOPATAS TERMINAIS

Nesse grupo encontram-se pacientes que, por apresentarem alto grau de disfunção hepática, estratificados pelo valor de MELD e pela presença de CHC no fígado, foram submetidos ao transplante de fígado. Foram consideradas 9 (nove) amostras tanto para a análise proteômica (Capítulo 2) quanto para a análise lipidômica (Capítulo 3).

5.2. CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

Aplicou-se nesse estudo as mesmas diretrizes dispostas na Portaria MS-GM nº 2.600, de 21 de outubro de 2009, que regulamenta os critérios adotados pelo país no caso de pacientes hepatopatas terminais candidatos ao transplante de fígado. Destaca-se aqui, resumidamente, os principais condicionantes adotados para inclusão de pacientes no estudo:

- ✓ Pacientes que apresentarem tumor hepático irressecável;
- ✓ Pacientes que apresentarem até três nódulos (tumor primário) ≤ 3 cm ou tumor único ≤ 5 cm, sem comprometimento vascular e sem indicação de ressecção;
- ✓ Pacientes que não apresentarem co-morbidez (ex.: doenças metabólicas, diabetes, doenças cardíacas);
- ✓ Pacientes que não apresentarem metástase extra-hepática;
- ✓ Pacientes que obtenham MELD entre 12 e 24;
- ✓ Pacientes com inflamação crônica tecidual derivada da etiologia vírus da hepatite C (VHC);
- ✓ Pacientes na faixa etária de 50 a 65 anos, sem distinção de sexo.

5.2. CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

- ✓ Pacientes que no momento do procedimento cirúrgico apresentaram sangramento excessivo ou qualquer comprometimento fisiológico na coleta das amostras;
- ✓ Pacientes submetidos previamente a algum tratamento quimioterápico (ex.: pacientes quimioembolizados);
- ✓ Pacientes re-transplantados.

5. PACIENTES DOADORES (GRUPO CONTROLE)

Nesse grupo encontram-se pacientes doadores falecidos que não apresentavam comprometimento fisiológico do fígado, representando assim a situação não patológica do experimento. Estes pacientes foram diagnosticados com morte tronco-encefálica, porém, a partir da sustentação com aparelhos, permaneceram com suas funções fisiológicas ativas, de acordo com o preconizado pela Portaria MS-GM nº 2.600, de 21 de outubro de 2009. Para a análise proteômica (Capítulo 2) foram consideradas 7 (sete) amostras e para a análise lipidômica (Capítulo 3) 9 (nove) amostras.

5.1. CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

Além daqueles dispostos na Portaria, foram inclusos outros critérios para melhor atender as finalidades desta pesquisa:

- ✓ Pacientes que sofreram traumatismo craniano, apresentando perda de função cerebral irreversível, sem perda de função fisiológica;
- ✓ Pacientes que sofreram AVC apresentando perda de função cerebral irreversível, sem perda de função fisiológica;
- ✓ Pacientes que apresentaram bom estado geral fisiológico, mas principalmente aspecto macroscópico normal do fígado: textura homogênea e evidência satisfatória de perfusão sanguínea (avaliada por exame macroscópico pelo cirurgião responsável pela captação do órgão);
- ✓ Órgãos que apresentaram taxa de esteatose hepática de leve a moderada ($\leq 60\%$) segundo avaliação *in situ* por análise macroscópica pelo cirurgião responsável pela captação do órgão;
- ✓ Pacientes sem distinção de faixa etária ou sexo.

5.2. CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

- ✓ Pacientes que apresentarem perda de função cerebral irreversível, sem perda de função fisiológica, mas que não tenha sido derivada de traumatismo craniano ou AVC;
- ✓ Órgãos que não apresentarem aspecto macroscópico satisfatório: textura heterogênea e perfusão sanguínea insuficiente (avaliada por exame macroscópico pelo cirurgião responsável pela captação do órgão);
- ✓ Órgãos que apresentarem taxa de esteatose hepática severa ($\geq 60\%$) segundo avaliação *in situ* por análise macroscópica pelo cirurgião responsável pela captação do órgão.

6. POPULAÇÃO DE PESQUISA

As amostras utilizadas no presente trabalho derivam de um acervo de 19 amostras de plasma sanguíneo coletadas entre 2015 e 2016 no Centro de Transplante de Fígado do Hospital Universitário Walter Cantídeo (HUWC/UFC) em Fortaleza/Ceará. Destes, 10 (dez) correspondem à pacientes hepatopatas terminais (CHC) e 9 (nove) à pacientes doadores (não patológicos, grupo controle, CTRL). As amostras foram coletadas no momento imediatamente anterior à realização do transplante no ambulatório (momento conhecido como coleta bioquímica T0), centrifugadas na presença de EDTA para obtenção de plasma do sangue total e congeladas em *superfreezer* a -80°C até a realização dos procedimentos laboratoriais.

O projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Ceará – COMEPE (026/08) (ANEXO A), segundo os critérios preconizados pela norma vigente para pesquisa com seres humanos regulamentado na Resolução 196/96 do Ministério da Saúde.

6.1. DADOS CLÍNICOS

A Tabela 1 apresenta os dados clínicos dos pacientes com CHC avaliados no presente trabalho. Entre pacientes com disfunção hepática semelhante – escore MELD –, a alfa-fetoproteína (AFP), principal marcador sorológico para hepatopatas, apresentou não só variação discrepante (Figura 8) como, em alguns casos, valores considerados de referência (inferior a 7.0 ng/mL) para indivíduos não patológicos, evidenciando que a proteína não representa um método laboratorial preciso para diagnóstico das doenças de fígado. Ademais, as variações observadas no grau de diferenciação e volume total do tumor (Figura 9), se avaliadas conjuntamente, demonstram que a capacidade de expansão tumoral não está diretamente relacionada à agressividade do CHC e ao acometimento da função hepática. Por conseguinte, os dados clinicopatológicos aqui descritos ratificam a urgente necessidade do uso de caracterização molecular para monitoramento de estágios patológicos e prognóstico de futuras complicações.

Tabela 1: Dados clínicos dos pacientes com carcinoma hepatocelular submetidos ao transplante de fígado.

Características Gerais

| | | | | | | | | | | | |
|----------------------------------------|-----|-----|------|-----|------|------|-----|-----|-----|-----|-----|
| Sexo | M | M | M | M | M | M | M | M | F | M | M |
| Idade | 58 | 66 | 54 | 57 | 67 | 62 | 60 | 66 | 66 | 56 | 68 |
| Grupo Sanguíneo | AB | O | AB | O | O | O | A | O | O | O | A |
| Alfa-fetoproteína (ng/mL) | 846 | 2.5 | 10.9 | 122 | 25.2 | 5.16 | 2.7 | 113 | 8.2 | 3.2 | |
| Child⁽¹⁾ | A | A | C | B | B | A | B | A | B | B | |
| MELD | 22 | 19 | 16 | 19 | 17 | 17 | 17 | 12 | 12 | 19 | |
| Recidiva do CHC Pós-transplante | Não | Não | Não | Sim | Não | Não | Não | Não | Não | Não | Não |

Achados Histopatológicos nos Explantes

| | | | | | | | | | | |
|----------------------------------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Número de Nódulos Viáveis | 1 | 1 | 2 | 3 | 1 | 1 | 1 | 1 | 2 | 1 |
|----------------------------------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|

| | | | | | | | | | | |
|-----------------------------------------------|-----|-----|-----|------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Diâmetro do Maior Nódulo Viável (cm) | 2.5 | 3.5 | 3.5 | 7,5 (5% necrose) | 1.5 | 2.8 | 3.6 | 0.8 | 2 | 2.3 |
| Grau de Diferenciação ⁽²⁾ | MD | MD | MD | MD | MD | MD | PD | MD | MD | BD |
| Invasão Microvascular | Não | Não | Não | Não +Linfática | Não | Não | Não | Não | Não | Não |
| Nódulos Satélites | Não | Não | Sim | Não | Não | Não | Não | Não | Não | Não |
| Volume Total do Tumor (cm³) | 2.5 | 3.5 | 6 | 11.5 | 1.5 | 2.8 | 3.6 | 0.8 | 3 | 2.3 |

Fonte: Dados gentilmente cedidos pelo Centro de Transplante de Fígado do Hospital Universitário Walter Cantídeo (UFC).

⁽¹⁾ Índice utilizado para classificar pacientes em 3 grupos (A, B e C) de predição de sobrevivência, sendo C a condição patológica mais severa.

⁽²⁾ Grau de diferenciação do CHC: (MD) Moderadamente Diferenciado; (PD) Pouco Diferenciado; (BD) Bem Diferenciado.

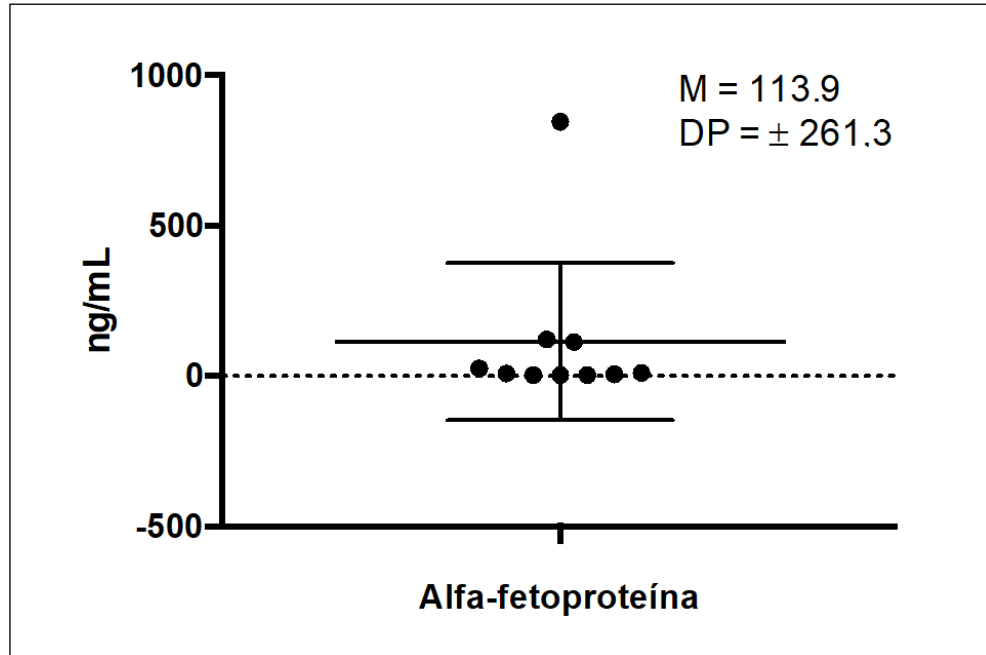


Figura 8: Média e desvio padrão para alfa-fetoproteína em plasma de pacientes com CHC submetidos ao transplante de fígado. A distribuição dos dados demonstra a variação do marcador sorológico em pacientes com disfunção hepática semelhante. Fonte: do autor (2018).

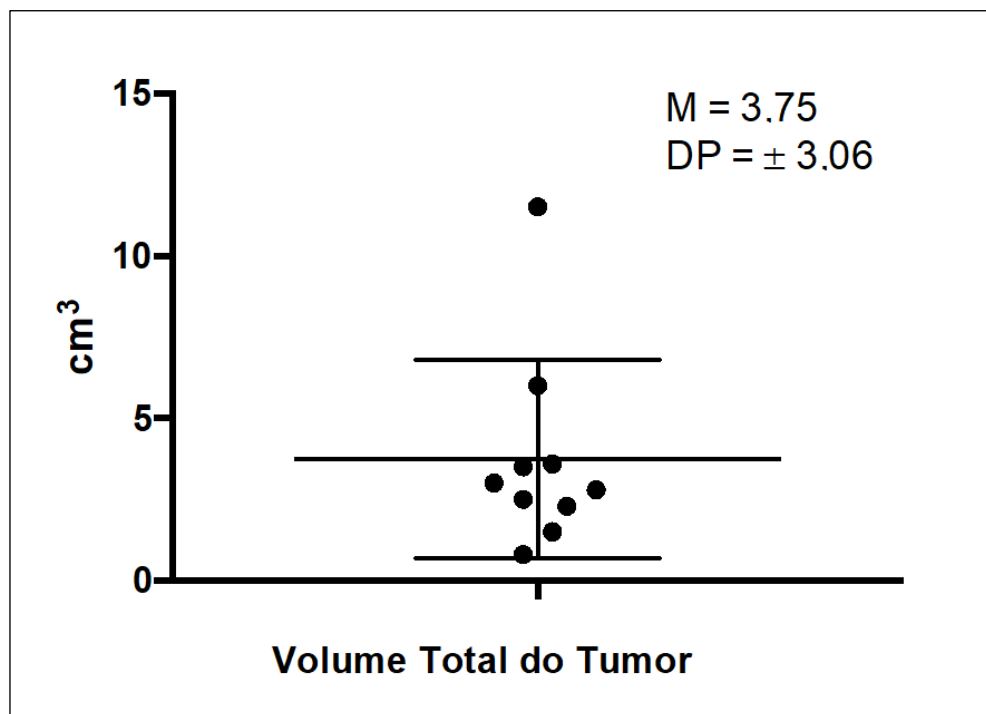


Figura 9: Média e desvio padrão para o volume total do tumor avaliado no explante de pacientes com CHC submetidos ao transplante de fígado. A distribuição dos dados demonstra a variação do volume do tumor em pacientes com disfunção hepática semelhante. Fonte: do autor (2018).

7. REFERÊNCIAS

AHMAD, S. A. et al. The role of the microenvironment and intercellular cross-talk in tumor angiogenesis. **Seminars in Cancer Biology**, v. 12, n. 2, p. 105–112, abr. 2002.

BAENKE, F. et al. Hooked on fat: the role of lipid synthesis in cancer metabolism and tumour development. **Disease Models & Mechanisms**, v. 6, n. 6, p. 1353–1363, 2013.

BALOG, J. et al. Intraoperative Tissue Identification Using Rapid Evaporative Ionization Mass Spectrometry. **Science Translational Medicine**, v. 5, n. 194, p. 194ra93-194ra93, 17 jul. 2013.

BOUCK, N.; STELLMACH, V.; HSU, S. C. How tumors become angiogenic. **Advances in Cancer Research**, v. 69, p. 135–74, 1996.

BRUIX, J. et al. Clinical Management of Hepatocellular Carcinoma. Conclusions of the Barcelona-2000 EASL Conference. **Journal of Hepatology**, v. 35, n. 3, p. 421–430, set. 2001.

BRUIX, J. et al. New aspects of diagnosis and therapy of hepatocellular carcinoma. **Oncogene**, v. 25, n. 27, p. 3848–3856, 26 jun. 2006.

BRUIX, J.; SHERMAN, M. Management of hepatocellular carcinoma. **Hepatology**, v. 42, n. 5, p. 1208–1236, nov. 2005.

CLAUDIA, A. et al. Impacto Do Escore Meld Na Alocação De Fígado E Nos Resultados Dos Transplantes Hepáticos: Uma Revisão Integrativa. **ABCD Arquivos Brasileiros de Cirurgia e Diagnóstico**, v. 30, n. 1, p. 65–68, 2017.

DE MARTEL, C. et al. Global burden of cancers attributable to infections in 2008: a review and synthetic analysis. **The Lancet Oncology**, v. 13, n. 6, p. 607–615, 19 jun. 2012.

DI FIORE, P. P. et al. erbB-2 is a potent oncogene when overexpressed in NIH/3T3 cells. **Science**, v. 237, n. 4811, p. 178–82, 10 jul. 1987.

DONATO, F. et al. Hepatitis B and C virus infection, alcohol drinking, and hepatocellular carcinoma: A case-control study in Italy. **Hepatology**, v. 26, n. 3, p. 579–584, set. 1997.

DRAGANI, T. A. Risk of HCC: Genetic heterogeneity and complex genetics. **Journal of Hepatology**, v. 52, n. 2, p. 252–257, fev. 2010.

EBERLIN, L. S. et al. Classifying Human Brain Tumors by Lipid Imaging with Mass Spectrometry. **Cancer Research**, v. 72, n. 3, p. 645–654, 1 fev. 2012.

EUROPEAN ASSOCIATION FOR THE STUDY OF THE LIVER; EUROPEAN ORGANISATION FOR RESEARCH AND TREATMENT OF CANCER. EASL-EORTC clinical practice guidelines: management of hepatocellular carcinoma. **Journal of**

Hepatology, v. 56, n. 4, p. 908–943, abr. 2012.

FENG, H.; WANG, M.; CHEN, W. N. iTRAQ-Coupled 2D LC–MS/MS Analysis of Secreted Proteome of HBV-Replicating HepG2 Cells: Potential in Biomarkers for Prognosis of HCC. **Current Microbiology**, v. 61, n. 4, p. 280–284, 18 out. 2010.

FENN, J. et al. Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. **Science**, v. 246, n. 4926, p. 64–71, 6 out. 1989.

FERLAY, J. et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. **International Journal of Cancer**, v. 136, n. 5, p. E359-386, 1 mar. 2015.

FREEMAN, R. B. et al. The new liver allocation system: moving toward evidence-based transplantation policy. **Liver transplantation: Official Publication of the American Association for the Study of Liver Diseases and the International Liver Transplantation Society**, v. 8, n. 9, p. 851–8, set. 2002.

FYNAN, T. M.; REISS, M. Resistance to inhibition of cell growth by transforming growth factor-beta and its role in oncogenesis. **Critical Reviews in Oncogenesis**, v. 4, n. 5, p. 493–540, 1993.

GAO, Y. et al. Quantitative proteomics by SWATH-MS reveals sophisticated metabolic reprogramming in hepatocellular carcinoma tissues. **Scientific reports**, v. 7, p. 45913, 5 abr. 2017.

GIANCOTTI, F. G.; RUOSLAHTI, E. Integrin signaling. **Science**, v. 285, n. 5430, p. 1028–32, 13 ago. 1999.

GUERRINI, G. P. et al. Value of HCC-MELD Score in Patients With Hepatocellular Carcinoma Undergoing Liver Transplantation. **Progress in Transplantation**, v. 28, n. 1, p. 63–69, 18 mar. 2018.

HANAHAHAN, D.; COUSSENS, L. M. Accessories to the Crime: Functions of Cells Recruited to the Tumor Microenvironment. **Cancer Cell**, v. 21, n. 3, p. 309–322, 20 mar. 2012.

HANAHAHAN, D.; FOLKMAN, J. Patterns and Emerging Mechanisms of the Angiogenic Switch during Tumorigenesis. **Cell**, v. 86, n. 3, p. 353–364, 9 ago. 1996.

HANAHAHAN, D.; WEINBERG, R. A. The Hallmarks of Cancer. **Cell**, v. 100, n. 1, p. 57–70, 7 jan. 2000.

HANAHAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646–674, 2011.

HARRIS, C. C. p53 tumor suppressor gene: from the basic research laboratory to the clinic--an abridged historical perspective. **Carcinogenesis**, v. 17, n. 6, p. 1187–98, jun. 1996.

HAYFLICK, L. Mortality and immortality at the cellular level. A review. **Biochemistry. Biokhimiia**, v. 62, n. 11, p. 1180–90, nov. 1997.

INSTITUTE OF MEDICINE (US); FORUM ON DRUG DISCOVERY DEVELOPMENT AND TRANSLATION. Qualifying Biomarkers. In: **Emerging Safety Science: Workshop Summary**. Washington (DC): National Academies Press (US), 2008.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER; MINISTÉRIO DA SAÚDE. **TNM: Classificação de Tumores Malignos**. 6. ed. Rio de Janeiro: Instituto Nacional de Câncer, Ministério da Saúde, 2004.

INTERNACIONAL AGENCY FOR RESEACH ON CANCER; WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Globocan 2012: estimated cancer incidence, mortality and prevalence worldwide in 2012**. Disponível em: <http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_population.aspx>. Acesso em: 21 nov. 2017a.

INTERNACIONAL AGENCY FOR RESEACH ON CANCER; WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Globocan IARC: Online Analysis of Prediciton**. Disponível em: <http://globocan.iarc.fr/Pages/burden_sel.aspx>. Acesso em: 3 abr. 2018b.

KAMATH, P. S. et al. A model to predict survival in patients with end-stage liver disease. **Hepatology**, v. 33, n. 2, p. 464–70, fev. 2001.

KASEB, A. O. et al. Clinical and Prognostic Implications of Plasma Insulin-Like Growth Factor-1 and Vascular Endothelial Growth Factor in Patients With Hepatocellular Carcinoma. **Journal of Clinical Oncology**, v. 29, n. 29, p. 3892–3899, 2011.

KIMHOFER, T. et al. Proteomic and metabonomic biomarkers for hepatocellular carcinoma: A comprehensive review. **British Journal of Cancer**, v. 112, n. 7, p. 1141–1156, 2015.

KULASINGAM, V.; DIAMANDIS, E. P. Strategies for discovering novel cancer biomarkers through utilization of emerging technologies. **Nature Clinical Practice Oncology**, v. 5, n. 10, p. 588–599, 12 out. 2008.

LAI, K. K. Y. et al. Extracellular Matrix Dynamics in Hepatocarcinogenesis: a Comparative Proteomics Study of PDGFC Transgenic and Pten Null Mouse Models. **PLoS Genetics**, v. 7, n. 6, p. e1002147, 2011.

LI, Z. et al. Aberrant Lipid Metabolism in Hepatocellular Carcinoma Revealed by Liver Lipidomics. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 12, p. 2550, 28 nov. 2017.

LIOTTA, L. A.; KOHN, E. C. The microenvironment of the tumour–host interface. **Nature**, v. 411, n. 6835, p. 375–379, 17 maio 2001.

LLOVET, J. M. et al. Sorafenib in Advanced Hepatocellular Carcinoma. **New England Journal of Medicine**, v. 359, n. 4, p. 378–390, 24 jul. 2008.

LLOVET, J. M. et al. Hepatocellular carcinoma. **Nature reviews. Disease primers**, v. 2, p. 16018, 2016.

LOPES, T. G. S. L.; SCHINONI, M. I. Aspectos gerais da hepatite B. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, v. 10, n. 3, p. 337–344, 2011.

- MANTOVANI, A. Inflaming metastasis. **Nature**, v. 457, n. 7225, p. 36–37, 1 jan. 2009.
- MAZZAFERRO, V. et al. Liver Transplantation for the Treatment of Small Hepatocellular Carcinomas in Patients with Cirrhosis. **New England Journal of Medicine**, v. 334, n. 11, p. 693–700, 14 mar. 1996.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE; INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. **Estimativa 2018 - Incidência de Câncer no Brasil**. [s.l.: s.n.].
- NIE, W. et al. Advanced mass spectrometry-based multi-omics technologies for exploring the pathogenesis of hepatocellular carcinoma. **Mass Spectrometry Reviews**, v. 35, n. 3, p. 331–349, maio 2016.
- OKUDA, K. et al. Natural history of hepatocellular carcinoma and prognosis in relation to treatment. Study of 850 patients. **Cancer**, v. 56, n. 4, p. 918–28, 15 ago. 1985.
- PADHYA, K. T.; MARRERO, J. A.; SINGAL, A. G. Recent advances in the treatment of hepatocellular carcinoma. **Current Opinion in Gastroenterology**, v. 29, n. 3, p. 285–292, maio 2013.
- PALUCKA, A. K.; COUSSENS, L. M. The Basis of Oncoimmunology. **Cell**, v. 164, n. 6, p. 1233–1247, 2016.
- PARKER, C. E.; BORCHERS, C. H. Mass spectrometry based biomarker discovery, verification, and validation - Quality assurance and control of protein biomarker assays. **Molecular Oncology**, v. 8, n. 4, p. 840–858, jun. 2014.
- PUGH, R. N. et al. Transection of the oesophagus for bleeding oesophageal varices. **The British Journal of Surgery**, v. 60, n. 8, p. 646–9, ago. 1973.
- RESSOM, H. W. et al. **Multi-omic Approaches for Characterization of Hepatocellular Carcinoma**. 38th Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society (EMBC). **Anais...IEEE**, ago. 2016Disponível em: <<http://ieeexplore.ieee.org/document/7591467/>>
- SARVARI, J. et al. Differentially Expressed Proteins in Chronic Active Hepatitis, Cirrhosis, and HCC Related to HCV Infection in Comparison With HBV Infection: A proteomics study. **Hepatitis Monthly**, v. 13, n. 7, p. e8351, 3 jul. 2013.
- SARVARI, J. et al. Comparative Proteomics of Sera From HCC Patients With Different Origins. **Hepatitis Monthly**, v. 14, n. 1, p. e13103, 2014.
- SERNA, J. et al. Quantitative lipidomic analysis of plasma and plasma lipoproteins using MALDI-TOF mass spectrometry. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 189, p. 7–18, 2015.
- ST JOHN, E. R. et al. Rapid evaporative ionisation mass spectrometry of electrosurgical vapours for the identification of breast pathology: towards an intelligent knife for breast cancer surgery. **Breast Cancer Research**, v. 19, n. 1, p. 59, 23 dez. 2017.
- STRAUSS, E. Hepatite C. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**,

v. 34, n. 1, p. 69–82, 2001.

SYMONDS, H. et al. p53-Dependent apoptosis suppresses tumor growth and progression in vivo. **Cell**, v. 78, n. 4, p. 703–711, 26 ago. 1994.

TALEB, R. S. Z. et al. Quantitative proteome analysis of plasma microparticles for the characterization of HCV-induced hepatic cirrhosis and hepatocellular carcinoma. **Proteomics - Clinical Applications**, p. 1700014, 10 jul. 2017.

TORRE, L. A. et al. Global Cancer Statistics, 2012. **CA: a Cancer Journal of Clinicians.**, v. 65, n. 2, p. 87–108, 2015.

VÉGSŐ, G. et al. Role of Organ Transplantation in the Treatment of Malignancies – Hepatocellular Carcinoma as the Most Common Tumour Treated with Transplantation. **Pathology & Oncology Research**, v. 18, n. 1, p. 1–10, 7 jan. 2012.

VIVARELLI, M.; RISALITI, A. Liver transplantation for hepatocellular carcinoma on cirrhosis: Strategies to avoid tumor recurrence. **World Journal of Gastroenterology**, v. 17, n. 43, p. 4741–4746, 21 nov. 2011.

WANG, Y. et al. Reveal the molecular signatures of hepatocellular carcinoma with different sizes by iTRAQ based quantitative proteomics. **Journal of Proteomics**, v. 150, p. 230–241, 6 jan. 2017.

WARBURG, O. The Metabolism of Carcinoma Cells. **The Journal of Cancer Research**, v. 9, n. 1, p. 148–163, 1 mar. 1925.

WARD, P. S.; THOMPSON, C. B. Metabolic Reprogramming: A Cancer Hallmark Even Warburg Did Not Anticipate. **Cancer Cell**, v. 21, n. 3, p. 297–308, 20 mar. 2012.

WEINBERG, R. A. The retinoblastoma protein and cell cycle control. **Cell**, v. 81, n. 3, p. 323–330, 5 maio 1995.

ZHANG, J. et al. Will Ambient Ionization Mass Spectrometry Become an Integral Technology in the Operating Room of the Future? **Clinical Chemistry**, v. 62, n. 9, p. 1172–1174, 1 set. 2016.

ZHANG, J. et al. Nondestructive tissue analysis for ex vivo and in vivo cancer diagnosis using a handheld mass spectrometry system. **Science Translational Medicine**, v. 9, n. 406, p. eaan3968, 6 set. 2017.

ZHU, X. et al. Rheumatoid Factor Interference of α -Fetoprotein Evaluations in Human Serum by ELISA. **Clinical Laboratory**, v. 60, n. 11, p. 1795–800, 2014.

CAPÍTULO 2

Análise Proteômica

*“ O começo de todas as ciências é o espanto de as coisas serem o que são.”
(Aristóteles)*

1. USO DA PROTEÔMICA NOS ESTUDOS DE PROSPECÇÃO DE BIOMARCADORES NO CARCINOMA HEPATOCELULAR

Embora o processo de carcinogênese tenha início frequentemente a partir de uma mutação genética que ativa um proto-oncogene, o estudo da genômica e transcriptômica do câncer representam os primeiros níveis do fluxo de informação do código genético cujas perturbações podem ou não gerar alteração do fenótipo expresso. As proteínas representam o produto final dos processos de transcrição e tradução, propiciando que a proteômica possa fornecer informações confiáveis sobre o impacto fenotípico das mutações genéticas.

Estados patológicos são frequentemente associados a modificação do proteoma, este definido como uma entidade dinâmica que abrange a totalidade de proteínas expressas em um dado cenário biológico considerando não só a identidade e quantidade, mas também a localização, estado de regulação, vias de interação, modificações, estrutura e funções (HEIN et al., 2013; SHENG et al., 2018). Muitos estudos diferenciam subtipos do CHC, no que tange tamanho do tumor e hepatopatia primária, comparando o padrão de expressão de proteínas em tecido ou sangue de pacientes hepatopatas e amostras não patológicas (SARVARI et al., 2014; WANG et al., 2017).

Indivíduos acometidos por condições inflamatórias crônicas possuem maior risco de desenvolver alguns tipos de câncer, entre eles o CHC (PALUCKA; COUSSENS, 2016; THUN; HENLEY; GANSLER, 2008). Durante a lesão aguda, o processo inflamatório promove a cicatrização de feridas e a regeneração tecidual a partir do recrutamento de tipos celulares específicos e liberação de mediadores inflamatórios que fornecem suporte a proliferação celular e a angiogênese, prejudicando respostas imunológicas como a apoptose (THUN; HENLEY; GANSLER, 2008). Palucka e Coussens (2016) consideram que o desenvolvimento e a progressão do câncer são significativamente afetados por respostas imunes antitumorais quando alteradas.

Efetores mobilizados durante as etapas de sinalização celular, como as proteínas sintetizadas pelas células cancerígenas ou seu microambiente, podem eventualmente atingir a circulação sanguínea e assim os padrões de expressão podem ser avaliados em fluidos ou tecidos biológicos (KULASINGAM; DIAMANDIS,

2008). Dessa forma, a proteômica não só contribui para a compreensão da patogênese do CHC, como possibilita avaliação, isolada ou em conjunto, de possíveis marcadores de diagnóstico diferencialmente expressos e não invasivos.

Awan et al. (2015), com o enriquecimento dos dados disponíveis em 7 bancos de dados públicos diferentes com anotações para proteínas e genes a partir de experimentos com microarranjos, imunohistoquímica e marcadores de seqüências expressas, identificaram 731 proteínas específicas expressas no fígado. Enriquecimento para proteínas secretadas, utilizando preditores computacionais e integração de estudos proteômicos do secretoma no câncer, e posterior comparação ao perfil de expressão em fígado e soro existentes em bancos de dados, revelaram 20 proteínas solúveis como potenciais biomarcadores para o CHC. Dentre elas vitronectina (LEE et al., 2014), angiogenina (HISAI et al., 2003), componente C4A do sistema complemento (KIM et al., 2013), haptoglobina (ANG et al., 2006), inibidor de inter-alfa-tripsina de cadeia pesada H4 (NOH et al., 2014) e glicoproteína rica em histidina (WANG et al., 2009) já haviam sido descritas em outros estudos de caracterização molecular do CHC. Finalmente, predições das interações proteína-proteína, incluindo biomarcadores como alfa-fetoproteína (AFP), e da influência de genes alvo de miRNAs especificamente desregulados no CHC sob a codificação das proteínas candidatas, permitiram a triagem de 7 proteínas – componente C8a do complemento, lectina de ligação à manose, antitrombina III, 11 β -hidroxiesteróide desidrogenase tipo 1, álcool desidrogenase 6, β -ureidopropionase e citocromo P450 2A6 – estatisticamente significativas e altamente correlacionadas à doença. O estudo demonstra o potencial da proteômica diferencial na comparação do nível, localização e modificação da expressão de proteínas associadas a patogênese em diversas amostras biológicas.

2. MÉTODOS

A análise proteômica das amostras foi realizada a partir de protocolos que permitem a avaliação do perfil global e abundância relativa de proteínas em cada grupo indicado no desenho experimental, bem como compreender futuramente as interações entre as vias metabólicas primária e secundária. O processo de análise é resumido no fluxograma a seguir (Figura 10).

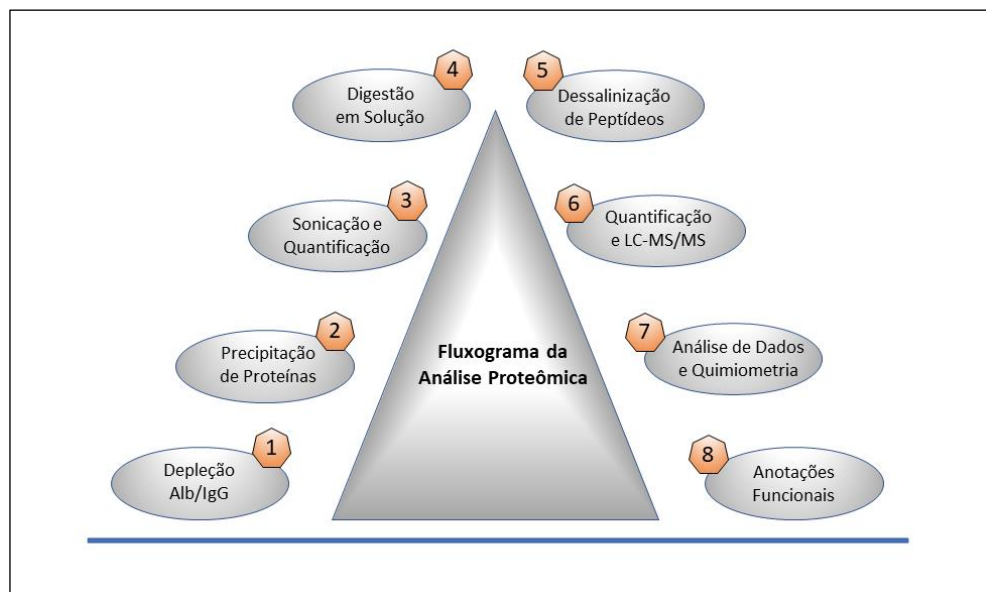


Figura 10: Fluxograma do método de análise proteômica. Resumo das principais etapas do processo de análise de proteínas em plasma de pacientes com CHC e pacientes controles. Fonte: do autor (2018).

2.1. PRINCÍPIO DA TÉCNICA LC-MS/MS

Na proteômica, a espectrometria de massas (MS) pode ser aplicada em abordagens *top-down*, quando proteínas intactas são avaliadas, ou *bottom-up*, quando proteínas são convertidas em peptídeos (SCHUBERT et al., 2017). A abordagem *bottom-up*, apesar de sensível e reprodutível mesmo em casos de proteomas complexos como o do soro/ plasma, fornece respostas baseadas em fragmentos de um todo, ocasionando desvantagens como a perda de informações quanto a modificações pós-traducionais, relação peptídeo-peptídeo ou variações na

sequência de aminoácidos (CATHERMAN; SKINNER; KELLEHER, 2014). Em contrapartida, a abordagem *top-down* permite 100% de cobertura da seqüência e caracterização completa de proteoformas, dirimindo as limitações anteriormente citadas (SMITH; KELLEHER, 2013). No entanto, em comparação à proteômica *bottom-up*, a análise de proteínas intactas é atualmente considerada inferior em termos de cobertura, sensibilidade e rendimento do proteoma devido à limitações técnico-instrumentais (CATHERMAN; SKINNER; KELLEHER, 2014). Por essa razão, no presente estudo foi adotado o método de identificação de proteínas baseado na fragmentação característica de peptídeos.

Tipicamente, o fluxo de trabalho na proteômica *bottom-up* inicia com a digestão trípica de uma amostra de conteúdo proteico complexo em peptídeos, que são separados por cromatografia líquida (LC), geralmente de acordo com a sua hidrofobicidade em fase reversa (XIE et al., 2011). A medida que são eluídos, os peptídeos são submetidos a ionização por *electrospray* (ESI) e atraídos para o espectrômetro, onde dois eventos de MS sequenciais (*tandem*) ditos MS¹ e MS² podem ocorrer: MS¹ para identificação da razão *m/z* dos íons peptídicos não fragmentados (precursores) e MS² para aferição da razão *m/z* dos íons fragmentados de peptídeos detectados e especificamente selecionados em MS¹ – no presente trabalho a fragmentação dos 15 precursores mais abundantes (*top 15*) – (AEBERSOLD; MANN, 2003; FENN et al., 1989). Cada peptídeo apresenta um padrão único de fragmentação, portanto, conjuntamente os dados permitem a identificação confiável dos peptídeos resultantes da fragmentação. A última etapa consiste em mapear as seqüências peptídicas identificadas para proteínas e correlacionar a intensidade dos sinais detectados pelo analisador com alterações relativas a abundância entre as amostras (SCHUBERT et al., 2017).

2.2. PREPARAÇÃO DE AMOSTRAS

A partir de uma alíquota não diluída de 100µL de plasma foi realizada a depleção de albumina (Alb) e imunoglobulina G (IgG), devido a abundância dessas proteínas no plasma. Em sistema FPLC (Amersham Biosciences ÄKTA Explorer 10), a coluna de afinidade pré-empacotada (Hitrap Collum GE) foi previamente lavada e

reequilibrada com tampão de ativação fosfato de sódio 20mM, NaCl 0.15M (pH 7.4). As amostras foram injetadas separadamente após centrifugação a 2500g e 4°C por 5 min. A fração de proteínas depletada foi eluída pelo tampão de ativação enquanto Alb e IgG permaneciam ligadas à resina. Posteriormente as proteínas abundantes foram eluídas em tampão de eluição Glicina-HCl 0.1M (pH 2.7).

Ao final das corridas, as frações eluídas foram estocadas a -80°C para futuras análises e as frações proteicas depletadas foram submetidas a precipitação *overnight* a -20°C com acetona 100% e NaCl em concentração final de 0.1M, conforme descrito por Crowell, Wall e Doucette (2013). As frações precipitadas foram ressuspensas em solução de TEAB 0.02M e submetidas à sonicação em Tip Sonicador Q125 (QSonica) com intensidade a 40% do potencial em 3 ciclos de 10 seg cada. Os concentrados proteicos foram quantificados utilizando o método de Qubit™.

2.3. QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS E PEPTÍDEOS

A quantificação da concentração de proteínas das amostras foi realizada a partir da detecção de fluorescência pela técnica de Qubit™ (Invitrogen). Primeiramente, preparou-se o reagente fluorescente a partir da junção entre soluções de fluoróforo e tampão na proporção de 1:200. Em seguida, alíquotas de 5ul de amostra diluídas em água Milli-Q® (1:3) foram adicionadas ao reagente para atingir volume final de 200µl. As misturas foram incubadas por 15 min cada, de forma sequencial, e então analisadas no equipamento portátil Qubit™.

Após a leitura de cada amostra, a concentração final foi obtida multiplicando o valor da leitura pelo fator de diluição escolhido. O protocolo do fabricante é apresentado na Figura 11.

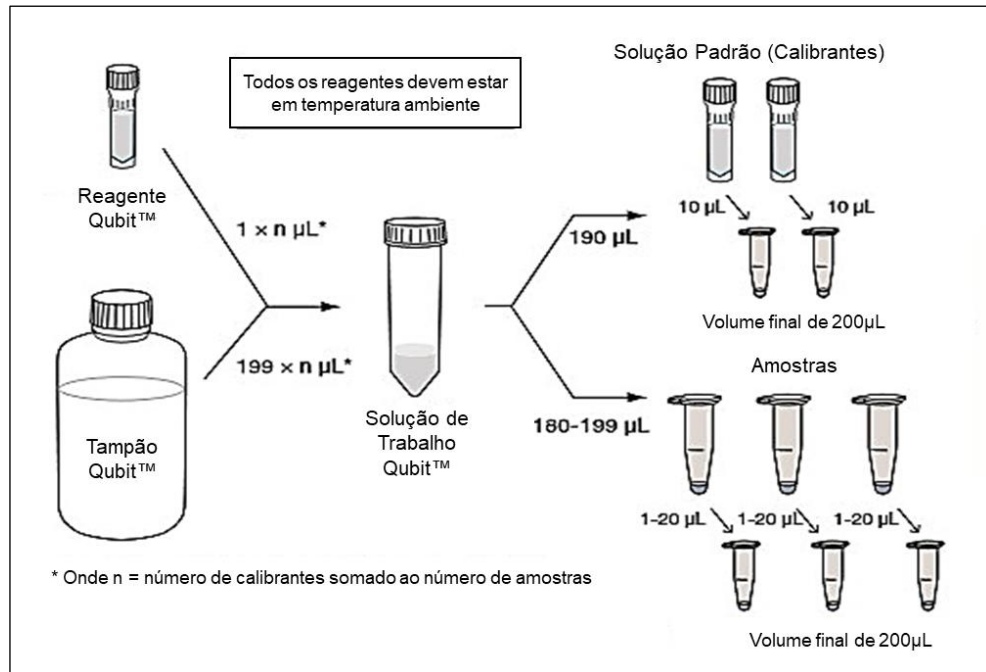


Figura 11: Quantificação por Qubit™. Instruções do fabricante acerca do procedimento para calibração e quantificação. Fonte: adaptado do fabricante (Invitrogen).

2.4. DIGESTÃO TRÍPTICA DE PROTEÍNAS EM SOLUÇÃO (CLÁSSICA)

Foram aliqüotadas $30 \mu\text{g}$ de proteína em tubos Eppendorf de baixa adsorção para proteínas e peptídeos (LoBind) para o processo de digestão. Liofilizados em concentrador rotatório *SpeedVac™* SC100 (Savant™), os extratos proteicos foram inicialmente ressuspensos em solução de TEAB 20mM, ureia 8M e DTT 50mM (pH 7,9) e incubados por 25 min a 55°C e 400rpm. Sob abrigo de luz e após resfriamento, foi adicionada solução de IAA suficiente para atingir concentração final de 14mM e incubou-se novamente por 40 min a 21°C e 400rpm. Posteriormente foi adicionada solução de DTT na concentração final de 5mM para parada da reação de alquilação.

As amostras foram então diluídas na razão 1:5 com solução de TEAB 20mM (pH 7,9), devido a intolerância da enzima tripsina a altas concentrações de ureia, já considerando a adição de solução de CaCl_2 suficiente para atingir concentração final de 1mM e a adição de tripsina (Promega) na razão 1:50. Em seguida, as amostras foram encubadas por 13 horas a 37°C e 300rpm, e após o período de digestão, foi adicionado TFA na concentração final de 1% para evitar clivagens inespecíficas e parar a reação. Os digestos proteicos foram dessalinizados imediatamente.

2.5. DESSALINIZAÇÃO DE PEPTÍDEOS

Os peptídios trípticos foram dessalinizados em microcolunas *home-made* de fase reversa. Construídas a partir de discos Empore™ SPE (Sigma-Aldrich, USA), com partículas C18 de característica hidrofóbica, as microcolunas permitem a purificação e enriquecimento dos peptídeos a partir da retirada de sal e subsequente eluição dos mesmos.

Para o preparo das microcolunas, construídas em ponteiras P200, foram realizadas sequências de centrifugação a 1000g por 3 min com 100µL de MeOH 100%, seguido de 100µL de solução de acetonitrila 80% (v/v) e ácido acético 0,5% (v/v), e por fim 100µL de solução de ácido acético 0,5% (v/v).

Finalmente, os digestos proteicos foram adicionados às colunas, centrifugados a 900g durante 4 min e dessalinizados duas vezes com 100µL de solução de ácido acético 0,5% (v/v) a 1000g por 3 min.

A eluição dos peptídeos foi realizada com concentrações crescentes de acetonitrila (25%, 50%, 80% e 100%), mantendo a concentração de ácido acético a 0,5% nas soluções, e centrifugações lentas de 600g durante 3 min. As frações, de 20µL (v/v) cada, foram coletas em tubos Eppendorf LoBind.

Os peptídeos eluídos foram liofilizados em concentrador rotatório *SpeedVac*™ SC100 (Savant™) e armazenados a -80°C até a quantificação, também realizada segundo a plataforma Qubit™.

2.6. ANÁLISE LABEL-FREE POR LC-MS/MS

As amostras foram analisadas por um sistema Nano-UHPLC Dionex Ultimate 3000 para fase reversa (Thermo Fisher Scientific) acoplado a um espectrômetro de massas LTQ-Orbitrap Elite (Thermo Fisher Scientific). Da fração de proteínas depletadas e extraídas de 100µl de plasma, 4µg de peptídeos foram injetados em pré-coluna *home-made* (100µm de diâmetro interno x 4cm de comprimento) com

partículas esféricas de sílica revestidas por C18 ReprosilPur de 5 μ m e poros de 120Å (Dr. Maich GmbH) para remoção de resíduos de sais. O gradiente de eluição foi composto de 98% de fase A (ácido fórmico 0,1%) a 2% de fase B (ácido fórmico 0,1% em acetonitrila 100%) em fluxo de 3 μ L/min. Os peptídeos foram então fracionados em coluna analítica *home-made* (75 μ m de diâmetro interno x 20cm de comprimento) com partículas C18 ReprosilPur de 3 μ m e poros de 120Å (Dr. Maich GmbH). O gradiente de eluição (Figura 12) foi composto de 100% de fase A a 35% de fase B durante 180 min e 35% a 90% de fase B durante 20 min (total de 200 min a 0.230 μ L/min). Após cada corrida, a coluna foi reequilibrada com 100% de fase A por 25 min.

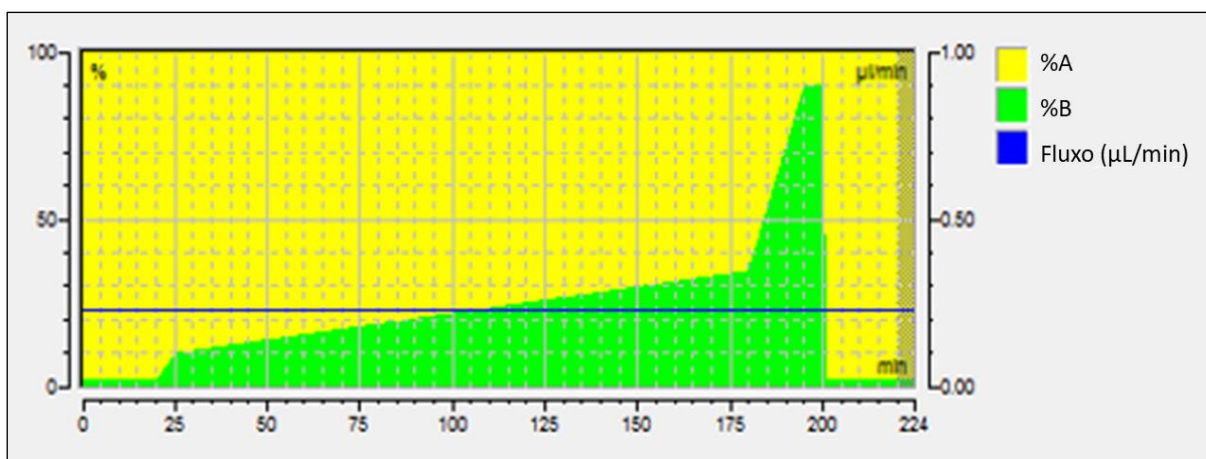


Figura 12: Gradiente de eluição dos peptídeos tripticos fracionados em sistema LC-MS/MS. Fonte: adaptado do *software* Xcalibur™ (Thermo Fisher Scientific).

Os espectros de massas foram adquiridos em modo positivo com aquisição de espectros de MS/MS dependente de dados (*Data Dependent Acquisition – DDA*). Em MS¹ foram obtidos espectros em alta resolução (120000 FWHM) entre 300 – 1650 *m/z*. Cada varredura foi seguida por MS² dos 15 íons mais intensos de carga > 2 em alta resolução (150000 FWHM) pelo método de dissociação induzida por colisão de alta energia (HCD). As sequências de íons selecionadas na faixa de erro de 10ppm foram excluídas dinamicamente por 90 seg e a janela de isolamento definida em precursores ≥ 2 *m/z*, energia de colisão normalizada a 35% e sinal mínimo requerido de 3000.

2.7. ANÁLISE DE DADOS E QUIMIOMETRIA

2.7.1. Progenesis QI

Os espectros foram processados pelo *software* Progenesis QI (<http://www.nonlinear.com/progenesis/qi>) (Nonlinear Dynamics©), onde primeiramente foram submetidos ao alinhamento do tempo de retenção cromatográfico e em seguida quantificados de acordo com a área de intensidade integrada dos picos recuperados do *extracted ion chromatogram* (XIC).

A aplicação dos filtros Anova ($p \leq 0.05$) e *Fold Change* (≥ 2) garantiram a triagem de dados estatisticamente significativos, no intervalo de confiança de 95%, e com variações relativas à abundância entre os cenários, respectivamente.

Peptídeos com máximo de 5 fragmentações foram aceitos para exportação e identificação na plataforma Peaks® Studio 7.0 (<http://www.bioinform.com/peaks-studio>) (Bioinformatics Solutions, Inc.) obedecendo os seguintes parâmetros: proteínas com mínimo de 2 peptídeos, taxonomia *Homo sapiens*, banco de dados UniProtKB - SWISS-PROT/TrEMBL (janeiro/2018), acurácia MS¹ de 10ppm; acurácia MS² de 0,05Da; até 2 locais de clivagem perdidos; carbamidometilação de cisteínas como modificação fixa; oxidação de metionina e deamidação de proteínas como modificações variáveis; até 5 modificações variáveis permitidas por peptídeo.

O número de proteínas, grupos de proteínas e número de peptídeos foram filtrados com FDR inferior a 1%. As proteínas contaminantes (vários tipos de queratinas humanas, albumina sérica bovina e tripsina porcina) foram adicionadas ao banco de dados e removidas manualmente da lista de identificações.

A lista de identificações foi exportada novamente para o *software* Progenesis QI, onde aplicou-se também às identificações de proteína os filtros Anova ($p \leq 0.05$) e *Fold Change* (≥ 2). As análises multivariadas de PCA e dendograma finalizaram o refinamento de dados baseado no desenho experimental.

2.7.2. MetaboAnalyst

A fim de avaliar a representatividade das proteínas reveladas pela análise no *software* Progenesis QI em cada cenário de estudo, construiu-se um arquivo com os dados de abundância bruta correspondentes em cada amostra para processamento no *software* MetaboAnalyst 3.0® (<http://www.metaboanalyst.ca>) (XIA; WISHART, 2016). A análise obedeceu os mesmos critérios e modelo definidos para avaliação de lipídeos (Capítulo 3, seção 2.4), com adição da transformação prévia dos dados proteômicos em log devido ao grande número de variáveis.

2.8. ANOTAÇÕES FUNCIONAIS

O *software* Strap (<http://www.bumc.bu.edu/cardiovascularproteomics/cpctools>), a partir de códigos do banco experimental UniProtKB, classificou e agrupou as proteínas identificadas considerando função molecular, componente celular e processo biológico – chamado de categorização por *Gene Ontology* (GO) – presentes nos bancos de dados GO, EBI *QuickGO* e UniProtKB (BHATIA et al., 2009).

O *software* Blast2go (<https://www.blast2go.com>) realizou anotações funcionais não só baseado no banco de dados GO como também NCBI (para proteínas não redundantes e dados relacionados ao gene), PIR, Annex e EC a partir da sequência de aminoácidos de cada proteína (GOTZ et al., 2008).

Com intuito de observar apenas proteínas cuja variação da abundância no plasma de pacientes com CHC possibilite a investigação clínica como possível biomarcador, foram selecionadas as 20 proteínas reguladas de maior *Fold Change* (≥ 5) em cada grupo do desenho experimental (APÊNDICE A e B) para avaliação individual das anotações GO no *software* Blast2go. Complementarmente, foram avaliadas as 20 proteínas com melhor grau de contribuição para a discriminação entre CHC e amostras não patológicas eleitas a partir do *VIP score* gerado pela análise PLS-DA *imp. features* no *software* MetaboAnalyst.

Somente foram consideradas para prospecção de biomarcadores as proteínas classificadas em ambas as triagens, *top 20 VIP score* (MetaboAnalyst) e *top 20 Fold Change* (Progenesis QI).

3. RESULTADOS

3.1. CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL DE PROTEÍNAS

A análise da potência estatística do conjunto de dados proteômicos (Figura 13) no *software* Progenesis Q1 revelou que, para o presente estudo, 14 replicatas são suficientes para obtenção de 99% das proteínas com alto poder estatístico (>0.8).

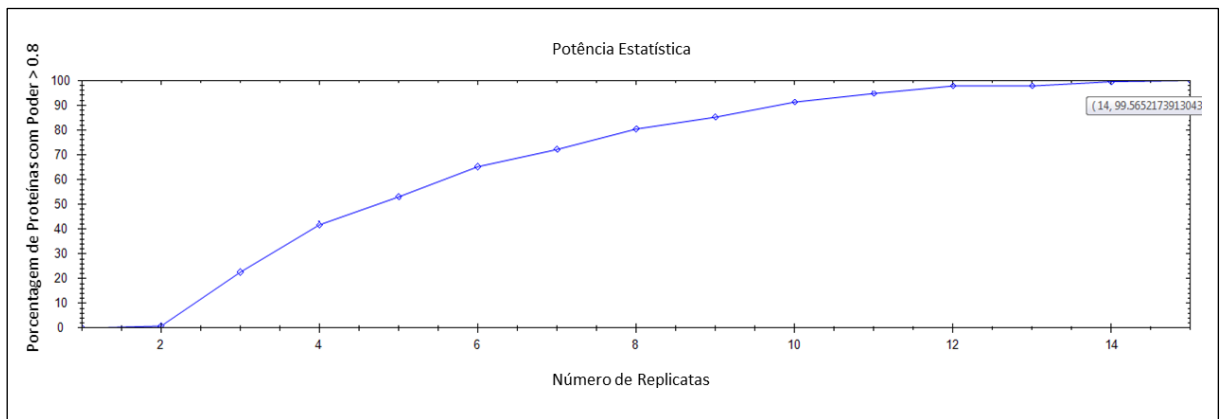


Figura 13: Potência estatística do conjunto de dados proteômicos (<0.8). No presente estudo, com 14 replicatas obtem-se alto poder estatístico para 99% das proteínas avaliadas. Fonte: adaptado do *software* Progenesis Q1.

As proteínas reguladas positivamente e negativamente em plasma de pacientes hepatopatas terminais, comparadas à condição controle, são apresentadas nos APÊNDICES C e D, respectivamente. Entre as 221 proteínas discriminantes, 65% apresentavam estado de regulação positivo (*upregulation*) em pacientes com CHC em comparação aos pacientes controle. O contrário ocorreu com o restante das proteínas (35%), cuja regulação foi negativa (*downregulation*) (Figura 14).

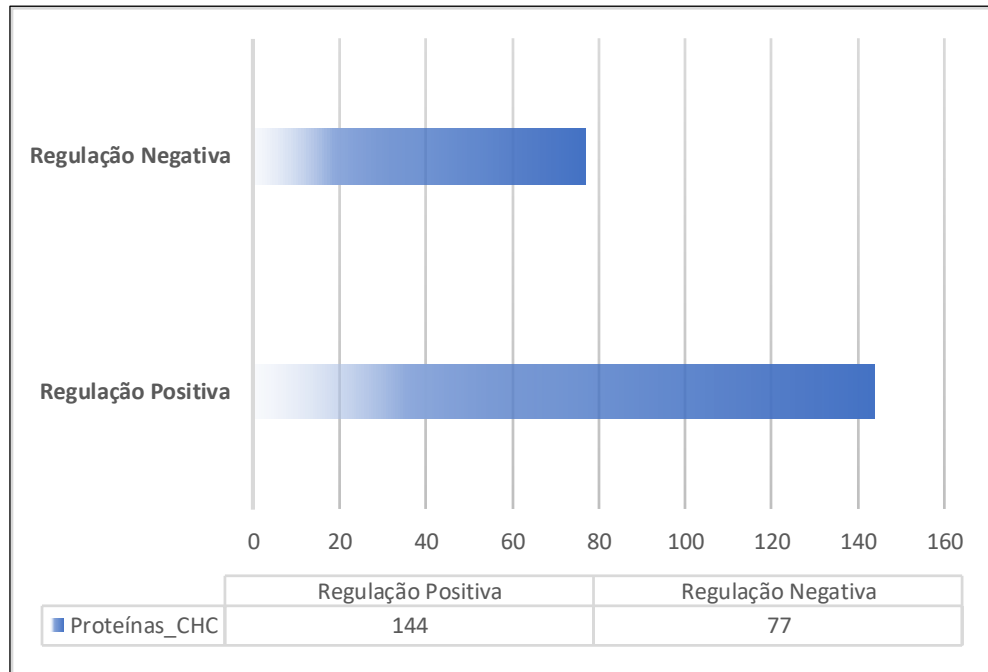


Figura 14: Regulação das proteínas em pacientes com CHC. Dentre as proteínas diferenciais quantificadas pelo *software* Progenesis Q1, 144 apresentavam-se em estado de regulação positivo em pacientes com CHC e 77 em regulação negativa se comparadas aos pacientes controles. Fonte: do autor (2018).

A análise multivariada não supervisionada PCA revelou a tendência de agrupamento dos dados a partir de autovetores (PC 1 e 2) projetados. A distribuição total das amostras dos pacientes em grupos distintos revela a estrutura interna dos dados e corrobora com os cenários fenotípicos de estudo. A Figura 15 apresenta a análise do perfil global de proteínas reguladas em ambas as condições enquanto a Figura 16 apresenta a influência de cada variável original sob os componentes principais traçados, ambas obtidas no *software* MetaboAnalyst. A Figura 17 apresenta o resultado adquirido no *software* Progenesis Q1 a partir não só do perfil global de proteínas reguladas como também do estado de regulação (positivo) em singular das proteínas em cada cenário.

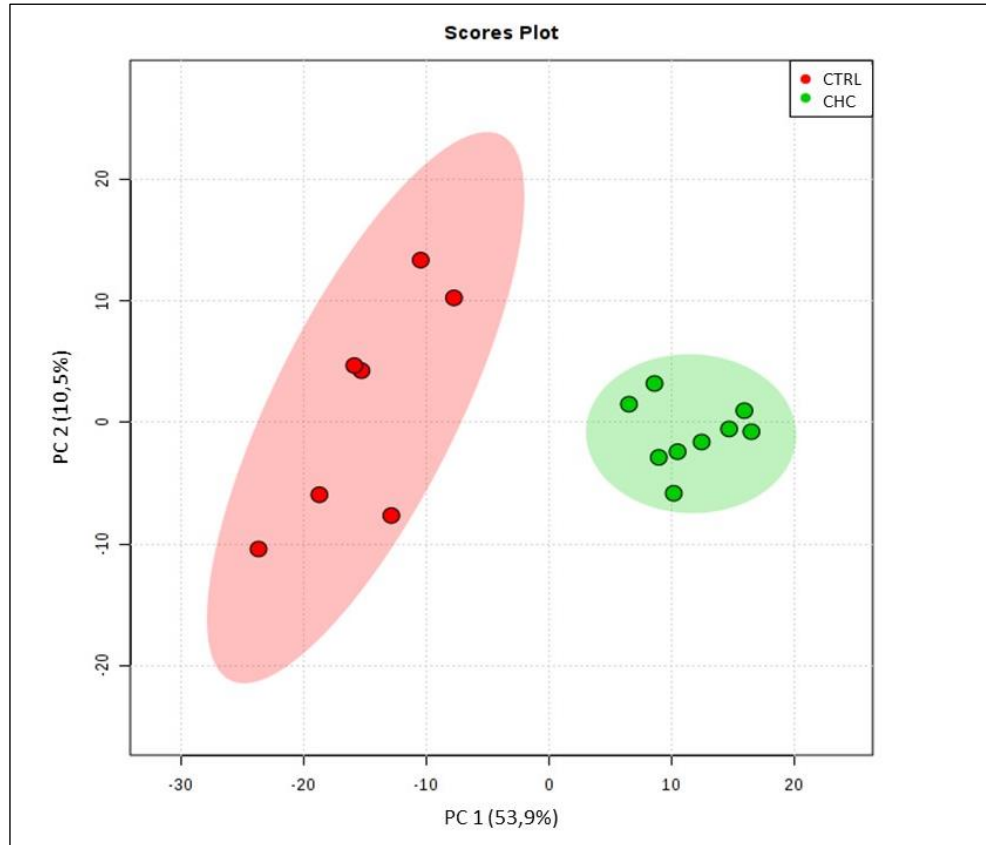


Figura 15: Análise PCA apresentando os *scores plot* das proteínas reguladas em plasma de pacientes com CHC e pacientes controle pelo software MetaboAnalyst ($p < 0.05$). O percentual de cada eixo revela a variância explicada em cada projeção traçada, sendo que PC1 apresenta melhor representatividade dos dados analisados. Na presença da hepatopatia pacientes exibem maior homogeneidade amostral e alteração do perfil de proteínas quando comparados a condição não patológica. Os pacientes pertencentes ao estudo são representados em pequenas esferas vermelhas e verdes, de acordo com o cenário de origem. As regiões elípticas correspondem ao intervalo de 95% de confiança. Fonte: adaptado do software MetaboAnalyst.

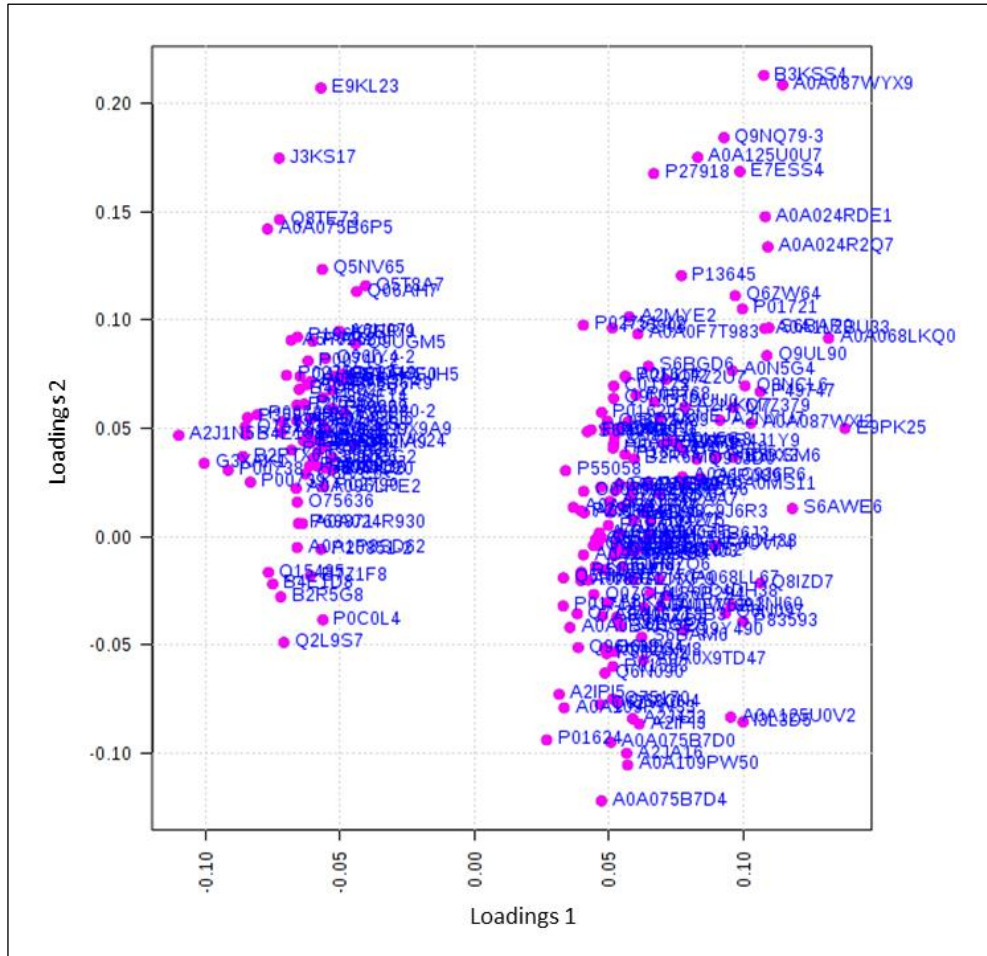


Figura 16: Análise PCA apresentando os *loadings plot* das proteínas reguladas em plasma de pacientes com CHC e pacientes controle pelo software MetaboAnalyst ($p < 0.05$). A distribuição das proteínas, representadas em pequenas esferas rosa, demonstra a influência de cada variável sob os componentes principais traçados. Na presença da hepatopatia pacientes exibem alteração do perfil de proteínas contribuintes quando comparados ao perfil apresentado sob condição não patológica. Fonte: adaptado do *software* MetaboAnalyst.

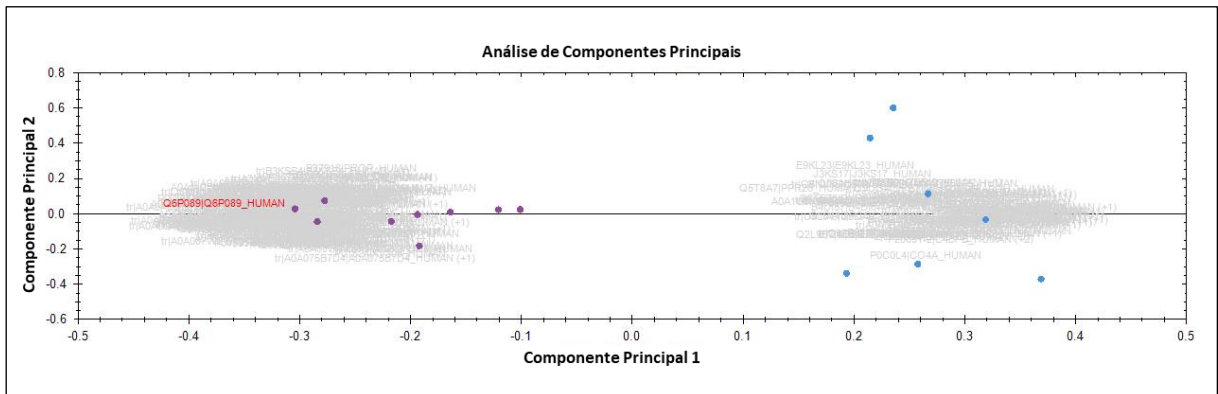


Figura 17: Análise PCA apresentando os *scores plot* das proteínas reguladas em plasma de pacientes com CHC e pacientes controle pelo *software* Progenesis Q1 ($p < 0.05$). As amostras de pacientes com CHC são representadas em roxo e de pacientes controle em azul. As proteínas são dispostas em cinza de acordo com o estado de regulação positivo e o cenário respectivo. Fonte: adaptado do *software* Progenesis Q1.

A análise multivariada supervisionada PLS-DA (Figura 18) demonstrou que pacientes com CHC apresentam perfil de proteínas em plasma diferente daquele expresso em indivíduos não patológicos. A Figura 19 apresenta a influência de cada variável original sob os componentes traçados. O método, cuja validação cruzada é apresentada na Figura 20, revela a covariância dos dados por meio dos componentes projetados.

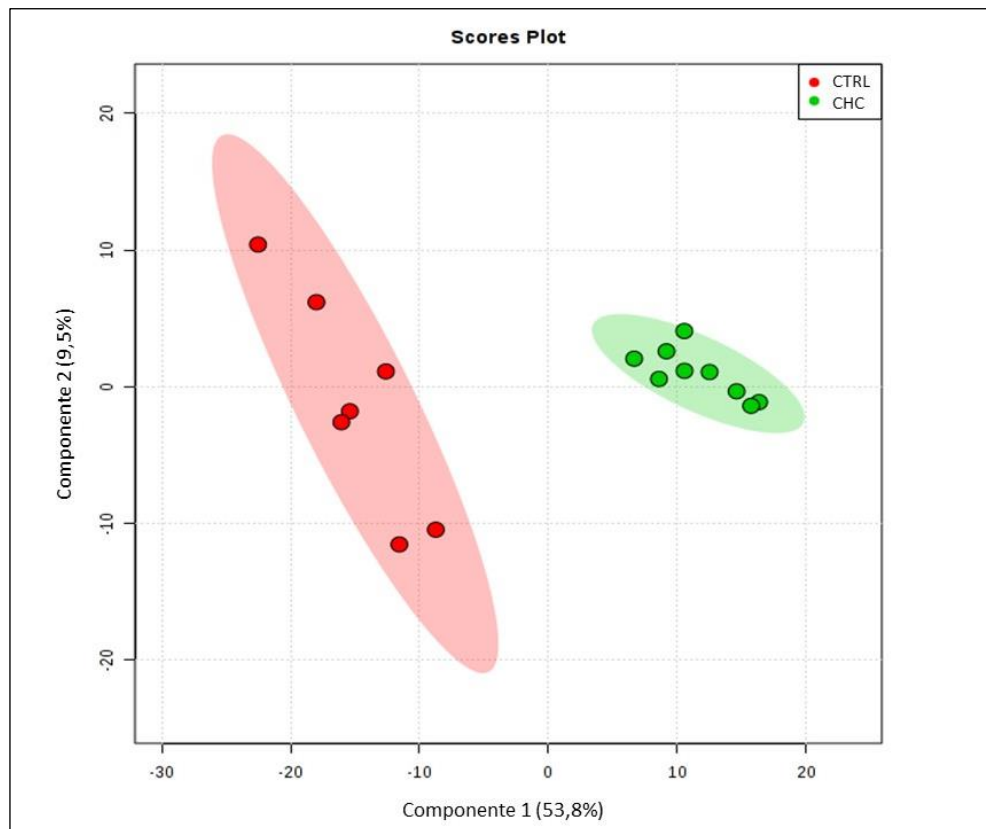


Figura 18: Análise PLS-DA apresentando os *scores plot* das proteínas reguladas em plasma de pacientes com CHC e pacientes controle pelo software MetaboAnalyst ($p < 0.05$). O percentual de cada eixo revela a covariância explicada em cada projeção traçada, sendo que o Componente 1 apresenta melhor representatividade dos dados analisados. Na presença da hepatopatia pacientes exibem maior homogeneidade amostral e alteração do perfil de proteínas quando comparados a condição não patológica. Os pacientes pertencentes ao estudo são representados em pequenas esferas vermelhas e verdes, de acordo com o cenário de origem. As regiões elípticas correspondem ao intervalo de 95% de confiança. Fonte: adaptado do software MetaboAnalyst.

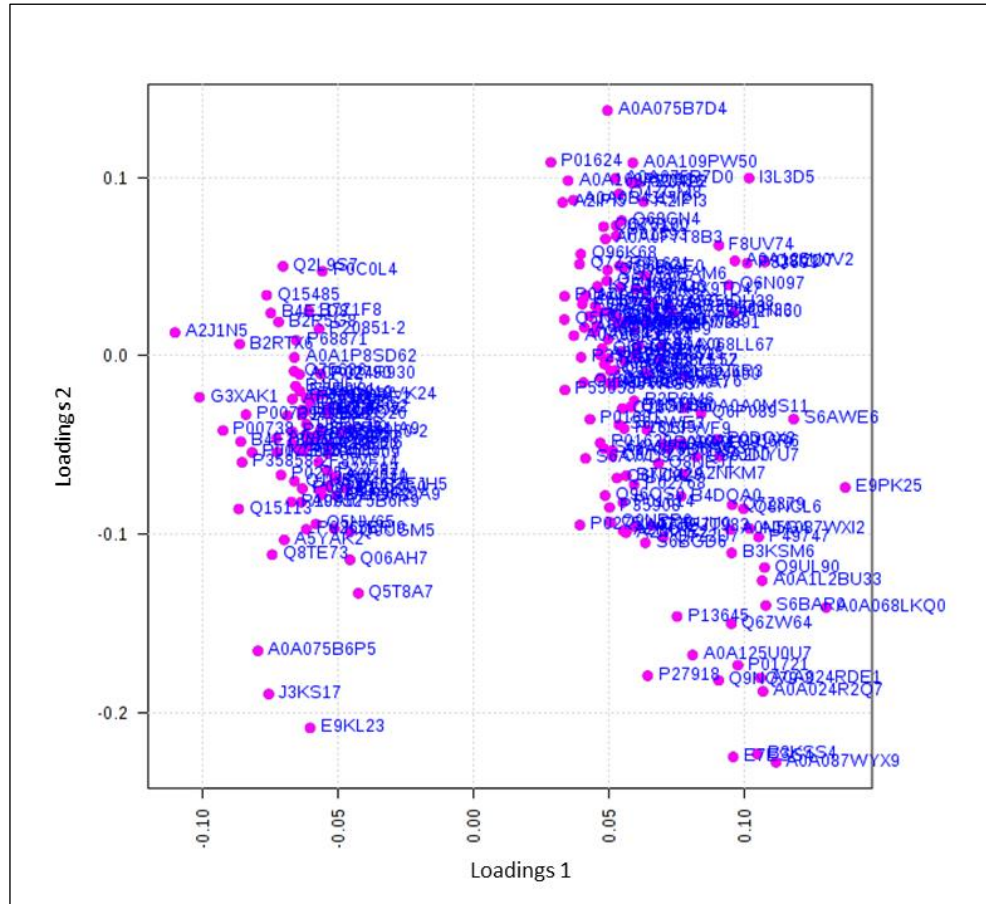


Figura 19: Análise PLS-DA apresentando os *loadings plot* das proteínas reguladas em plasma de pacientes com CHC e pacientes controle pelo software MetaboAnalyst ($p < 0.05$). A distribuição das proteínas, representadas em pequenas esferas rosa, demonstra a influência de cada variável sob os componentes projetados. Na presença da hepatopatia pacientes exibem alteração do perfil de proteínas contribuintes quando comparados ao perfil apresentado sob condição não patológica. Fonte: adaptado do software MetaboAnalyst.

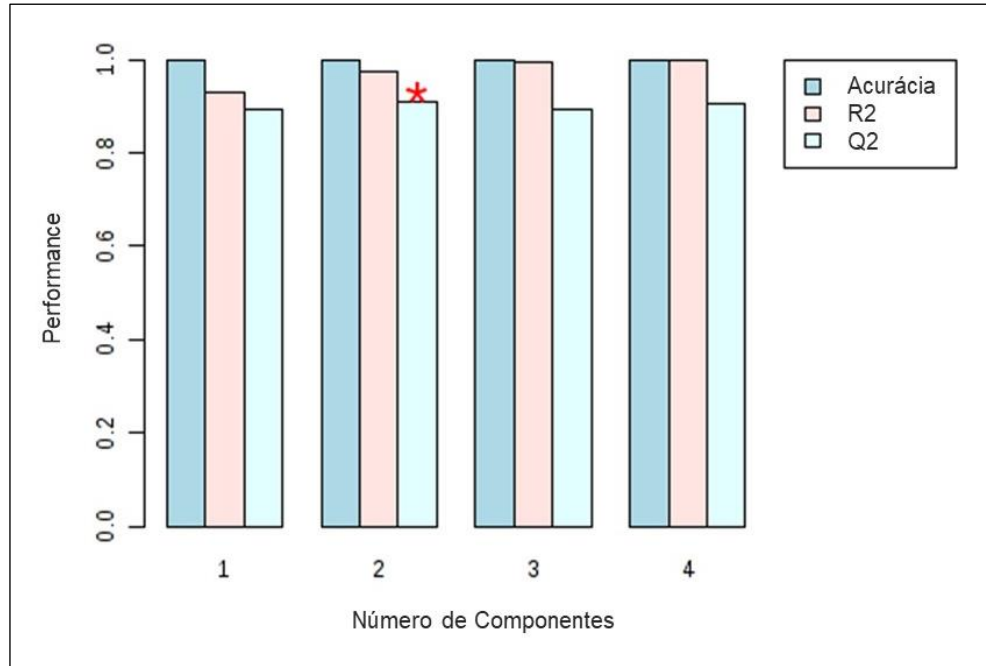


Figura 20: Análise por validação cruzada do método PLS-DA para perfil proteômico no software MetaboAnalyst. O asterisco vermelho indica o conjunto de componentes com maior habilidade de predição (Q2). Fonte: adaptado do software MetaboAnalyst.

A análise multivariada supervisionada Orthogonal PLS-DA (Figura 21), mais apropriada ao modelo de biomarcadores devido à triagem de variáveis não correlacionadas, também demonstrou que pacientes com CHC apresentam alteração do perfil de proteínas em plasma quando comparados a indivíduos da condição controle. A Figura 22 apresenta a influência de cada variável original sob a construção do modelo.

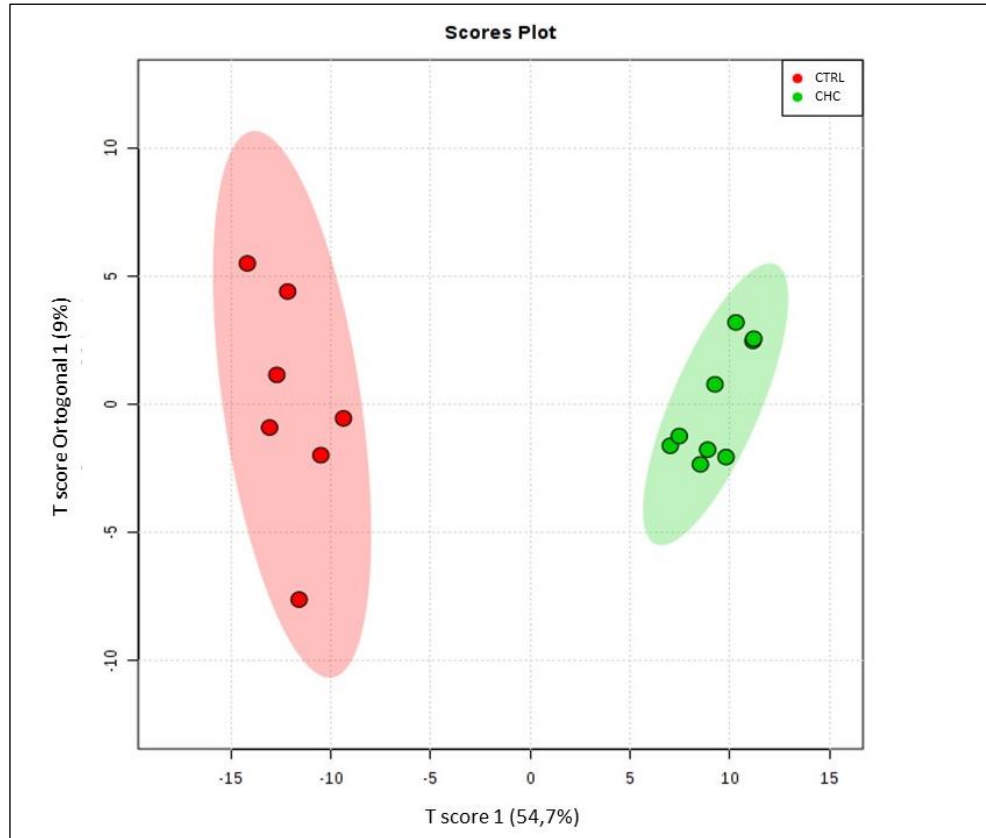


Figura 21: Análise por Orthogonal PLS-DA apresentando os *scores plot* das proteínas reguladas em plasma de pacientes com CHC e pacientes controle pelo software MetaboAnalyst ($p < 0.05$). O *score* de cada vetor revela a covariância explicada em cada projeção traçada, sendo que o vetor ortogonal representa variáveis estatisticamente não correlacionadas ao restante dos dados analisados. Na presença da hepatopatia pacientes exibem maior homogeneidade amostral e alteração do perfil de proteínas quando comparados a condição não patológica. Os pacientes pertencentes ao estudo são representados em pequenas esferas vermelhas e verdes, de acordo com o cenário de origem. As regiões elípticas correspondem ao intervalo de 95% de confiança. Fonte: adaptado do software MetaboAnalyst.

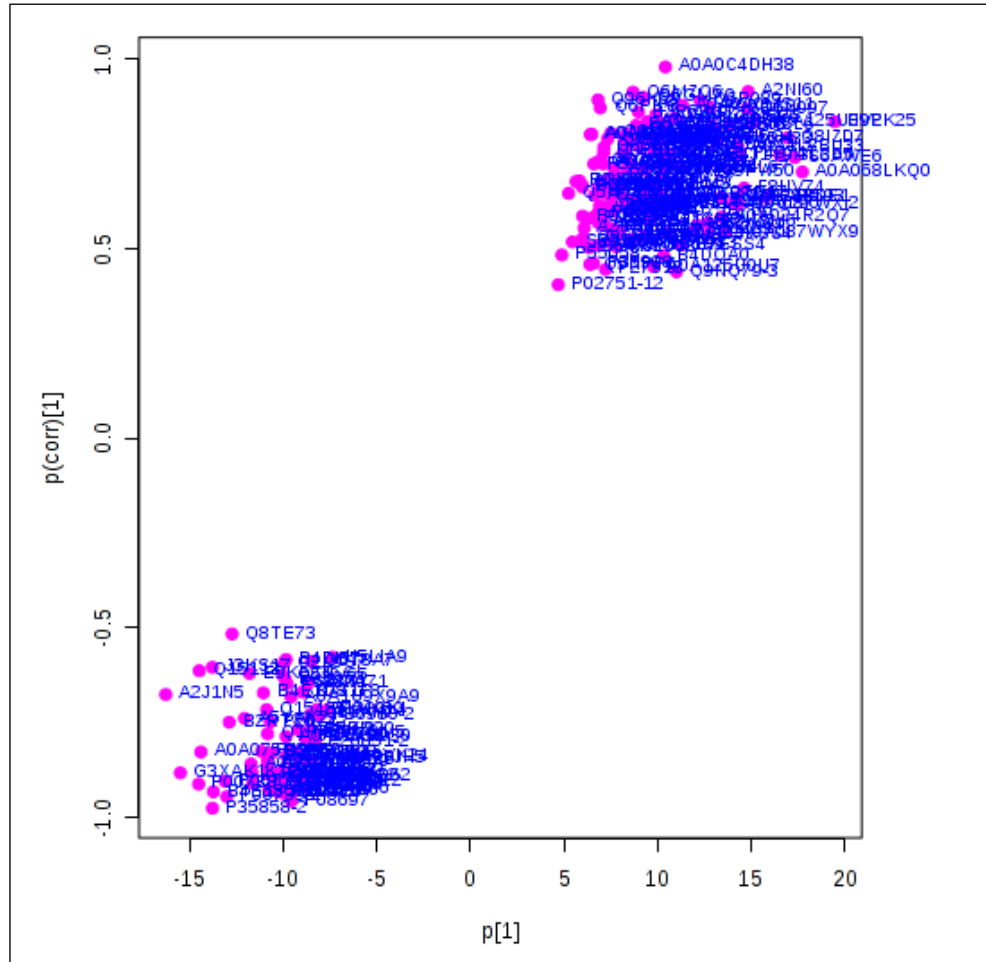


Figura 22: Análise por Orthogonal PLS-DA apresentando os *loadings S-plot* das proteínas reguladas em plasma de pacientes com CHC e pacientes controle pelo software MetaboAnalyst ($p < 0.05$). A distribuição das proteínas, representadas em pequenas esferas rosa, demonstra a influência de cada variável para a construção do modelo, onde p representa o vetor de *loading* e $p(\text{corr})$ a combinação entre covariância e correlação. Na presença da hepatopatia pacientes exibem alteração do perfil de proteínas contribuintes quando comparados ao perfil sob condição não patológica. Fonte: adaptado do software MetaboAnalyst.

As 221 proteínas reguladas, indicadas pelo software Progenesis Q1, foram submetidas à análise em 2 softwares distintos para anotação funcional, Strap e Blast2go. Dentre o conjunto de proteínas avaliadas, 4 não tiveram suas sequências alinhadas pelo software Blast2go, totalizando 217 proteínas analisadas; para 86 não foram atribuídos termos GO pelo software Strap; e para 47 proteínas não foram atribuídas anotações funcionais pelo software Blast2go.

Durante as análises foi observado que 8 entradas UniProtKB haviam sido deletadas do banco de dados experimental, portanto as investigações aqui descritas não possuem informações quanto às proteínas listadas no APÊNDICE E. Além disso, a proteína de entrada P83593 foi redirecionada ao código P03612 e as proteínas

identificadas em ambos os bancos SWISS-PROT e TrEMBL foram revisadas de forma a selecionar os dados de maior *protein score*.

As anotações funcionais a partir de termos GO para processos biológicos demonstraram que a maioria das proteínas reguladas estão implicadas no processo de regulação (80%) e em processos celulares (75%) (Figura 23). Mais especificamente, processos biológicos pertencentes à resposta imune, com ativação da via clássica do complemento, mediação da endocitose por receptores e aplicação na resposta imune inata (Figura 24).

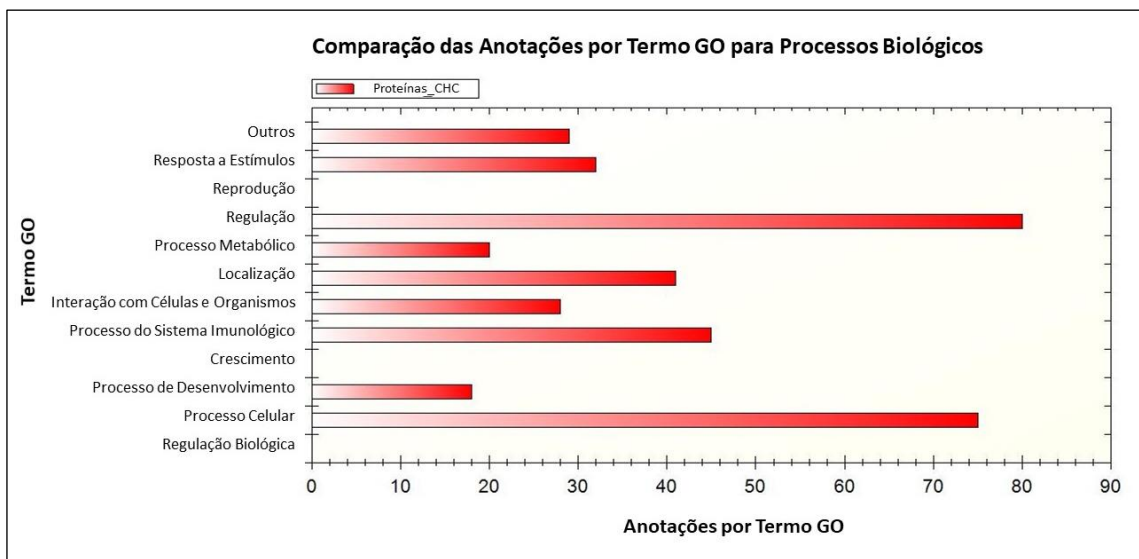


Figura 23: Anotações GO quanto ao processo biológico para proteínas reguladas em plasma de pacientes com CHC e pacientes controle (software Strap). Os termos regulação e processo celular são os principais discriminantes para caracterização dos dados. Fonte: adaptado do software Strap.

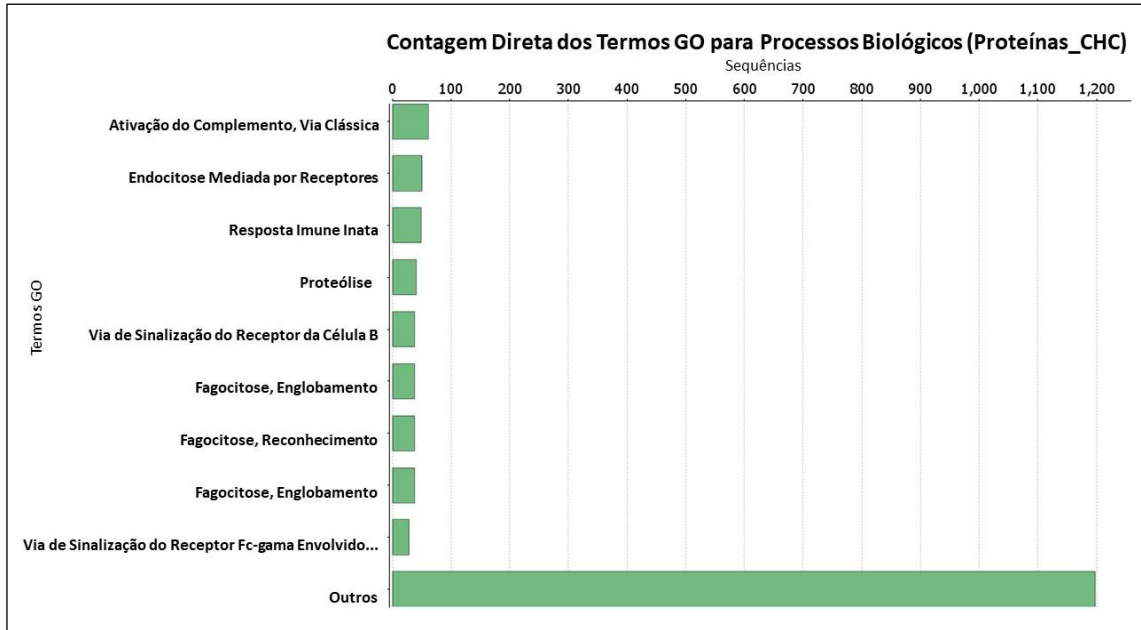


Figura 24: Anotações GO quanto ao processo biológico para proteínas reguladas em plasma de pacientes com CHC e pacientes controle (software Blast2go). Os termos ativação da via clássica do sistema complemento, mediação da endocitose por meio de receptores e resposta imune inata são os principais discriminantes para caracterização dos dados. Fonte: adaptado do *software* Blast2go.

Quanto a composição celular, a distribuição dos dados em termos GO revelou que as proteínas reguladas são representadas majoritariamente por biomoléculas presentes no meio extracelular (107%) e na membrana plasmática (45%) (Figura 25), sobretudo compreendendo exossomas e micropartículas secretadas (Figura 26).

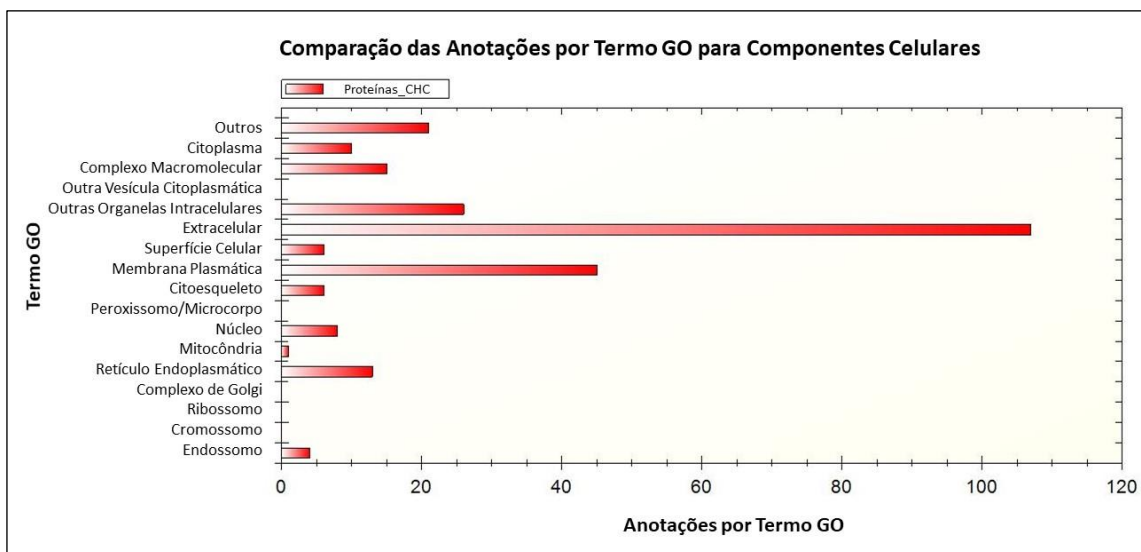


Figura 25: Anotações GO quanto ao componente celular para proteínas reguladas em plasma de pacientes com CHC e pacientes controle (software Strap). A análise demonstra que as proteínas analisadas são encontradas predominantemente no meio extracelular e na membrana plasmática. Fonte: adaptado do *software* Strap.

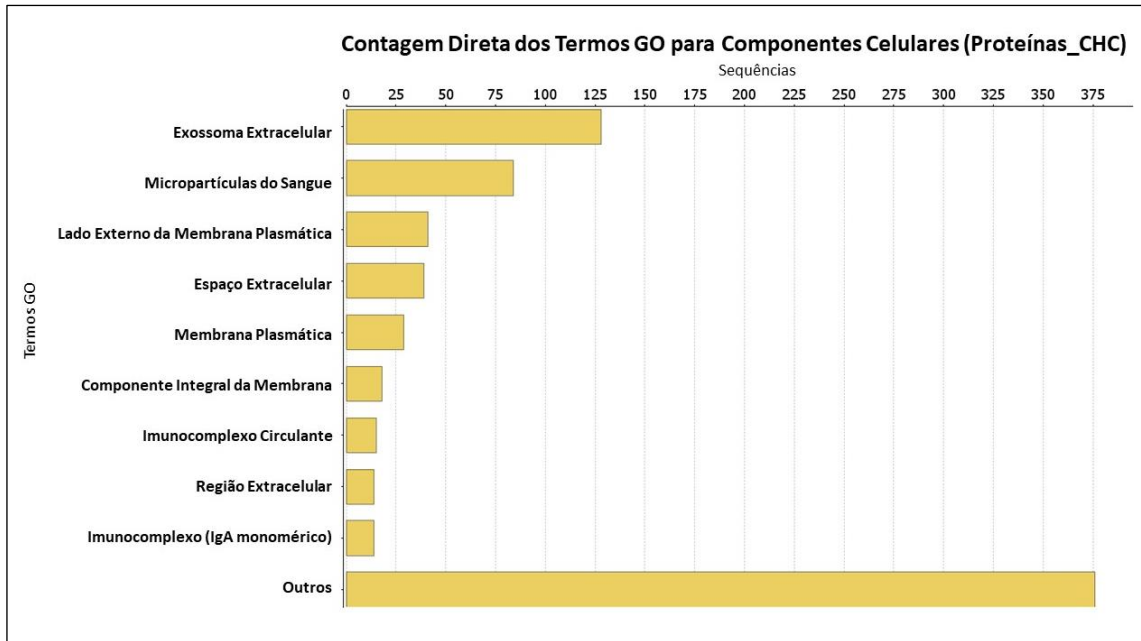


Figura 26: Anotações GO quanto ao componente celular para proteínas reguladas em plasma de pacientes com CHC e pacientes controle (software Blast2go). A distribuição do conjunto de dados demonstra que as proteínas analisadas são encontradas majoritariamente no exossoma e como micropartículas extracelulares. Fonte: adaptado do software Blast2go.

O agrupamento do conjunto de proteínas reguladas na forma de um dendograma possibilitou a visualização de semelhanças existentes entre as variáveis do conjunto amostral de forma hierárquica, revelando organização dos dados similar ao desenho experimental. A Figura 27 apresenta o resultado obtido no software Progenesis Q1 a partir do estado de regulação (positivo) em singular das proteínas em cada cenário. A Figura 28, adquirida durante análise no software MetaboAnalyst, apresenta a análise do perfil global de proteínas reguladas em ambas as condições.

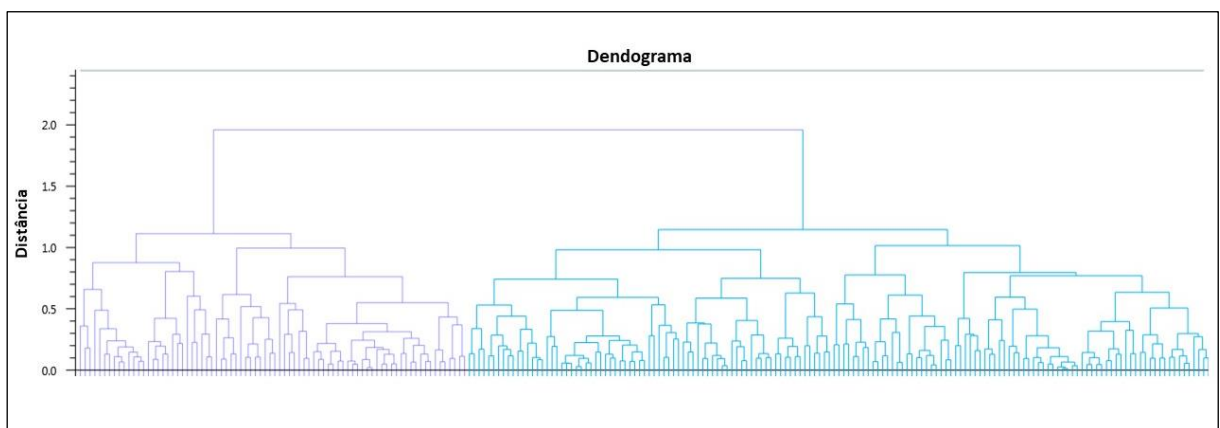


Figura 27: Análise HCA por agrupamento dos dados proteômicos em dendograma no software Progenesis Q1 ($p < 0.05$). Os arranjos exprimem a relação das proteínas reguladas em sistema

hierárquico e a distância euclidiana, os níveis de similaridade. Em azul estão destacadas as proteínas reguladas positivamente em pacientes com CHC e em roxo as proteínas reguladas positivamente nos pacientes controle. Fonte: adaptado do *software* Progenesis Q1.

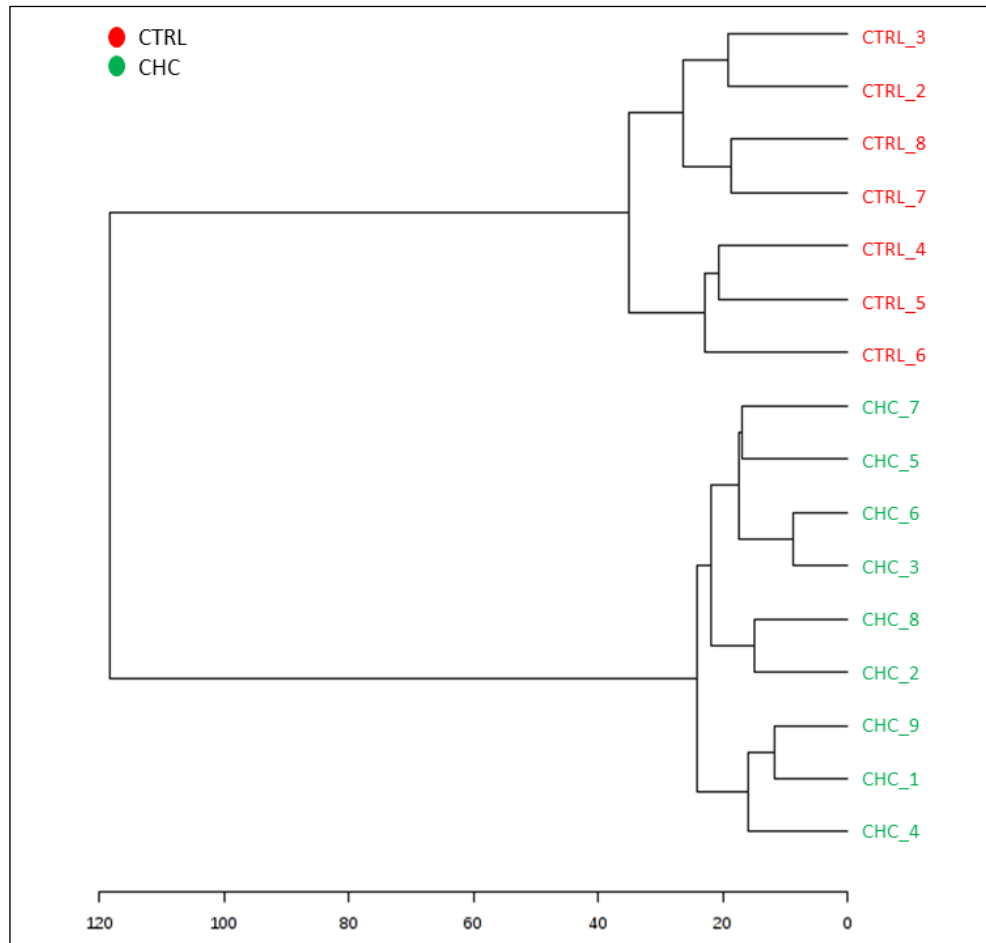


Figura 28: Análise HCA por agrupamento dos dados proteômicos em dendrograma no *software* MetaboAnalyst ($p < 0.05$). Os arranjos exprimem a relação das amostras em sistema hierárquico e a distância euclidiana, os níveis de similaridade segundo perfil global de proteínas reguladas. Fonte: adaptado do *software* MetaboAnalyst.

O agrupamento segundo o algoritmo particional K-means revelou grande homogeneidade amostral no cenário patológico e distanciamento do padrão observado em indivíduos controle (Figura 29). No grupo 3 foram classificadas somente amostras pertencentes aos pacientes com CHC e nos grupos 1, 2, 4 e 5 apenas amostras controle.

Detalhes do Agrupamento K-means

| Grupos | Membros |
|---------|---------------------------------------------------------------|
| Grupo 1 | CTRL_5, CTRL_4 |
| Grupo 2 | CTRL_6 |
| Grupo 3 | CHC_1, CHC_2, CHC_3, CHC_4, CHC_5, CHC_6, CHC_7, CHC_8, CHC_9 |
| Grupo 4 | CTRL_2, CTRL_3 |
| Grupo 5 | CTRL_7, CTRL_8 |

Figura 29: Agrupamento K-means dos dados proteômicos ($p < 0.05$). O algoritmo particional encontrou diferenças significantes em até 5 grupos. Fonte: adaptado do *software* MetaboAnalyst.

A classificação Random Forest demonstrou que o erro aleatório na designação das amostras é nulo (Figura 30), ratificando o potencial do conjunto de dados na caracterização dos cenários. Além disso, a técnica detectou potenciais *outliers*, em 2 amostras do grupo controle e em 3 pertencentes aos pacientes com CHC (Figura 31). Variações em dados clínicopatológicos dos paciente avaliados podem auxiliar no esclarecimento das disparidades identificadas entre amostras do mesmo cenário biológico.

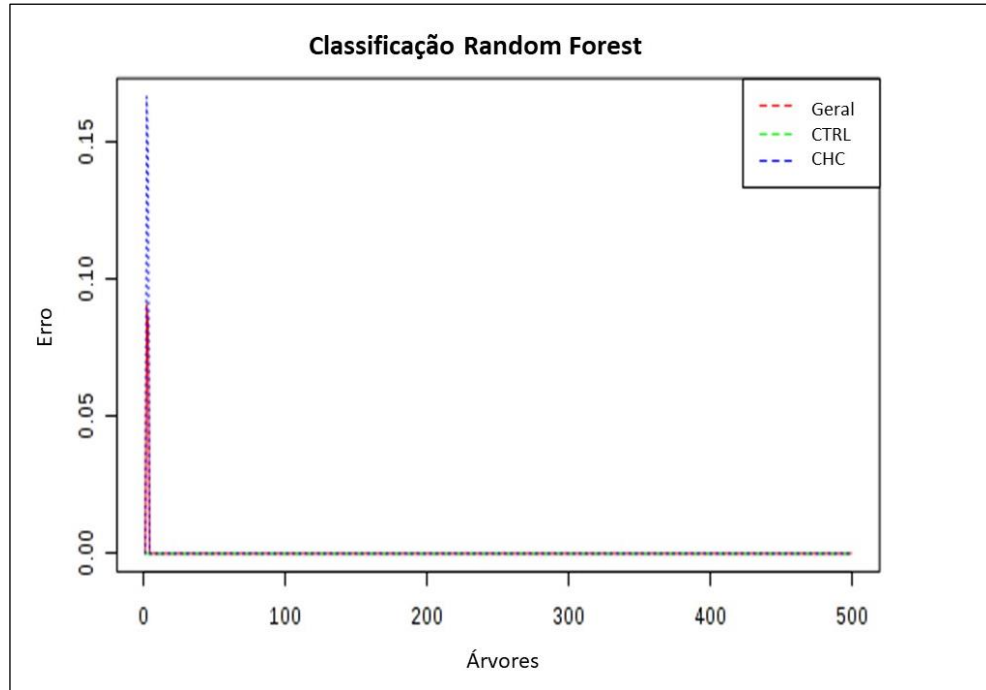


Figura 30: Classificação Random Forest do conjunto de dados proteômicos. O erro amostral foi considerado nulo conforme ampliaram-se as alternativas de fluxo classificatório. Fonte: adaptado do software MetaboAnalyst.

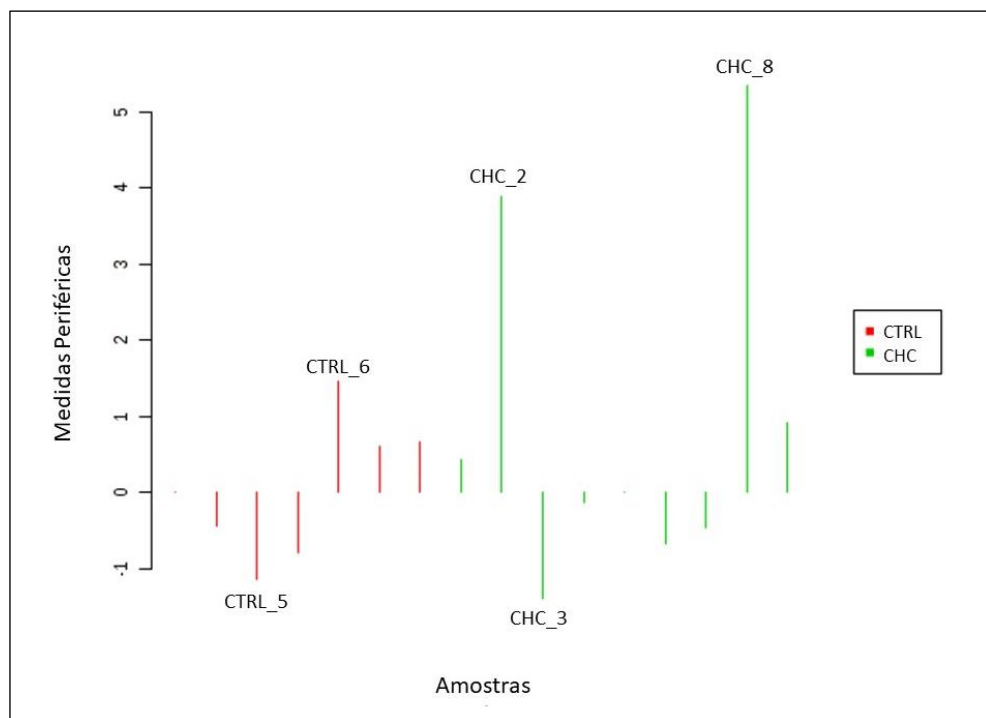


Figura 31: Potenciais outliers detectados por Random Forest na análise proteômica. O método classificatório indica desconformidade de 5 amostras com afastamento atípico ≤ 5 do conjunto amostral. Fonte: adaptado do software MetaboAnalyst.

3.2. PROTEÔMICA DE DESCOBERTA DE POSSÍVEIS BIOMARCADORES

A distribuição dos dados em termos GO para funções moleculares demonstrou que majoritariamente as proteínas reguladas estão implicadas nas atividades de ligação (94%) e catalítica (43%) (Figura 32). Mais especificamente, os principais termos atribuídos são ligação ao antígeno, serina endopeptidase e ligação ao receptor de imunoglobulina (Figura 33).

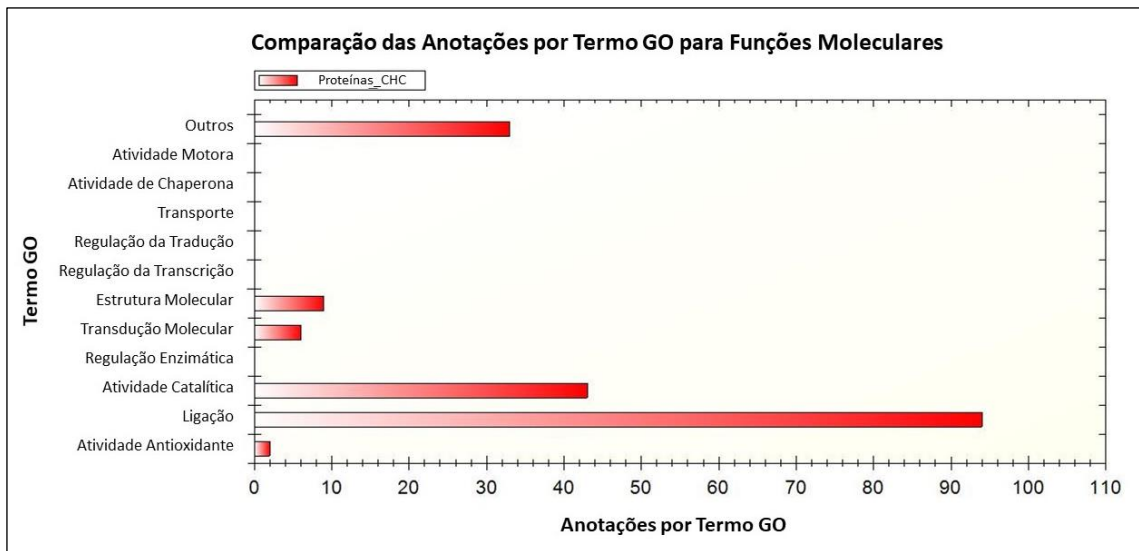


Figura 32: Anotações GO quanto à função molecular para proteínas reguladas em plasma de pacientes com CHC e pacientes controle (*software* Strap). A distribuição do conjunto de dados demonstra que majoritariamente as proteínas analisadas estão envolvidas em atividade de ligação, seguida por atividade catalítica. Fonte: adaptado do *software* Strap.

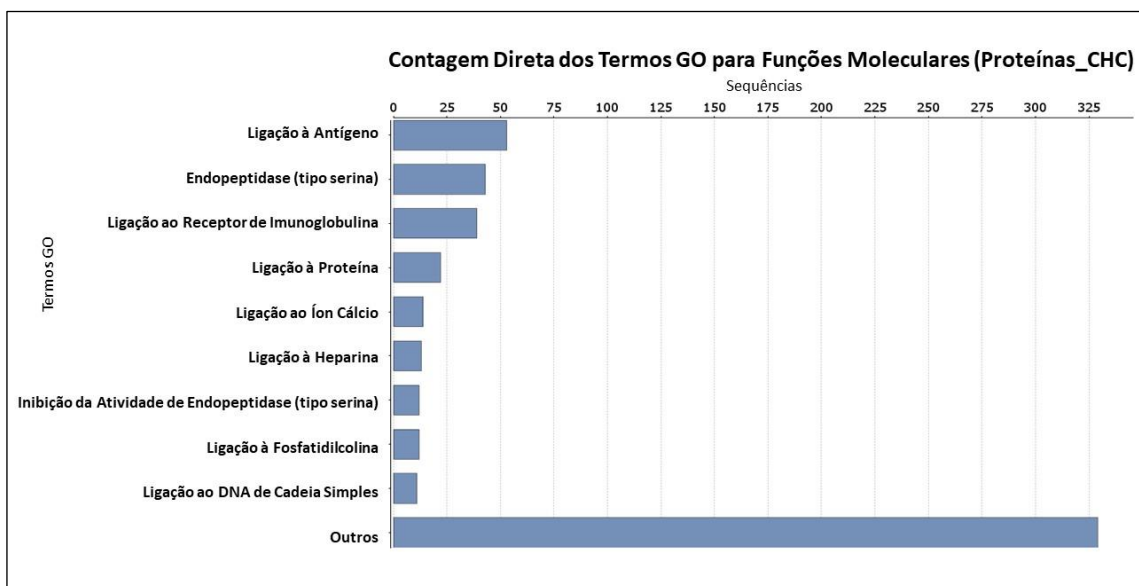


Figura 33: Anotações GO quanto à função molecular para proteínas reguladas em plasma de pacientes com CHC e pacientes controle (*software* Blast2go). As principais funções atribuídas ao

conjunto de proteínas analisadas são ligação à antígeno, serina endopeptidase e ligação ao receptor de imunoglobulina. Fonte: adaptado do *software* Blast2go.

As anotações funcionais baseadas no Enzyme Code revelaram que as proteínas reguladas de função enzimática apresentam predominantemente atividade hidrolítica (Figura 34), sobretudo àquelas em ligações peptídicas (Figura 35).

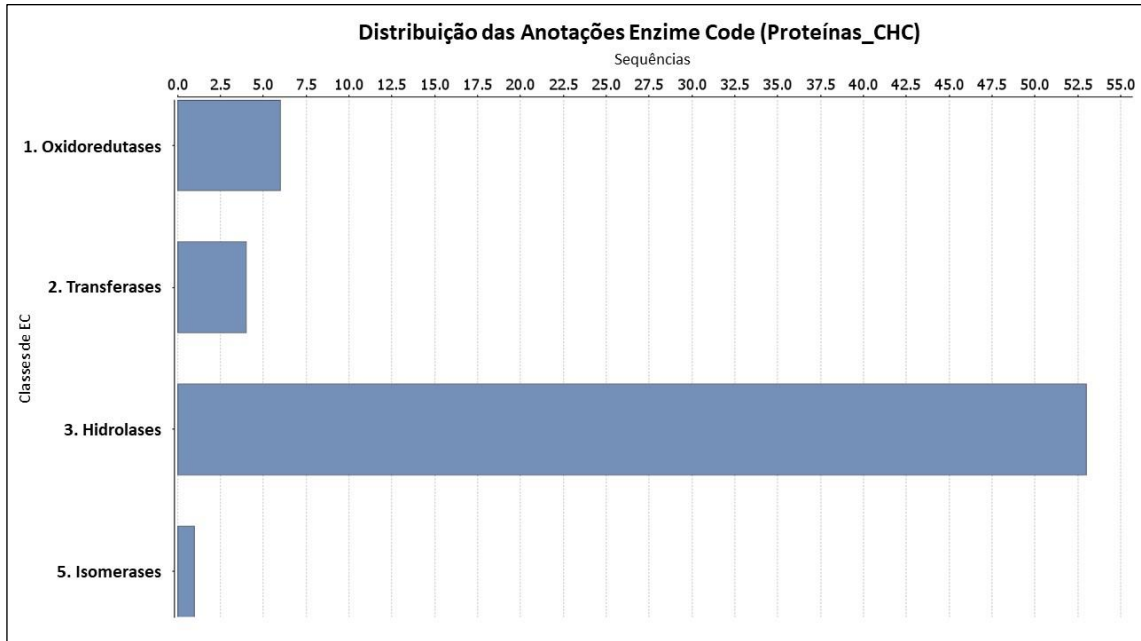


Figura 34: Anotações Enzyme Code para proteínas reguladas em plasma de pacientes com CHC e pacientes controle. A principal função enzimática atribuída ao conjunto de proteínas analisadas é a hidrólise. Fonte: adaptado do *software* Blast2go.

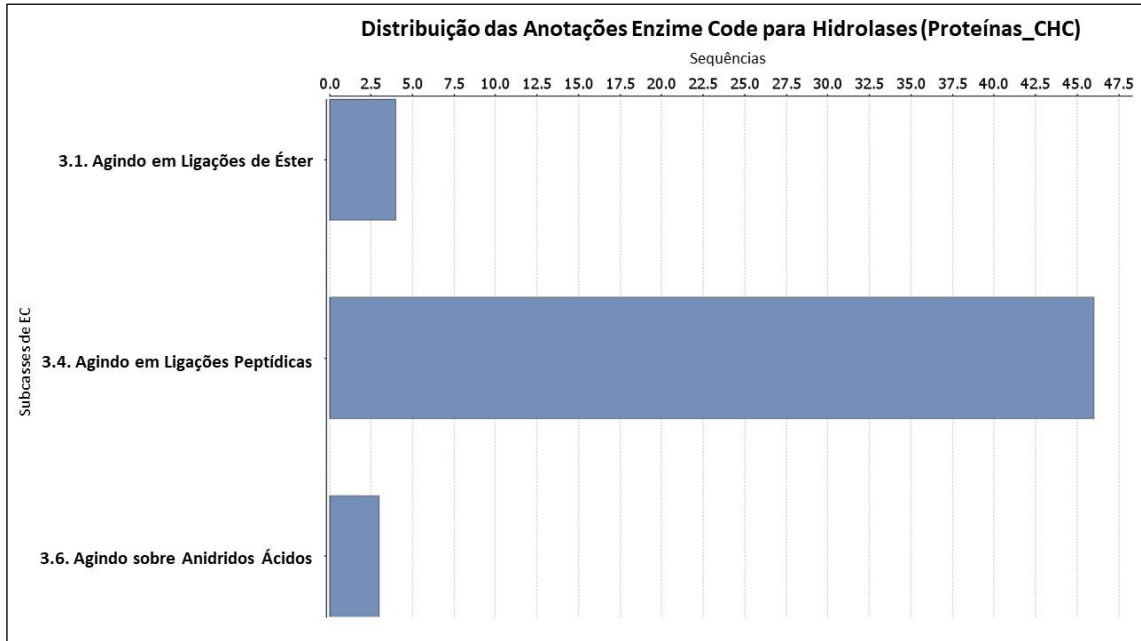


Figura 35: Anotações Enzyme Code para hidrolases em plasma de pacientes com CHC e pacientes controle. A aplicação da atividade hidrolítica ocorre principalmente nas ligações peptídicas. Fonte: adaptado do *software* Blast2go.

O modelo PLS-DA permitiu a avaliação do grau de contribuição das proteínas reguladas na diferenciação dos cenários do presente estudo (Figura 36). Dentre as 20 proteínas reguladas de maior representatividade (*VIP score* 1,4 – 2,0) somente 3 apresentam regulação negativa em pacientes com CHC.

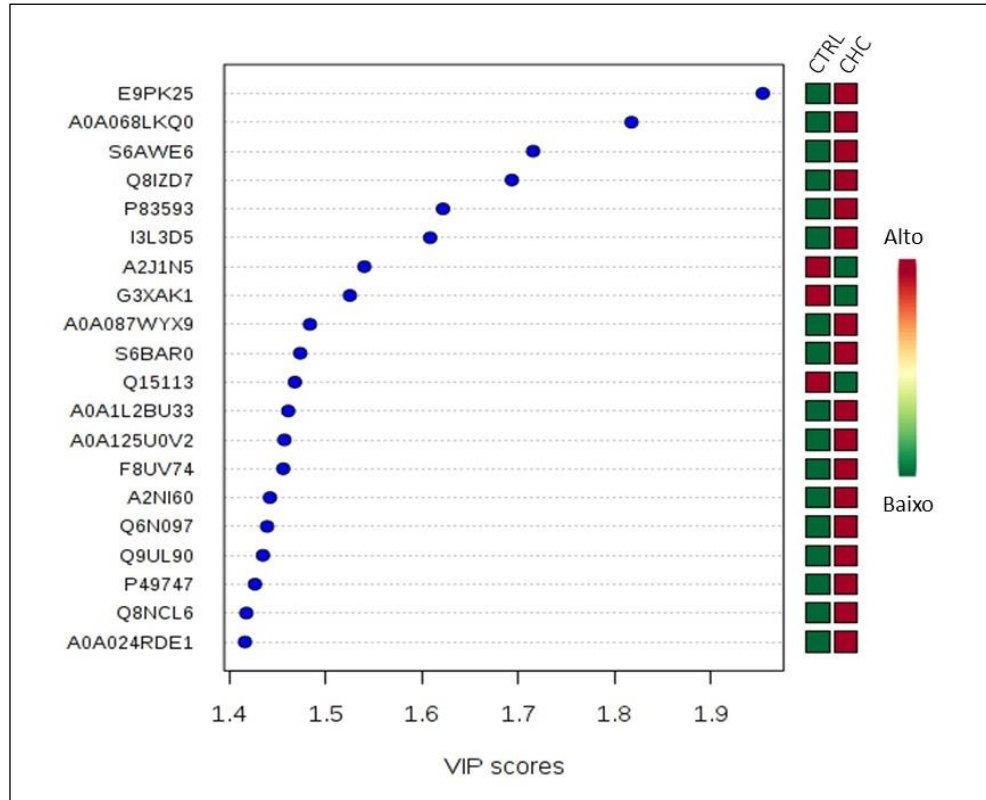


Figura 36: VIP scores das proteínas reguladas em plasma de pacientes com CHC e pacientes controle (PLS-DA *imp. features*, $p < 0.05$). Dentre as 20 proteínas reguladas de maior VIP score, 17 apresentam regulação positiva em pacientes com CHC. As caixas coloridas à direita indicam a intensidade relativa de cada proteína nos respectivos cenários. Fonte: adaptado do *software* MetaboAnalyst.

O agrupamento hierárquico *heatmap* permitiu visualizar de maneira mais simplificada a estrutura interna dos dados proteômicos de acordo com o VIP score investigado por PLS-DA (Figura 37). O estado de regulação das proteínas discriminantes em cada cenário pode ser observado pela coloração homogênea nas respectivas amostras.

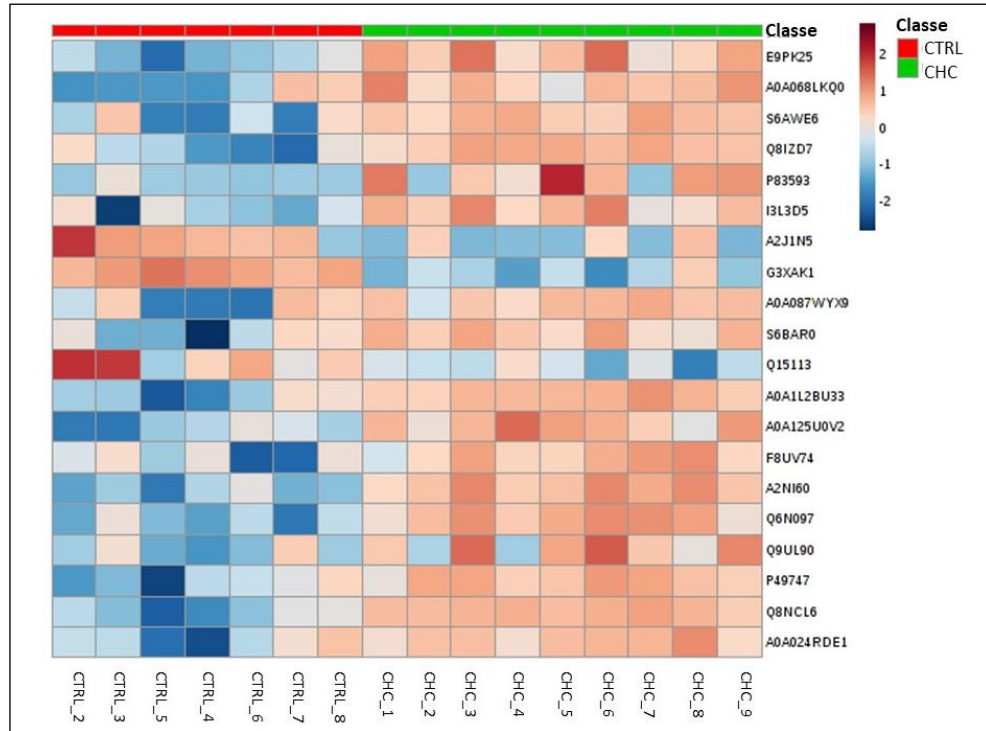


Figura 37: Análise HCA por agrupamento em *heatmap* das proteínas discriminantes indicadas pela análise PLS-DA (*imp. features*, $p < 0.05$). A intensidade relativa de cada proteína é apresentada para cada amostra analisada segundo a coloração indicada na escala lateral. As amostras, por sua vez, são agrupadas de acordo com o respectivo cenário. Fonte: adaptado do software MetaboAnalyst.

As proteínas selecionadas para prospecção de biomarcadores em plasma de pacientes com CHC, segundo classificação em ambas as triagens – *top 20 VIP score* e *top 20 Fold Change* – são apresentadas no Quadro 5. Adicionalmente, foram examinadas as anotações funcionais associadas a estas biomoléculas e dentre as 17 proteínas triadas, somente 10 foram associadas à códigos de evidência para anotações funcionais em termos GO (APÊNDICE F). As proteínas com o maior número de anotações foram a F8UV74 e a I3L3D5, com 48 e 40 termos associados, respectivamente. Às demais proteínas foram atribuídas mais de 20 termos, com exceção das proteínas Q15113 e A2NI60. Quanto aos tipos de evidência, aproximadamente 44% correspondem a métodos automatizados, sem julgamento curatorial (*IEA*) e 33% a caracterização física de um gene ou produto gênico (*IDA*, *IEP*, *IGI*, *IMP* e *IPi*).

| Categoria | Entrada UniProtKB | Proteína |
|------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------|-------------------------------------------------------------------------|
| <i>As categorias correspondem ao cenário de regulação positiva e intensidade relativa alta</i> | | |
| <i>Pacientes Controle</i> | Q15113 | <i>Proteína potencializadora de pró-colágeno C-endopeptidase tipo 1</i> |

| | | |
|--------------------------|---------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| | G3XAK1 | <i>Proteína similar ao fator de crescimento de hepatócitos (HGFL)</i> |
| | A2J1N5 | <i>Fator reumatóide RF-ET6</i> |
| <i>Pacientes com CHC</i> | P83593 | <i>Região variável da cadeia leve κ 4-1 de imunoglobulina</i> |
| | E9PK25 | <i>Cofilina-1</i> |
| | Q9UL90 | <i>Região variável da cadeia pesada de imunoglobulina reativa à miosina</i> |
| | I3L3D5 | <i>Profilina</i> |
| | A0A125U0V2 | <i>Região variável da cadeia pesada GCT-A1</i> |
| | A0A068LKQ0 | <i>Região variável da cadeia pesada de imunoglobulina</i> |
| | Q8IZD7 | <i>Região variável da cadeia pesada de antitireoglobulina</i> |
| | F8UV74 | <i>Molécula de adesão celular vascular-1 (VCAM-1)</i> |
| | Q6N097 | <i>Proteína não caracterizada DKFZp686H20196</i> |
| | S6BAR0 | <i>Cadeia leve da IgG</i> |
| | A2NI60 | <i>BRE</i> |
| | P49747 | <i>Proteína oligomérica da matriz da cartilagem (COMP)</i> |
| | Q8NCL6 | <i>Proteína altamente similar à cadeia pesada alfa da região constante de IgA tipo I (cDNA FLJ90170 fis, clone MAMMA1000370)</i> |
| A0A1L2BU33 | <i>Região variável da cadeia pesada de antienterotoxina D de staphylococcus</i> | |

Quadro 5: Proteínas classificadas para prospecção de biomarcadores em plasma de pacientes com CHC. As proteínas são apresentadas de acordo com o cenário de regulação positiva (*Fold Change*) e intensidade relativa alta (*VIP score*). Fonte: do autor (2018).

4. DISCUSSÃO

Um dos maiores obstáculos na condução clínica do carcinoma hepatocelular (CHC) é o diagnóstico tardio em estágios avançados, atribuído em parte a baixa acurácia dos métodos diagnósticos recomendados atualmente. Em decorrência da urgente necessidade de marcadores não invasivos que possam rotineiramente avaliar a progressão do CHC e de outras doenças hepáticas (DANCEY; CHEN, 2006; LLOVET et al., 2016; SONG; ALDREDGE; LEBRILLA, 2015; ZHANG et al., 2013), uma das estratégias mais frequentemente adotadas para descoberta de novos biomarcadores tumorais é a análise proteômica (KARIMI; SHAHROKNI; NEZAMI RANJBAR, 2014; KULASINGAM; DIAMANDIS, 2008).

Os resultados obtidos nesse estudo demonstraram um panorama geral acerca do perfil de proteínas encontrado em plasma de pacientes hepatopatas terminais comparado a indivíduos controle. Para acessar o efeito da reprogramação metabólica no perfil global destas macromoléculas, aplicou-se técnica de alta resolução (MS) e critérios analíticos que favorecem a prospecção de novos biomarcadores tumorais ante a elucidação da patogênese do CHC.

Os dados demonstram que pacientes com CHC apresentam um perfil proteômico distinto dos pacientes controle. Diversos autores relatam que condições patológicas, especialmente processos inflamatórios e degenerativos crônicos, prejudicam o metabolismo hepático de forma a produzir irregularidades no proteoma circulante como um reflexo da patogênese (FENG; WANG; CHEN, 2010; GAO et al., 2017; PARADIS et al., 2005; SARVARI et al., 2013, 2014; SHENG et al., 2018; TALEB et al., 2017; TSAI et al., 2015).

No primeiro momento, foram observadas alterações no estado de regulação de 221 proteínas estatisticamente significantes, das quais 144 apresentam expressão elevada em pacientes com CHC. A aplicação de critérios para elegibilidade de proteínas apropriadas às condições de um biomarcador ideal possibilitou a triagem de 17 proteínas candidatas. Embora seja necessária validação futura com um maior número de pacientes (etapa chamada *proteomic validation*), os dados demonstram classificar as condições patológica e controle em arranjos distintos numa abordagem inicial denominada experimento de descoberta (*proteomic discovery*). Paradis et al. (2005) analisando o soro de 82 pacientes com cirrose hepática, entre os quais 44

apresentavam CHC, por SELDI-TOF/MS identificaram 30 picos diferenciais de proteína associados a ambas as condições. Adicionalmente, os autores utilizaram os picos de maior pontuação sob análise de regressão para desenvolvimento de um algoritmo diagnóstico para o CHC. De acordo com a presença ou não da doença, a concordância diagnóstica foi superior a 90% (AUC 0.92) com 85% de sensibilidade e 91% de especificidade para valor de corte 2.0. Tsai et al. (2015), a partir de análise *label-free* por LC-MS/MS, relataram 101 proteínas com diferenças estatísticas significativas no soro de pacientes com CHC se comparado a pacientes com cirrose. Após quantificação por monitoramento de reações múltiplas (MRM), os autores reduziram à 21 potenciais candidatos a biomarcadores. A análise das vias demonstrou regulação positiva da via do complemento e da cascata de coagulação, bem como regulação negativa da via de apresentação e processamento de antígenos em pacientes com CHC.

As anotações funcionais em termos GO permitiram avaliar a função e disposição das proteínas reguladas no organismo dos pacientes examinados. Majoritariamente, as proteínas inserem-se em estruturas ou secretomas, especificamente exossomas e micropartículas, secretadas para o meio extracelular e como parte de membranas plasmáticas, como um reflexo das condições do órgão. Gao et al. (2017), comparando o proteoma de tecido com CHC e tecido hepático adjacente ao tumor por SWATH-MS, observaram que aproximadamente 85% das proteínas diferencialmente expressas apresentavam potencial de secreção na circulação sanguínea.

A maioria das proteínas reguladas nesse trabalho está associada a processos celulares pertinentes a indução de respostas inflamatórias que auxiliam no combate de infecções, como aplicação na resposta imune inata, mediação da endocitose por receptores e ativação do sistema complemento pela via clássica. Uma vez que um dos principais fatores de risco para o CHC é a infecção viral pelo vírus da hepatite B (VHB) ou C (VHC), a etiologia da hepatopatia primária pode determinar a ativação de vias de sinalização distintas no CHC. Sarvari et al. (2013) compararam o proteoma sérico de pacientes em três estágios – hepatite crônica ativa, cirrose e CHC – da infecção por VHC e VHB à indivíduos controle a partir de eletroforese bidimensional e LC-MS/MS. Os autores identificaram 15 proteínas diferencialmente expressas entre os grupos, dentre elas 5 (α -2-glicoproteína rica em leucina, transtirretina, α -1-antitripsina, isoformas de haptoglobina α -2 e isoformas de haptoglobina α)

apresentavam regulação positiva em pacientes com CHC por VHB em comparação a pacientes do mesmo estágio infectados por VHC. Em continuidade, Sarvari et al. (2014) compararam o proteoma sérico de pacientes com CHC de diferentes origens – VHB, VHC e CHC não viral – à indivíduos controle e identificaram 3 proteínas (α -2-glicoproteína rica em leucina, transtirretina e ficolina-3) diferencialmente expressas entre os grupos hepatite B e CHC não viral, e somente uma (isoformas de haptoglobina α -2) entre os grupos hepatite C e CHC não viral.

As principais funções moleculares atribuídas às proteínas reguladas reveladas nesse trabalho foram atividade de ligação, especificamente à antígenos ou receptores de imunoglobulina, atividade catalítica e degradação de proteínas por hidrólise enzimática, a partir principalmente de serina endopeptidases. Visto que as proteínas fornecem intermediários para formação de diversas moléculas ativas, como anticorpos, e desempenham função reparadora em organismos, estas compreendem muitos dos efetores mobilizados durante a sinalização celular na resposta imune antitumoral. Por conseguinte, os resultados demonstram indícios da existência de respostas imunes antitumorais em alguns tipos de câncer, como o CHC, conceito cuja importância impulsionou a atualização das alterações fisiológicas adquiridas pelas células cancerígenas, capazes de ditar o desenvolvimento maligno (HANAHAN; WEINBERG, 2011). Além disso, expressam o reflexo da reprogramação metabólica ocasionado pelo crescimento e proliferação celular contínua, com a mobilização de vias alternativas para suprir a demanda energética e síntese de intermediários para a produção de novas proteínas, lipídeos e ácidos nucleicos (BAENKE et al., 2013).

As anotações funcionais em EC revelaram que dentre as 217 proteínas avaliadas pelo *software* Blast2GO, 61 apresentavam função enzimática predominantemente como proteases. As alterações não hereditárias na atividade de proteases, envolvidas em muitos processos metabólicos intrínsecos – especialmente coagulação, inflamação, desenvolvimento e apoptose –, podem resultar no desenvolvimento de neoplasias malignas (FRÖHLICH, 2004). A maioria das enzimas identificadas pertencem ao grupo das serina endopeptidases, proteases inibidas pela ligação covalente a serpinas como PAI-1 e α -1 antitripsina, já correlacionadas a hepatocarcinogênese (AHN et al., 2012; ZHOU et al., 2000). Serina endopeptidases como NS3 desempenham importante papel na maturação e replicação do VHC, e na proliferação e morte celular durante o desenvolvimento do CHC provocado pela infecção (MAO et al., 2003; NEDDERMANN et al., 1997; ZEMEL et al., 2001).

A maioria das proteínas indicadas no presente estudo como candidatas a prospecção de biomarcadores foi funcionalmente anotada em termos GO. Embora cerca de 44% das evidências representem métodos não verificados, grande parte dos termos associados foram atribuídos também a evidências experimentais (33%). As proteínas com o maior número de anotações, molécula de adesão celular vascular-1 (VCAM-1) e profilina-1, são reguladas positivamente em pacientes com CHC.

Wadkin et al. (2017) analisaram tecido hepático e linfócitos isolados de amostras de sangue de pacientes submetidos ao transplante de fígado. As amostras de tecido não patológico foram obtidas de doadores rejeitados ou do tecido adjacente à ressecção hepática. Ensaios de adesão para análise do fluxo funcional por meio de linfócitos humanos primários e células endoteliais sinusoidais hepáticas humanas demonstraram atividade colaborativa entre as moléculas VCAM-1, membro da superfamília das imunoglobulinas e responsável pela adesão endotelial, e o receptor CD151, aplicado na modulação da atividade de várias famílias de proteínas transmembrana e associado ao desenvolvimento e progressão de vários tipos de câncer (CHIEN et al., 2008; KWON et al., 2012). Os resultados revelaram ainda que CD151 é regulado positivamente no fígado durante a inflamação crônica e fornece suporte ao recrutamento de linfócitos pelo endotélio hepático, logo, o receptor pode estar aplicado na regulação da atividade de VCAM-1 no recrutamento de linfócitos para o fígado humano.

De acordo com as anotações GO a proteína VCAM-1 é observada em diversas organelas celulares, endossomas e principalmente em membranas plasmáticas. No meio extracelular podem apresentar-se também em exossomas. Atua na interação com a matriz extracelular, exercendo funções relacionadas à adesão celular, especialmente adesão leucocitária; resposta às condições do microambiente, como hipóxia e disposição de nutrientes; mediação da sinalização de diversos fatores, como TNF- α e IFN- γ ; e resposta inflamatória aguda e crônica.

Shen et al. (2016) avaliando tecido com CHC e tecido adjacente ao tumor de 86 pacientes em estágio avançado, observaram associação entre a redução dos níveis de profilina-1 e baixa taxa de sobrevivência. Os autores analisaram ainda a relação entre um bioativo encontrado em frutos de *Garcinia yunnanensis* e os níveis de expressão da proteína em diversas linhagens celulares de CHC. Os resultados demonstraram que a alta expressão de profilina-1 inibe a motilidade celular e capacidade metastática, além de reduzir os níveis de F-actina e a expressão de

proteínas aplicadas na nucleação, ramificação e polimerização da actina. Dessa forma, o estado de regulação positivo da proteína relatado no presente estudo pode estar associado a progressão tumoral pela desestruturação do citoesqueleto celular, e consequente perda de funcionalidade, e desestabilização do anel contráctil durante a divisão celular, favorecendo o desenvolvimento de anomalias cromossômicas numéricas.

Segundo as anotações GO observadas, a profilina é disposta principalmente no núcleo, citoesqueleto e córtex celular. No meio extracelular podem apresentar-se em exossomas e micropartículas sanguíneas. Dentre as funções, podem ser descritas a estruturação dinâmica das células por meio da interação com a actina; regulação da migração de células epiteliais por meio da adesão focal; regulação da transcrição de diversos fatores ligados principalmente ao metabolismo do RNA; ativação da atividade de ATPase e GTPase; polarização celular pela via de sinalização Wnt; e interação com receptores por meio da região rica em prolina. Também atua na rede neural nos processos de projeção neuronal e sinapse.

As HGFL, potencializadora de pró-colágeno C-endopeptidase tipo 1 e fator reumatóide RF-ET6 apresentaram regulação negativa em pacientes com CHC. O contrário ocorreu às demais proteínas candidatas à biomarcadores, com regulação positiva se comparado a condição controle.

A proteína HGFL e seu receptor RON, estão associados ao desenvolvimento de lesões crônicas. Glasbey et al. (2015) observaram aumento significativo na expressão do transcrito de ambas as moléculas em tecido humano em processos de injúria aguda se comparado aos processos de injúria crônica, expressão mínima em cicatrização crônica e injúria crônica não cicatricial, e aumento em comparação a pele regular, embora não significativo. Uma vez que o CHC é a principal complicação de um processo degenerativo crônico do fígado, infere-se que a regulação negativa da proteína descrita no presente estudo seja resultante do quadro clínico cirrótico dos pacientes.

Embora o tratamento de queratinócitos humanos imortalizados (HaCaT) com HGFL recombinante humano tenha revelado aumento da migração celular mas nenhum efeito sobre a taxa de crescimento (GLASBEY et al., 2015), no câncer de próstata a HGFL endógeno contribui para a sobrevivência de células tumorais por meio da ativação da via STAT3 e consequente inibição da apoptose pela proteína Bcl-2 (VASILIAUSKAS et al., 2014). As anotações funcionais em termos GO demonstram

que a proteína constitui majoritariamente o meio extracelular e participa da regulação de outras vias de sinalização, como JAK-STAT e de processos como expressão gênica, apoptose de células epiteliais, quimiotaxia de macrófagos e gluconeogênese. Possui ainda atividade proteolítica como serina endopeptidase e participa do desenvolvimento de espermatozóides e glândulas mamárias.

A proteína potencializadora de pró-colágeno C-endopeptidase tipo 1 pode estar aplicada na fibrogênese hepática, visto que seu gene (PCOLCE) é fortemente correlacionado ao fenótipo e foi observada regulação positiva dose dependente de seu produto gênico em plasma de ratos a partir da administração de produtos fibrinogênicos (IPPOLITO et al., 2016). Ogata et al. (1997) demonstraram que a expressão do mRNA do gene é regulada positivamente em fígado cirrótico de ratos – induzido por tetracloreto de carbono – e que as células de Kupffer, principais produtoras de colágeno do tipo 1, são responsáveis pela expressão hepática. Os autores demonstraram ainda que a superexpressão é possivelmente regulada por TGF- β 1. De acordo com as anotações GO, a proteína é disposta no meio extracelular como ligante de heparina e principalmente colágeno. Atua na regulação e ativação da clivagem de peptídeos.

Fatores reumatóide são uma classe de imunoglobulinas direcionadas contra a região Fc da IgG, observadas não só em doenças auto-imune, mas também em outras condições patológicas e indivíduos saudáveis (INGEGNOLI; CASTELLI; GUALTIEROTTI, 2013). O anticorpo tem sido relacionado a resultados falsamente elevados do marcador sérico AFP durante imunoensaio para avaliação de pacientes com CHC, favorecendo diagnósticos incorretos da doença (ZHU et al., 2014). Apesar da ausência de evidências da associação entre o fator ET6 e o CHC na literatura, Ghonaim et al. (2005) demonstraram maior prevalência do fator reumatóide entre outros anticorpos – anticorpos antinuclear, antimitocondrial, anti célula parietal e anti microssoma hepático/renal – em pacientes com CHC.

A proteína cofilina-1 foi associada a resistência à drogas terapêuticas no CHC. Liao et al. (2017) analisaram o inibidor de histona desacetilase (HDCAi) na resistência à drogas em linhagem celular HA22T de CHC. A inibição da proteína, altamente expressa em células de linhagem resistente ao inibidor, reduz a migração e aumenta a apoptose celular. Ademais, sua fosforilação pela via ERK1/2 protege contra lesões provocadas pelo inibidor, portanto, a proteína cofilina-1 pode estar associada a motilidade, metástase e mecanismos de defesa em células tumorais no CHC.

Segundo as anotações GO, a proteína constitui o citoesqueleto, membranas plasmáticas, vesículas e exossomas. As principais funções moleculares são estruturação dinâmica das células por meio da interação com a actina; projeção citoplasmática (na transição epitelial-mesenquimal – EMT) e adesão celular; resposta e regulação positiva do processo viral pelo hospedeiro; e regulação negativa da apoptose.

A proteína não caracterizada DKFZp686H20196, embora não descrita na literatura, foi associada à 24 termos GO. As anotações demonstram que a proteína é localizada na membrana plasmática e no meio extracelular, em exossomas ou micropartículas sanguíneas. Envolvida principalmente na resposta imune, tanto inata quanto adaptativa, é mobilizada na via de sinalização dos receptores de linfócitos B e contribui para os processos de fagocitose, resposta às bactérias gram-negativas e ativação do sistema complemento pela via clássica. Possui atividade de ligação a antígenos e peptídeos glicosilados, bem como participa da formação de complexos com a IgM.

A proteína BRE foi associada a evasão da apoptose e proliferação celular no CHC. A expressão elevada da proteína, *in vivo* e *in vitro*, resulta na inibição da via intrínseca apoptótica mitocondrial e consequente atenuação da apoptose induzida por receptores e estresse (CHAN et al., 2008; LI et al., 2004). Em células CD95 do tipo II, como os hepatócitos primários, a via dependente de mitocôndria é fundamental na apoptose mediada por receptores (CHUI et al., 2010; SCAFFIDI, 1998). Chui et al. (2010) induziram tumor hepático em ratos transgênicos expressando a proteína humana no fígado para avaliar a correlação com o desenvolvimento de CHC. Os autores observaram aumento do tamanho do tumor se comparado ao controle, sem alteração do número de nódulos encontrados. Os resultados sugerem que a proteína BRE desempenha importante papel na proliferação de células cancerígenas, sem interceder na promoção da carcinogênese. As anotações GO demonstram que a proteína é expressa na membrana plasmática e no meio extracelular, em micropartículas secretadas no sangue. Envolvida na resposta imune, está aplicada na ativação do sistema complemento pela via clássica, mediação da endocitose e da sinalização de receptores reconhecedores de IgG e IgE, ligação a antígenos e atividade proteolítica como serina endopeptidase.

A expressão elevada da proteína COMP foi fortemente associada ao desenvolvimento de cirrose e do CHC por Norman et al. (2015). Durante estudo, os

autores detectaram a proteína (> 15 U/L) no soro de 22%-36% dos 187 pacientes avaliados com doenças hepáticas crônicas. Destes, 83% já apresentavam quadro cirrótico, com elevação significativa do nível sérico de COMP. Entre aqueles que desenvolveram CHC ao decorrer da pesquisa, 74% eram positivos para a proteína. Adicionalmente, análises estatísticas estabeleceram correlação entre indicadores laboratoriais, como AFP e enzimas hepáticas, e a positividade da proteína. Xiao et al. (2004) no entanto observaram que a proteína é ausente ou raramente expressa em tecido hepático regular e cirrótico, mas significativamente superexpressa em amostras de CHC avaliadas por *Northern* e *Western Blot*. Segundo as anotações em termos GO, a proteína COMP constitui essencialmente o meio e matriz extracelulares, favorecendo a adesão celular e a ligação a diversas moléculas, como cálcio, heparina, colágeno e proteases. Além do desenvolvimento cartilaginoso, foi associada a regulação negativa do processo apoptótico.

O plasma sanguíneo, apresenta cerca de 60 a 80 mg/ml de proteína, dos quais a Alb compreende até 55% do conteúdo proteico enquanto imunoglobulinas, transferrina, haptoglobina e lipoproteínas constituem aproximadamente 35%, totalizando 90% do proteoma plasmático (ANDERSON; ANDERSON, 2002; BELLEI et al., 2011). A IgG representa a segunda proteína mais abundante, por conseguinte, métodos de depleção de proteínas altamente abundantes em plasma frequentemente dirigem-se não só a Alb mas também à essa classe de proteínas (BELLEI et al., 2011).

No presente estudo, foi observado regulação positiva da cadeia leve de IgG em pacientes com CHC. Embora o processo de depleção reduza a complexidade da amostra, mesmo a remoção de 90% de um componente principal ainda resulta em elevada concentração na amostra se comparado às outras proteínas plasmáticas (PARKER; BORCHERS, 2014). Ademais, características físico-químicas intrínsecas a própria molécula, como variações estruturais da cadeia lateral dos peptídeos e modificações pós traducionais, como fosforilação e glicosilação, podem interferir no processo de ionização de modo a favorecer alguns analitos e alterar a razão m/z de forma a dificultar a identificação das proteínas. A maioria das moléculas essenciais para a resposta imune inata e adaptativa, inclusive as cinco classes de imunoglobulinas, são glicoproteínas (LAUC et al., 2016; PUČIĆ et al., 2010). Por conseguinte, atribui-se à regulação diferencial de somente alguns componentes estruturais de imunoglobulinas, a variação de propriedades físicas e químicas dessas moléculas.

As anotações GO revelaram que a cadeia leve de IgG está funcionalmente disposta em membranas plasmáticas e no meio extracelular, ocasionalmente em exossomas e micropartículas sanguíneas. Como parte constituinte da resposta imune, atua na mediação da fagocitose, ativação do sistema complemento pela via clássica, ativação e regulação de linfócitos B, ligação a antígenos e defesa contra agentes bacterianos. Apresenta atividade proteolítica como serina endopeptidase e participa de complexos na circulação sanguínea. Apesar do mecanismo de patogênese mediado pela IgG não ter sido bem descrito, a presença do efector foi associada ao crescimento do tumor, uma vez que a incubação com anticorpos séricos de pacientes com CHC promovem proliferação *in vitro* de células tumorais e pacientes expressando o anticorpo no tecido hepático apresentam tumores maiores e elevada incidência de trombose na veia porta (YI et al., 2015). Em carcinomas, IgGs de especificidade desconhecida podem ser secretados diretamente pelas células tumorais e fornecer suporte a sobrevivência e proliferação durante a carcinogênese (QIU et al., 2003).

Embora não descrita na literatura, a proteína altamente similar à cadeia pesada alfa da região constante de IgA tipo I regulada positivamente em pacientes com CHC foi associada à 23 termos GO. Disposta em membranas plasmáticas, no meio extracelular e em micropartículas sanguíneas, a proteína participa da mediação de sinalizações em respostas imune, como ativação de linfócitos B, ligação a antígenos, ativação do sistema complemento pela via clássica e fagocitose. Todavia a presença de IgA, aplicada especialmente na resposta contra bactérias e vírus, foi associada à infecção ativa por vírus da hepatite C, bem como seu desaparecimento à resposta positiva em terapias com IFN (TANAKA et al., 1995). Além disso seu receptor polimérico é mediador na indução da EMT por meio da sinalização por proteínas SMAD e quando altamente expresso correlaciona-se a metástase e recorrência precoce do CHC em estágios iniciais (AI et al., 2011).

Infelizmente os polipeptídeos identificados: região variável da cadeia leve κ 4-1 de imunoglobulina, região variável da cadeia pesada de imunoglobulina reativa à miosina, região variável da cadeia pesada GCT-A1, região variável da cadeia pesada de imunoglobulina, região variável da cadeia pesada de antitireoglobulina e região variável da cadeia pesada de antienterotoxina D de *Staphylococcus* reguladas positivamente em pacientes com CHC não foram funcionalmente anotadas, possivelmente devido à escassez de estudos na literatura acerca da aplicação na doença.

5. CONCLUSÃO

O presente estudo demonstrou e caracterizou, por meio de técnicas de proteômica diferencial, as alterações no perfil global de proteínas em plasma de pacientes hepatopatas terminais em comparação aos indivíduos controle. A aplicação de critérios baseados na abundância (*Fold Change*) e representatividade (*VIP score*) das proteínas caracterizadas como reguladas permitiu a identificação de 17 proteínas candidatas à biomarcadores em método diagnóstico não invasivo para o CHC e outras doenças hepáticas. Destas, 10 foram funcionalmente anotadas em termos GO e associadas à estudos sobre neoplasias, majoritariamente acerca do carcinoma hepatocelular, na literatura internacional. Estudos complementares são ainda necessários para avaliação da capacidade diagnóstica das proteínas discriminantes reveladas.

6. REFERÊNCIAS

- AEBERSOLD, R.; MANN, M. Mass spectrometry-based proteomics. **Nature**, v. 422, n. 6928, p. 198–207, 13 mar. 2003.
- AHN, Y. H. et al. A lectin-coupled, targeted proteomic mass spectrometry (MRM MS) platform for identification of multiple liver cancer biomarkers in human plasma. **Journal of Proteomics**, v. 75, n. 17, p. 5507–5515, 18 set. 2012.
- AI, J. et al. The Role of Polymeric Immunoglobulin Receptor in Inflammation-Induced Tumor Metastasis of Human Hepatocellular Carcinoma. **JNCI: Journal of the National Cancer Institute**, v. 103, n. 22, p. 1696–1712, 16 nov. 2011.
- ANDERSON, N. L.; ANDERSON, N. G. The Human Plasma Proteome. **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 1, n. 11, p. 845–867, nov. 2002.
- ANG, I. L. et al. Study of Serum Haptoglobin and Its Glycoforms in the Diagnosis of Hepatocellular Carcinoma: A Glycoproteomic Approach. **Journal of Proteome Research**, v. 5, n. 10, p. 2691–2700, out. 2006.
- AWAN, F. M. et al. Identification of Circulating Biomarker Candidates for Hepatocellular Carcinoma (HCC): An Integrated Prioritization Approach. **PLoS One**, v. 10, n. 9, p. 29663340, 28 set. 2015.
- BAENKE, F. et al. Hooked on fat: the role of lipid synthesis in cancer metabolism and tumour development. **Disease Models & Mechanisms**, v. 6, n. 6, p. 1353–1363, 2013.
- BELLEI, E. et al. High-abundance proteins depletion for serum proteomic analysis: concomitant removal of non-targeted proteins. **Amino Acids**, v. 40, n. 1, p. 145–156, 22 jan. 2011.
- BHATIA, V. N. et al. Software Tool for Researching Annotations of Proteins: Open-Source Protein Annotation Software with Data Visualization. **Analytical Chemistry**, v. 81, n. 23, p. 9819–9823, 1 dez. 2009.
- CATHERMAN, A. D.; SKINNER, O. S.; KELLEHER, N. L. Top Down proteomics: Facts and perspectives. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 445, n. 4, p. 683–693, 21 mar. 2014.
- CHAN, B. C.-L. et al. BRE is an antiapoptotic protein in vivo and overexpressed in human hepatocellular carcinoma. **Oncogene**, v. 27, n. 9, p. 1208–1217, 20 fev. 2008.
- CHIEN, C.-W. et al. Regulation of CD151 by Hypoxia Controls Cell Adhesion and Metastasis in Colorectal Cancer. **Clinical Cancer Research**, v. 14, n. 24, p. 8043–8051, 15 dez. 2008.
- CHUI, Y.-L. et al. BRE over-expression promotes growth of hepatocellular carcinoma. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 391, n. 3, p. 1522–1525, 15 jan. 2010.
- CROWELL, A. M. J.; WALL, M. J.; DOUCETTE, A. A. Maximizing recovery of water-soluble proteins through acetone precipitation. **Analytica Chimica Acta**, v. 796, p. 48–54, 24 set. 2013.

- DANCEY, J. E.; CHEN, H. X. Strategies for optimizing combinations of molecularly targeted anticancer agents. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 5, n. 8, p. 649–659, ago. 2006.
- FENG, H.; WANG, M.; CHEN, W. N. iTRAQ-Coupled 2D LC–MS/MS Analysis of Secreted Proteome of HBV-Replicating HepG2 Cells: Potential in Biomarkers for Prognosis of HCC. **Current Microbiology**, v. 61, n. 4, p. 280–284, 18 out. 2010.
- FENN, J. et al. Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. **Science**, v. 246, n. 4926, p. 64–71, 6 out. 1989.
- FRÖHLICH, E. Proteases in malignant tumors. **DMW - Deutsche Medizinische Wochenschrift**, v. 129, n. 8, p. 391–395, 20 fev. 2004.
- GAO, Y. et al. Quantitative proteomics by SWATH-MS reveals sophisticated metabolic reprogramming in hepatocellular carcinoma tissues. **Scientific Reports**, v. 7, p. 45913, 5 abr. 2017.
- GHONAIM, M. et al. Autoantibodies in chronic liver disease. **The Egyptian Journal of Immunology**, v. 12, n. 2, p. 101–11, 2005.
- GLASBEY, J. et al. Expression of Hepatocyte Growth Factor-Like Protein in Human Wound Tissue and Its Biological Functionality in Human Keratinocytes. **Biomedicines**, v. 3, n. 1, p. 110–123, 4 fev. 2015.
- GOTZ, S. et al. High-throughput functional annotation and data mining with the Blast2GO suite. **Nucleic Acids Research**, v. 36, n. 10, p. 3420–3435, 15 abr. 2008.
- HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646–674, 2011.
- HEIN, M. Y. et al. Proteomic Analysis of Cellular Systems. In: WALHOUT, M.; VIDAL, M.; DEKKER, J. (Eds.). . **Handbook of Systems Biology**. 1st. ed. [s.l.] Elsevier Inc., 2013. p. 3–25.
- HISAI, H. et al. Increased expression of angiogenin in hepatocellular carcinoma in correlation with tumor vascularity. **Clinical Cancer Research: an Official Journal of the American Association for Cancer Research**, v. 9, n. 13, p. 4852–4859, 15 out. 2003.
- INGEGNOLI, F.; CASTELLI, R.; GUALTIEROTTI, R. Rheumatoid Factors: Clinical Applications. **Disease Markers**, v. 35, n. 6, p. 727–734, 2013.
- IPPOLITO, D. L. et al. Gene Expression Patterns Associated With Histopathology in Toxic Liver Fibrosis. **Toxicological Sciences**, v. 149, n. 1, p. 67–88, jan. 2016.
- KARIMI, P.; SHAHROKNI, A.; NEZAMI RANJBAR, M. R. Implementation of Proteomics for Cancer Research: Past, Present, and Future. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 15, n. 6, p. 2433–2438, 30 mar. 2014.
- KIM, H. et al. Development of Biomarkers for Screening Hepatocellular Carcinoma Using Global Data Mining and Multiple Reaction Monitoring. **PLoS ONE**, v. 8, n. 5, p. e63468, 22 maio 2013.
- KULASINGAM, V.; DIAMANDIS, E. P. Strategies for discovering novel cancer biomarkers through utilization of emerging technologies. **Nature Clinical Practice Oncology**, v. 5, n. 10, p. 588–599, 12 out. 2008.

- KWON, M. J. et al. Clinical significance of CD151 overexpression in subtypes of invasive breast cancer. **British Journal of Cancer**, v. 106, n. 5, p. 923–930, fev. 2012.
- LAUC, G. et al. Mechanisms of disease: The human N-glycome. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, v. 1860, n. 8, p. 1574–1582, 2016.
- LEE, H.-J. et al. Abundance-Ratio-Based Semiquantitative Analysis of Site-Specific N-Linked Glycopeptides Present in the Plasma of Hepatocellular Carcinoma Patients. **Journal of Proteome Research**, v. 13, n. 5, p. 2328–2338, 2 maio 2014.
- LI, Q. et al. A Death Receptor-associated Anti-apoptotic Protein, BRE, Inhibits Mitochondrial Apoptotic Pathway. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 50, p. 52106–52116, 10 dez. 2004.
- LIAO, P.-H. et al. Phosphorylation of cofilin-1 by ERK confers HDAC inhibitor resistance in hepatocellular carcinoma cells via decreased ROS-mediated mitochondria injury. **Oncogene**, v. 36, n. 14, p. 1978–1990, 17 abr. 2017.
- LLOVET, J. M. et al. Hepatocellular carcinoma. **Nature reviews. Disease primers**, v. 2, p. 16018, 2016.
- MAO, H.-X. et al. Establishment of a cell-based assay system for hepatitis C virus serine protease and its primary applications. **World Journal of Gastroenterology**, v. 9, n. 11, p. 2474, nov. 2003.
- NEDDERMANN, P. et al. The nonstructural proteins of the hepatitis C virus: structure and functions. **Biological Chemistry**, v. 378, n. 6, p. 469–76, jun. 1997.
- NOH, C.-K. et al. Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H4 as a diagnostic and prognostic indicator in patients with hepatitis B virus-associated hepatocellular carcinoma. **Clinical Biochemistry**, v. 47, n. 13–14, p. 1257–1261, set. 2014.
- NORMAN, G. L. et al. Cartilage oligomeric matrix protein: A novel non-invasive marker for assessing cirrhosis and risk of hepatocellular carcinoma. **World Journal of Hepatology**, v. 7, n. 14, p. 1875–83, 18 jul. 2015.
- OGATA, I. et al. Up-regulation of type I procollagen C-proteinase enhancer protein messenger RNA in rats with CCl₄-induced liver fibrosis. **Hepatology**, v. 26, n. 3, p. 611–617, set. 1997.
- PALUCKA, A. K.; COUSSENS, L. M. The Basis of Oncoimmunology. **Cell**, v. 164, n. 6, p. 1233–1247, 2016.
- PARADIS, V. et al. Identification of a new marker of hepatocellular carcinoma by serum protein profiling of patients with chronic liver diseases. **Hepatology**, v. 41, n. 1, p. 40–47, jan. 2005.
- PARKER, C. E.; BORCHERS, C. H. Mass spectrometry based biomarker discovery, verification, and validation - Quality assurance and control of protein biomarker assays. **Molecular Oncology**, v. 8, n. 4, p. 840–858, jun. 2014.
- PUČIĆ, M. et al. Common aberrations from the normal human plasma N-glycan profile. **Glycobiology**, v. 20, n. 8, p. 970–975, ago. 2010.
- QIU, X. et al. Human epithelial cancers secrete immunoglobulin g with unidentified specificity to promote growth and survival of tumor cells. **Cancer Research**, v. 63, n. 19, p. 6488–95, 1 out. 2003.

- SARVARI, J. et al. Differentially Expressed Proteins in Chronic Active Hepatitis, Cirrhosis, and HCC Related to HCV Infection in Comparison With HBV Infection: A proteomics study. **Hepatitis Monthly**, v. 13, n. 7, p. e8351, 3 jul. 2013.
- SARVARI, J. et al. Comparative Proteomics of Sera From HCC Patients With Different Origins. **Hepatitis Monthly**, v. 14, n. 1, p. e13103, 2014.
- SCAFFIDI, C. Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. **The EMBO Journal**, v. 17, n. 6, p. 1675–1687, 16 mar. 1998.
- SCHUBERT, O. T. et al. Quantitative proteomics: challenges and opportunities in basic and applied research. **Nature Protocols**, v. 12, n. 7, p. 1289–1294, 1 jun. 2017.
- SHEN, K. et al. Guttiferone K suppresses cell motility and metastasis of hepatocellular carcinoma by restoring aberrantly reduced profilin 1. **Oncotarget**, v. 7, n. 35, p. 56650–56663, 30 ago. 2016.
- SHENG, X. et al. Identification of the Differential Expression Profiles of Serum and Tissue Proteins During Rat Hepatocarcinogenesis. **Technology in Cancer Research & Treatment**, v. 17, p. 1–13, 25 jan. 2018.
- SMITH, L. M.; KELLEHER, N. L. Proteoform: a single term describing protein complexity. **Nature Methods**, v. 10, n. 3, p. 186–187, 1 mar. 2013.
- SONG, T.; ALDREDGE, D.; LEBRILLA, C. B. A Method for In-Depth Structural Annotation of Human Serum Glycans That Yields Biological Variations. **Analytical Chemistry**, v. 87, n. 15, p. 7754–7762, 2015.
- TALEB, R. S. Z. et al. Quantitative proteome analysis of plasma microparticles for the characterization of HCV-induced hepatic cirrhosis and hepatocellular carcinoma. **Proteomics - Clinical Applications**, p. 1700014, 10 jul. 2017.
- TANAKA, M. et al. Clinical study of IgA antibody against hepatitis C virus core antigen in patients with type C chronic liver disease. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 40, n. 2, p. 457–64, fev. 1995.
- THUN, M. J.; HENLEY, S. J.; GANSLER, T. Inflammation and Cancer: An Epidemiological Perspective. In: CHADWICK, D. J.; GOODE, J. A. (Eds.). **Cancer and Inflammation: Novartis Foundation Symposium**. [s.l.] Novartis Foundation Symposium, 2008. v. 256p. 6–28.
- TSAI, T. H. et al. LC-MS/MS-based serum proteomics for identification of candidate biomarkers for hepatocellular carcinoma. **Proteomics**, v. 15, n. 13, p. 2369–2381, 2015.
- VASILIAUSKAS, J. et al. Hepatocyte growth factor-like protein is required for prostate tumor growth in the TRAMP mouse model. **Oncotarget**, v. 5, n. 14, p. 5547–58, 30 jul. 2014.
- WADKIN, J. C. R. et al. CD151 supports VCAM-1-mediated lymphocyte adhesion to liver endothelium and is upregulated in chronic liver disease and hepatocellular carcinoma. **American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 313, n. 2, p. G138–G149, 1 ago. 2017.
- WANG, J. et al. Identification of CHI3L1 and MASP2 as a biomarker pair for liver cancer through integrative secretome and transcriptome analysis. **Proteomics -**

Clinical Applications, v. 3, n. 5, p. 541–551, maio 2009.

XIA, J.; WISHART, D. S. Using MetaboAnalyst 3.0 for Comprehensive Metabolomics Data Analysis. In: **Current Protocols in Bioinformatics**. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2016. v. 55p. 14.10.1-14.10.91.

XIAO, Y. et al. Cartilage oligomeric matrix protein expression in hepatocellular carcinoma and the cirrhotic liver. **Journal of Gastroenterology and Hepatology**, v. 19, n. 3, p. 296–302, mar. 2004.

XIE, F. et al. Liquid Chromatography-Mass Spectrometry-based Quantitative Proteomics. **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 29, p. 25443–25449, 22 jul. 2011.

YI, C.-H. et al. Elevated core-fucosylated IgG is a new marker for hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma. **Oncolmmunology**, v. 4, n. 12, p. e1011503, 2015.

ZEMEL, R. et al. Cell transformation induced by hepatitis C virus NS3 serine protease. **Journal of Viral Hepatitis**, v. 8, n. 2, p. 96–102, mar. 2001.

ZHANG, D. et al. Predictive value of serum CEA, CA19-9 and CA125 in diagnosis of colorectal liver metastasis in Chinese population. **Hepato-gastroenterology**, v. 60, n. 126, p. 1297–301, set. 2013.

ZHOU, L. et al. Expression of urokinase-type plasminogen activator, urokinase-type plasminogen activator receptor, and plasminogen activator inhibitor-1 and -2 in hepatocellular carcinoma. **Pathology International**, v. 50, n. 5, p. 392–7, maio 2000.

ZHU, X. et al. Rheumatoid Factor Interference of α -Fetoprotein Evaluations in Human Serum by ELISA. **Clinical Laboratory**, v. 60, n. 11, p. 1795–800, 2014.

CAPÍTULO 3

Análise Lipidômica

“Descobrir consiste em olhar para o que todo mundo está vendo e pensar uma coisa diferente.”

(Roger Von Oech)

1. USO DA LIPIDÔMICA NOS ESTUDOS DE PROSPECÇÃO DE BIOMARCADORES NO CARCINOMA HEPATOCELULAR

Oncogenes podem ativar vias de sinalização de uma forma atípica e conseqüentemente alterar a biossíntese e abundância de múltiplas formas de lipídeos, impactando diretamente no tráfico de membrana, ligação de complexos aplicados na sinalização celular e numerosos processos críticos para a transformação celular (BAENKE et al., 2013).

A proliferação celular acentuada demanda suporte energético e produção eficiente de biomassa para expansão e disseminação, dessa forma, alterações do metabolismo lipídico, particularmente a ativação da lipogênese *de novo*, correlacionam-se ao desenvolvimento e a progressão do câncer (BELORIBI-DJEFAFLIA; VASSEUR; GUILLAUMOND, 2016; DEBERARDINIS et al., 2008; GAO et al., 2017). O processo lipogênico é mediado pela ativação de múltiplas enzimas e, em alguns tipos de tumores, a elevada expressão destas moléculas pode ser observada muito cedo no desenvolvimento do câncer, independentemente do estado proliferativo das células (MILGRAUM et al., 1997; PIYATHILAKE et al., 2000). Ademais, a proliferação de diversas linhagens celulares de câncer (PC3M, HepG2, HOP62 e T24), em condições de baixa concentração de lipídeos, é atenuada e apresenta maior dependência da via lipogênica (DANIËLS et al., 2014).

Há tempos, foi sugerido que o papel da lipogênese associada ao tumor pode se estender além da produção de membranas e permitir a modulação de propriedades biofísicas por meio da saturação lipídica para proteção contra a apoptose mediada por peroxidação lipídica (RYSMAN et al., 2010). Além disso, a ativação exarcebada de enzimas lipogênicas pode ocasionar o aumento da expressão de receptores de fator de crescimento epidérmico e fornecer suporte a carcinogênese (VAZQUEZ-MARTIN et al., 2008).

Em momentos de baixa nutricional, o acúmulo de lipídeos também fornece suporte energético para a progressão do tumor, portanto, a oncogênese também é associada a dependência da via β oxidação de ácidos graxos, mesmo em células que exibem alta taxa de atividade lipogênica, que se torna aumentada em condições ambientais de depleção de oxigênio e nutrientes (ARMITAGE; SOUTHAM, 2016;

BAENKE et al., 2013; BELORIBI-DJEFAFLIA; VASSEUR; GUILLAUMOND, 2016; KAMPHORST et al., 2013).

O tecido adiposo, como glândula endócrina, desempenha importante papel na secreção de adipocinas, adiponectinas e fatores de crescimento de hepatócitos (DENG et al., 2016). No microambiente tumoral, a mobilização de adipócitos é associado a proliferação e sobrevivência de células neoplásicas, bem como recrutamento e polarização de macrófagos a estado alternativo M2 (CORRÊA et al., 2017; DIRAT et al., 2010). Dessa forma, a reprogramação do metabolismo de lipídeos associada ao câncer, especialmente o recrutamento de adipócitos, estende-se a reserva de energia para síntese de intermediários durante a proliferação celular acentuada e permitem a modulação da resposta imune e consequente suporte ao desenvolvimento e progressão maligna.

De acordo com Wenk (2010), elucidar o metabolismo lipídico juntamente com análise de outras biomoléculas pode expandir o conhecimento acerca do sistema biológico e customizar as aplicações nas áreas de ciência e medicina. Uma vez que os metabólitos em fenótipos patológicos são irregulares e uma das principais funções fisiológicas do fígado é o metabolismo lipídico, a lipidômica tornou-se uma alternativa para avaliar diferentes cenários biológicos como um reflexo da assinatura metabólica associada ao CHC (JIANG et al., 2015).

Chen et al. (2013) descreveram o perfil global de lipídeos em soro de pacientes com hepatite B crônica, cirrose e carcinoma hepatocelular (CHC) por meio da técnica de UFLC-IT-TOF-MS. A análise demonstrou diferenças entre os cenários controle *versus* patológico e embora os perfis de cirrose e CHC tenham apresentado semelhanças, distinguiram do perfil de pacientes com hepatite. Lin et al. (2017) avaliando o lipidoma de diversas linhagens celulares de CHC, identificaram correlação entre o decaimento de ácido palmítico (C16:0) e o comportamento metastático das células tumorais. Após testes bioquímicos e investigações *in vitro* e *in vivo*, os autores relataram que tal alteração está relacionada com a fluidez da membrana plasmática e com a modulação do metabolismo da glicose, portanto pode ser um importante alvo na terapia do CHC agressivo.

2. MÉTODOS

A análise do perfil lipídico das amostras foi realizada a partir de protocolos que permitem a avaliação do perfil global e abundância relativa de lipídeos em cada grupo indicado no desenho experimental. Este tipo de avaliação também poderá gerar dados para uma análise futura sobre a interação entre as vias metabólicas primária (proteínas) e secundária (lipídeos). O processo de análise é resumido no fluxograma a seguir (Figura 38).

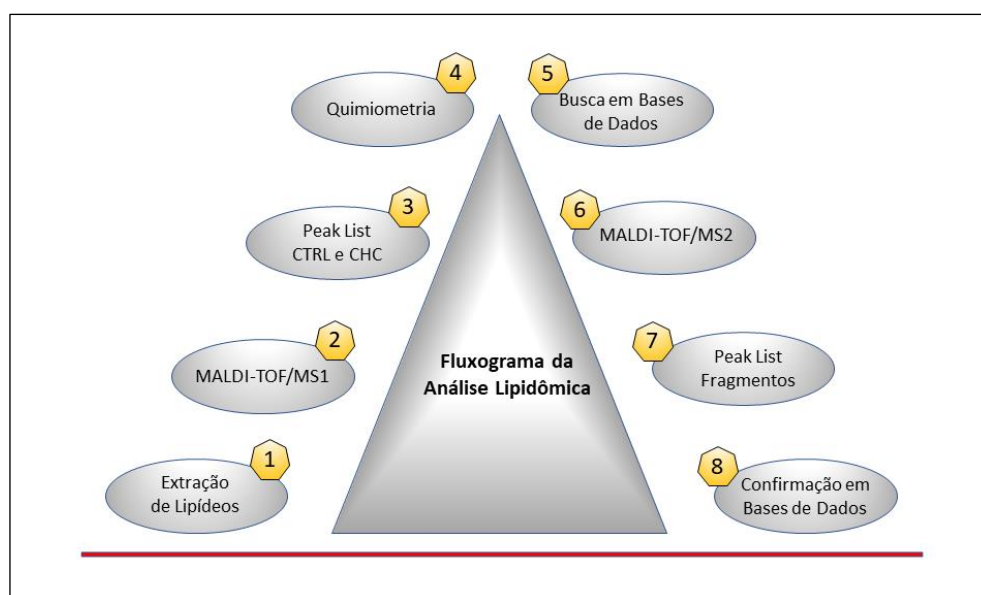


Figura 38: Fluxograma do método de análise do perfil lipídico. Resumo das principais etapas do processo de análise de lipídeos em plasma de pacientes com CHC e pacientes controles. Fonte: do autor (2018).

2.1. PRINCÍPIO DA TÉCNICA MALDI-TOF/TOF

O sistema MALDI-TOF/MS é amplamente aplicado para ionização e análise de micro e macromoléculas a partir de 4 passos principais, (1) mistura da amostra a uma matriz que absorve luz no mesmo comprimento de onda do feixe de laser a ser utilizado; (2) aplicação da mistura em estado aquoso sobre um anteparo, onde é deixada até que o solvente evapore, restando matriz e amostra co-cristalizadas; (3) irradiação do anteparo com laser UV a fim de provocar a ionização e dessorção da

mistura; (4) atração dos íons em fase gasosa para o analisador de massas do tipo TOF, onde são separadas a partir da razão m/z (CHO et al., 2015). Uma vez que íons de massas diferentes atravessam uma distância fixa em diferentes tempos, o analisador TOF em modo linear ou refletivo separa íons de carga igual de acordo com o tempo de voo molecular sobre aceleração constante de um campo elétrico até um detector. Para detecção da razão m/z de fragmentos em sistema MALDI-TOF/TOF, é necessário não só a seleção típica de íons para fragmentação como a aplicação de nova força de aceleração sob o campo elétrico, uma vez que os fragmentos tendem por inércia a comportar-se como seus íons precursores (SUCKAU et al., 2003).

Devido à sua facilidade de uso, alta sensibilidade e frequência analítica, baixo risco de contaminação cruzada entre as amostras e potencial aplicação futura na clínica prática, a análise por MALDI-TOF/MS é considerada uma abordagem atrativa para estudos de caracterização de metabólitos, especialmente lipídeos, em doenças complexas como o câncer (CHO et al., 2015; SERNA et al., 2015). Diversos autores elegeram a técnica para estudos de prospecção de biomarcadores tumorais e alvos terapêuticos na doença (CHO et al., 2017; PASSOS-CASTILHO et al., 2015; ROS-MAZURCZYK et al., 2017).

2.2. PREPARAÇÃO DE AMOSTRAS

Os lipídeos foram extraídos de acordo com o protocolo modificado de Bligh e Dyer (1959). Primeiramente, foram diluídos 150 μ L de plasma em água Milli-Q® (1:1, v/v) e adicionados 190 μ L de CHCl_3 e 375 μ L de MeOH. Após homogeneização por vórtex durante 2 min, foram adicionados mais 190 μ L de CHCl_3 e 150 μ L de água Milli-Q®, homogeneizando novamente por vórtex por 1 min. Para induzir separação de fases, centrifugou-se a mistura a 14000g em temperatura ambiente durante 5 min. A fase orgânica inferior foi recuperada, liofilizada em concentrador rotatório *SpeedVac*™ SC100 (Savant™) e reconstituída em 100 μ L de solução de $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (1:1, v/v). Uma gota (1 μ L) foi então aplicada em um poço da placa de MALDI e espontaneamente seca ao ar livre. Posteriormente, uma gota (1 μ L) de matriz DHB, preparada a uma concentração de 10mg/mL⁻¹ em MeOH, foi aplicada sobre a amostra e seca ao ar livre novamente.

A calibração do espectrômetro foi realizada a partir de uma mistura de fosfolípidos e peptídeos composta por DPPC, PC, SM, oleil PC, angiotensina I, angiotensina II, substância P, bombesina, substrato de renina, peptídeo do lobo intermediário semelhante à corticotropina (1-17 e 18-39) e somatostatina (28). Todos os reagentes químicos apresentavam grau de pureza HPLC.

2.3. ANÁLISE POR MALDI-TOF/TOF

As amostras foram analisadas por um espectrômetro de massas tipo Autoflex III MALDI-TOF/TOF (Bruker Daltonics) equipado com um laser de feixe inteligente de 334nm. Os dados de espectrometria de massas (MS), em ambas as etapas, foram adquiridos em modo refletor positivo com faixa de aquisição para lipídeos entre 600-1200 m/z . A energia do laser foi ajustada logo acima do limite para a produção de íons, com extração tardia de 260ns a 20kV de ionização. Com uma média de 5000 tiros a laser (1000 tiros a laser em 5 posições diferentes no mesmo poço), os espectros de massas foram adquiridos em triplicatas técnicas e coletados manualmente.

Os dados de MS sequenciais (*tandem*) foram adquiridos a partir da ativação do dispositivo *lift* e fragmentação por dissociação induzida por colisão (CID) com energia normalizada em 20keV. Para o processamento, foi utilizada a ferramenta AutoExecute do *software* de aquisição FlexControl (Versão 2.4; Bruker-Daltonik GmbH). Apenas os picos de íons com uma relação $S/N > 3$ foram considerados.

No *software* FlexAnalysis (Versão 3.3; Bruker-Daltonik GmbH), para cada dado de MS obtido, incluindo as triplicatas, foram selecionados os parâmetros m/z e intensidade relativa com a finalidade de construir arquivos pertencentes a uma *Peak List* de cada grupo do desenho experimental.

2.4. QUIMIOMETRIA

Os dados organizados em forma de *Peak List* foram inseridos no *software* MetaboAnalyst 3.0® (<http://www.metaboanalyst.ca>) (XIA; WISHART, 2016), onde primeiramente foi realizado o tratamento de dados por meio do alinhamento automático dos valores *m/z*, normalização por soma e centralização em média dividida pela raiz quadrada do desvio padrão de cada variável (escala de Pareto). Picos que apareceram em menos que 50% das amostras de cada grupo foram ignorados.

Foram realizadas análises univariadas, multivariadas, de agrupamento e de classificação. Inicialmente, o Teste t-student não paramétrico foi empregado para avaliar a significância estatística ($p < 0.05$) dos íons lipídicos adquiridos. Em sequência, a análise multivariada não supervisionada PCA permitiu observar a tendência de agrupamento das amostras.

As análises multivariadas supervisionadas PLS-DA e *Orthogonal* PLS-DA avaliaram a covariância presente no conjunto de dados, sendo a segunda análise mais adequada ao modelo de biomarcadores devido a capacidade de distinguir variações de dados relevantes e irrelevantes para a predição de cenários.

Análises não supervisionadas de agrupamento hierárquico e não hierárquico foram realizados para revelar semelhanças entre os grupos. O dendograma baseou-se na distância euclidiana calculada pelo algoritmo Ward para minimizar perdas geradas pelo agrupamento. Já o *heatmap* utilizou correlação de Pearson calculada pelo algoritmo Ward a partir de dados gerados pelo *VIP score* (PLS-DA *imp. features*). A técnica *K-means* foi aplicada complementarmente para observar partições disjuntas.

O método de classificação supervisionada *Random Forest* identificou os dados a partir de 7 preditores que combinam 500 alternativas de classificação cujas representações seguem o modelo de um fluxograma. Foram considerados espaços amostrais randomizados.

2.5. IDENTIFICAÇÃO DAS MOLECULAR FEATURES

A análise PLS-DA permitiu a seleção de *molecular features* (padrões moleculares) que melhor contribuíram para a discriminação entre CHC e amostras não patológicas, eleitos a partir do *VIP score* (*imp. features*).

No *software* FlexAnalysis (Versão 3.3; Bruker-Daltonik GmbH), em cada amostra avaliada em MS, selecionou-se a razão *m/z* correspondente a cada *molecular feature* discriminativa para o respectivo cenário com a finalidade de construir arquivos pertencentes a uma *Peak List* de cada grupo do desenho experimental (APÊNDICE G e H). Os dados adquiridos foram inseridos nas bases HMDB® e LIPID MAPS® para identificação (FAHY et al., 2009; WISHART et al., 2007).

A mesma abordagem foi realizada após a obtenção dos dados de fragmentação (MS/MS), contudo foram selecionados os parâmetros *m/z* e intensidade relativa dos fragmentos das *molecular features* discriminantes (íons precursores) para confirmação da identificação nos bancos de dados HMDB®, LIPID MAPS®, METLIN™, MINE® e KEGG (janeiro/2018) a partir da ferramenta *on-line* CEU Mass Mediator© (GIL DE LA FUENTE et al., 2018).

3. RESULTADOS

3.1. CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL DE LIPÍDEOS

A análise multivariada não supervisionada PCA verificou projeções (autovetores PC1 e PC2) em que os dados podem ser compilados, apresentando a tendência de agrupamento dos dados. O resultado revela semelhanças na estrutura interna dos dados apesar da diferença fenotípica observada nos pacientes do estudo (Figura 39). A Figura 40 apresenta a influência de cada variável original sob os componentes principais traçados. As amostras fora da região de confiança foram retiradas do conjunto de dados para confirmação de *outliers*, porém não houve melhora estatística da análise, indicando que o afastamento atípico provavelmente refere-se a variações intrínsecas aos indivíduos do mesmo cenário biológico.

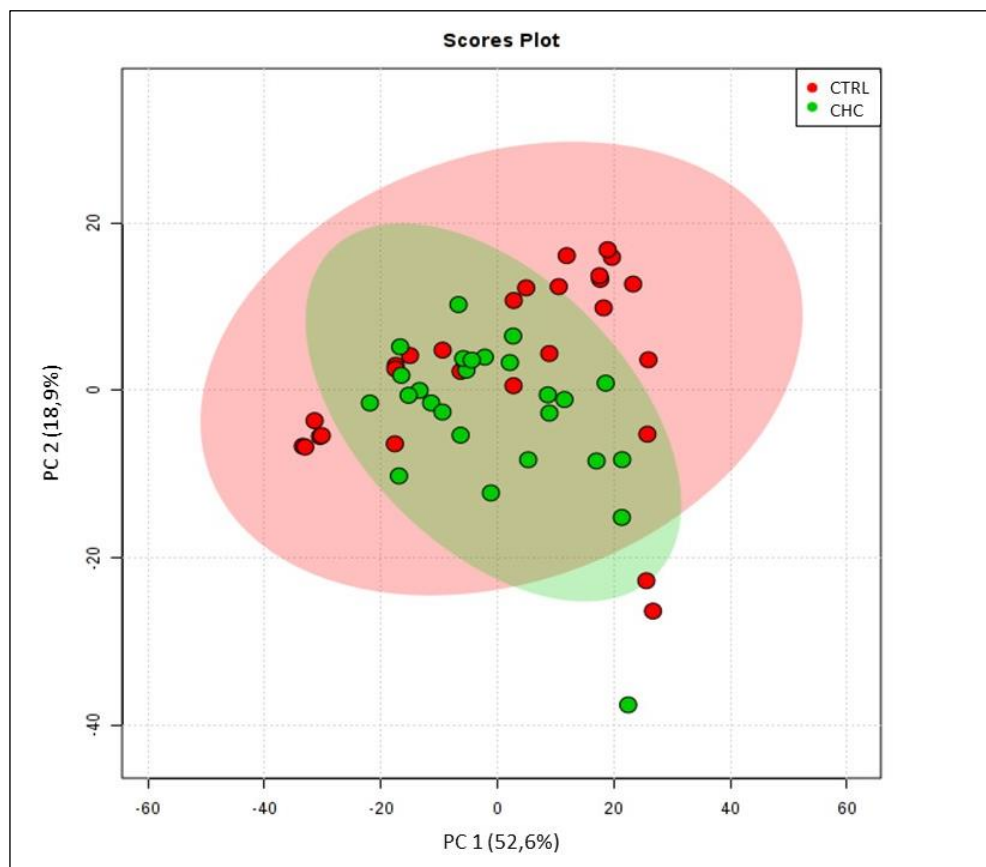


Figura 39: Análise PCA apresentando os *scores plot* dos lipídeos avaliados em plasma de pacientes com CHC e pacientes controle ($p < 0.05$). O percentual de cada eixo revela a variância explicada em cada projeção traçada, sendo que PC1 apresenta melhor representatividade dos dados

analisados. Os pacientes pertencentes ao estudo analisados em triplicatas são representados em pequenas esferas vermelhas e verdes, de acordo com o cenário de origem. No total, 3 replicatas (2 CTRL e 1 CHC) apresentaram afastamento atípico do conjunto de dados. As regiões elípticas correspondem ao intervalo de 95% de confiança. Fonte: adaptado do *software* MetaboAnalyst.

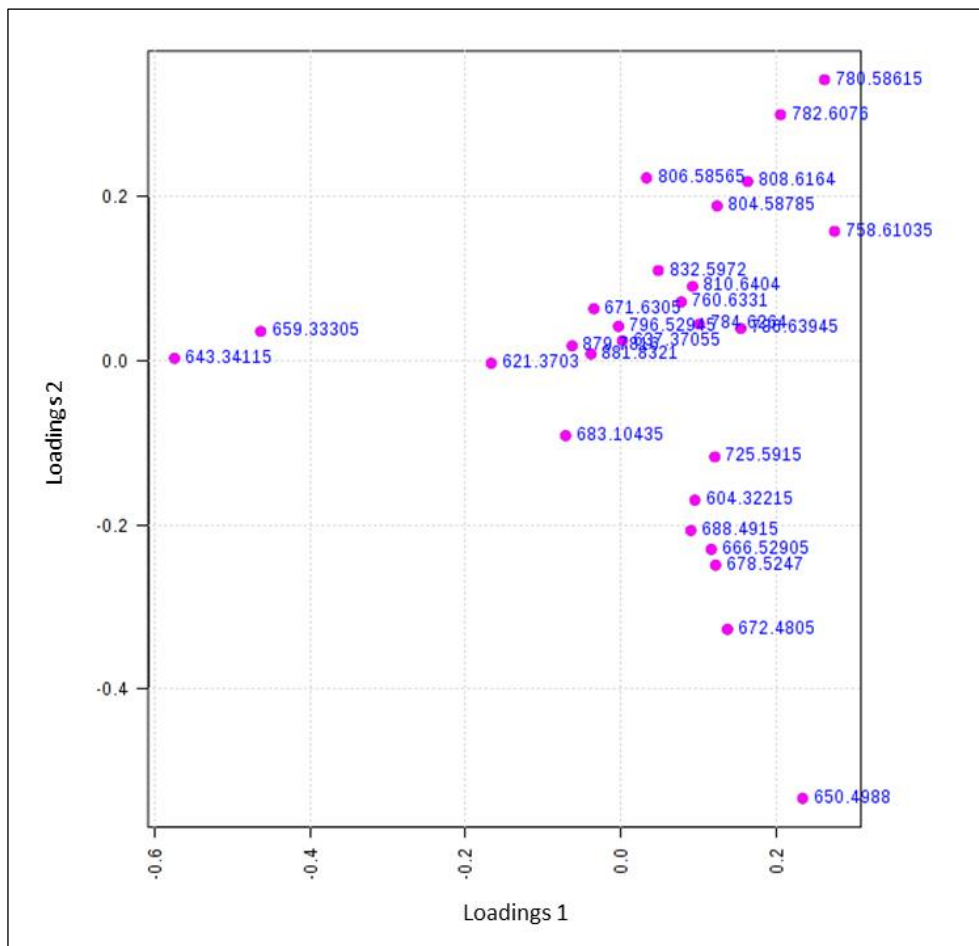


Figura 40: Análise PCA apresentando os *loadings plot* dos lipídeos avaliados em plasma de pacientes com CHC e pacientes controle ($p < 0.05$). A distribuição dos íons, representados em pequenas esferas rosa, demonstra a influência de cada variável sob os componentes principais traçados. Os íons de 643.34115 *m/z*, 659.33305 *m/z* e 650.4988 *m/z* apresentaram afastamento atípico do conjunto de dados. Fonte: adaptado do *software* MetaboAnalyst.

A análise multivariada supervisionada PLS-DA (Figura 41) demonstrou a covariância dos dados a partir da projeção de componentes. A Figura 42 apresenta a influência de cada variável original sob os componentes traçados. O modelo, cuja validação cruzada é apresentada na Figura 43, revelou ligeira dissociação entre os cenários. As amostras fora da região de confiança foram retiradas do conjunto de dados para confirmação de *outliers*, porém não houve melhora estatística da análise, indicando que o afastamento atípico provavelmente refere-se a variações intrínsecas aos indivíduos do mesmo cenário biológico.

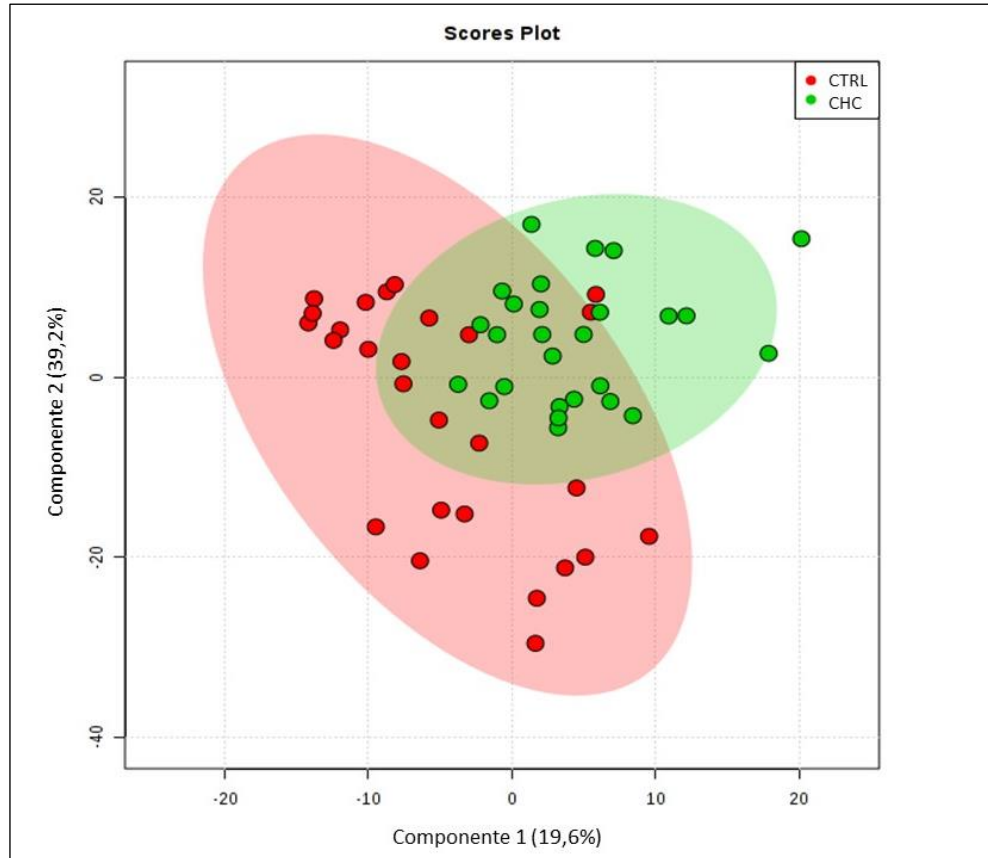


Figura 41: Análise por PLS-DA apresentando os *scores plot* dos lipídeos avaliados em plasma de pacientes com CHC e pacientes controle ($p < 0.05$). O percentual de cada eixo revela a covariância explicada em cada projeção traçada, sendo que o Componente 2 apresenta melhor representatividade dos dados analisados. Os pacientes pertencentes ao estudo analisados em triplicatas são representadas em pequenas esferas vermelhas e verdes, de acordo com o cenário de origem. No total, 3 replicatas (1 CTRL e 2 CHC) apresentaram afastamento atípico do conjunto de dados. As regiões elípticas correspondem ao intervalo de 95% de confiança. Fonte: adaptado do *software* MetaboAnalyst.

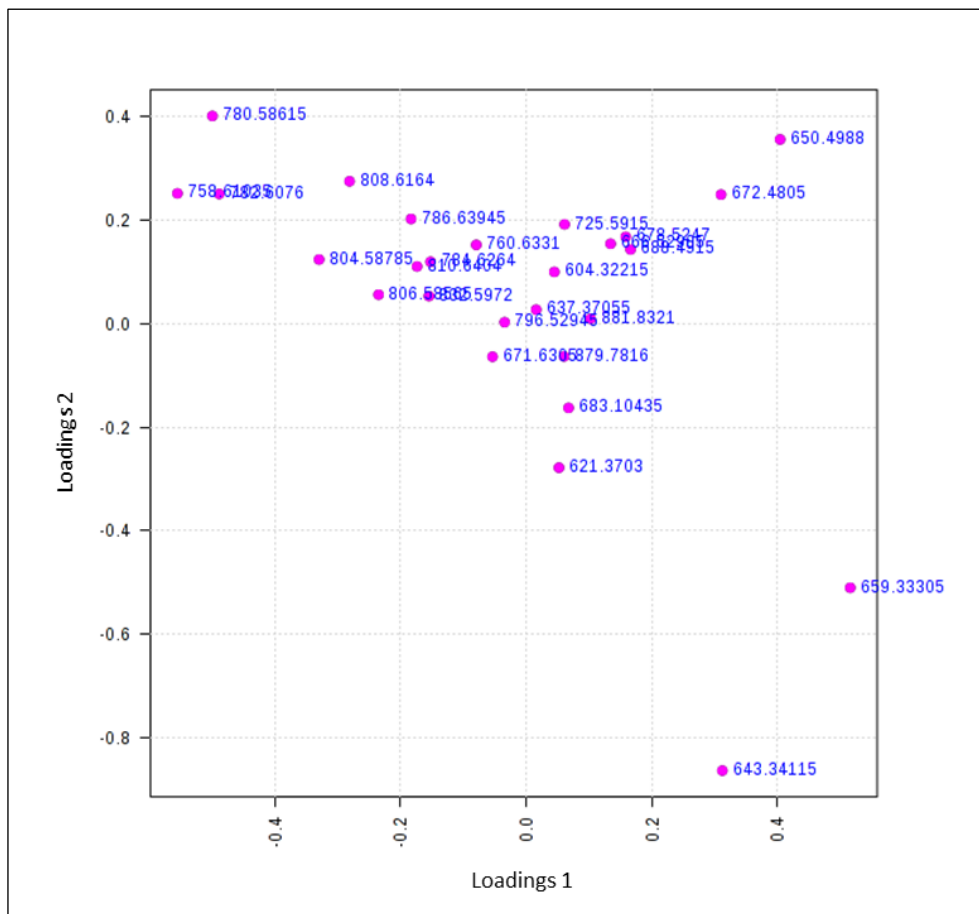


Figura 42: Análise PLS-DA apresentando os *loadings plot* dos lipídeos avaliados em plasma de pacientes com CHC e pacientes controle ($p < 0.05$). A distribuição dos íons, representados em pequenas esferas rosa, demonstra a influência de cada variável sob os componentes projetados. Os íons de 643.34115 m/z e 659.33305 m/z apresentaram afastamento atípico do conjunto de dados. Fonte: adaptado do *software* MetaboAnalyst.

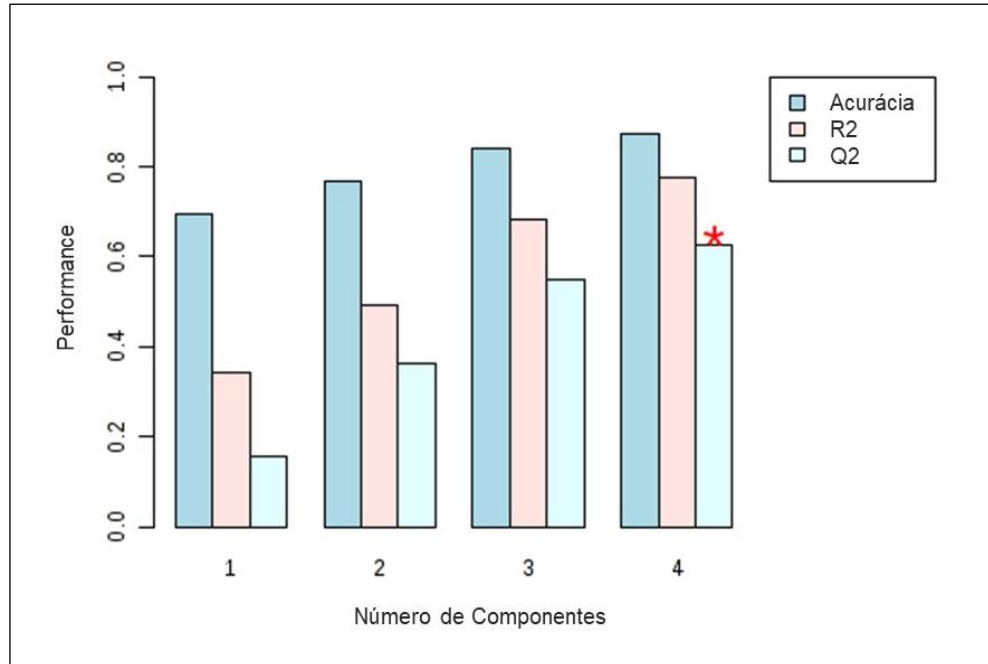


Figura 43: Análise por validação cruzada do método PLS-DA para perfil lipídico. O asterisco vermelho indica o conjunto de componentes com maior habilidade de predição (Q2). Fonte: adaptado do *software* MetaboAnalyst.

A simplificação dos dados por Orthogonal PLS-DA (Figura 44), mais apropriada ao modelo de biomarcadores devido à triagem de variáveis não correlacionadas, demonstrou que os pacientes com CHC apresentam perfil de lipídeos em plasma diferente daquele expresso em indivíduos não patológicos, refletindo o metabolismo lipídico aberrante em pacientes com doenças hepáticas. A Figura 45 apresenta a influência de cada variável original sob a construção do modelo. As amostras fora da região de confiança foram retiradas do conjunto de dados para confirmação de *outliers*, porém não houve melhora estatística da análise, indicando que o afastamento atípico provavelmente refere-se a variações intrínsecas aos indivíduos do mesmo cenário biológico.

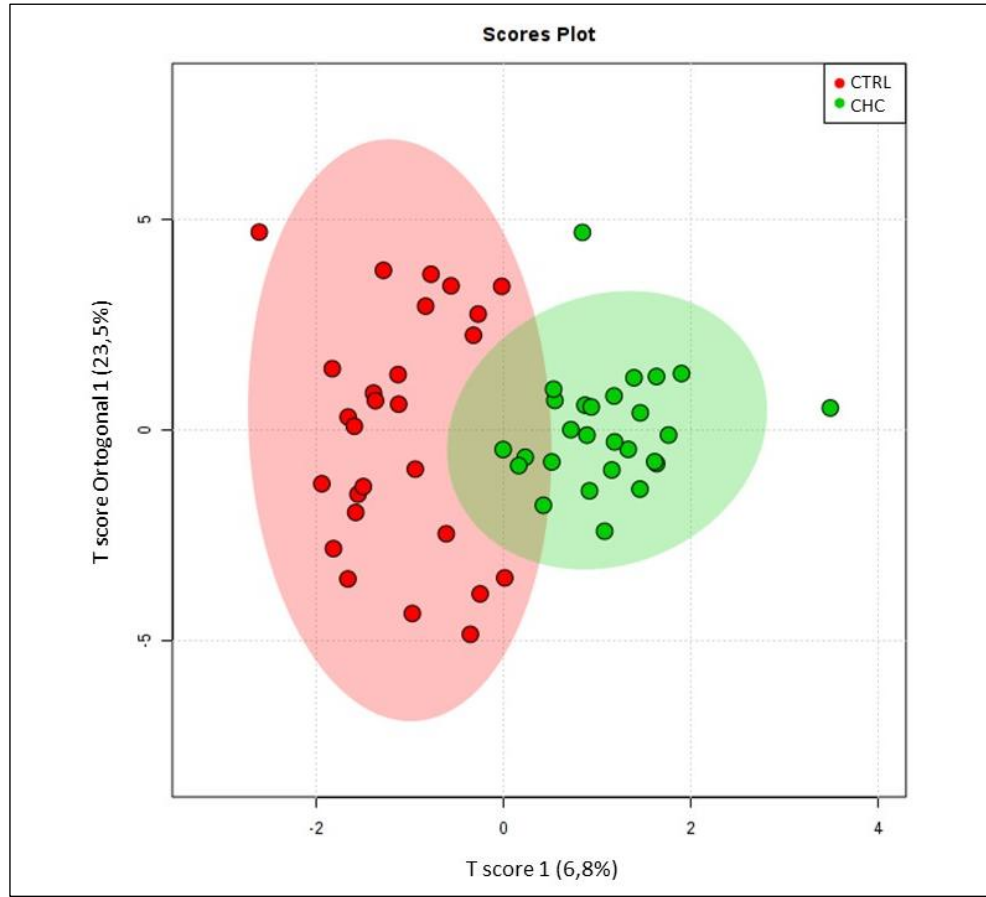


Figura 44: Análise Orthogonal PLS-DA apresentando os *scores plot* dos lipídeos avaliados em plasma de pacientes com CHC e pacientes controle ($p < 0.05$). O *score* de cada vetor revela a covariância explicada em cada projeção traçada, sendo que o vetor ortogonal representa variáveis estatisticamente não correlacionadas ao restante dos dados analisados. Na presença da hepatopatia pacientes exibem perfil global de lipídeos alterado quando comparado a condição não patológica. Os pacientes pertencentes ao estudo analisados em triplicatas são representados em pequenas esferas vermelhas e verdes, de acordo com o cenário de origem. No total, 3 replicatas (1 CTRL e 2 CHC) apresentaram afastamento atípico do conjunto de dados. As regiões elípticas correspondem ao intervalo de 95% de confiança. Fonte: adaptado do *software* MetaboAnalyst.

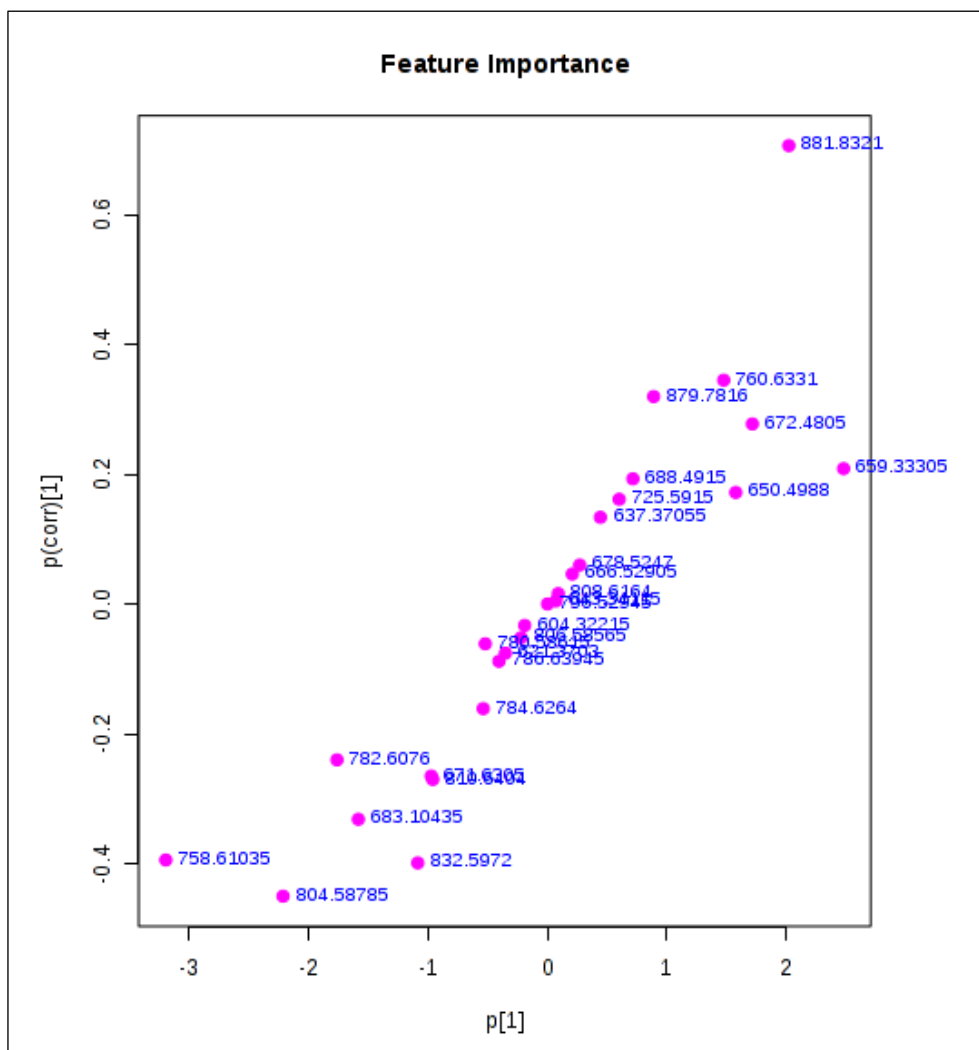


Figura 45: Análise por Orthogonal PLS-DA apresentando os *loadings* S-plot dos lipídeos avaliados em plasma de pacientes com CHC e pacientes controle ($p < 0.05$). A distribuição dos íons, representados em pequenas esferas rosa, demonstra a influência de cada variável para a construção do modelo, onde p representa o vetor de *loading* e $p(\text{corr})$ a combinação entre covariância e correlação. Os íons de 881.8321 m/z , 758.61035 m/z e 804.58785 m/z apresentaram afastamento atípico do conjunto de dados. Fonte: adaptado do *software* MetaboAnalyst.

O modelo PLS-DA permitiu a análise dos íons de maior representatividade e contribuição para diferenciação entre amostras de pacientes hepatopatas terminais e pacientes controle (Figura 46). Dentre as 20 *molecular features* de maior *VIP score*, 10 apresentam contribuição considerada significativa (≥ 0.8). Para confirmação de *outliers*, selecionou-se variáveis do conjunto de dados de forma a excluir os íons de baixa contribuição (*VIP score* < 0.8) das análises. Os resultados indicaram que o potencial estatístico na discriminação dos cenários é maior quando considerada a distribuição total do conjunto de dados.

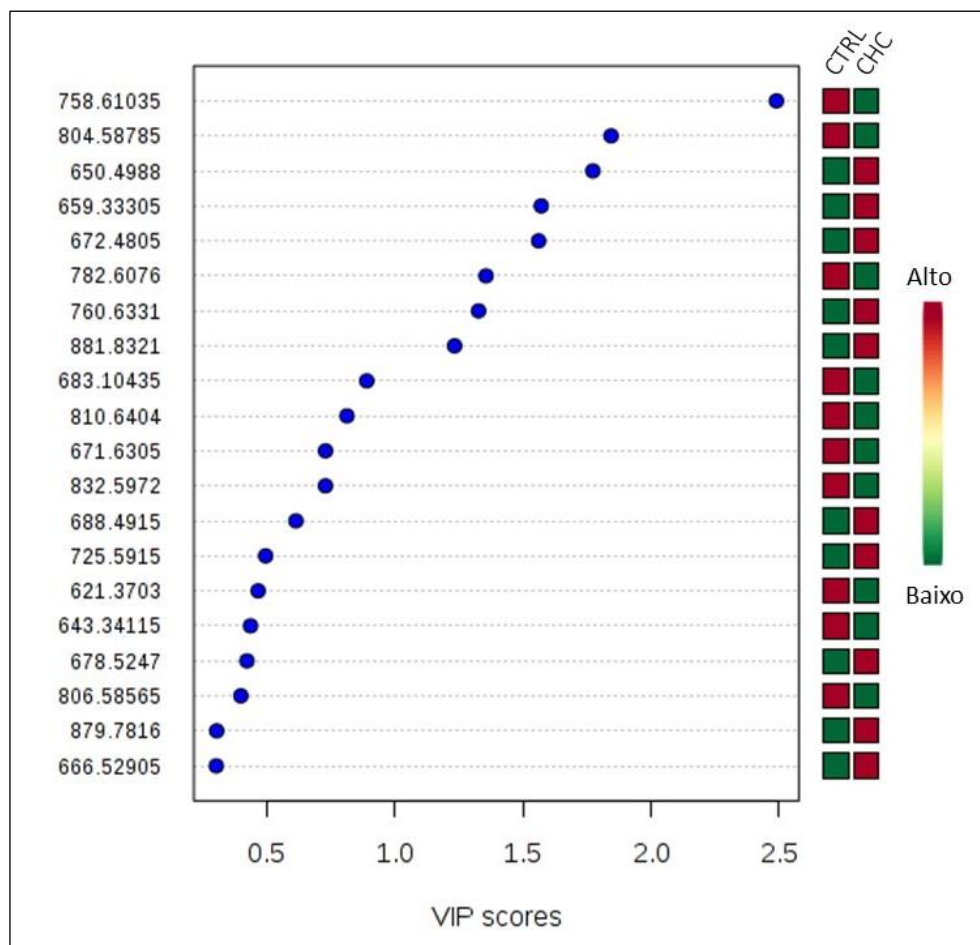


Figura 46: VIP scores dos lipídeos avaliados em plasma de pacientes com CHC e pacientes controle (PLS-DA *imp. features*, $p < 0.05$). Dentre as 20 *molecular features* de maior VIP score, 10 apresentam maior intensidade relativa de íons e 10 apresentam menor intensidade relativa de íons em pacientes com CHC. As caixas coloridas à direita indicam a intensidade relativa de cada *molecular feature* nos respectivos cenários. Fonte: adaptado do *software* MetaboAnalyst.

O teste univariado T-student durante avaliação da diferença estatística entre a média dos íons discriminativos encontrados em ambos os cenários, demonstrou que apenas 3 mantiveram-se no intervalo de erro padrão (Figura 47). Os resultados, apesar de insatisfatórios para a margem de erro desejada, reportam-se a análise univariada dos dados, que em singular não representa o melhor tratamento de dados para aplicação no presente estudo. Não obstante, o teste univariado T-student sugere que o número de pacientes totais seja acrescido em cada grupo.

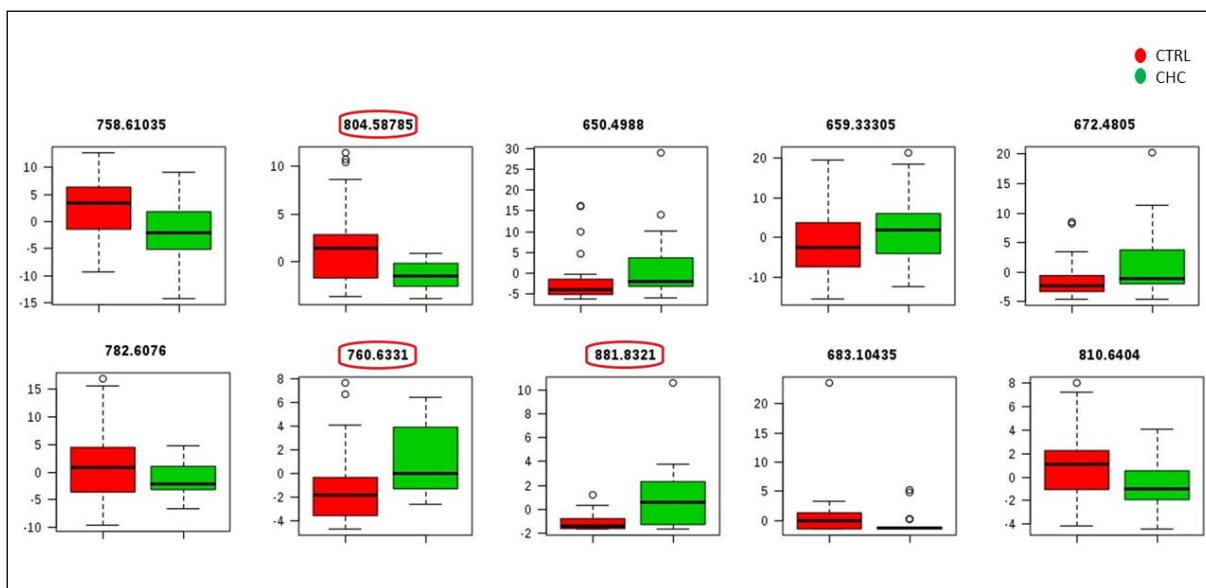


Figura 47: Box plot dos íons discriminantes de $VIP\ score \geq 0,8$ por teste T-student não paramétrico ($p < 0,05$). O diagrama apresenta a distribuição dos dados em quartis de acordo com a variável de interesse, permitindo ainda a observação de potenciais *outliers* plotados como pontos individuais fora dos limites superior ou inferior. Os círculos vermelhos destacam *molecular features* que obtiveram relevância estatística segundo o método matemático. Fonte: adaptado do software MetaboAnalyst.

O agrupamento hierárquico em *heatmap* baseado no *VIP score* avaliado por PLS-DA permitiu a visualização dos dados lipidômicos de forma simplificada (Figura 48). A reprodutibilidade entre as triplicatas é determinada pela coloração homogênea nas respectivas amostras.

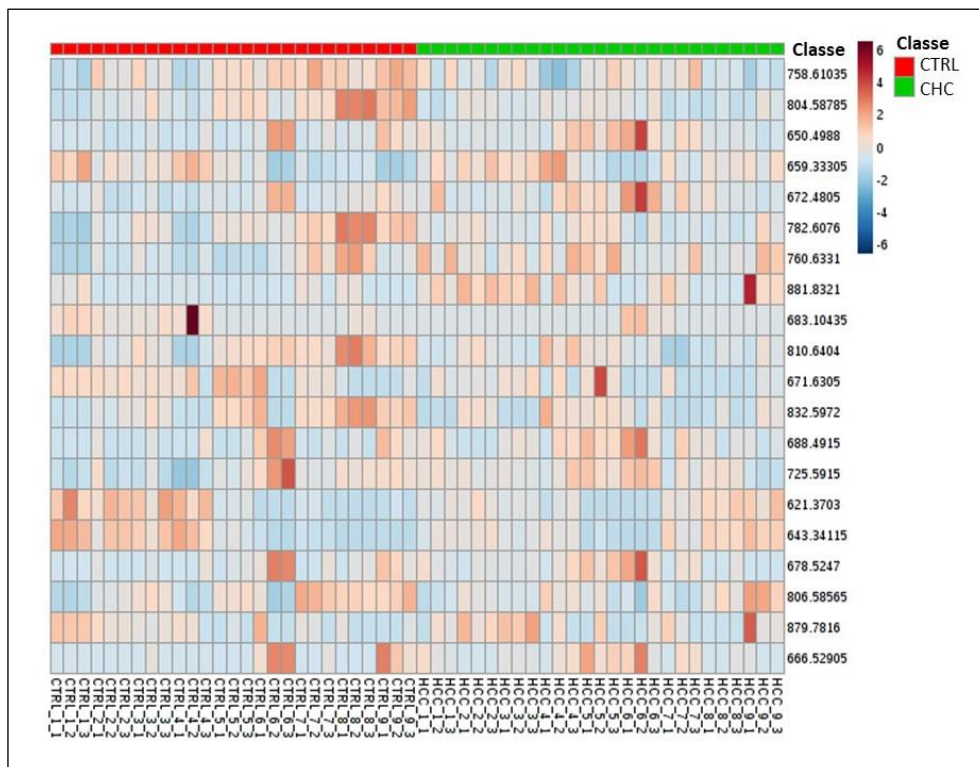


Figura 48: Análise HCA por agrupamento em *heatmap* dos íons discriminantes indicados pela análise PLS-DA (*imp. features*, $p < 0.05$). A intensidade relativa de cada *molecular feature* é apresentada para cada triplicata técnica analisada segundo a coloração indicada na escala lateral. As amostras, por sua vez, são agrupadas de acordo com o respectivo cenário. Fonte: adaptado do software MetaboAnalyst.

O agrupamento na forma de dendograma possibilitou visualizar o grau de semelhança das amostras, independentemente do cenário pertencente, de forma simplificada (Figura 49). Não houve separação clara dos pacientes com CHC e pacientes controle de acordo com os perfis lipídicos avaliados em amostras de plasma.

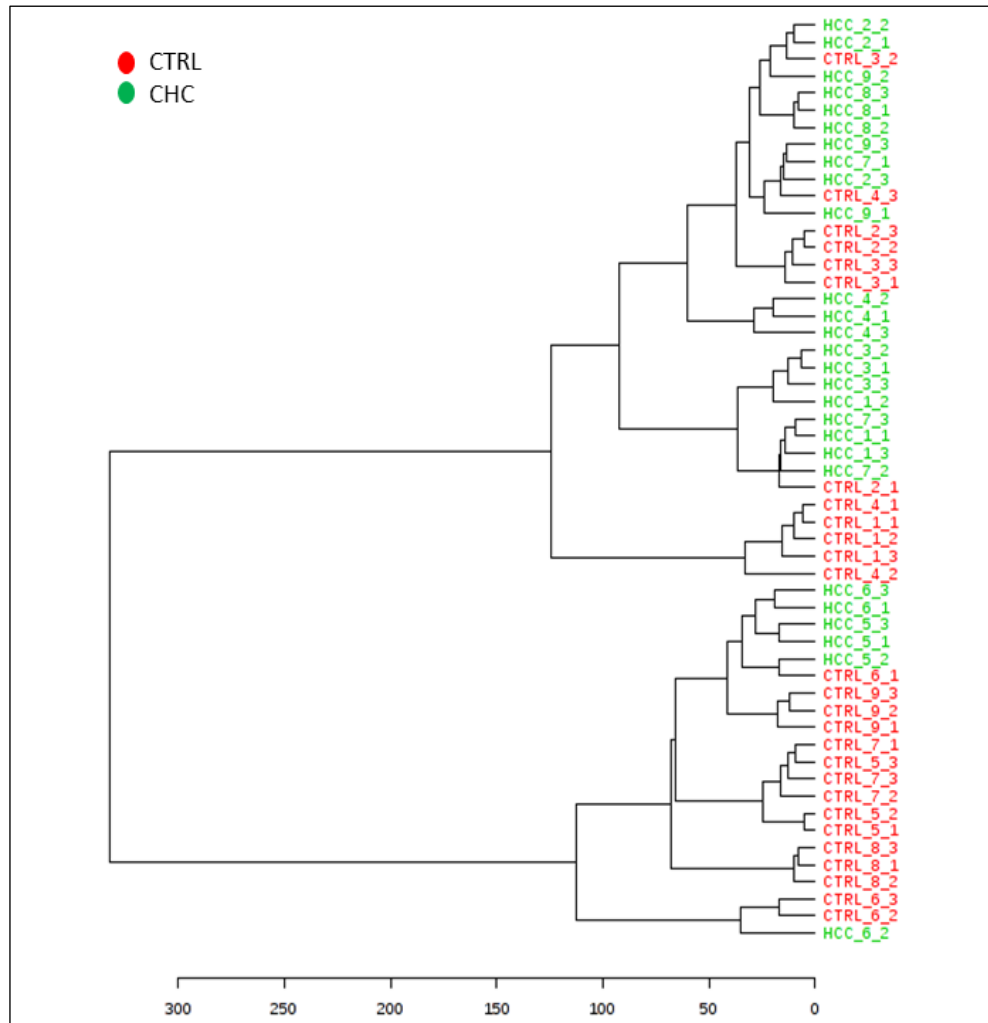


Figura 49: Análise HCA por agrupamento dos dados lipidômicos em dendrograma. Os arranjos exprimem a relação das amostras avaliadas em triplicatas técnicas em sistema hierárquico e a distância euclidiana os níveis de similaridade segundo perfil global de lipídeos. Fonte: adaptado do *software* MetaboAnalyst.

O algoritmo de agrupamento não hierárquico K-means reorganizou os dados considerando partições em grupos unitários disjuntos (Figura 50). No grupo 6 foram classificadas somente amostras pertencentes aos pacientes com CHC e nos grupos 2 e 4 apenas amostras controle. Os grupos 1, 3 e 5 apresentaram heterogeneidade.

| Detalhes do Agrupamento K-means | |
|---------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Grupos | Membros |
| Grupo 1 | CTRL_6_2, CTRL_6_3, CTRL_9_1, HCC_5_1, HCC_5_3, HCC_6_1, HCC_6_2 |
| Grupo 2 | CTRL_1_1, CTRL_1_2, CTRL_1_3, CTRL_4_1, CTRL_4_2 |
| Grupo 3 | CTRL_2_2, CTRL_2_3, CTRL_3_1, CTRL_3_2, CTRL_3_3, CTRL_4_3, HCC_8_1, HCC_8_2, HCC_8_3, HCC_9_1, HCC_9_2, HCC_9_3, HCC_7_1, HCC_2_2 |
| Grupo 4 | CTRL_7_1, CTRL_7_2, CTRL_7_3, CTRL_8_1, CTRL_8_2, CTRL_8_3, CTRL_9_2, CTRL_9_3 |
| Grupo 5 | CTRL_2_1, CTRL_5_1, CTRL_5_2, CTRL_5_3, CTRL_6_1, HCC_3_1, HCC_3_2, HCC_7_2, HCC_7_3, HCC_1_1, HCC_1_3, HCC_5_2, HCC_6_3 |
| Grupo 6 | HCC_4_1, HCC_4_2, HCC_4_3, HCC_3_3, HCC_1_2, HCC_2_1, HCC_2_3 |

Figura 50: Agrupamento K-means dos dados lipidômicos. O algoritmo particional encontrou diferenças significantes em até 6 grupos. Fonte: adaptado do *software* MetaboAnalyst.

A análise Random Forest, a partir da classificação do conjunto de dados, permitiu aferir o erro amostral aleatório (Figura 51) e detectar potenciais *outliers* (Figura 52). A margem de erro manteve-se abaixo do limite considerado aceitável e as replicatas apontadas pela análise foram retiradas do conjunto de dados para confirmação de *outliers*, porém não houve melhora estatística das análises, indicando que o afastamento atípico provavelmente refere-se a variações intrínsecas aos indivíduos do mesmo cenário biológico.

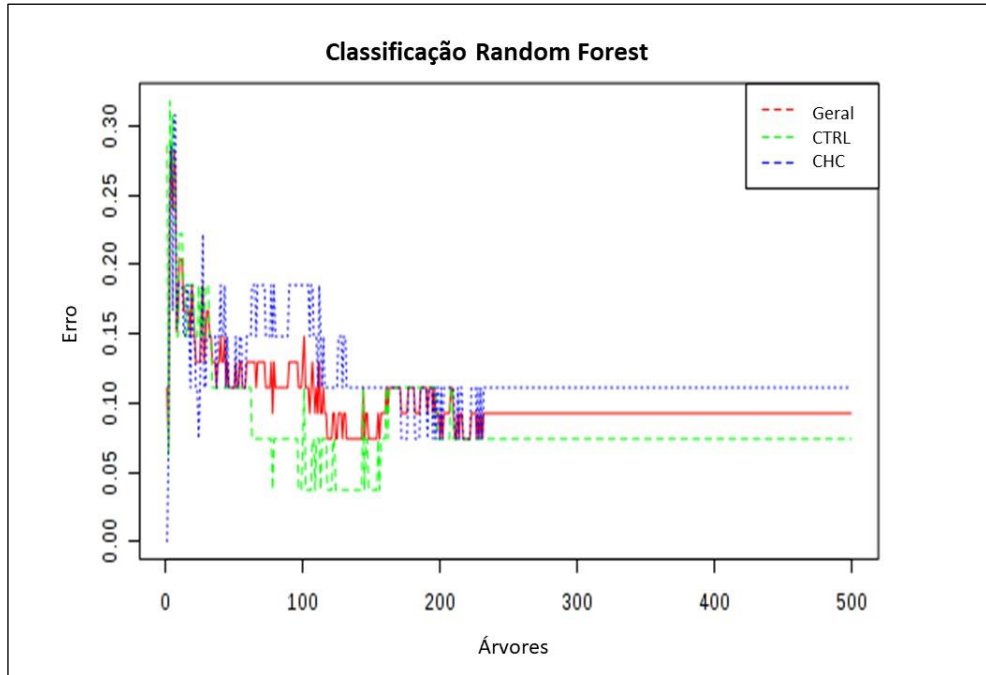


Figura 51: Classificação Random Forest do conjunto de dados lipidômicos. O erro amostral foi considerado < 0.2 conforme ampliaram-se as alternativas de fluxo classificatório. Fonte: adaptado do *software* MetaboAnalyst.

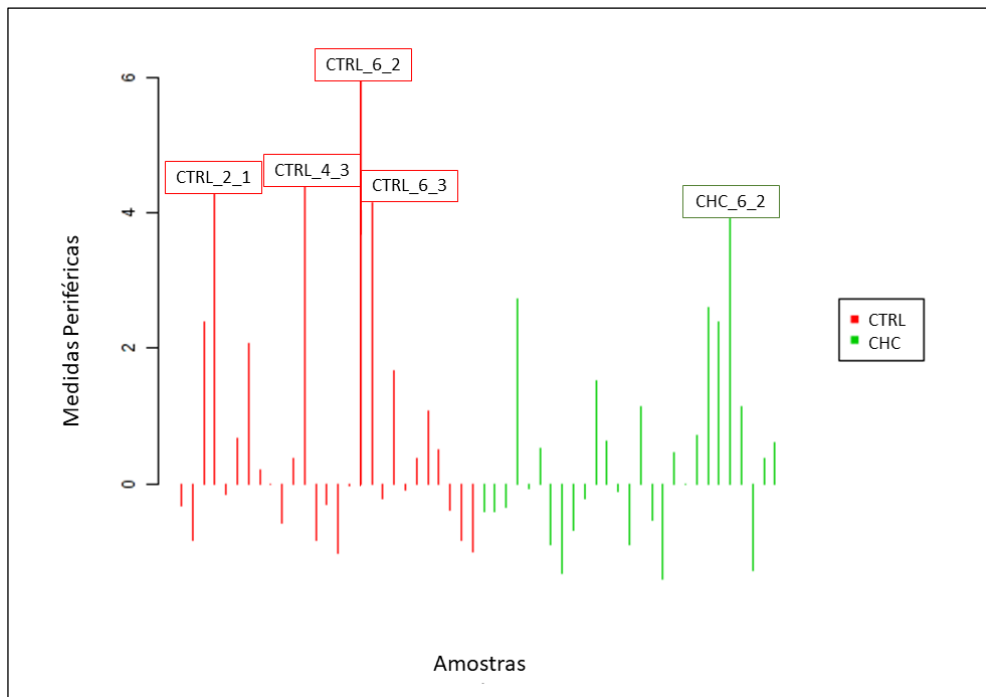


Figura 52: Potenciais outliers detectados por Random Forest na análise do perfil lipídico. O método classificatório indica desconformidade de 5 replicatas com afastamento atípico ≥ 4 do conjunto amostral. Fonte: adaptado do *software* MetaboAnalyst.

3.2. LIPIDÔMICA DE DESCOBERTA DE POSSÍVEIS BIOMARCADORES

Molecular features de *VIP score* $\geq 0,8$ foram selecionados para aquisição de dados MS/MS. A fragmentação dos íons precursores são demonstradas nas figuras a seguir, em ordem decrescente de contribuição para caracterização de pacientes com CHC (Figuras 53-57) e pacientes controle (Figuras 58-62). Considerando a tolerância de massa para a técnica MALDI-TOF, a maioria dos espectros apresentam em sua composição fragmentos de 184 *m/z*, característico da cabeça polar de colina em fosfatidilcolinas (PCs), e de 147 *m/z*, característico de ciclofosfano.

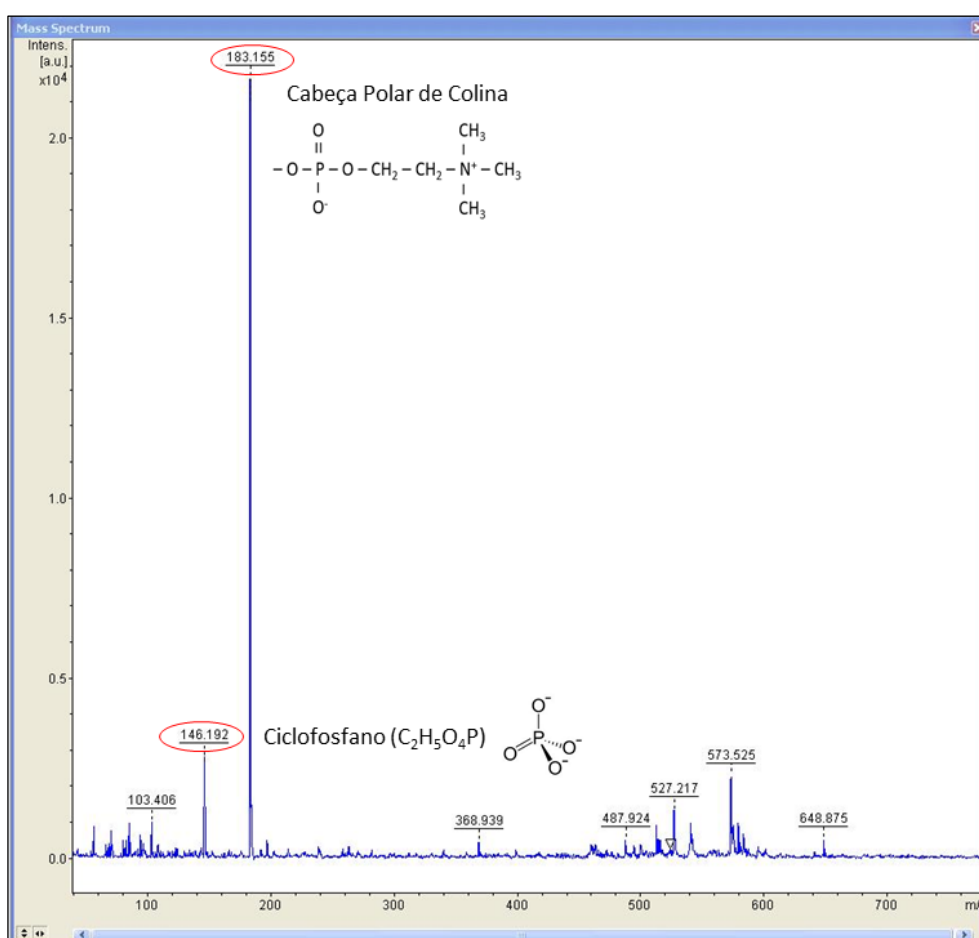


Figura 53: Espectro de massas da fragmentação MS/MS do íon precursor 650.4988 *m/z* por energia de CID. Os círculos vermelhos destacam os fragmentos de 184 *m/z*, característico da cabeça polar de colina em fosfatidilcolinas (PCs), e de 147 *m/z*, característico de ciclofosfano. Fonte: adaptado do software FlexAnalysis.

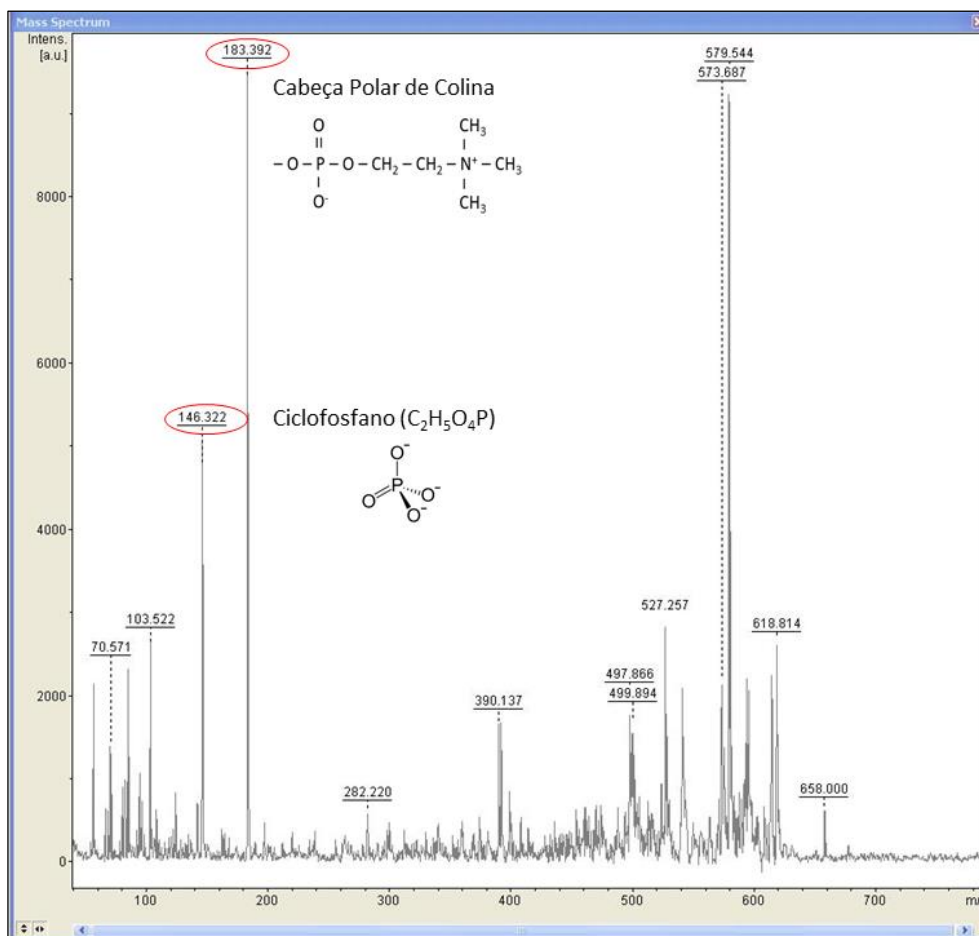


Figura 54: Espectro de massas da fragmentação MS/MS do íon precursor 659.33305 m/z por energia de CID. Os círculos vermelhos destacam os fragmentos de 184 m/z , característico da cabeça polar de colina em fosfatidilcolinas (PCs), e de 147 m/z , característico de ciclofosfano. Fonte: adaptado do *software* FlexAnalysis.

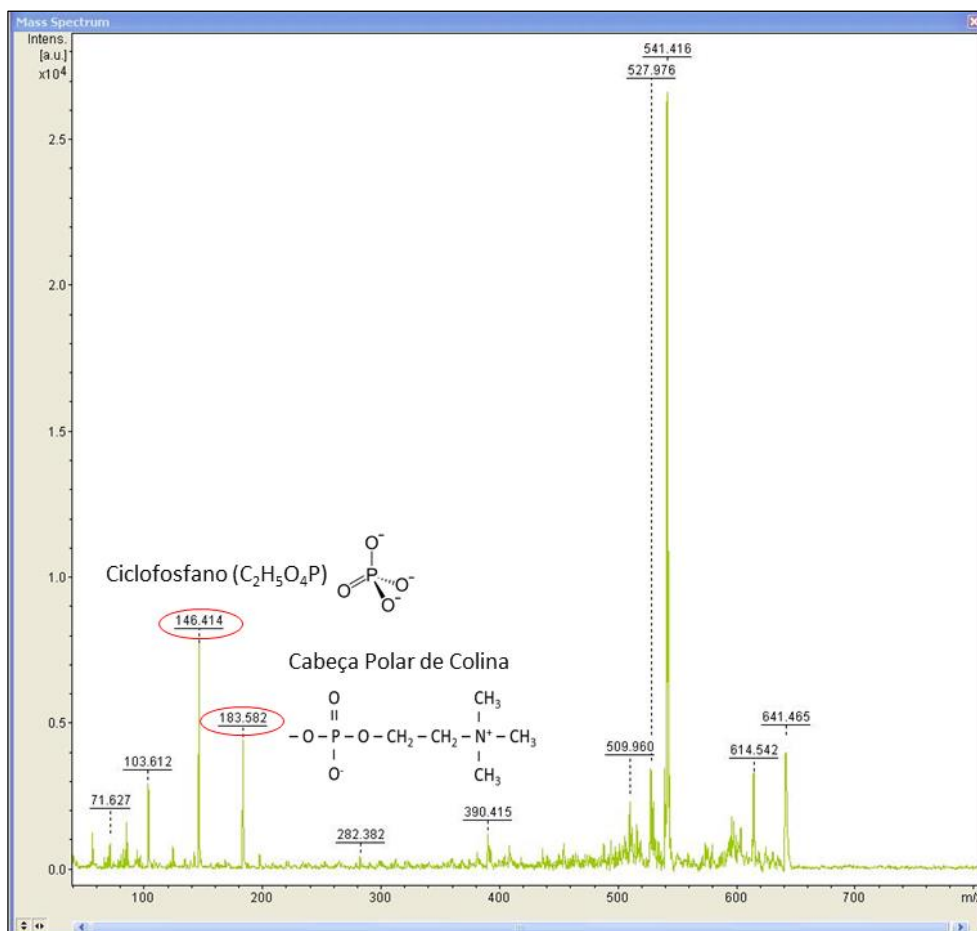


Figura 55: Espectro de massas da fragmentação MS/MS do íon precursor 672.4805 m/z por energia de CID. Os círculos vermelhos destacam os fragmentos de 184 m/z , característico da cabeça polar de colina em fosfatidilcolinas (PCs), e de 147 m/z , característico de ciclofosfano. Fonte: adaptado do software FlexAnalysis.

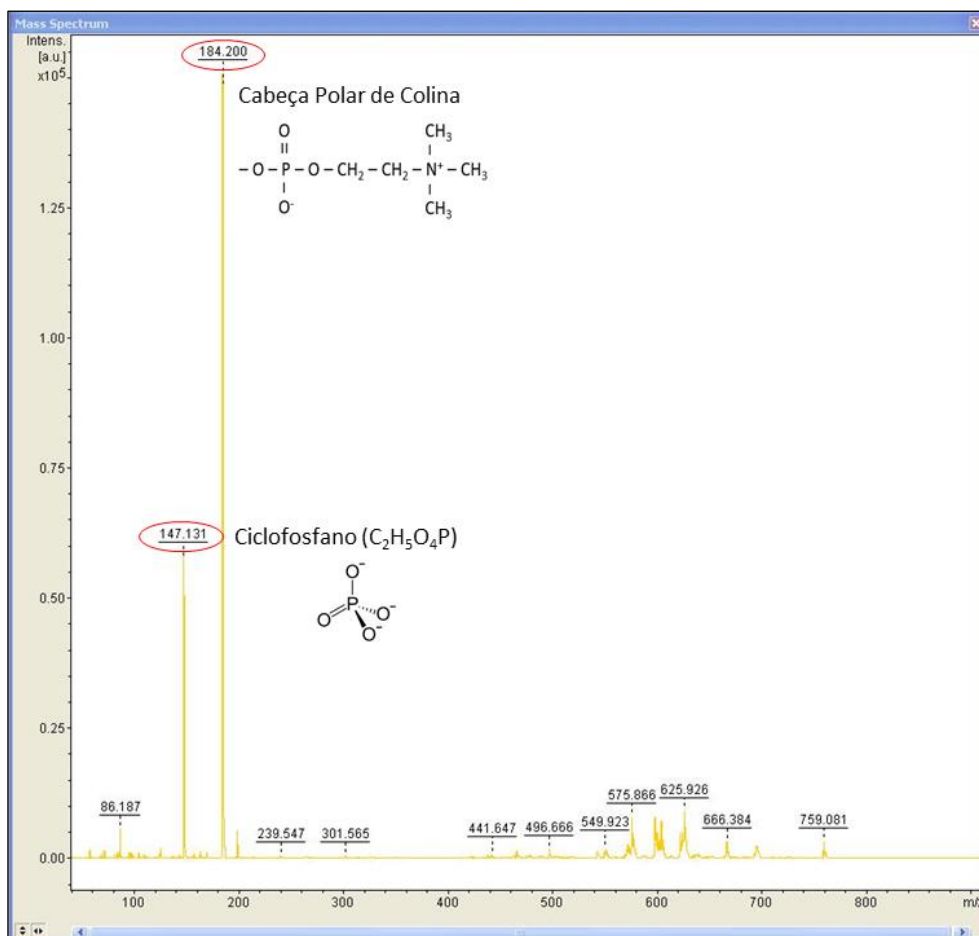


Figura 56: Espectro de massas da fragmentação MS/MS do íon precursor 760.6331 m/z por energia de CID. Os círculos vermelhos destacam os fragmentos de 184 m/z , característico da cabeça polar de colina em fosfatidilcolinas (PCs), e de 147 m/z , característico de ciclofosfano. Fonte: adaptado do software FlexAnalysis.

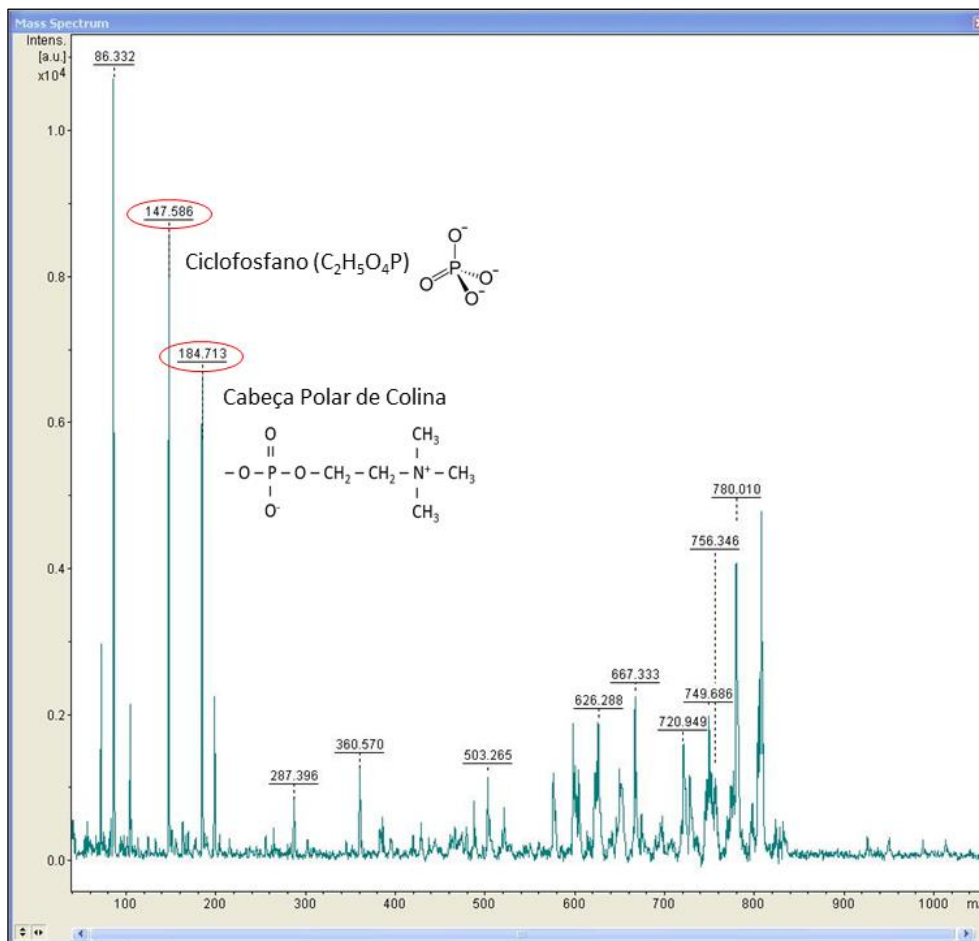


Figura 57: Espectro de massas da fragmentação MS/MS do íon precursor 881.8321 m/z por energia de CID. Os círculos vermelhos destacam os fragmentos de 184 m/z , característico da cabeça polar de colina em fosfatidilcolinas (PCs), e de 147 m/z , característico de ciclofosfano. Fonte: adaptado do *software* FlexAnalysis.

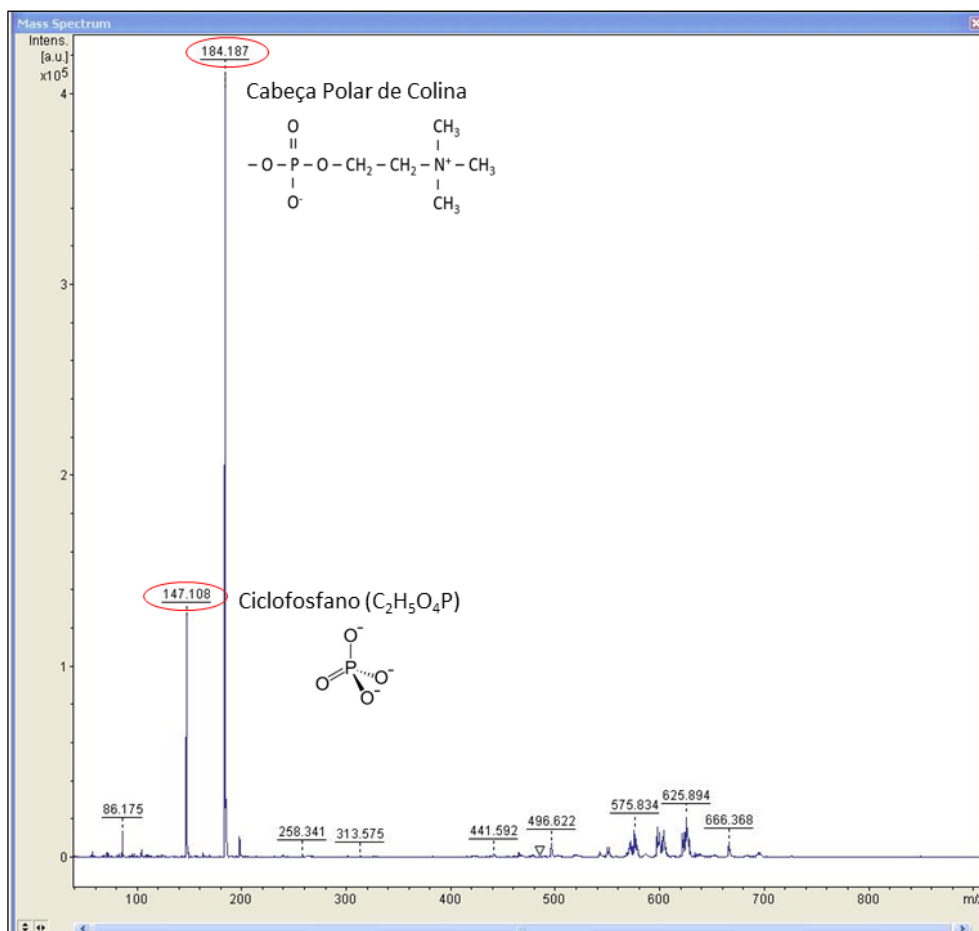


Figura 58: Espectro de massas da fragmentação MS/MS do íon precursor 758.61035 m/z por energia de CID. Os círculos vermelhos destacam os fragmentos de 184 m/z , característico da cabeça polar de colina em fosfatidilcolinas (PCs), e de 147 m/z , característico de ciclofosfano. Fonte: adaptado do *software* FlexAnalysis.

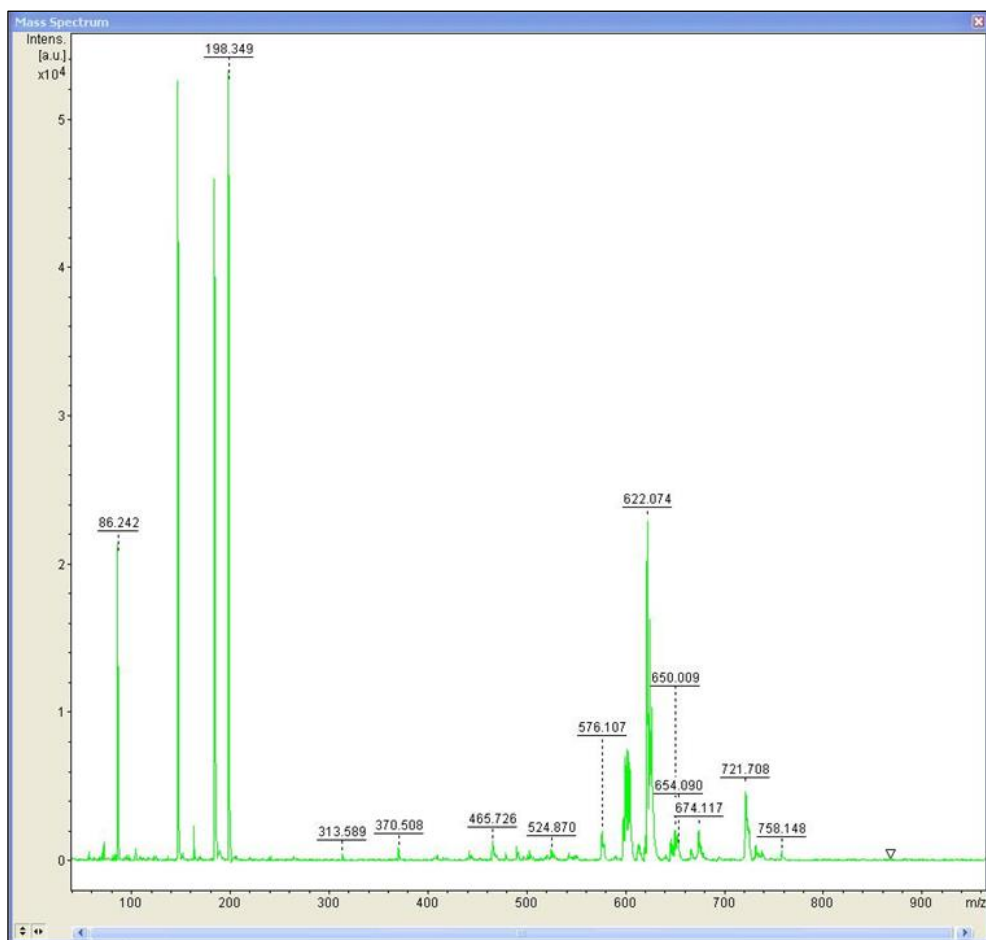


Figura 59: Espectro de massas da fragmentação MS/MS do íon precursor 804.58785 m/z por energia de CID. Fonte: adaptado do software FlexAnalysis.

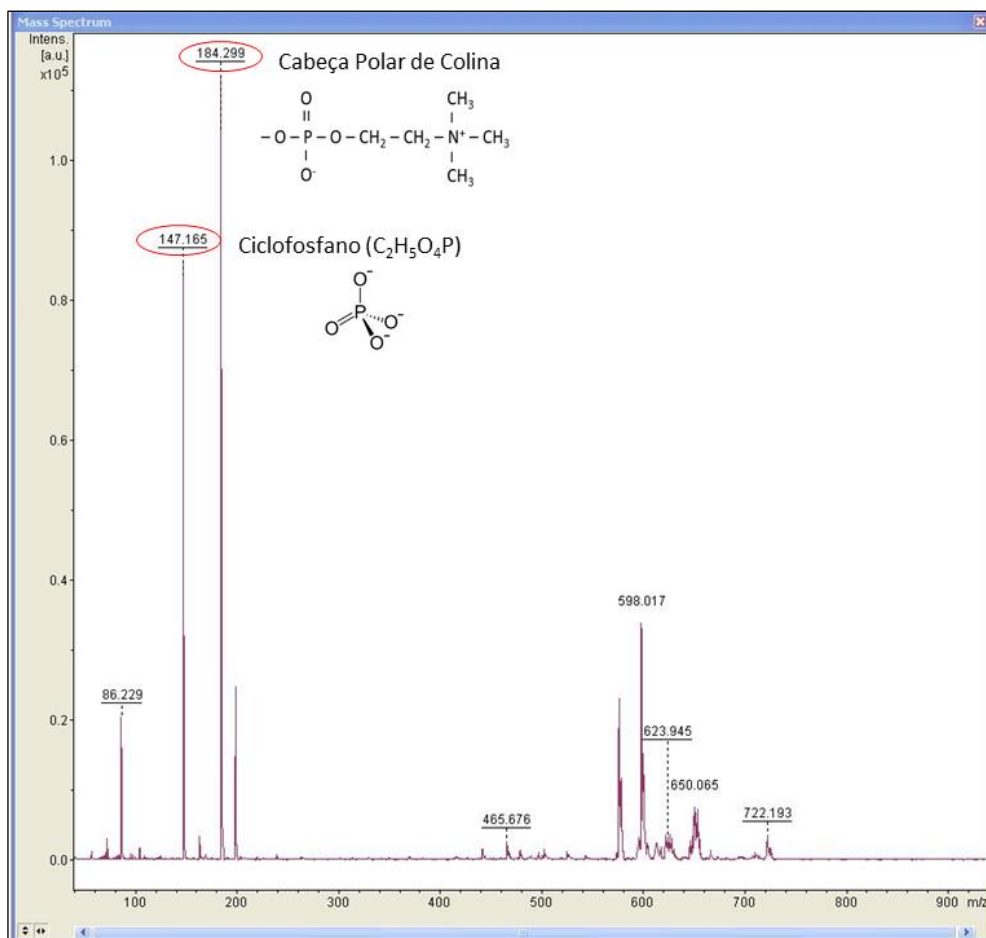


Figura 60: Espectro de massas da fragmentação MS/MS do íon precursor 782.6076 m/z por energia de CID. Os círculos vermelhos destacam os fragmentos de 184 m/z , característico da cabeça polar de colina em fosfatidilcolinas (PCs), e de 147 m/z , característico de ciclofosfano. Fonte: adaptado do *software* FlexAnalysis.

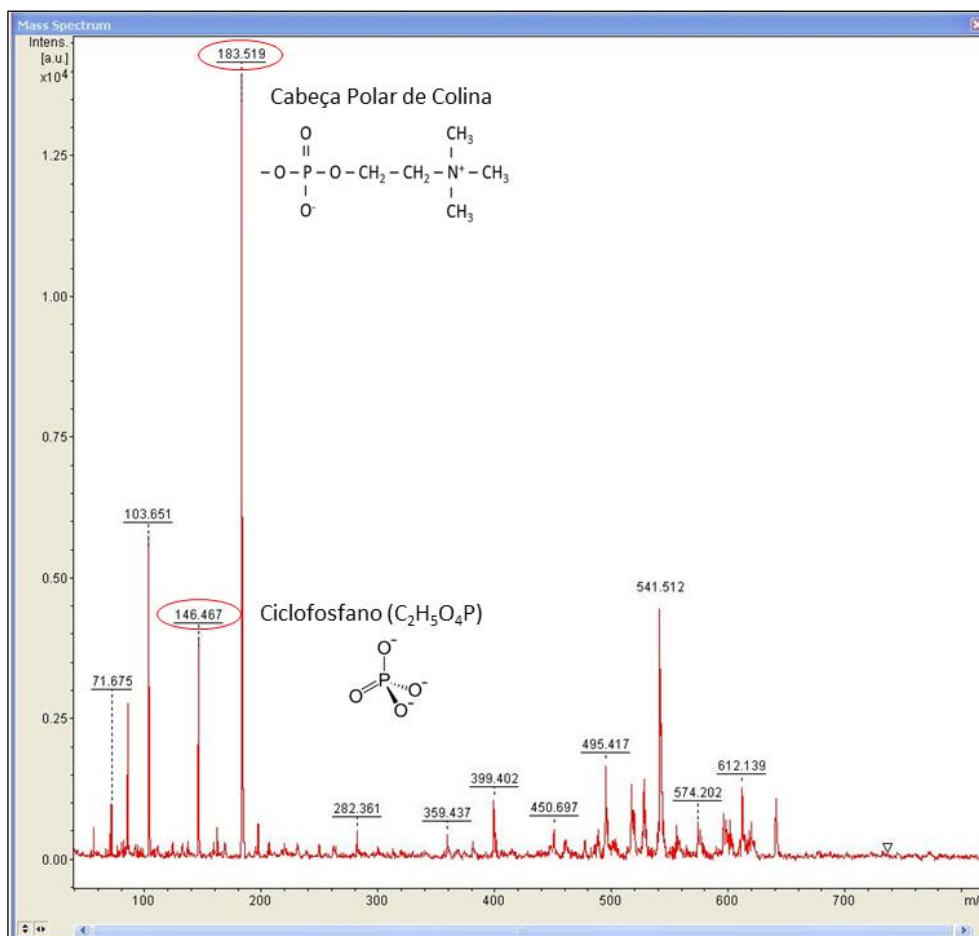


Figura 61: Espectro de massas da fragmentação MS/MS do íon precursor 683.10435 m/z por energia de CID. Os círculos vermelhos destacam os fragmentos de 184 m/z , característico da cabeça polar de colina em fosfatidilcolinas (PCs), e de 147 m/z , característico de ciclofosfano. Fonte: adaptado do software FlexAnalysis.

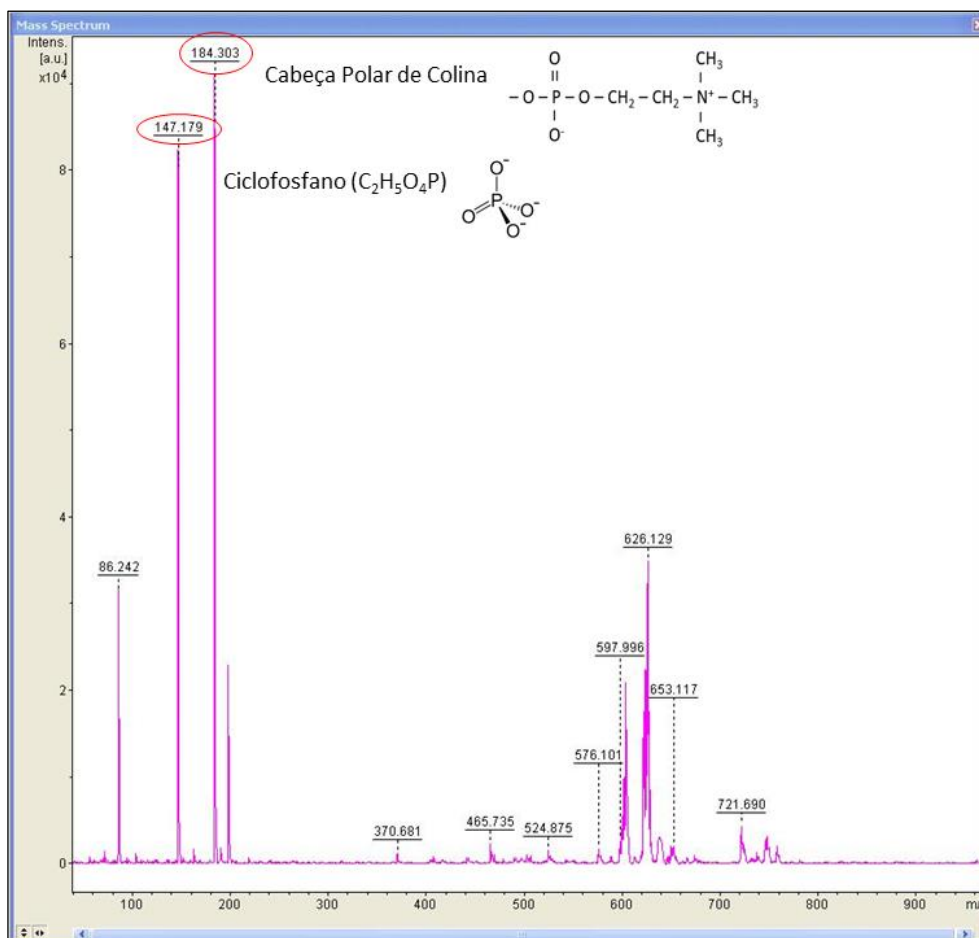


Figura 62: Espectro de massas da fragmentação MS/MS do íon precursor 810.6404 m/z por energia de CID. Os círculos vermelhos destacam os fragmentos de 184 m/z , característico da cabeça polar de colina em fosfatidilcolinas (PCs), e de 147 m/z , característico de ciclofosfano. Fonte: adaptado do *software* FlexAnalysis.

No total, 5 *molecular features* representativos em cada cenário experimental foram selecionados para identificação em bases de dados. Entre os 10 lípideos identificados, 9 pertencem à classe de glicerofosfolídeos (Figura 63). O lípideo mais abundante em pacientes controle é a PC, com 4 íons contribuintes. Em contraste, em pacientes com CHC a PE passou a contribuir igualmente a PC para a caracterização do cenário.

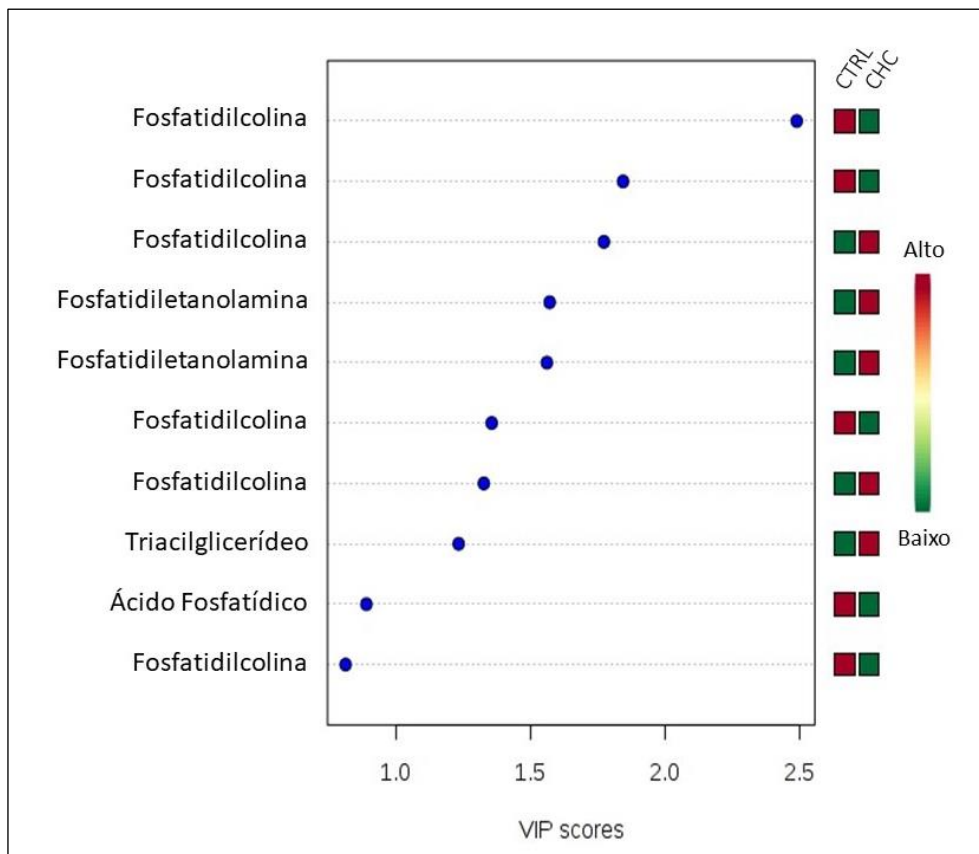


Figura 64: Identificação das *molecular features* de *VIP score* $\geq 0,8$ em plasma de pacientes com CHC e pacientes controle. A identificação dos íons lipídicos de maior relevância demonstrou que a hepatopatia afeta principalmente a classe dos glicerofolídeos. As caixas coloridas à direita indicam a intensidade relativa de cada *molecular feature* nos respectivos cenários. Fonte: adaptado do *software* MetaboAnalyst.

4. DISCUSSÃO

As alterações metabólicas associadas ao câncer por muito tempo foram consideradas um efeito secundário à doença, mas atualmente são reconhecidas como características tumorais típicas (HANAHAN; WEINBERG, 2011). No presente estudo as alterações relacionadas ao metabolismo de lipídeos foram abordadas pela técnica de MALDI-TOF/MS para determinar diferenças no perfil global destas macromoléculas entre os cenários patológico e não patológico.

Nossos dados demonstram que pacientes com CHC apresentam um perfil lipídico em plasma distinto dos indivíduos controles como reflexo da reprogramação metabólica. Uma vez que células tumorais sob hipoxia e estresse metabólico apresentam oxidação lipídica por catabolismo severo e compensação de nutrientes, e instabilidade da membrana plasmática causada por intensa multiplicação celular, alterações no perfil global de lipídeos são frequentemente relatadas na literatura (CHEN et al., 2013; KRAUTBAUER et al., 2016; LI et al., 2017; LIN et al., 2017). Passos-Castilho et al. (2015) utilizaram MALDI-TOF/MS para caracterizar o perfil de lipídeos em plasma de pacientes com hepatite C crônica, cirrose e CHC derivados de infecção viral por vírus da hepatite C (VHC). A análise destacou 7 íons discriminativos com a habilidade de distinguir CHC das outras condições patológicas a partir de um algoritmo, com 96% de sensibilidade e 87% de especificidade para CHC *versus* cirrose, e 100% de sensibilidade e especificidade para CHC *versus* hepatite C.

A seleção de *molecular features* baseada no grau de contribuição (*VIP score* > 0.8, PLS-DA imp. features) para a caracterização dos cenários permitiu a triagem de 10 lipídeos discriminantes, 5 de alta contribuição para o fenótipo patológico e 5 para a condição controle. Dentre os 10 lipídeos de alta representatividade, 9 foram identificados como glicerofosfolipídeos, importante classe de lipídeos estruturais das membranas biológicas. Ressom et al. (2016), durante estudo multiômico para caracterização do CHC, identificou por GC-MS e LC-MS alteração na abundância de diversos metabólitos de diferentes classes, dentre eles os fosfolipídeos apresentaram regulação positiva em amostras de tecido hepático com CHC quando comparadas a tecidos cirróticos. De outro modo, em comparação ao tecido adjacente não tumoral, os fosfolipídeos fosfatidiletanolamina (PE), fosfatidilserina (PS) e fosfatidilinositol (PI)

exibiram regulação negativa em tecidos de CHC enquanto fosfatidilcolina (PC) e lisofosfatidilcolina (LPC) não apresentaram alteração (KRAUTBAUER et al., 2016).

O lipídeo mais representativo em pacientes controle foi identificado como fosfatidilcolina (PC), com contribuição de quatro íons segundo análise PLS-DA *imp. features*. Considerado o principal fosfolípideo da membrana plasmática, PC desempenha importante papel na função celular e na estabilidade da membrana, tanto em células não patológicas quanto em células neoplásicas (CHEN et al., 2013). Sakakima et al. (2007) investigaram *in vitro* e *in vivo* a inibição do crescimento de células tumorais e a indução da apoptose por PC no CHC. Os resultados demonstraram que *in vitro*, PC foi capaz de inibir a proliferação das linhagens celulares Hep-3B, Hep-G2, HuH-7 e Alexander e induzir a apoptose de forma dose dependente. *In vivo*, ratos que receberam dieta rica em PC apresentaram não só redução macroscópica dos nódulos tumorais e de focos imunoreativos para marcação contra glutathione S-transferase, como indução da apoptose comprovada pela coloração TUNEL. Em contrapartida, roedores expostos a carcinogênicos, porém anterior e posteriormente condicionados a dieta deficiente em colina, desenvolvem a hepatopatia com maior avidéz (KISHIDA et al., 2000).

Na presença da hepatopatia, em contraste, foi observada uma modificação no perfil lipídico, com a fosfatidiletanolamina (PE) contribuindo igualmente a PC sob a análise PLS-DA *imp. features*. Dessa forma, a composição de fosfolípidos no plasma de pacientes com CHC demonstrou possível alteração da principal via de biossíntese de PCs poliinsaturadas, onde PE atua como uma estrutura precursora. Krautbauer et al. (2016) demonstraram desequilíbrio na síntese de fosfolípidos no CHC devido ao aumento de espécies saturadas e redução de espécies poliinsaturadas.

Tessitore et al. (2003) demonstraram que a enzima que produz PC a partir de PE hepática quando não há fornecimento adequado de colina pela dieta, a PE N-metiltransferase (PEMT), apresenta atividade reduzida em amostras de tecido hepático com CHC se comparado ao tecido adjacente regular. Chen et al. (2013) observaram padrão semelhante em soro de pacientes com CHC como reflexo das condições do órgão e abundância reduzida de PCs poliinsaturadas, uma vez que a enzima é a principal via de síntese dessas espécies. Morita et al. (2013) avaliando linhagens celulares e tecido hepático com CHC por IMS, RT-PCR e *western blotting* relataram aumento de PC saturados ou monoinsaturados na hepatopatia devido a

superexpressão da enzima lisofosfatidilcolina aciltransferase 1, responsável pela conversão de LPC em PC.

O equilíbrio observado entre a prevalência de PC e PE em pacientes hepatopatas ressalta o distúrbio do metabolismo lipídico pela intensa proliferação no desenvolvimento do câncer, indicando que a alteração na via de síntese dos glicerofosfolípidos pode decorrer além da prevalência de formas saturadas, mas em virtude da dificuldade na conversão de estrutura mais simples. Lu et al. (2018) demonstraram que, embora as assinaturas lipidômicas de soro e tecido hepático sejam independentes, PE plasmalogênios (36:4/40:6) apresentam grande potencial como biomarcadores sorológicos para o CHC, uma vez que foram capazes de diferenciar o fenótipo tumoral de indivíduos cirróticos e controles. Abel et al. (2009) observaram redução significativa na razão PC/PE em tecidos de CHC se comparados ao tecido adjacente ao tumor, visto que a concentração de PC foi diminuída enquanto PE não apresentou nenhum efeito significativo na hepatopatia. Os resultados sugerem aumento do conteúdo de PE sob PC em membranas plasmáticas com possíveis aplicações na sobrevivência de células neoplásicas. A abundância elevada de PE, especialmente devido a diminuição da conversão em PC a partir da enzima PEMT, foi associada ao aumento da proliferação celular no CHC e após hepatectomia parcial (HOUWELING et al., 1997; TESSITORE et al., 1999).

A prevalência de estruturas lipídicas saturadas ou monoinsaturadas no CHC pode estender-se além da classe de fosfolípidos. Guan et al. (2017), analisando a composição de diversos triacilglicerídeos (TAGs) em fígado de pacientes com CHC submetidos à ressecção cirúrgica por UPLC-ESI-MS, observaram espécies com mais de três insaturações em estado de regulação negativa enquanto espécies saturadas eram positivamente reguladas, o que demonstra a importância da avaliação da composição de TAGs nas doenças hepáticas em contraste a determinação por ensaios colorimétricos usuais na prática clínica. No presente trabalho, o TAG, classificado como glicerolípido, foi destacado entre os lipídeos de maior relevância em pacientes com CHC.

Composto por longa cadeia de ácidos graxos constituídas basicamente por hidrocarbonetos, os TAGs são uma das formas lipídicas mais adequadas para armazenamento energético e reserva de ácidos graxos essenciais e não essenciais para síntese de fosfolípidos, tipicamente observada durante a expansão e disseminação tumoral (CHEN et al., 2013). Seu estoque para futura mobilização pode

ocorrer sob a forma de gotículas lipídicas, cuja presença acentuada em células neoplásicas é associada a agressividade do tumor (ABRAMCZYK et al., 2015; DE GONZALO-CALVO et al., 2015).

O ácido fosfatídico (PA), dificilmente observado em organismos devido à baixa abundância, é extremamente importante como intermediário na síntese de fosfolípídeos e TAGs. Embora condições inadequadas de conservação e extração possam promover a liberação da espécie por hidrólise enzimática, a intensidade relativa reduzida observada em pacientes com CHC nesta pesquisa pode estar correlacionado a supressão de respostas antitumorais. A espécie foi associada a regulação da migração de macrófagos pela inibição da via ceramida-1-fosfato, revelando importante papel no controle de funções patofisiológicas como inflamação e metástase tumoral (OURO et al., 2014). Além disso, é capaz de inibir a ativação da PI 3-quinase, implicada no estímulo da divisão celular e na inibição da apoptose em diversos tipos celulares (LAUENER et al., 1995).

Considerando as semelhanças apontadas pelas análises de agrupamento, foi realizado um teste de classificação das amostras que demonstrou, em geral, erro aleatório inferior ao limite desejado e capacidade de predição do cenário de origem de cada amostra a partir da combinação de árvores de decisão. Uma vez que métodos de classificação não compartilham dos mesmos princípios de algoritmos de agrupamento, conformidades em dados clínicopatológicos dos paciente avaliados podem auxiliar no esclarecimento das paridades identificadas. Para a predição da recorrência do CHC após ressecção cirúrgica, a incorporação desses dados permitiu a construção de um modelo prógnóstico para vigilância personalizada de pacientes candidatos ao tratamento (VILLANUEVA et al., 2011).

5. CONCLUSÃO

O presente estudo demonstrou alteração no perfil global de lipídeos em plasma de pacientes com CHC em comparação aos indivíduos controle, especialmente no que se refere a irregularidade na síntese de glicerofosfolipídeos. A identificação de lipídeos de alta contribuição para caracterização dos cenários (*VIP score* > 0.8) revelou alteração da razão fosfatidilcolina/ fosfatidiletanolamina (PC/PE) na presença da hepatopatia. Interpretados individualmente ou em conjunto, os resultados aqui apresentados sugerem uma via candidata ao estudo de biomarcadores em método diagnóstico não invasivo para o CHC e outras doenças hepáticas. Estudos complementares são ainda necessários para elucidação da estrutura molecular dos lipídeos discriminantes identificados, bem como avaliação da capacidade diagnóstica da classe de lipídeos observadas em desequilíbrio.

6. REFERÊNCIAS

- ABEL, S. et al. Altered lipid profile, oxidative status and hepatitis B virus interactions in human hepatocellular carcinoma. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v. 81, n. 5–6, p. 391–399, nov. 2009.
- ABRAMCZYK, H. et al. The role of lipid droplets and adipocytes in cancer. Raman imaging of cell cultures: MCF10A, MCF7, and MDA-MB-231 compared to adipocytes in cancerous human breast tissue. **The Analyst**, v. 140, n. 7, p. 2224–35, 7 abr. 2015.
- ARMITAGE, E. G.; SOUTHAM, A. D. Monitoring cancer prognosis, diagnosis and treatment efficacy using metabolomics and lipidomics. **Metabolomics**, v. 12, n. 9, p. 146, 16 set. 2016.
- BAENKE, F. et al. Hooked on fat: the role of lipid synthesis in cancer metabolism and tumour development. **Disease Models & Mechanisms**, v. 6, n. 6, p. 1353–1363, 2013.
- BELORIBI-DJEFAFLIA, S.; VASSEUR, S.; GUILLAUMOND, F. Lipid metabolic reprogramming in cancer cells. **Oncogenesis**, v. 5, p. e189, 2016.
- BLIGH, E. G.; DYER, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, v. 37, n. 8, p. 911–917, ago. 1959.
- CHEN, S. et al. Serum lipid profiling of patients with chronic hepatitis B, cirrhosis, and hepatocellular carcinoma by ultra fast LC/IT-TOF MS. **Electrophoresis**, v. 34, n. 19, p. 2848–2856, jul. 2013.
- CHO, Y.-T. et al. Biomarker Characterization by MALDI–TOF/MS. In: **Advances in Clinical Chemistry**. 1. ed. [s.l.] Elsevier Inc., 2015. v. 69p. 209–254.
- CHO, Y.-T. et al. Fine Needle Aspiration Combined With Matrix-assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight/Mass Spectrometry to Characterize Lipid Biomarkers for Diagnosing Accuracy of Breast Cancer. **Clinical Breast Cancer**, v. 17, n. 5, p. 373–381.e1, ago. 2017.
- CORRÊA, L. H. et al. Adipocytes and macrophages interplay in the orchestration of tumor microenvironment: New implications in cancer progression. **Frontiers in Immunology**, v. 8, n. SEP, p. 1–12, 2017.
- DANIËLS, V. W. et al. Cancer cells differentially activate and thrive on de novo lipid synthesis pathways in a low-lipid environment. **PLoS ONE**, v. 9, n. 9, p. 13–19, 2014.
- DE GONZALO-CALVO, D. et al. Intratumor cholesteryl ester accumulation is associated with human breast cancer proliferation and aggressive potential: a molecular and clinicopathological study. **BMC Cancer**, v. 15, n. 1, p. 460, 9 dez. 2015.
- DEBERARDINIS, R. J. et al. The Biology of Cancer: Metabolic Reprogramming Fuels Cell Growth and Proliferation. **Cell Metabolism**, v. 7, n. 1, p. 11–20, 2008.
- DENG, T. et al. Obesity, Inflammation, and Cancer. **Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease**, v. 11, n. 1, p. 421–449, 23 maio 2016.
- DIRAT, B. et al. Unraveling the Obesity and Breast Cancer Links: A Role for Cancer-

Associated Adipocytes? In: **Adipose Tissue Development**. Basel: KARGER, 2010. v. 19p. 45–52.

FAHY, E. et al. Update of the LIPID MAPS comprehensive classification system for lipids. **Journal of Lipid Research**, v. 50, n. Supplement, p. S9–S14, abr. 2009.

GAO, Y. et al. Quantitative proteomics by SWATH-MS reveals sophisticated metabolic reprogramming in hepatocellular carcinoma tissues. **Scientific Reports**, v. 7, p. 45913, 5 abr. 2017.

GIL DE LA FUENTE, A. et al. Knowledge-based metabolite annotation tool: CEU Mass Mediator. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 154, p. 138–149, 30 maio 2018.

GUAN, M. et al. Comprehensive qualification and quantification of triacylglycerols with specific fatty acid chain composition in horse adipose tissue, human plasma and liver tissue. **Talanta**, v. 172, p. 206–214, 1 set. 2017.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646–674, 2011.

HOUWELING, M. et al. Induction of hepatocyte proliferation after partial hepatectomy is accompanied by a markedly reduced expression of phosphatidylethanolamine N-methyltransferase-2. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism**, v. 1346, n. 1, p. 1–9, 17 maio 1997.

JIANG, S. et al. Mass spectrometry-based lipidomics analysis using methyl tert-butyl ether extraction in human hepatocellular carcinoma tissues. **Anal. Methods**, v. 7, n. 19, p. 8466–8471, 2015.

KAMPHORST, J. J. et al. Hypoxic and Ras-transformed cells support growth by scavenging unsaturated fatty acids from lysophospholipids. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, n. 22, p. 8882–8887, 2013.

KISHIDA, H. et al. Enhancement of hepatocarcinogenesis initiated with diethylnitrosamine or N-nitrosobis(2-hydroxypropyl)amine by a choline-deficient, L-amino acid-defined diet administered prior to the carcinogen exposure in rats. **Experimental and Toxicologic Pathology**, v. 52, n. 5, p. 405–412, out. 2000.

KRAUTBAUER, S. et al. Ceramide and polyunsaturated phospholipids are strongly reduced in human hepatocellular carcinoma. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1861, n. 11, p. 1767–1774, nov. 2016.

LAUENER, R. et al. Selective inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase by phosphatidic acid and related lipids. **Biochemical and Biophysical Research communications**, v. 215, n. 1, p. 8–14, 4 out. 1995.

LI, Z. et al. Aberrant Lipid Metabolism in Hepatocellular Carcinoma Revealed by Liver Lipidomics. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 12, p. 2550, 28 nov. 2017.

LIN, L. et al. Functional lipidomics: Palmitic acid impairs hepatocellular carcinoma development by modulating membrane fluidity and glucose metabolism. **Hepatology**, v. 66, n. 2, p. 432–448, ago. 2017.

LU, Y. et al. Comparison of hepatic and serum lipid signatures in hepatocellular

carcinoma patients leads to the discovery of diagnostic and prognostic biomarkers. **Oncotarget**, v. 9, n. 4, p. 5032–5043, 12 jan. 2018.

MILGRAUM, L. Z. et al. Enzymes of the fatty acid synthesis pathway are highly expressed in in situ breast carcinoma. **Clinical Cancer Research: an Official Journal of the American Association for Cancer Research**, v. 3, n. 11, p. 2115–20, nov. 1997.

MORITA, Y. et al. Lysophosphatidylcholine acyltransferase 1 altered phospholipid composition and regulated hepatoma progression. **Journal of Hepatology**, v. 59, n. 2, p. 292–299, ago. 2013.

OURO, A. et al. Phosphatidic acid inhibits ceramide 1-phosphate-stimulated macrophage migration. **Biochemical Pharmacology**, v. 92, n. 4, p. 642–650, 15 dez. 2014.

PASSOS-CASTILHO, A. M. et al. Plasma lipidomic fingerprinting to distinguish among hepatitis C-related hepatocellular carcinoma, liver cirrhosis, and chronic hepatitis C using MALDI-TOF mass spectrometry: a pilot study. **Journal of Gastrointestinal and Liver Diseases**, v. 24, n. 1, p. 43–9, 1 mar. 2015.

PIYATHILAKE, C. J. et al. The expression of fatty acid synthase (FASE) is an early event in the development and progression of squamous cell carcinoma of the lung. **Human Pathology**, v. 31, n. 9, p. 1068–1073, 2000.

RESSOM, H. W. et al. **Multi-omic approaches for characterization of hepatocellular carcinoma**. 38th Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society (EMBC). **Anais. IEEE**, ago. 2016Disponível em: <<http://ieeexplore.ieee.org/document/7591467/>>

ROS-MAZURCZYK, M. et al. Serum lipid profile discriminates patients with early lung cancer from healthy controls. **Lung Cancer**, v. 112, p. 69–74, out. 2017.

RYSMAN, E. et al. De novo lipogenesis protects cancer cells from free radicals and chemotherapeutics by promoting membrane lipid saturation. **Cancer Research**, v. 70, n. 20, p. 8117–8126, 2010.

SAKAKIMA, Y. et al. Prevention of hepatocarcinogenesis with phosphatidylcholine and menaquinone-4: In vitro and in vivo experiments. **Journal of Hepatology**, v. 47, n. 1, p. 83–92, jul. 2007.

SERNA, J. et al. Quantitative lipidomic analysis of plasma and plasma lipoproteins using MALDI-TOF mass spectrometry. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 189, p. 7–18, 2015.

SUCKAU, D. et al. A novel MALDI LIFT-TOF/TOF mass spectrometer for proteomics. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 376, n. 7, p. 952–965, 1 ago. 2003.

TESSITORE, L. et al. Diminished expression of phosphatidylethanolamine N-methyltransferase 2 during hepatocarcinogenesis. **The Biochemical Journal**, v. 337, n. Pt 1, p. 23–7, 1 jan. 1999.

TESSITORE, L. et al. Expression of Phosphatidylethanolamine N-Methyltransferase in Human Hepatocellular Carcinomas. **Oncology**, v. 65, n. 2, p. 152–158, 2003.

VAZQUEZ-MARTIN, A. et al. Overexpression of fatty acid synthase gene activates

HER1/HER2 tyrosine kinase receptors in human breast epithelial cells. **Cell Proliferation**, v. 41, n. 1, p. 59–85, 16 jan. 2008.

VILLANUEVA, A. et al. Combining Clinical, Pathology, and Gene Expression Data to Predict Recurrence of Hepatocellular Carcinoma. **Gastroenterology**, v. 140, n. 5, p. 1501–1512, maio 2011.

WENK, M. R. Lipidomics: New Tools and Applications. **Cell**, v. 143, n. 6, p. 888–895, 10 dez. 2010.

WISHART, D. S. et al. HMDB: the Human Metabolome Database. **Nucleic Acids Research**, v. 35, n. Database issue, p. D521-6, 3 jan. 2007.

XIA, J.; WISHART, D. S. Using MetaboAnalyst 3.0 for Comprehensive Metabolomics Data Analysis. In: **Current Protocols in Bioinformatics**. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2016. v. 55p. 14.10.1-14.10.91.

CAPÍTULO 4

Considerações Finais, Apêndices e Anexos

“Os que se encantam com a prática sem a ciência são como os timoneiros que entram no navio sem timão nem bússola, nunca tendo certeza do seu destino.”

(Leonardo da Vinci)

1. CONCLUSÕES

O carcinoma hepatocelular (CHC) apresenta uma cascata de eventos moleculares complexos, portanto, a compreensão do desequilíbrio metabólico complementarmente ao desarranjo proteômico em estágios avançados da doença, quando pacientes apresentam severa disfunção hepática, é considerada uma abordagem valiosa para o entendimento acerca do desenvolvimento e progressão de neoplasias bem como para o avanço no diagnóstico precoce. O presente estudo apresentou um panorama geral sobre as alterações no perfil global de proteínas e lipídeos como reflexo da reprogramação metabólica associada ao câncer em pacientes hepatopatas terminais.

A aplicação da espectrometria de massas (MS) a questões clínicas sob uma abordagem translacional-multiômica fornece uma compreensão mais profunda sobre o CHC avançado e possíveis candidatos a biomarcadores. Nesta pesquisa, variações no *Fold Change* e no *VIP score* demonstram alterações na expressão e contribuição de diversas proteínas, permitindo a triagem de 17 candidatas a biomarcadores para futura validação. Embora estudos complementares sejam necessários para elucidar a estrutura molecular dos lipídeos identificados, a alteração na razão fosfatidilcolina/fosfatidiletanolamina (PC/PE) revelou o desequilíbrio de glicerofosfolipídeos como potencial via de biomarcadores diagnósticos e intervenção terapêutica. Ademais, os lipídeos sob análise por PLS-DA *imp. features* apresentaram maior contribuição (*VIP score* 2.5) na caracterização dos cenários se comparado ao conjunto de dados proteômicos (*VIP score* 2.0).

As análises proteômica e lipidômica, avaliadas individualmente ou em conjunto, permitiram observar o impacto do CHC sob a expressão gênica e temporal, respectivamente, e revelaram possíveis candidatos a marcadores diagnósticos tanto em via metabólica primária quanto secundária em método não invasivo para o CHC e outras doenças do fígado. Dados de quantificação absoluta, comparação à outras condições patológicas semelhantes, enriquecimento do número de amostras experimentais e análises específicas para biomarcadores, como curva ROC, podem auxiliar na avaliação da capacidade diagnóstica das proteínas e lipídeos discriminantes revelados.

2. PERSPECTIVAS

Para melhor elucidar as alterações no conjunto de proteínas e lipídeos no CHC é necessário ainda avaliar os dados clínicos de cada paciente como uma variável adicional à análise, verificando principalmente aspectos que incorporem correspondência entre as condições do órgão e as alterações observadas. A construção de um modelo de correlação estatística pode auxiliar ainda no esclarecimento quanto aos potenciais outliers indicados pela classificação Random Forest e às semelhanças observadas entre o perfil global de lipídeos em amostras de cenários opostos sob análises de agrupamento.

Dentre os dados clínicos disponíveis, o score MELD (Model for End-stage Liver Disease) e o tamanho do tumor e número de nódulos avaliados são os parâmetros que melhor representam o grau de comprometimento do órgão pré-transplante hepático. Embora a classificação TNM de tumores malignos avalie não apenas parâmetros como taxa de crescimento e extensão da neoplasia, mas também o reflexo da relação tumor-hospedeiro, os critérios de nivelamento para eleição de candidatos ao transplante impossibilita a aplicação direta dos dados em análises de correlação. Por conseguinte, o modelo matemático MELD apresenta melhor adequação ao modelo estatístico sob análise da reprogramação metabólica no CHC.

Com intuito de avaliar a especificidade dos potenciais biomarcadores identificados, pretendemos incluir no estudo pacientes com infecção por vírus da hepatite C (VHC) como uma forma de controle positivo da doença. Ademais, em virtude da busca por biomarcadores diferencialmente expressos e não invasivos que integrem a assinatura molecular do CHC é fundamental a avaliação em conjunto dos dados apresentados, portanto pretendemos ainda desenvolver um mapa interativo entre as vias metabólicas para melhor interpretação dos eventos moleculares observados após elucidação estrutural dos lipídeos discriminantes por técnica LC-qTOF.

Para enriquecer e dar continuidade ao projeto, pretendemos analisar futuramente as alterações no regime de glicanos desses pacientes e produzir nova interação com as vias abordadas no presente estudo. A caracterização dos glicanos em doenças complexas como o CHC, bem como os avanços atuais no campo da

glicobiologia, podem auxiliar a elucidar propriedades biológicas do câncer ainda mal compreendidas (DE OLIVEIRA; RICART; MARTINS, 2018 - ANEXO B).

APÊNDICE A – Seleção de proteínas reguladas positivamente em plasma de pacientes com CHC de acordo com Fold Change

| Entrada UniProtKB | Anova (p) | Max fold change |
|--------------------------------|-------------|-----------------|
| P83593 KV405_HUMAN | 0.010063283 | 1716.938732 |
| tr E9PK25 E9PK25_HUMAN | 1.30E-05 | 199.603108 |
| tr Q9UL90 Q9UL90_HUMAN | 0.015248344 | 61.15552205 |
| I3L3D5 I3L3D5_HUMAN | 0.000406622 | 27.17469958 |
| Q9Y490 TLN1_HUMAN | 0.01820918 | 23.94492933 |
| A0A125U0V2 A0A125U0V2_HUMAN | 0.00017907 | 17.50591287 |
| tr A0A068LKQ0 A0A068LKQ0_HUMAN | 0.001373038 | 16.48666148 |
| tr A2J422 A2J422_HUMAN | 0.019839611 | 16.36513515 |
| tr Q8IZD7 Q8IZD7_HUMAN | 5.68E-05 | 16.30196966 |
| A0A0X9TD47 A0A0X9TD47_HUMAN | 0.007923363 | 15.36363066 |
| tr F8UV74 F8UV74_HUMAN | 0.000729906 | 14.67559026 |
| tr Q6N097 Q6N097_HUMAN | 9.68E-06 | 14.24012571 |
| tr Q6P089 Q6P089_HUMAN | 0.000297057 | 12.31496053 |
| tr S6BAR0 S6BAR0_HUMAN | 0.001521602 | 12.25779884 |
| P02768 ALBU_HUMAN | 0.017869586 | 12.18410202 |
| Q4ZGM8 Q4ZGM8_HUMAN | 0.009956505 | 12.12195572 |
| tr A2NI60 A2NI60_HUMAN | 2.54E-06 | 12.03259119 |
| P49747 COMP_HUMAN | 0.000444397 | 11.10152465 |
| tr Q8NCL6 Q8NCL6_HUMAN | 1.14E-05 | 11.01751416 |
| A0A1L2BU33 A0A1L2BU33_HUMAN | 9.86E-05 | 11.0108439 |

Fonte: adaptado do *software* Progenesis Q1.

APÊNDICE B – Seleção de proteínas reguladas positivamente em plasma de pacientes controle de acordo com Fold Change

| Entrada UniProtKB | Anova (p) | Max fold change |
|--------------------------------|-------------|-----------------|
| Q15113 PCOC1_HUMAN | 0.013057428 | 221.4939873 |
| J3KS17 J3KS17_HUMAN | 0.020654462 | 110.5649606 |
| tr A2J1N5 A2J1N5_HUMAN | 0.005253707 | 77.8280423 |
| Q2L9S7 Q2L9S7_HUMAN | 0.018339341 | 35.43058727 |
| tr D9ZGG2 D9ZGG2_HUMAN | 0.024035478 | 31.48802268 |
| B2RTX6 B2RTX6_HUMAN | 0.001941082 | 22.93394392 |
| E9KL23 E9KL23_HUMAN | 0.031988872 | 22.15071576 |
| tr A0A075B6P5 A0A075B6P5_HUMAN | 0.000246678 | 20.33240515 |
| tr A0A087WYR4 A0A087WYR4_HUMAN | 0.001445509 | 17.45970304 |
| tr G3XAK1 G3XAK1_HUMAN | 4.57E-06 | 13.13894216 |
| P20742 PZP_HUMAN | 0.00495613 | 8.97310108 |
| P03952 KLKB1_HUMAN | 0.021822059 | 8.550620769 |
| B4E180 B4E180_HUMAN | 6.82E-08 | 7.48634218 |
| P35858-2 ALS_HUMAN | 4.68E-13 | 7.286470433 |
| P00739 HPTR_HUMAN | 1.29E-05 | 6.819613495 |
| tr D6RF35 D6RF35_HUMAN | 0.004325196 | 6.808447333 |
| P00738 HPT_HUMAN | 1.78E-05 | 6.59836859 |
| P00739-2 HPTR_HUMAN | 1.02E-06 | 5.900373071 |
| tr A5YAK2 A5YAK2_HUMAN | 0.00462263 | 5.384538772 |
| B4DI57 B4DI57_HUMAN | 0.047753157 | 4.982457809 |

Fonte: adaptado do *software* Progenesis Q1.

APÊNDICE C – Lista de proteínas reguladas positivamente em plasma de pacientes com CHC durante análise no software Progenesis Q1

| Entrada UniProtKB | Anova (p) | Max fold change |
|--------------------------------|-------------|-----------------|
| tr A0A0C4DH38 A0A0C4DH38_HUMAN | 2.25499E-07 | 4.100814482 |
| Q6P089 Q6P089_HUMAN | 6.78417E-07 | 7.370576986 |
| B2R6W1 B2R6W1_HUMAN | 9.07999E-07 | 3.542221639 |
| P04275 VWF_HUMAN | 9.89827E-07 | 7.078860892 |
| B2R6M6 B2R6M6_HUMAN | 1.75326E-06 | 3.521293034 |
| tr A0A0A0MS11 A0A0A0MS11_HUMAN | 2.05013E-06 | 6.070326992 |
| tr Q6MZQ6 Q6MZQ6_HUMAN | 2.0543E-06 | 3.075551953 |
| P0DOX3 IGD_HUMAN | 2.29331E-06 | 9.808277637 |
| tr A2NI60 A2NI60_HUMAN | 2.53727E-06 | 12.03259119 |
| Q6GMX0 Q6GMX0_HUMAN | 5.66996E-06 | 3.358185965 |
| tr A0A075B6J3 A0A075B6J3_HUMAN | 7.7386E-06 | 6.106463519 |
| tr Q6N097 Q6N097_HUMAN | 9.68331E-06 | 14.24012571 |
| tr A2NYU7 A2NYU7_HUMAN | 1.11751E-05 | 10.75668474 |
| tr Q8NCL6 Q8NCL6_HUMAN | 1.14414E-05 | 11.01751416 |
| Q6MZV6 Q6MZV6_HUMAN | 1.18359E-05 | 2.673331619 |
| tr E9PK25 E9PK25_HUMAN | 1.30485E-05 | 199.603108 |
| tr A0A068LN03 A0A068LN03_HUMAN | 1.35075E-05 | 3.161050985 |
| A0A1C9J6R6 A0A1C9J6R6_HUMAN | 2.17907E-05 | 4.837343426 |
| Q6PIL8 Q6PIL8_HUMAN | 2.48054E-05 | 2.210127651 |
| tr Q65ZC9 Q65ZC9_HUMAN | 2.57156E-05 | 2.506413663 |
| O00391-2 QSOX1_HUMAN | 2.69163E-05 | 2.209193001 |
| A2NKM7 A2NKM7_HUMAN | 3.39648E-05 | 5.094875993 |
| A0A1C9J6R3 A0A1C9J6R3_HUMAN | 4.41476E-05 | 3.850653514 |

| | | |
|--------------------------------|-------------|-------------|
| A0N5G4 A0N5G4_HUMAN | 5.08739E-05 | 8.746774854 |
| tr Q8IZD7 Q8IZD7_HUMAN | 5.67554E-05 | 16.30196966 |
| P01591 IGJ_HUMAN | 6.3414E-05 | 3.343557384 |
| tr B1N7B6 B1N7B6_HUMAN | 6.8926E-05 | 3.024946419 |
| tr A0A0C4DH33 A0A0C4DH33_HUMAN | 8.59342E-05 | 7.291228801 |
| tr A0A087X130 A0A087X130_HUMAN | 8.76795E-05 | 2.577656112 |
| P01871 IGHM_HUMAN | 9.22695E-05 | 5.342391006 |
| A0A1L2BU33 A0A1L2BU33_HUMAN | 9.86479E-05 | 11.0108439 |
| A0A0F7T891 A0A0F7T891_HUMAN | 0.000102079 | 3.934534755 |
| P01621 KV303_HUMAN | 0.000117998 | 3.258264094 |
| tr Q6GMX4 Q6GMX4_HUMAN | 0.000121047 | 2.369688097 |
| P01833 PIGR_HUMAN | 0.000122952 | 3.791129222 |
| Q96JD0 Q96JD0_HUMAN | 0.000122992 | 7.262246323 |
| tr A0A0B4J1V4 A0A0B4J1V4_HUMAN | 0.000128087 | 2.080634857 |
| tr Q7Z379 Q7Z379_HUMAN | 0.000139649 | 9.68733778 |
| tr S6AWE6 S6AWE6_HUMAN | 0.000140864 | 10.36296756 |
| S6BAM6 S6BAM6_HUMAN | 0.000150903 | 3.84109603 |
| Q9Y5Y7 LYVE1_HUMAN | 0.000155939 | 5.110293929 |
| tr A0N5G3 A0N5G3_HUMAN | 0.000177249 | 5.170721762 |
| A0A125U0V2 A0A125U0V2_HUMAN | 0.00017907 | 17.50591287 |
| A0N5G1 A0N5G1_HUMAN | 0.000196643 | 2.04242534 |
| P23142 FBLN1_HUMAN | 0.000197556 | 2.211967616 |
| tr S6BGE0 S6BGE0_HUMAN | 0.000197699 | 3.956550172 |
| P51884 LUM_HUMAN | 0.000215065 | 2.37787352 |
| tr A2NZ55 A2NZ55_HUMAN | 0.00022529 | 3.388509696 |
| P01593 KVD33_HUMAN | 0.00025391 | 3.464004405 |

| | | |
|--------------------------------|-------------|-------------|
| P18135 KV312_HUMAN | 0.000309307 | 3.133708141 |
| A0A0B4J1V2 HV226_HUMAN | 0.000331504 | 2.614107444 |
| A0A1W6IYJ0 A0A1W6IYJ0_HUMAN | 0.000354919 | 2.104053572 |
| tr A0A0B4J1Y9 A0A0B4J1Y9_HUMAN | 0.000382135 | 4.794220551 |
| tr S6AWD6 S6AWD6_HUMAN | 0.000384208 | 3.338442639 |
| A0A087WSY6 KVD15_HUMAN | 0.000395816 | 3.215528413 |
| I3L3D5 I3L3D5_HUMAN | 0.000406622 | 27.17469958 |
| P49747 COMP_HUMAN | 0.000444397 | 11.10152465 |
| tr Q9UL72 Q9UL72_HUMAN | 0.000489116 | 4.383941093 |
| tr Q7Z374 Q7Z374_HUMAN | 0.000535156 | 2.35599483 |
| A2NXP9 A2NXP9_HUMAN | 0.00069665 | 4.019225394 |
| P07333 CSF1R_HUMAN | 0.000727064 | 3.73830866 |
| tr F8UV74 F8UV74_HUMAN | 0.000729906 | 14.67559026 |
| tr B4DW52 B4DW52_HUMAN | 0.000747518 | 7.584863239 |
| P01620 KV302_HUMAN | 0.000771553 | 2.602576031 |
| O75170 PP6R2_HUMAN | 0.000814197 | 2.613857428 |
| tr H6VRG3 H6VRG3_HUMAN | 0.0009349 | 4.152636716 |
| P01714 LV319_HUMAN | 0.001086767 | 2.062725134 |
| P01614 KV201_HUMAN | 0.001093762 | 2.774021886 |
| C0JYZ2 C0JYZ2_HUMAN | 0.001137092 | 2.991007343 |
| A0A0F7T8B3 A0A0F7T8B3_HUMAN | 0.001272784 | 2.845483049 |
| tr A2JA16 A2JA16_HUMAN | 0.001275883 | 3.998467797 |
| A0A0A0MS15 HV349_HUMAN | 0.001328341 | 2.40989825 |
| tr A0A068LKQ0 A0A068LKQ0_HUMAN | 0.001373038 | 16.48666148 |
| tr A0A068LL67 A0A068LL67_HUMAN | 0.001376242 | 7.032396454 |
| tr A0A024RAA7 A0A024RAA7_HUMAN | 0.001435766 | 2.782783268 |

| | | |
|--------------------------------|-------------|-------------|
| tr Q0ZCH4 Q0ZCH4_HUMAN | 0.001447502 | 2.474196729 |
| P35443 TSP4_HUMAN | 0.001460323 | 4.814648142 |
| tr S6BAR0 S6BAR0_HUMAN | 0.001521602 | 12.25779884 |
| Q96K68 Q96K68_HUMAN | 0.001640533 | 2.059341288 |
| Q5FWF9 Q5FWF9_HUMAN | 0.001857688 | 5.660878978 |
| tr Q6ZVX0 Q6ZVX0_HUMAN | 0.001879607 | 2.443135733 |
| tr A2IPI3 A2IPI3_HUMAN | 0.001902689 | 3.305828782 |
| tr S6B294 S6B294_HUMAN | 0.001926455 | 7.757105804 |
| A0A024RDE1 A0A024RDE1_HUMAN | 0.001985591 | 7.404020073 |
| tr Q6N092 Q6N092_HUMAN | 0.002145648 | 2.557972108 |
| B7ZM29 B7ZM29_HUMAN | 0.002203566 | 2.756080134 |
| tr A0A087WXI2 A0A087WXI2_HUMAN | 0.002464898 | 8.690566583 |
| A0A0B4J1X8 HV343_HUMAN | 0.003020971 | 2.285955418 |
| Q68CN4 Q68CN4_HUMAN | 0.003059912 | 4.637452957 |
| tr A2MYE2 A2MYE2_HUMAN | 0.003185917 | 2.855588457 |
| tr A2NUT2 A2NUT2_HUMAN | 0.003268937 | 2.401392489 |
| S6AWD9 S6AWD9_HUMAN | 0.003916106 | 2.207412017 |
| P55058 PLTP_HUMAN | 0.00406172 | 2.093963239 |
| tr A0A024R2Q7 A0A024R2Q7_HUMAN | 0.004369202 | 5.803107945 |
| Q6GMX6 Q6GMX6_HUMAN | 0.004461853 | 7.085136359 |
| tr B3KSS4 B3KSS4_HUMAN | 0.004923711 | 3.184359136 |
| tr Q59ED3 Q59ED3_HUMAN | 0.005018097 | 3.64606672 |
| tr S6AWE3 S6AWE3_HUMAN | 0.005307311 | 2.749387998 |
| tr A0A068LL52 A0A068LL52_HUMAN | 0.005426816 | 5.379565315 |
| Q6N094 Q6N094_HUMAN | 0.006022982 | 2.543170388 |
| Q8NEJ1 Q8NEJ1_HUMAN | 0.006050037 | 4.450955614 |

| | | |
|--------------------------------|-------------|-------------|
| Q6ZW64 Q6ZW64_HUMAN | 0.006594766 | 4.433635234 |
| tr Q7Z2U7 Q7Z2U7_HUMAN | 0.006759549 | 3.913332762 |
| P01601 KV109_HUMAN | 0.006889601 | 2.484547298 |
| P01704 LV214_HUMAN | 0.007434283 | 3.402346168 |
| Q13707 Q13707_HUMAN | 0.00790739 | 5.134092057 |
| P02751-12 FINC_HUMAN | 0.007915982 | 2.080913293 |
| A0A0X9TD47 A0A0X9TD47_HUMAN | 0.007923363 | 15.36363066 |
| Q6N091 Q6N091_HUMAN | 0.007964039 | 2.36042655 |
| P13645 K1C10_HUMAN | 0.008148853 | 3.359663008 |
| P06311 KV311_HUMAN | 0.008162149 | 2.268225526 |
| A0A087WYX9 A0A087WYX9_HUMAN | 0.008727541 | 4.691393899 |
| tr A0A075B7D4 A0A075B7D4_HUMAN | 0.00891943 | 2.801335505 |
| tr Q5NV84 Q5NV84_HUMAN | 0.009051664 | 2.019274524 |
| tr Q6N090 Q6N090_HUMAN | 0.009287207 | 2.413618677 |
| P35908 K22E_HUMAN | 0.00932142 | 3.219429877 |
| A0A109PW50 A0A109PW50_HUMAN | 0.009411034 | 3.3826095 |
| Q4ZGM8 Q4ZGM8_HUMAN | 0.009956505 | 12.12195572 |
| P83593 KV405_HUMAN | 0.010063283 | 1716.938732 |
| tr B3KSM6 B3KSM6_HUMAN | 0.01059648 | 3.218474111 |
| A0A0F7T983 A0A0F7T983_HUMAN | 0.012445766 | 4.036681312 |
| tr S6BGD6 S6BGD6_HUMAN | 0.013455488 | 2.77269932 |
| A0A109PW33 A0A109PW33_HUMAN | 0.013547349 | 2.329666006 |
| tr K7EJH8 K7EJH8_HUMAN | 0.013988452 | 2.023529104 |
| tr D3DUU0 D3DUU0_HUMAN | 0.014800971 | 2.182213722 |
| P01721 LV601_HUMAN | 0.015163902 | 4.570574254 |
| tr Q9UL90 Q9UL90_HUMAN | 0.015248344 | 61.15552205 |

| | | |
|--------------------------------|-------------|-------------|
| E7ESS4 E7ESS4_HUMAN | 0.0153957 | 3.568132819 |
| P02768 ALBU_HUMAN | 0.017869586 | 12.18410202 |
| P0DOX2 IGA2_HUMAN | 0.018189558 | 2.384828551 |
| Q9Y490 TLN1_HUMAN | 0.01820918 | 23.94492933 |
| P27918 PROP_HUMAN | 0.019756878 | 2.121361144 |
| Q9NQ79-3 CRAC1_HUMAN | 0.01977629 | 7.747685509 |
| tr A2J422 A2J422_HUMAN | 0.019839611 | 16.36513515 |
| A8K479 A8K479_HUMAN | 0.020864205 | 3.881052268 |
| tr A0A075B7D0 A0A075B7D0_HUMAN | 0.021331583 | 3.047875421 |
| P01624 KV306_HUMAN | 0.021359029 | 2.027493541 |
| tr S6AWF0 S6AWF0_HUMAN | 0.023097715 | 4.491151862 |
| tr Q96QS0 Q96QS0_HUMAN | 0.026773199 | 2.339836742 |
| tr Q9NPP6 Q9NPP6_HUMAN | 0.02833994 | 3.671459294 |
| tr A2IPI5 A2IPI5_HUMAN | 0.029372164 | 2.100315302 |
| tr B4DQA0 B4DQA0_HUMAN | 0.031573754 | 2.332900739 |
| tr A0A075B6H9 A0A075B6H9_HUMAN | 0.031762259 | 2.978592375 |
| A0A125U0U7 A0A125U0U7_HUMAN | 0.043735196 | 5.963324508 |

Fonte: adaptado do *software* Progenesis Q1.

APÊNDICE D – Lista de proteínas reguladas positivamente em plasma de pacientes controle durante análise no software Progenesis Q1

| Entrada UniProtKB | Anova (p) | Max fold change |
|--------------------------------|-------------|-----------------|
| P35858-2 ALS_HUMAN | 4.68181E-13 | 7.286470433 |
| P07225 PROS_HUMAN | 1.75951E-08 | 2.269067096 |
| P10909 CLUS_HUMAN | 6.27751E-08 | 2.129267816 |
| B4E180 B4E180_HUMAN | 6.82438E-08 | 7.48634218 |
| H0YAC1 H0YAC1_HUMAN | 8.86676E-08 | 2.680812253 |
| tr D3DRR6 D3DRR6_HUMAN | 6.48668E-07 | 2.336617164 |
| tr Q8IVC0 Q8IVC0_HUMAN | 7.03032E-07 | 2.838569305 |
| P19827 ITIH1_HUMAN | 7.26412E-07 | 2.540461464 |
| tr E9KL36 E9KL36_HUMAN | 7.76236E-07 | 2.57883597 |
| P00739-2 HPTR_HUMAN | 1.01937E-06 | 5.900373071 |
| P08697 A2AP_HUMAN | 1.21731E-06 | 2.329754089 |
| D9ZGG2 D9ZGG2_HUMAN | 1.7807E-06 | 2.069007545 |
| tr A0A024R6I6 A0A024R6I6_HUMAN | 2.2527E-06 | 3.167994947 |
| P22792 CPN2_HUMAN | 2.69684E-06 | 2.200090905 |
| P02753 RET4_HUMAN | 3.54624E-06 | 3.893611723 |
| tr G3XAK1 G3XAK1_HUMAN | 4.56985E-06 | 13.13894216 |
| D6RF35 D6RF35_HUMAN | 5.70833E-06 | 2.658252319 |
| P00740-2 FA9_HUMAN | 6.18642E-06 | 3.023657746 |
| P17936-2 IBP3_HUMAN | 8.13809E-06 | 3.557746071 |
| A0A0R7FJH5 A0A0R7FJH5_HUMAN | 8.69257E-06 | 2.423108788 |
| P0C0L5 CO4B_HUMAN | 9.58624E-06 | 2.794100811 |
| O75636 FCN3_HUMAN | 1.10727E-05 | 3.063937457 |
| P00739 HPTR_HUMAN | 1.28509E-05 | 6.819613495 |

| | | |
|--------------------------------|-------------|-------------|
| P00734 THRB_HUMAN | 1.43082E-05 | 2.338628395 |
| A0A096LPE2 A0A096LPE2_HUMAN | 1.67395E-05 | 3.178617171 |
| P00738 HPT_HUMAN | 1.78049E-05 | 6.59836859 |
| tr B7ZKJ8 B7ZKJ8_HUMAN | 1.81805E-05 | 2.002703126 |
| tr B2R9F2 B2R9F2_HUMAN | 2.3267E-05 | 2.164223351 |
| P29622 KAIN_HUMAN | 2.58894E-05 | 2.118357631 |
| P02749 APOH_HUMAN | 2.92803E-05 | 2.05431537 |
| P02656 APOC3_HUMAN | 2.95239E-05 | 3.285426356 |
| Q96IY4-2 CBPB2_HUMAN | 3.18934E-05 | 2.418140981 |
| P15169 CBPN_HUMAN | 4.1862E-05 | 2.764750476 |
| tr K7ER74 K7ER74_HUMAN | 6.46574E-05 | 3.873695604 |
| A0A140VK24 A0A140VK24_HUMAN | 8.50828E-05 | 2.45076041 |
| tr A0A0A0MRJ7 A0A0A0MRJ7_HUMAN | 9.07127E-05 | 3.842347942 |
| A0A075B6R9 A0A075B6R9_HUMAN | 9.49389E-05 | 3.899352492 |
| tr F8WF14 F8WF14_HUMAN | 0.000130161 | 2.265333657 |
| A0A1P8SD62 A0A1P8SD62_HUMAN | 0.00013152 | 3.176020886 |
| tr A0A075B6P5 A0A075B6P5_HUMAN | 0.000246678 | 20.33240515 |
| P19652 A1AG2_HUMAN | 0.00024835 | 3.672622497 |
| E7EU81 E7EU81_HUMAN | 0.000304284 | 2.777338078 |
| tr A0A024R930 A0A024R930_HUMAN | 0.000328013 | 3.558714198 |
| P80108 PHLD_HUMAN | 0.000358582 | 2.774794146 |
| tr B2R5G8 B2R5G8_HUMAN | 0.000553016 | 4.920779607 |
| B3KQ20 B3KQ20_HUMAN | 0.000599186 | 2.601131369 |
| P27169 PON1_HUMAN | 0.000606775 | 2.36683275 |
| Q9UGM5 FETUB_HUMAN | 0.00075793 | 2.269356439 |
| tr K7ERI9 K7ERI9_HUMAN | 0.001461679 | 2.751791673 |

| | | |
|-----------------------------|-------------|-------------|
| Q1HP67 Q1HP67_HUMAN | 0.001797759 | 4.219885007 |
| B2RTX6 B2RTX6_HUMAN | 0.001941082 | 22.93394392 |
| P20851-2 C4BPB_HUMAN | 0.002108866 | 2.091063663 |
| P01019 ANGT_HUMAN | 0.002457945 | 2.999452302 |
| P02790 HEMO_HUMAN | 0.002718091 | 2.069048562 |
| Q15485 FCN2_HUMAN | 0.004547012 | 3.576408156 |
| tr A5YAK2 A5YAK2_HUMAN | 0.00462263 | 5.384538772 |
| P20742 PZP_HUMAN | 0.00495613 | 8.97310108 |
| tr A2J1N5 A2J1N5_HUMAN | 0.005253707 | 77.8280423 |
| tr B4E1D8 B4E1D8_HUMAN | 0.006254934 | 3.972605921 |
| P0C0L4 CO4A_HUMAN | 0.006315393 | 2.46534327 |
| tr Q06AH7 Q06AH7_HUMAN | 0.008093628 | 2.955868896 |
| P68871 HBB_HUMAN | 0.01013028 | 4.811799259 |
| B7Z1F8 B7Z1F8_HUMAN | 0.011534568 | 4.250754677 |
| A0A1U9X9A9 A0A1U9X9A9_HUMAN | 0.01216283 | 2.780295143 |
| Q15113 PCOC1_HUMAN | 0.013057428 | 221.4939873 |
| P36980-2 FHR2_HUMAN | 0.014711912 | 2.01573768 |
| tr B1AKG0 B1AKG0_HUMAN | 0.015345257 | 2.652717789 |
| Q2L9S7 Q2L9S7_HUMAN | 0.018339341 | 35.43058727 |
| tr A0N071 A0N071_HUMAN | 0.019743279 | 4.21184148 |
| J3KS17 J3KS17_HUMAN | 0.020654462 | 110.5649606 |
| P03952 KLKB1_HUMAN | 0.021822059 | 8.550620769 |
| tr Q5NV65 Q5NV65_HUMAN | 0.030268882 | 4.685693299 |
| E9KL23 E9KL23_HUMAN | 0.031988872 | 22.15071576 |
| Q5T8A7 PPR26_HUMAN | 0.039747029 | 3.670083356 |
| Q8TE73 DYH5_HUMAN | 0.040291923 | 4.284163721 |

| | | |
|------------------------|-------------|-------------|
| tr U5LIA9 U5LIA9_HUMAN | 0.043989936 | 2.772090634 |
| B4DI57 B4DI57_HUMAN | 0.047753157 | 4.982457809 |

Fonte: adaptado do *software* Progenesis Q1.

APÊNDICE E – Lista de entradas UniProtKB deletadas do banco de dados experimental

| Entrada UniProtKB | Anova (p) | Max fold change |
|--------------------------------|-------------|-----------------|
| tr A0A087WTX5 A0A087WTX5_HUMAN | 2.55E-06 | 4.764354699 |
| tr A0A087WZW8 A0A087WZW8_HUMAN | 0.000139315 | 2.007732199 |
| tr A0A087WWV8 A0A087WWV8_HUMAN | 0.000240182 | 2.272098108 |
| tr A0A087WU91 A0A087WU91_HUMAN | 0.001246473 | 5.534483476 |
| tr A0A087WYN7 A0A087WYN7_HUMAN | 0.001396999 | 2.871773668 |
| tr A0A087WYR4 A0A087WYR4_HUMAN | 0.001445509 | 17.45970304 |
| tr A0A087WXL8 A0A087WXL8_HUMAN | 0.004836937 | 3.885267537 |
| tr A0A087X079 A0A087X079_HUMAN | 0.015403459 | 7.062407843 |

Fonte: adaptado do *software* Progenesis Q1.

| | | | | | | | | | | |
|-------------------------------------------------------------------------|-----|------------|---|------------|------------|-------------------|-----|-----|-------------------|-----|
| B Cell Differentiation | - | - | - | - | - | IEA | - | - | - | - |
| B Cell Receptor Signaling Pathway | - | - | - | IBA | - | - | - | IBA | - | IBA |
| Blood Microparticle | - | IEA IDA | - | IDA IBA | - | - | IDA | IDA | - | IDA |
| Calcium Ion Binding | - | - | - | - | - | - | - | - | IEA IDA TAS | - |
| Calcium-Mediated Signaling Using Intracellular Calcium Source | - | - | - | - | - | IEA IGI | - | - | - | - |
| Cell Adhesion | - | - | - | - | - | IEA IDA | - | - | IEA | - |
| Cell Adhesion Molecule Binding | - | - | - | - | - | IEA IDA IPI | - | - | - | - |
| Cell Chemotaxis | - | - | - | - | - | IEA | - | - | - | - |
| Cell Cortex | - | IEA IDA | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Cell Matrix Adhesion | - | - | - | - | - | IEA IDA | - | - | - | - |
| Cell Projection | IEA | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Cell Projection Organization | IDA | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Cell Surface | - | - | - | - | - | IEA IDA | - | - | - | - |
| Cellular Response to Growth Factor Stimulus | - | IEA | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Cellular Response to Tumor Necrosis Factor | - | - | - | - | - | IEA | - | - | - | - |
| Cellular Response to Vascular Endothelial Growth Factor Stimulus | - | - | - | - | - | IEA | - | - | - | - |
| Chronic Inflammatory Response | - | - | - | - | - | IEA | - | - | - | - |
| Collagen Trimer | - | - | - | - | IEA | - | - | - | - | - |
| Collagen Binding | - | - | - | - | IEA IDA | - | - | - | IEA IDA | - |
| Complement Activation | - | - | - | TAS | - | - | TAS | - | - | - |

| | | | | | | | | | | |
|----------------------------------------------------|-------------------|-------------------|------------|------------|------------|------------|------------|-----|------------|-----|
| Complement Activation, Classical Pathway | - | - | - | IBA TAS | - | - | TAS | IBA | - | IBA |
| Cytoplasm | IEA IDA TAS | IEA IDA IBA | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Cytoskeleton | IEA | IEA | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Cytoskeleton Organization | IEA IMP ISS | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Cytosol | - | TAS | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Defense Response to Bacterium | - | - | - | IBA | - | - | - | - | - | - |
| Defense Response to Gram-Negative Bacterium | - | - | - | - | - | - | - | IDA | - | - |
| Early Endosome | - | - | - | - | - | IEA IDA | - | - | - | - |
| Embryo Implantation | - | - | IEA | - | - | - | - | - | - | - |
| Endoplasmic Reticulum | - | - | - | - | - | IEA IDA | - | - | - | - |
| External Side of Plasma Membrane | - | - | - | IBA | - | IEA IDA | - | - | - | IBA |
| Extracellular Exosome | IEA IDA | IEA IDA | IDA | IDA | IEA IDA | IEA IDA | - | IDA | IEA IDA | IDA |
| Extracellular Matrix | - | - | - | - | IDA | - | - | - | IEA IDA | - |
| Extracellular Matrix Organization | - | - | - | - | - | TAS | - | - | TAS | - |
| Extracellular Matrix Structural Constituent | - | - | - | - | - | - | - | - | TAS | - |
| Extracellular Region | - | - | IEA TAS | IEA TAS | IEA | - | NAS TAS | IEA | IEA TAS | TAS |
| Extracellular Space | IEA IDA | - | IDA | IDA | IEA IDA | IEA IDA | - | IDA | IEA IDA | IDA |
| Fc-epsilon Receptor Signaling Pathway | - | - | - | TAS | - | - | TAS | - | - | - |

| | | | | | | | | | | |
|-----------------------------------------------------------------------------|-----|------------|-----|-----|-----|------------|-----|-----|------------|-----|
| Positive Regulation of Gene Expression | - | - | IEA | - | - | - | - | - | - | - |
| Positive Regulation of Mammary Gland Epithelial Cell Proliferation | - | - | IEA | - | - | - | - | - | - | - |
| Positive Regulation of Peptidase Activity | - | - | - | - | IEA | - | - | - | - | - |
| Positive Regulation of Respiratory Burst | - | - | - | - | - | - | - | - | - | IDA |
| Positive Regulation of Ruffle Assembly | - | IEA IMP | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Positive Regulation of Stress Fiber Assembly | - | IEA | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Positive Regulation of T Cell Proliferation | - | - | - | - | - | IEA IDA | - | - | - | - |
| Positive Regulation of Transcription from RNA Polymerase II Promoter | - | IEA | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Positive Regulation of Viral Transcription | - | IEA | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Primary Amine Oxidase Activity | - | - | - | - | - | IEA IDA | - | - | - | - |
| Proline-Rich Region Binding | - | IEA IPI | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Protease Binding | - | - | - | - | - | - | - | - | IEA IPI | - |
| Protein Binding | IPI | IPI | IPI | IPI | IPI | - | - | IPI | IPI | - |
| Protein Stabilization | - | IEA IDA | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Proteinaceous Extracellular Matrix | - | - | - | - | - | - | - | - | IEA TAS | - |
| Protein-Chromophore Linkage | - | - | - | - | - | - | - | - | - | IEA |
| Proteolysis | - | - | IEA | IEA | IEA | - | IEA | - | - | - |
| Receptor Binding | - | IEA | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Receptor Tyrosine Kinase Binding | - | - | IDA | - | - | - | - | - | - | - |
| Receptor-Mediated Endocytosis | - | - | - | TAS | - | - | TAS | - | - | TAS |

| | | | | | | | | | | |
|------------------------------------------------------------|-----|-----|-----|-----|---|-----|-----|-----|-----|---|
| Serine-Type Endopeptidase Activity | - | - | IEA | TAS | - | - | TAS | - | - | - |
| Single Organismal Cell-Cell Adhesion | - | - | - | - | - | IEA | - | - | - | - |
| Single-Stranded DNA Binding | - | - | - | - | - | - | - | IDA | - | - |
| Skeletal System Development | - | - | - | - | - | - | - | - | TAS | - |
| Spermatogenesis | - | - | IEA | - | - | - | - | - | - | - |
| Synapse | - | IEA | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Vacuole | - | - | IEA | - | - | - | - | - | - | - |
| Vesicle | IEA | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | IDA | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Viral Process | - | - | - | - | - | IEA | - | - | - | - |
| WNT Signaling Pathway, Planar Cell Polarity Pathway | - | TAS | - | - | - | - | - | - | - | - |

Códigos de evidência atribuídos: (EIA) Inferred from Electronic Annotation; (IDA) Inferred from Direct Assay; (TAS) Traceable Author Statement; (NAS) Non-traceable Author Statement; (IPI) Inferred from Physical Interaction; (IEP) Inferred from Expression Pattern; (ISS) Inferred from Sequence or Structural Similarity; (IMP) Inferred from Mutant Phenotype; (IBA) Inferred from Biological Aspect of Ancestor; (IGI) Inferred from Genetic Interaction. Sinais convencionais utilizados: (-) Não se aplica. Fonte: adaptado do software Blast2go.

APÊNDICE G – Lista de identificação dos lipídeos regulados positivamente no plasma de pacientes com CHC

| Pico | <i>m/z</i> | Classe/Subclasse | Identificação |
|------|------------|-------------------------------------------------|---------------|
| 650 | 650.53 | Glicerofosfolípídeo/ Glicerofosfocolina | PC |
| | 650.5759 | | |
| | 650.4185 | | |
| | 650.4351 | | |
| | 650.4581 | | |
| | 650.4999 | | |
| | 650.4924 | | |
| | 650.5373 | | |
| | 650.5615 | | |
| 659 | 659.3801 | Glicerofosfolípídeo/ Glicerofosfoetanolamina | PE |
| | 659.4004 | | |
| | 659.2498 | | |
| | 659.2797 | | |
| | 659.2988 | | |
| | 659.3177 | | |
| | 659.3331 | | |
| | 659.3966 | | |
| | 659.389 | | |
| 672 | 672.539 | Glicerofosfolípídeo/ Glicerofosfoetanolamina | PE |
| | 672.5554 | | |
| | 672.4059 | | |
| | 672.414 | | |
| | 672.4477 | | |

| | | | |
|-----|----------|--------------------------------------------|-----|
| | 672.4732 | | |
| | 672.483 | | |
| | 672.7458 | | |
| | 672.5414 | | |
| 760 | 760.6766 | Glicerofosfolípídeo/ Glicerofosfocolina | PC |
| | 760.7087 | | |
| | 760.5339 | | |
| | 760.56 | | |
| | 760.5777 | | |
| | 760.6152 | | |
| | 760.625 | | |
| | 760.6712 | | |
| | 760.6907 | | |
| 881 | 881.8527 | Glicerolípídeo/ Triacilglicerídeo | TAG |
| | 881.8782 | | |
| | 881.6977 | | |
| | 881.7834 | | |
| | 881.7573 | | |
| | 881.7827 | | |
| | 881.7834 | | |
| | 881.979 | | |
| | 881.8628 | | |

Fonte: do autor (2018).

APÊNDICE H – Lista de identificação dos lipídeos regulados positivamente no plasma de pacientes controle

| Pico | <i>m/z</i> | Classe/Subclasse | Identificação |
|----------|------------|--------------------------------------------|---------------|
| 758 | 758.6992 | Glicerofosfolípídeo/ Glicerofosfocolina | PC |
| | 758.6564 | | |
| | 758.6579 | | |
| | 758.4898 | | |
| | 758.513 | | |
| | 758.5439 | | |
| | 758.5809 | | |
| | 758.6129 | | |
| 804 | 758.6323 | Glicerofosfolípídeo/ Glicerofosfocolina | PC |
| | 804.6781 | | |
| | 804.6319 | | |
| | 804.6365 | | |
| | 804.4629 | | |
| | 804.4917 | | |
| | 804.5312 | | |
| | 804.5634 | | |
| | 804.6324 | | |
| 804.6247 | | | |
| 782 | 782.6991 | Glicerofosfolípídeo/ Glicerofosfocolina | PC |
| | 782.6724 | | |
| | 782.6618 | | |
| | 782.4919 | | |
| | 782.5167 | | |

| | | | |
|-----|----------|--------------------------------------------|----|
| | 782.5536 | | |
| | 782.5766 | | |
| | 782.6141 | | |
| | 782.6305 | | |
| 683 | 683.1903 | Glicerofosfolípídeo/ Glicerofosfato | PA |
| | 683.167 | | |
| | 683.1438 | | |
| | 683.001 | | |
| | 683.0274 | | |
| | 683.0274 | | |
| | 683.063 | | |
| | 683.0845 | | |
| | 683.1022 | | |
| 810 | 810.7502 | Glicerofosfolípídeo/ Glicerofosfocolina | PC |
| | 810.7107 | | |
| | 810.7015 | | |
| | 810.5275 | | |
| | 810.5543 | | |
| | 810.5903 | | |
| | 810.6116 | | |
| | 810.6304 | | |
| | 810.6558 | | |

Fonte: do autor (2018).

ANEXO A – Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Ceará (COMPEPE 026/08)



Universidade Federal do Ceará
Comitê de Ética em Pesquisa

Of. Nº 139/08

Fortaleza, 14 de março de 2008

Protocolo COMPEPE nº 26/ 08

Pesquisador responsável: Aline Maria Araújo Martins

Deptº./Serviço: Departamento de Fisiologia e Farmacologia/ UFC

Título do Projeto: "Proteômica dos processos inflamatórios crônicos e o estabelecimento do processo neoplásico"

Levamos ao conhecimento de V.S^a. que o Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Ceará – COMPEPE, dentro das normas que regulamentam a pesquisa em seres humanos, do Conselho Nacional de Saúde – Ministério da Saúde, Resolução nº 196 de 10 de outubro de 1996 e complementares, aprovou o projeto supracitado na reunião do dia 13 de março de 2008.

Outrossim, informamos, que o pesquisador deverá se comprometer a enviar o relatório final do referido projeto.


Atenciosamente,

Mirian Parente Monteiro


Dra. Mirian Parente Monteiro
Coordenadora Adjunta do Comitê
de Ética em Pesquisa
COMPEPE/UFC

ANEXO B - DE OLIVEIRA, R. M.; RICART, C. A. O.; MARTINS, A. M. A. Use of Mass Spectrometry to Screen Glycan Early Markers in Hepatocellular Carcinoma.

Frontiers in Oncology, v. 7, n. January, p. 1–10, 2018.



REVIEW
published: 15 January 2018
doi: 10.3389/fonc.2017.00328



Use of Mass Spectrometry to Screen Glycan Early Markers in Hepatocellular Carcinoma

*Raphaella Menezes de Oliveira*¹, *Carlos Andre Ornelas Ricart*¹
and *Aline Maria Araujo Martins*^{1,2*}

¹Laboratory of Biochemistry and Protein Chemistry, Department of Cell Biology, Institute of Biological Sciences, University of Brasilia, Brasilia, Brazil, ²University Hospital Walter Cantideo, Surgery Department, Federal University of Coara, Fortaleza, Brazil

OPEN ACCESS

Edited by:
Sebastian Cordan,
Consejo Superior de Investigaciones Cientificas (CSIC), Spain

Reviewed by:
M. Carmen Martínez-Bisbal,
Biomedical Research Networking Center in Bioengineering, Biomaterials and Nanomedicine, Spain
Paloma V. Ballesteros,
Universidad Nacional de Educación a Distancia, Spain
Santosh Kumar Bharti,
Johns Hopkins University, United States

***Correspondence:**
Aline Maria Araujo Martins
alinomartins@unb.br

Association between altered glycosylation patterns and poor prognosis in cancer points glycans as potential specific tumor markers. Most proteins are glycosylated and functionally arranged on cell surface and extracellular matrix, mediating interactions and cellular signaling. Thereby, aberrant glycans may be considered a pathological phenotype at least as important as changes in protein expression for cancer and other complex diseases. As most serum glycoproteins have hepatic origin, liver disease phenotypes, such as hepatocellular carcinoma (HCC), may present altered glycan profile and display important modifications. One of the prominent obstacles in HCC is the diagnostic in advanced stages when patients have several liver dysfunctions, limiting treatment options and life expectancy. The characterization of glycomic profiles in pathological conditions by means of mass spectrometry (MS) may lead to the discovery of early diagnostic markers using non-invasive approaches. MS is a powerful analytical technique capable of elucidating many glycobiochemical issues and overcome limitations of the serological markers currently applied in clinical practice. Therefore, MS-based glycomics of tumor biomarkers is a promising tool to increase early detection and monitoring of disease.

Keywords: glycans, hepatocellular carcinoma, mass spectrometry, glycomics, biomarkers, cancer