



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIRURGIA**

WALYSON SILVA SURIMÃ

PROTEÔMICA DOS EFETORES DA RECORRÊNCIA DO CARCINOMA
HEPATOCELULAR APÓS TRANSPLANTE HEPÁTICO.

FORTALEZA
2021

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- S959p Surimã, Walyson Silva.
Proteômica dos efetores da recorrência do carcinoma hepatocelular após transplante hepático. /
Walyson Silva Surimã. – 2021.
71 f. : il. color.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Cirurgia, Fortaleza, 2021.
Orientação: Prof. Dr. José Huygens Parente Garcia.
Coorientação: Profa. Dra. Aline Maria Araújo Martins.
1. Carcinoma Hepatocelular. 2. Recidiva. 3. Transplante de fígado. 4. Proteômica. 5. Espectrometria de massas. I. Título.

CDD 617

WALYSON SILVA SURIMÃ

PROTEÔMICA DOS EFETORES DA RECORRÊNCIA DO CARCINOMA
HEPATOCELULAR APÓS TRANSPLANTE HEPÁTICO.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação do Departamento de Cirurgia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Cirurgia.

Área de atuação: comportamento biocelular em neoplasias.

Orientador: Dr. José Huygens Parente Garcia

FORTALEZA

2021

WALYSON SILVA SURIMÃ

PROTEÔMICA DOS EFETORES DA RECORRÊNCIA DO CARCINOMA
HEPATOCELULAR APÓS TRANSPLANTE HEPÁTICO.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação do Departamento de Cirurgia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Cirurgia.

Área de atuação: comportamento biocelular em neoplasias.

Fortaleza, ___ / ___ / _____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. José Huygens Parente Garcia – Orientador
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof.^a Dra. Aline Maria Araújo Martins – Coorientadora
Universidade de Brasília (UnB)

Dr. Duílio Reis da Rocha Filho
Hospital Universitário Walter Cantídio (UFC)

Dr. Marcos Aurélio Pessoa Barros - suplente
Hospital Universitário Walter Cantídio (UFC)

AGRADECIMENTOS

A minha esposa que me deu apoio e me incentivou a completar esta etapa em minha vida.

Aos meus filhos que aceitaram minha ausência neste período de muito trabalho.

À Nidyedja Goyanna, pelo apoio na parte laboratorial de preparo das lâminas e digestão de proteínas para análise proteômica.

À Raphaela Menezes pelo apoio na realização do estudo proteômico com espectrômetro de massas das amostras.

À Aline Martins por todo o suporte na análise dos resultados e sugestões. Obrigado pelo entusiasmo e paixão à pesquisa que me incentivaram iniciar neste mundo e me impulsionaram a querer seguir pesquisando para contribuir cada vez mais com a produção do conhecimento.

Ao Dr. Huygens pela sensatez e experiência na posição de mentor, conduzindo-me na estrada do mestrado.

RESUMO

Introdução: O câncer de fígado primário vem apresentando-se como um grande problema de saúde pública no mundo, estando em sexta posição quanto à incidência e em quarto lugar, quando analisados dados de mortalidade. O transplante hepático se tornou o tratamento padrão para carcinomas hepatocelulares (CHCs) em estágio inicial. Esta modalidade mostra-se vantajosa porque trata não apenas o CHC como também a cirrose subjacente, que é o principal fator de risco para desenvolvimento de novos tumores. Embora seja o melhor tratamento, o número de pacientes nas listas é maior que os órgãos disponíveis, sendo necessária uma seleção dos pacientes que irão apresentar benefício de sobrevida após o transplante. Mesmo com uma criteriosa seleção dos pacientes para o transplante, a recorrência após transplante hepático fica em torno de 8 a 20%. Portanto, é de suma importância tentar identificar um perfil molecular e correlacionar com a recorrência desta neoplasia. **Pacientes e Métodos:** Foram coletadas amostras de 49 blocos de parafina de pacientes submetidos a transplante hepático entre 2011 e 2018, sendo 07 blocos de enxertos de doadores, 01 bloco de tecido tumoral e 01 bloco do fígado cirrótico de cada um dos 08 pacientes que recidivaram após transplante, 01 bloco do tumor e 01 bloco de fígado cirrótico de cada um dos 13 pacientes que não recidivaram. Foi realizado protocolo de desparafinização e digestão das proteínas. As amostras foram analisadas por um sistema cromatográfico RLSCnano-UPLC Dionex Ultimate 3000 acoplado a um espectrômetro de massas LTQ-Orbitrap Elite (Thermo Fisher Scientific). **Resultados e discussão:** Foram encontradas 9 proteínas com alta relevância no cenário do tumor recidivado: PHGDH, SHMT2, ARF4, SQSTM1, FLNA, HSPD1, MYH9, MARCKS, TIMM-13. Os principais processos biológicos envolvidos neste cenário foram estresse oxidativo, divisão/adesão/motilidade celular, metabolismo mitocondrial. Foram encontradas 15 proteínas com alta relevância no cenário do fígado cirrótico do paciente com tumor que recidivou: FLNA, HSPD1, FN1, HDGF, CANX, GDA, COL4A2, EML4, CALR, SERPINA1, GWL/MASTL, QDPR, B2M, TAGLN SOD1. Os principais processos biológicos envolvidos neste cenário foram metabolismo dos aminoácidos, adesão/divisão/motilidade celular, estresse oxidativo, sinalização celular, resposta imunológica. **Conclusão:** Existe diferenças entre o perfil proteico encontrado no cenário de carcinomas hepatocelulares que recidivaram após transplante hepático comparado aos que não recidivaram e estão relacionados principalmente aos processos de divisão/adesão/motilidade celular. Também foi observado diferenças entre o cenário do fígado cirrótico do paciente que recidivou comparado ao fígado cirrótico do paciente que não recidivou, sendo relacionados principalmente aos processos de divisão/adesão/motilidade celular, seguida por alterações no metabolismo celular e no regime de aminoácidos.

Palavras-chave: Transplante de fígado. Carcinoma hepatocelular. Recidiva. Proteômica. Espectrometria de massas.

ABSTRACT

Introduction: Primary liver cancer has been presented as a major public health problem in the world, ranking sixth in terms of incidence and fourth, when analyzing mortality data. Liver transplantation has become the standard treatment for early-stage hepatocellular carcinomas (HCCs). This modality proves to be advantageous, because it treats not only HCC, but also the underlying cirrhosis, which is the main risk factor for the development of new tumors. Although it is the best treatment, the number of patients on the lists is greater than the available organs, requiring a selection of patients who will benefit from transplantation. Even with a careful selection of patients for transplantation, the recurrence after liver transplantation is around 8 to 20%. Therefore, it is extremely important to try to identify a molecular profile and correlate with the recurrence of this neoplasia. **Patients and Methods:** Samples were collected from 49 formalin fixed and paraffin embedded (FFPE) tissues of patients submitted to liver transplantation between 2011 and 2018. The specimens were 07 FFPE liver grafts tissues, 01 FFPE sample of tumor and 01 FFPE sample of the cirrhotic liver from each subject of 08 HCC relapsed patients, 01 FFPE HCC samples and 01 FFPE samples of the cirrhotic livers from each subject of 13 patients who did not recur. A dewaxing and protein digestion protocol was carried out. The samples were analyzed by a Dionex Ultimate 3000 RLSCnano-UPLC chromatographic system coupled to an LTQ-Orbitrap Elite mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific). **Results and discussion:** Nine highly relevant proteins were found in the recurrent tumor scenario: PHGDH, SHMT2, ARF4, SQSTM1, FLNA, HSPD1, MYH9, MARCKS, TIMM-13. The main biological processes involved in this scenario were oxidative stress, cell division / adhesion / motility, mitochondrial metabolism. 15 highly relevant proteins were found in the cirrhotic liver scenario of patients that relapsed after liver transplantation: FLNA, HSPD1, FN1, HDGF, CANX, GDA, COL4A2, EML4, CALR, SERPINA1, GWL / MASTL, QDPR, B2M, TAGLN SOD1. The main biological processes involved in this scenario were amino acid metabolism, cell adhesion / division / motility, oxidative stress, cell signaling, immune response. **Conclusion:** There are differences between the protein profile found in the scenario of hepatocellular carcinomas that relapsed after liver transplantation and those that did not relapse and they are mainly related to the processes of cell division/adhesion/motility. There are also differences between the scenario of the cirrhotic liver of patients with recurrent tumor and those of patients whose tumors did not recur, being mainly related to the processes of cell division/adhesion/motility, followed by changes in cell metabolism and in the amino acid regime.

Keywords: Liver transplantation. Hepatocellular carcinoma. Recurrence. Relapse. Proteomics. Mass spectrometry.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Incidência de casos de cânceres no mundo à esquerda e mortalidade por cânceres à direita.....	12
Figura 2 – Imagens de carcinoma hepatocelular em exame de tomografia computadorizada.....	14
Figura 3 – Estadiamento BCLC e terapêutica.....	15
Figura 4 – Componentes do espectrômetro de massas.....	20
Figura 5 – Diagrama de Venn demonstrando todos os cenários do experimento.....	30
Figura 6 - Diagrama de Venn: RT vs SRT.....	31
Figura 7 – Diagrama de Venn: RST vs SRST.....	32
Figura 8 – Diagrama de relação entre proteínas e miRNAs exclusivos do tumor que apresentou recidiva após transplante hepático.....	33
Figura 9 – Diagrama de relação entre proteínas e miRNAs exclusivas do fígado cirrótico do paciente com recidiva após transplante hepático.....	34

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Critérios de indicação para transplante hepático.....	17
Tabela 2 – Características clínico-patológicas dos pacientes com recidiva e não recidiva após transplante hepático.....	29
Tabela 3 – Relação entre processos biológicos e proteínas exclusivas do tumor recidivado.....	35
Tabela 4 – Relação entre processos biológicos e proteínas exclusivas do fígado cirrótico do paciente com recidiva do tumor após transplante hepático.....	35

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAT	Alfa-1 antitripsina
ADP	Adenosina difosfato
AFP	Alfafetoproteína
ARF4	Fator de ADP-Ribosilação 4
B2M	Beta-2 Microglobulina
BCLC	<i>Barcelona Clinic Liver Cancer</i>
CALR	Calreticulina
CANX	Calnexina
CHC	Carcinoma hepatocelular
CLIP	<i>Cancer of the Liver Italian Program</i>
COL4A2	Cadeia alfa-2 do colágeno tipo 4
D	Cenário do fígado do doador
DCP	Des-gamacarboxiprotrombina
EML4	Proteína tipo 4 associada a microtúbulo
FLNA	Filamina A
FN1	Fibronectina 1
GDA	Guanina Deaminase
GWL/ MASTL	Serina/treonina quinase associada aos microtúbulos
HCV	Vírus da hepatite C
HDGF	Fator de crescimento derivado do hepatoma
HSC	Hospital São Carlos
HSP27	<i>Heat Shock Protein 27</i>
HSP60	<i>Heat Shock Protein</i> família D membro 1
HSP90	<i>Heat Shock Protein 90</i>
HSPD1	<i>Heat Shock Protein</i> família D membro 1
HUWC	Hospital Universitário Walter Cantídio
JIS	<i>Japan Integrated Score</i>
MARCKS	Substrato C-Quinase rico em alanina miristoilada
MELD	<i>Model for End-stage Liver Disease</i>
MS	Espectrometria de massas
MYH9	Gene da Cadeia 9 da Miosina Pesada
NMM-II	Miosina II não-muscular
PHGDH	Fosfoglicerato Deidrogenase
PLD	Fosfolipase D
QDPR	Diidropteridina redutase quinoide
RST	Cenário do fígado cirrótico do paciente com recidiva após transplante hepático (Recidiva Sem Tumor)

RT	Cenário tumor recidivado após transplante hepático (Recidiva Tumor)
SERPINA1	Alfa-1 antitripsina
SHMT2	Serina Hidroximetiltransferase
SINAN	Sistema de informação de agravos de notificação
SOD1	Superóxido Dismutase 1
SQSTM1	Sequestossomo 1
SRST	Cenário do fígado cirrótico do paciente sem recidiva após transplante hepático (Sem Recidiva Sem Tumor)
SRT	Cenário de tumor não recidivado após transplante hepático (Sem Recidiva Tumor)
TAGLN	Transgelina
TC	Tomografia Computadorizada
THF	Tetraidrofolato
TIMM-13	Translocase da camada interna da mitocôndria
UFC	Universidade Federal do Ceará

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	12
1.1 Carcinoma hepatocelular.....	12
1.2 Transplante hepático.....	16
1.3 Proteômica e a espectrometria de massas no carcinoma hepatocelular (CHC).....	19
2. PERGUNTA INICIAL E HIPÓTESES.....	22
2.1 Pergunta inicial.....	22
2.2 Hipóteses.....	22
3. OBJETIVOS.....	22
3.1 Objetivo principal.....	22
3.2 Objetivo secundário.....	22
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	22
4.1 Delineamento do estudo.....	22
4.2 População da pesquisa.....	23
4.2.1 Pacientes hepatopatas terminais.....	23
4.2.1.1 Critérios de inclusão.....	23
4.2.1.2 Critérios de exclusão.....	24
4.2.2 Pacientes doadores (grupo controle)	24
4.3 Processamento das amostras.....	24
4.3.1 Preparação e amostras de tecidos fixados em formalina e embebidos em parafina para análise proteômica	24
4.3.2 Obtenção e preparação dos cortes de tecido e confecção de lâminas	25
4.3.3 Procedimento de desparafinização	25
4.3.4 Preparo de amostras para fase analítica	26
4.3.5 Análise <i>label-free</i> por uPCL/-MS/MS	26
4.3.6 Análise e processamento de dados	27
5. RESULTADOS	28
6. DISCUSSÃO	36
6.1 Importância dos efetores moleculares exclusivos do cenário do CHC recidivado após transplante hepático comparado ao cenário não recidivado	36

6.2 Importância dos efetores moleculares exclusivos do cenário do fígado cirrótico dos pacientes que apresentaram recidiva após transplante hepático comparado aos que não recidivaram.....	40
7. CONCLUSÃO	45
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	46
9. ANEXOS.....	61
9.1 Aprovação pelo comitê de ética do HUWC.....	61
9.2 Aprovação pelo comitê de ética da Universidade de Fortaleza (UNIFOR).....	66

1. INTRODUÇÃO

1.1 Carcinoma hepatocelular

O câncer primário de fígado vem se apresentando como um grande problema de saúde pública no mundo, está na sexta posição quanto à incidência e em quarto lugar quando analisamos dados de mortalidade, sendo sua incidência maior em homens do que em mulheres (Figura 1) (GLOBOCAN, 2018). O carcinoma hepatocelular (CHC) é o subtipo de tumor primário do fígado mais comum, perfazendo noventa por cento de todos os casos desta neoplasia (EASL..., 2018)

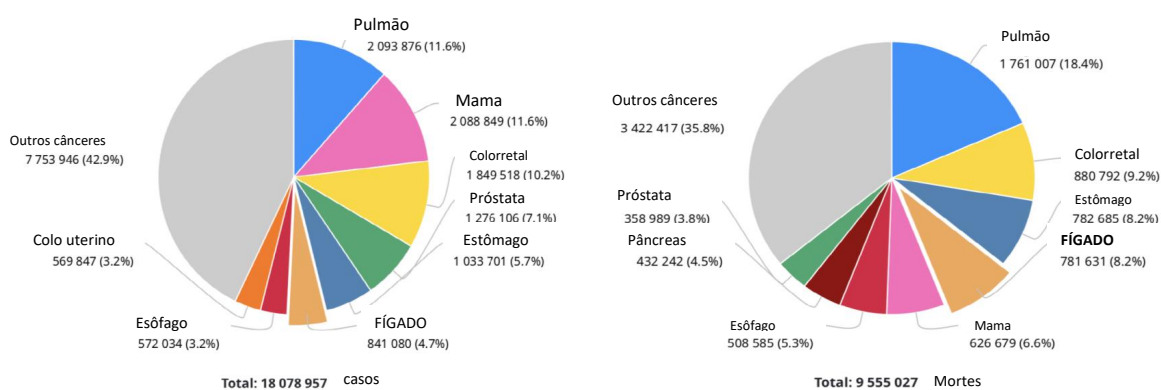


Figura 1 - Incidência de casos de cânceres no mundo à esquerda e mortalidade por cânceres à direita. Adaptado de GLOBOCAN, 2018.

Dentre os principais fatores de risco para o desenvolvimento do CHC estão a cirrose hepática em geral, infecção pelos vírus da hepatite B, vírus da hepatite C, abuso de álcool, síndrome metabólica, doença gordurosa do fígado não alcoólica, deficiência de alfa-1-antitripsina e hemocromatose (BRUIX; SHERMAN, 2005). Outros fatores associados são tabagismo e ingestão de aflatoxina B1 (LAURSEN, 2014).

A maioria dos CHCs ocorrem no contexto de cirrose hepática, porém é possível haver carcinogênese sem cirrose (YANG *et al.*, 2011). A taxa de incidência de CHC por esta causalidade tem diminuído bastante, principalmente devido a vacinação e terapia medicamentosa contra hepatite B (CHANG *et al.*, 2009; WONG *et al.*, 2013). O CHCs associados a infecção pelo vírus da hepatite C estão em sua maioria relacionados à cirrose hepática (LOK *et al.*, 2009). A infecção pelo vírus da hepatite C equivale a 36,1% dos casos de hepatites virais notificados de 1999 a 2018

no Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN) no Brasil. Nos últimos 5 anos, a incidência de hepatite pelo vírus C vem apresentando uma tendência de aumento, apresentando taxas de incidência superiores às da hepatite B (BOLETIM, 2019). O vírus C destaca-se como a principal causa de cirrose dos pacientes transplantados por CHC no Serviço de Transplante Hepático do Hospital Universitário Walter Cantídio (HUWC) (COSTA *et al.*, 2014).

Uma condição que vem sendo relacionada ao aumento do risco de desenvolvimento de CHC é a síndrome metabólica decorrente do diabetes e da obesidade, além da doença gordurosa do fígado não alcoólica. Mittal e colaboradores (2015) demonstraram que até quase 40 por cento dos pacientes amostrados com CHC e doença gordurosa do fígado não alcoólica não apresentavam cirrose (MITTAL *et al.*, 2015).

O diagnóstico do CHC é feito principalmente por meio de exames de imagem. Pacientes com fatores de risco para CHC que apresentam um nódulo novo visto em um ultrassom abdominal precisam de confirmação diagnóstica com critérios não invasivos ou biópsia. O diagnóstico radiológico é feito com bastante acurácia usando exame de imagem contrastado (tomografia computadorizada ou ressonância magnética) em paciente cirrótico. Observando-se uma imagem hipervascular na fase arterial do exame contrastado e uma diminuição do sinal em comparação com o resto do fígado nas fases venosa portal e na fase tardia (*washout*), pode-se fechar o diagnóstico sem necessidade de biópsia (MITCHELL *et al.*, 2015; KHALILI *et al.*, 2011) (Figura 2).

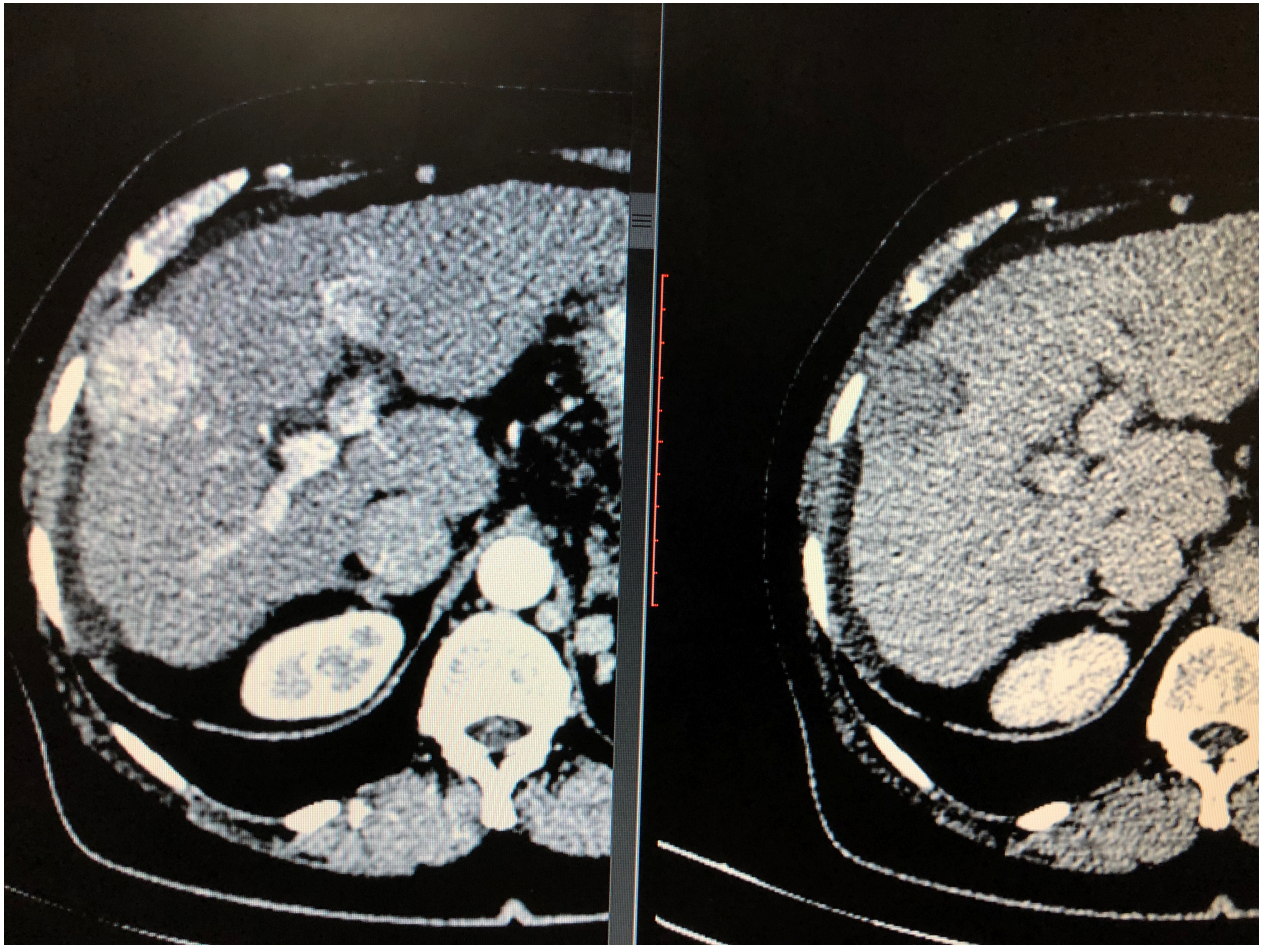


Figura 2 - Imagens de carcinoma hepatocelular em exame de tomografia computadorizada. Observar lesão hipervascular em imagem à esquerda e “washout” à direita.

Fonte: Foto cedida pelo Serviço de Transplante Hepático do HUWC/Hospital São Carlos

Quando os achados radiológicos são atípicos e o diagnóstico não pode ser feito por exames não invasivos, a biópsia faz-se necessária. Os riscos associados ao procedimento como sangramento e disseminação da doença giram em torno de 3% (SILVA *et al.*, 2008).

O estadiamento do CHC é determinado por exames para investigação dos principais focos de metástases que são os pulmões, linfonodos, ossos e glândulas adrenais (UKA *et al.*, 2007). Utiliza-se TC de tórax, abdômen superior e pelve além de cintilografia óssea, na suspeita de metástase óssea, para avaliação de doença extra-hepática (DUSEJA, 2014).

Existem vários sistemas de estadiamento do CHC tais como Classificação de Hong Kong, *Cancer of the Liver Italian Program* (CLIP), TNM, *Japan Integrated Score* (JIS), *Barcelona Clinic Liver Cancer* (BCLC). O mais difundidamente utilizado é o BCLC devido a sua fácil execução e

alocação de tratamento baseado nas características do tumor e do grau de comprometimento hepático (LLOVET; BRÚ; BRUIX, 1999; EASL...,2018) (Figura 3).

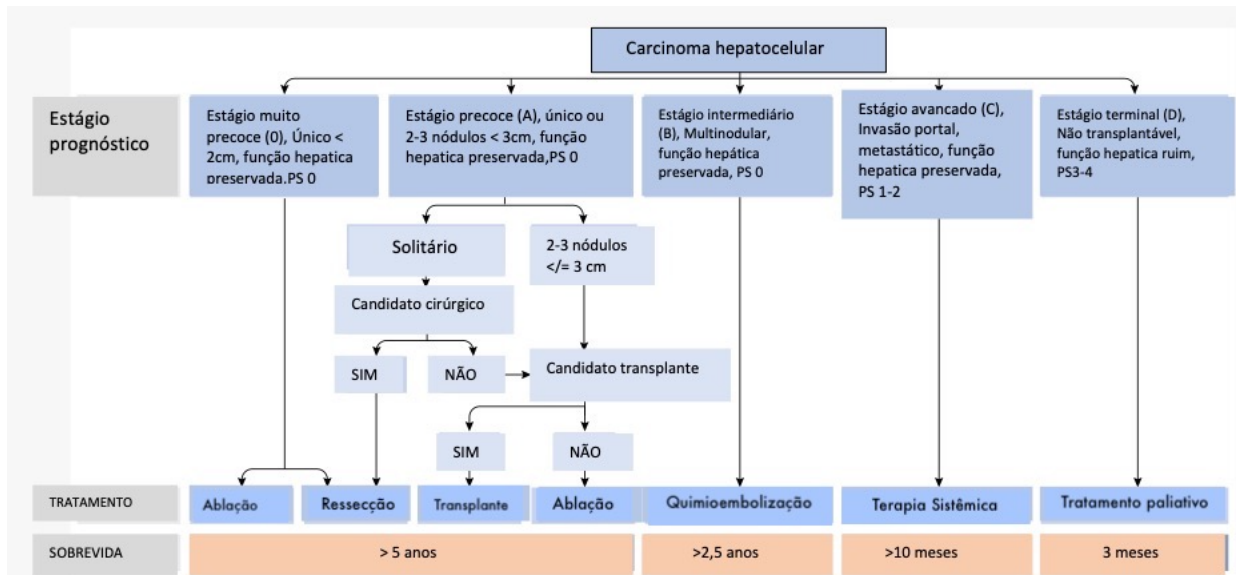


Figura 3 - Estadiamento BCLC e terapêutica. Tto: tratamento Adaptado de EASL Clinical Practice Guidelines: Management of hepatocellular carcinoma. J Hepatol. 2018 Jul;69(1):182-236.

O tratamento dos tumores em estadiamento inicial (BCLC 0 e A) baseia-se principalmente na ressecção cirúrgica. Os tumores únicos, sem hipertensão portal ou hiperbilirrubinemia são bons candidatos para ressecção cirúrgica, com sobrevida em 5 anos em torno de 70%, mas as taxas de recorrência em 5 anos chegam a 70% (LLOVET; SCHWARTZ; MAZZAFERRO,2005; BRUIX *et al.*, 2015).

O transplante hepático é considerado a melhor opção de tratamento para os pacientes BCLC A (BRUIX; SHERMAN, 2005; MAZZAFERRO *et al.*, 1996). Os pacientes que apresentam tumores únicos menores que 2 cm e os que não têm condição de cirurgia ou transplante podem ser submetidos a ablação local com sobrevida em 5 anos variando de 50 a 70% (BRUIX; SHERMAN, 2005).

Os pacientes do estadiamento BCLC B - estadiamento intermediário - caracterizam-se por doença multinodular, com função hepática preservada, ausência de invasão vascular ou disseminação extra-hepática. Esses casos são tratados com quimioembolização, que se caracteriza por

embolização dos vasos nutridores do tumor com ou sem quimioterapia associada, respectivamente. Esse tratamento mostrou benefício em sobrevida sobre suporte clínico, com sobrevida mediana em torno de 26 meses (LO *et al.*, 2002; LLOVET; BRUIX, 2003; SAPISOCHIN; BRUIX, 2017).

O estadio BCLC C, doença avançada, caracteriza-se por invasão portal macroscópica, presença de linfonodos positivos, metástases à distância e CHILD A-B. Nesses pacientes pode ser utilizado o sorafenibe, um inibidor de múltiplas tirosina-quinases, que demonstrou aumento estatisticamente significativo da sobrevida (10,7 meses vs 7,9 meses do placebo; *Hazard Ratio* (HR): 0,69, CI0,55 - 0,87; $p < 0,001$) (LLOVET *et al.*, 2008). Atualmente, já existem outras opções de tratamento sistêmico com atezolizumabe em combinação com bevacizumabe como tratamento padrão de primeira linha (FINN *et al.*, 2020), além de lenvatinibe em primeira linha e regorafenibe, cabozatinibe e ramucirumabe em segunda linha (KUDO *et al.*, 2018; BRUIX *et al.*, 2017; ABOU-ALFA *et al.*, 2018; ZHU *et al.*, 2015). Os pacientes com doença terminal, CHILD C e ECOG > 2 , são candidatos exclusivamente a suporte nutricional, psicológico e manejo da dor.

1.2 Transplante Hepático

O transplante hepático se tornou o tratamento padrão para carcinomas hepatocelulares em estágio inicial. Esta modalidade mostra-se vantajosa porque trata não apenas o CHC como também a cirrose subjacente, que é o principal fator de risco para desenvolvimento de novos tumores e a hipertensão portal (FORNER; LLOVET; BRUIX, 2012; DE LOPE *et al.*, 2012). Embora seja o melhor tratamento, o número de pacientes nas listas é maior que os órgãos disponíveis, sendo necessário uma seleção dos pacientes que vão apresentar benefício de sobrevida após o transplante.

Os pacientes são alocados e priorizados para o transplante de acordo com a sua pontuação no escore MELD (*Model for End-stage Liver Disease*). Este escore relaciona-se com o risco de morte em três meses na fila de espera e é calculado utilizando a razão de normatização internacional (INR), bilirrubina e a creatinina sérica (WIESNER *et al.*, 2003; MALINCHOC *et al.*, 2000). Entretanto, os pacientes com CHC têm função hepática preservada na sua maioria, com pontuação pelo escore de MELD baixa, logo seu risco de saída de lista de transplante devido a progressão do tumor é maior que o risco de falência hepática (TOSO *et al.*, 2014). Por este motivo, a maioria dos sistemas de alocação de órgãos dão pontos extras para os pacientes com CHC. No Brasil, os pacientes com CHC maiores que 2 cm são listados com MELD modificado de 20 e evoluem para 24 em 3 meses e 29 em mais 3 meses se não forem transplantados.

Alguns marcadores tumorais foram avaliados como critério de seleção, tais como alfafetoproteína (AFP) e des-gama-carboxiprotrombina (DCP). A AFP é uma glicoproteína que é normalmente produzida na gravidez pelo fígado fetal e pelo saco gestacional e sua concentração pode estar aumentada na presença de CHC. Níveis séricos também podem aumentar com a gravidez, em tumores de origem gonadal e alguns outros tumores, como o carcinoma gástrico. A AFP mostrou valores preditivos positivos muito baixos no diagnóstico de CHC, limitando seu uso como biomarcador (TREVISANI F *et al.*, 2001), mas mostrou ter correlação com prognóstico (MAILEY *et al.*, 2011; HAMEED *et al.*, 2014).

A DCP (desgamacarboxiprotrombina) é uma protrombina não funcional devido à ausência de uma alteração pós-translacional, uma enzima dependente de vitamina K que está ausente nos CHCs. Alguns estudos mostraram o aumento dos valores deste marcador relacionados com pior prognóstico (TAKETOMI *et al.*, 2009; FUJIKI *et al.*, 2009).

Os Critérios de Milão são adotados em vários centros do mundo e no Brasil para selecionar os pacientes para o transplante. São eles: tumor único menor ou igual a 5 cm ou até 3 tumores menores ou iguais a 3 cm, sem invasão vascular macroscópica ou doença metastática à distância. Utilizando esses critérios alcançamos uma sobrevida pós-transplante de 84% em 4 anos e sobrevida livre de doença de 92% em 4 anos (MAZZAFERRO *et al.*, 1996; MAZZAFERRO *et al.*, 2011). Entretanto, esses critérios são considerados restritivos e pode-se deixar de tratar alguns pacientes que poderiam se beneficiar do transplante. Por este motivo, foram criados vários critérios expandidos para realização de transplante hepático em pacientes com CHC (Tabela 1).

Tabela 1 – Critérios de indicação para transplante hepático.

Critério para transplante	Sobrevida Livre de doença	Sobrevida Pós-transplante	Comentário
Critério de Milão: 1 nod. até 5 cm ou 3 nod. até 3 cm	92% em 4 anos	85% em 4 anos	Baseado no tamanho e número de nódulos
UCSF: 1 nod. até 6,5cm ou 3 nod. até 4,5 cm, com diâmetro tumoral total até 8,0cm	90,9% em 5 anos	80,9% em 5 anos	Baseado no tamanho e número de nódulos

Critério para transplante	Sobrevida Livre de doença	Sobrevida Pós-transplante	Comentário
Critério <i>up-to-7</i> : A soma do maior diâmetro e número de nod. <7 cm	Acima do Critério de Milão, mas até 7cm 64,1% em 5 anos	Acima do Critério de Milão, mas até 7cm 71,2% em 5 anos	Baseado no tamanho e número de nódulos
Volume total do tumor (VTT): VTT até 115 cm ³ e AFP até 400 ng/mL	Acima do Critério de Milão, mas até VTT/AFP 68% em 4 anos	Acima do Critério de Milão, mas até VTT/AFP 74,6% em 4 anos	Baseado no tamanho e número de nódulos e marcador tumoral (AFP)
Critério Estendido de Toronto (CET): Sem limite de tamanho ou número Ausência de invasão vascular/metástases/ sintomas Bx maior tumor: não pouco diferenciado	Acima do Critério de Milão, mas dentro de CET. 30,5 % em 5 anos	Acima do Critério de Milão, mas dentro de CET. 68% em 5 anos	Não se baseia em tamanho ou número de nódulos, mas em comportamento biológico e diferenciação
Critério de Kyoto: até 10 nod, até 5 cm, DCP até 400 mAU/mL	Acima de Milão, mas dentro de Kyoto 30% em 5 anos	Acima de Milão, mas dentro de Kyoto 65% em 5 anos	Baseado no tamanho e número de nódulos e marcador tumoral (DCP)

UCSF: *University of California San Francisco*; nod: nódulo; Bx: biópsia; DCP: DesGamaCarboxiprotrombina; AFP: alfa-fetoproteína; VTT: volume total do tumor; CET: critério estendido de Toronto

Fonte: adaptado de SAPISOCHIN; BRUIX, 2017

Mesmo com uma criteriosa seleção dos pacientes para o transplante, a taxa de recorrência pós-transplante hepático fica em torno de 8 a 20% (SAPISOCHIN *et al.*, 2017; YAO, 2007; MAZZAFERRO *et al.*, 1996). Quanto mais se expandem os critérios de inclusão dos pacientes com CHC para o transplante, maior será a taxa de recorrência (MAZZAFERRO *et al.*, 2009). A recorrência ocorre frequentemente extra-hepática, principalmente em pulmões e ossos (BODZIN *et al.*, 2017).

Existem alguns fatores relacionados à recorrência do CHC. Dentre eles podemos citar o número e tamanho do tumor, níveis séricos de marcadores tumorais (AFP, DCP), além de achados histopatológicos no explante. O número e tamanho do tumor nos exames de imagem pré-transplante são fatores bem estabelecidos relacionados a recorrência. Pacientes com tumores acima

dos Critérios de Milão apresentam taxas de recorrência maiores quando comparado com os pacientes dentro dos critérios (SAPISOCHIN *et al.*, 2017; YAO, 2007). A AFP sérica está relacionada com prognóstico e recorrência do CHC, mas um ponto de corte ainda não foi definido (SAPISOCHIN *et al.*, 2017; YAO, 2007; TOSO *et al.*, 2015).

Avaliando os fatores vistos na análise patológica do explante, invasão vascular micro e macroscópica, lesões satélites e diferenciação do tumor são características muito relacionados a recorrência (SOTIROPOULOS *et al.*, 2007; TAMURA *et al.*, 2001; MARSH *et al.*, 1997). Em estudo publicado com dados dos transplantes realizados no Hospital Universitário Walter Cantídio (CE/Brasil), os principais fatores relacionados à recorrência pós-transplante foram tempo de lista maior que 7,8 meses, presença de mais de 3,5 nódulos no explante, tumores fora dos Critério de Milão, AFP maior que 1000 mg/dL e microinvasão vascular (COSTA *et al.*, 2014).

A busca por marcadores biomoleculares tem sido uma constante no desenvolvimento da medicina personalizada e isso não tem sido diferente com o CHC. Vários estudos têm sido feitos pesquisando microRNAs, análise de DNA e células tumorais circulantes na tentativa de descobrir marcadores capazes de prever recorrência, realizar diagnóstico precoce e determinar prognóstico para melhor seleção dos pacientes para tratamento (VON FELDEN *et al.*, 2017; LU *et al.*, 2018; HANN *et al.*, 2017; HUANG *et al.*, 2015). Dentro deste contexto, a proteômica por meio da espectrometria de massas (MS) surge como uma ferramenta na descoberta de biomarcadores do CHC (MARTINS; GARCIA; EBERLIN, 2019; NAGAI *et al.*, 2020).

1.3 Proteômica e a espectrometria de massas no carcinoma hepatocelular (CHC)

Proteômica refere-se ao estudo em larga escala das proteínas, sua estrutura, fisiologia e função em uma célula, tecido ou organismo em uma específica e determinada condição (SHAH; MIRSA, 2011; YU; STEWART; VEENSTRA, 2010). Caracteriza-se pela mensuração qualitativa ao nível proteico da expressão gênica para caracterizar processos biológicos e celulares, decifrando, por exemplo, mecanismo do controle da expressão gênica e fenótipos finais (KIERNAN, 2008). Proteínas são base de construção estrutural e metabólica de qualquer organismo vivo, variando em função, estabilidade, estrutura e são consideradas o produto final da maioria dos genes (SHRUTHI; VINODHKUMAR; SELVAMANI, 2016). Comparativamente, algumas das limitações da análise genômica (análise do DNA) são relativas ao não fornecimento

de informações completas sobre a função ao nível celular, subcelular e intercelular, que é gerido pelas proteínas e outros metabólitos (PATTERSON; AEBERSOLD, 2003).

A proteômica se baseia em três pontos analíticos fundamentais: o fracionamento da proteína em peptídeos; a espectrometria de massas para aquisição dos dados necessários para identificação das proteínas; e a utilização da bioinformática em larga escala para análise dos dados produzidos pela fase analítica (YU; STEWART; VEENSTRA, 2010).

O espectrômetro de massas mede a transformação da amostra em íons gasosos por meio da ionização de elétrons. Depois deste processo, os íons são separados de acordo com sua razão massa/carga (m/s) e abundância. Os íons são capazes de dar informações sobre a natureza e estrutura da sua molécula precursora. Estas informações são transmitidas para uma forma binária (por meio de *softwares* de computação) e transformadas em gráficos para serem mais facilmente analisados (figura 4).

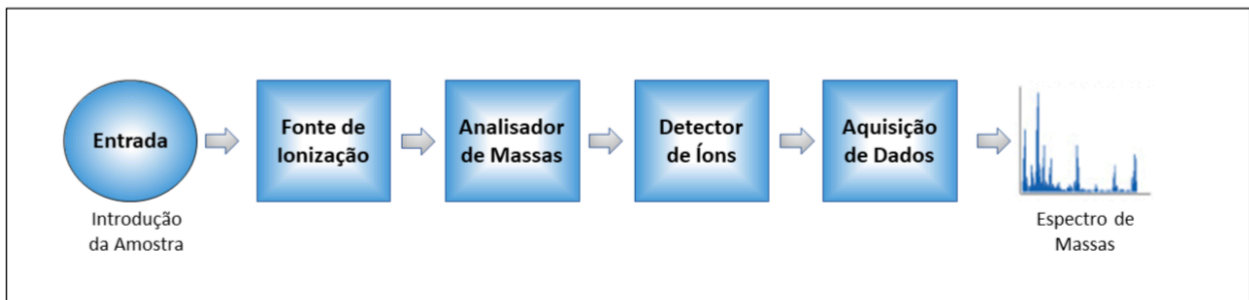


Figura 4. Componentes do espectrômetro de massas. Fonte: Adaptado da Premier Biosoft.

De maneira geral, os métodos aplicados em proteômica e em particular na espectrometria de massas, podem ser classificados como “*top-down*” ou “*bottom-up*”. No primeiro caso, são avaliadas proteínas intactas e no segundo, as proteínas são hidrolisadas em peptídeos, na chamada fragmentação química (SCHUBERT *et al.*, 2017). A abordagem “*top-down*” permite cobertura total da sequência e caracterização completa das proteoformas. Já a metodologia “*bottom-up*” (também conhecida por “*shotgun*”), apesar de sensível e reprodutível mesmo em casos de proteomas complexos como o do soro/plasma e lisados celulares, fornece respostas baseadas em fragmentos de um todo. No entanto, considerando as limitações técnico-instrumentais atuais, grande parte dos autores considera a análise de proteínas intactas um método ainda com muitas

limitações, baixa sensibilidade e baixo rendimento (CATHERMAN; SKINNER; KELLEHER, 2014).

Tipicamente, o fluxo de trabalho na proteômica “*bottom-up*” inicia com a digestão trípica de uma amostra proteica em peptídeos, que são separados por cromatografia líquida, geralmente de alta ou ultra *performance*, de acordo com a sua hidrofobicidade em fase reversa (AEBERSOLD; MANN, 2003; SCHUBERT *et al.*, 2017). Nesta etapa, cada componente da amostra interage de forma distinta com o material solvente que, quando pressurizado e bombeado por uma coluna, resulta em tempos de retenção distintos (para cada resíduo de peptídeo), permitindo sua separação e conseqüentemente fracionamento da amostra complexa. À medida que são eluídos, os peptídeos são submetidos a ionização por *electrospray* (ESI) e atraídos para o espectrômetro, em que 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 (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 sequências peptídicas identificadas para proteínas e correlacionar a intensidade dos sinais detectados pelo analisador com alterações relativas à abundância entre as amostras (SCHUBERT *et al.*, 2017).

A proteômica tem sido utilizada como ferramenta na busca de biomarcadores para o câncer. Zhang e colaboradores (2019) identificaram possíveis marcadores diagnósticos em exossomas no câncer de ovário (ZHANG. *et al.*, 2019). Em outro estudo foi utilizado proteômica na tentativa de encontrar marcadores para diagnóstico de câncer gástrico (CHONG *et al.*, 2010).

Na investigação do CHC, também temos estudos com o uso desta técnica na área de proteômica. Pesquisadores identificaram no plasma de pacientes com CHC a proteína *Heat Shock Protein 27* (HSP27) como um possível marcador para rastreamento (FENG *et al.*, 2005). Sun e colaboradores identificaram a proteína *Heat Shock Protein 90* (HSP90) no plasma dos indivíduos estudados como possível marcador para diagnóstico precoce, prognóstico e monitoramento de terapia do CHC (SUN *et al.*, 2010).

Tendo em vista o mau prognóstico e taxas consideráveis de recorrência do CHC mesmo após transplante hepático, é de suma importância tentar identificar um perfil molecular e correlacionar com sobrevida e recorrência, sendo talvez no futuro, ferramenta para selecionar

pacientes para transplante hepático ou até servir como possíveis alvos em terapias moleculares adjuvantes.

2. PERGUNTA INICIAL E HIPÓTESES

2.1 Pergunta inicial: Qual o perfil global de proteínas dos carcinomas hepatocelulares recorrentes de pacientes submetidos ao transplante hepático?

2.2 Hipóteses:

- a) Existe diferença de perfil proteico global entre CHC no cenário de recorrência e não recorrência após transplante hepático.
- b) Existe diferença entre perfil proteico global do fígado cirrótico sem tumor no cenário de recorrência e não recorrência após transplante hepático.

3. OBJETIVO

3.1 Objetivo principal

Realizar análise proteômica dos carcinomas hepatocelulares de pacientes transplantados e obter um perfil molecular global de efetores associados à recorrência do CHC após transplante de fígado realizado no Hospital Universitário Walter Cantídio (HUWC) e Hospital São Carlos (HSC) de 2011 a 2018.

3.2 Objetivo secundário:

Descrever os processos biológicos relacionados aos possíveis marcadores encontrados no experimento.

4. PACIENTES E MÉTODOS

4.1 Delineamento do estudo

Estudo retrospectivo, não intervencionista, comparativo, descritivo com amostra de conveniência. O estudo foi aprovado no comitê de ética do Hospital Universitário Walter Cantídio.

4.2 População da pesquisa

As amostras derivaram de um acervo de 49 blocos de parafina de peças histológicas disponíveis coletados entre 2011 e 2018 no Centro de Transplante de Fígado do Hospital Universitário Walter Cantídio (HUWC/UFC) e Hospital São Carlos (HSC) em Fortaleza/Ceará. Destes, 01 amostra de tecido de CHC e 01 amostra de fígado cirrótico de cada indivíduo dos 08 pacientes que apresentaram recidiva após transplante hepático, 01 amostra de tecido tumoral e 01 amostra de fígado cirrótico de cada indivíduo dos 13 pacientes que não apresentaram recidiva após transplante hepático, e 07 amostras do enxerto de pacientes doadores (não-patológicos, grupo controle). Os pacientes que não apresentaram recidiva foram transplantados no período de 2011 a 2013. As amostras foram coletadas no arquivo histopatológico do Departamento de Patologia da Universidade Federal do Ceará (UFC) e do Laboratório PATHUS.

4.2.1 Pacientes hepatopatas terminais

Nesse grupo encontram-se pacientes que apresentaram carcinoma hepatocelular no fígado e foram submetidos ao transplante de fígado.

4.2.1.1 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. Essas diretrizes são regidas pelos dois critérios mundialmente adotados, os Critérios de Milão e os Critérios de Barcelona. Destacam-se aqui, resumidamente, os principais condicionantes adotados para inclusão de amostras:

- a) Pacientes que apresentarem até três nódulos (tumor primário) ≤ 3 cm ou tumor único ≤ 5 cm, sem comprometimento vascular; dentro dos critérios de Milão, com diagnóstico baseado nos critérios de Barcelona e sem indicação de ressecção;
- b) Pacientes que não apresentarem metástase extra-hepática;
- c) Coletas apenas de amostras de tecido com inflamação crônica derivadas de etiologia do vírus da hepatite C (HCV);
- d) Coleta de amostra de pacientes, sem distinção de sexo.

4.2.1.2 Critérios de exclusão

- a) Pacientes que evoluíram com morte nos primeiros 30 dias pós transplante;
- b) Pacientes submetidos previamente a algum tratamento quimioterápico (ex.: pacientes quimioembolizados);
- c) Pacientes re-transplantados.

4.2.2 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 encefálica, mas, a partir de sustentação com aparelhos, permaneceram com suas funções fisiológicas ativas. Os critérios atendidos para doadores falecidos estão regulamentados na Portaria MS-GM nº 2.600, de 21 de outubro de 2009.

4.3 Processamento das amostras

4.3.1 Preparação de amostras de tecidos fixados em formalina e embebidos em parafina para análise proteômica

Alguns protocolos têm sido estabelecidos para preparação de amostras teciduais fixadas em formalina para posterior análise por espectrometria de massas. De maneira geral, os protocolos

incluem etapas de desparafinização, reidratação, extração de proteínas e, por fim, digestão enzimática. Foi utilizado uma modificação do protocolo descrito por Scicchitano *et al.* (2009). As eventuais dificuldades são o baixo rendimento da extração proteica causada por ligações cruzadas inter e intra-moleculares induzidas por formaldeído e a possível baixa porcentagem de peptídeos confiáveis identificados (SCICCHITANO *et al.*, 2009).

4.3.2 Obtenção e preparação dos cortes de tecido e confecção de lâminas

Os tecidos dos explantes de fígado foram obtidos de lâminas do arquivo do Laboratório de Anatomia Patológica do Departamento de Patologia UFC e do laboratório PATHUS. Nos casos em que não há lâmina reserva foram preparadas cinco lâminas de cada bloco selecionando os casos em que a amostra for abundante, visando não correr o risco de danificar o bloco de parafina, tendo em vista que o mesmo poderia ser usado novamente em uma eventual necessidade do paciente.

As lâminas confeccionadas seguiram o protocolo habitual de corte histológico em micrótomo com espessura de 4 μ m em lâmina comum e fosca não salinizada para facilitar sua retirada com o bisturi para o processo de digestão das proteínas.

4.3.3 Procedimento de desparafinização

As lâminas com o material foram transferidas para uma cuba contendo xilol e mantidas por 10 min à temperatura ambiente nessa solução. Esse procedimento foi repetido seis vezes, utilizando xilol P.A. a cada etapa.

Em seguida, as lâminas foram transferidas para uma cuba contendo etanol 100% e incubadas por 10 min à temperatura ambiente, repetindo-se esse procedimento por quatro vezes.

Decorrida a etapa anterior, as lâminas foram transferidas para uma cuba contendo etanol 96% e mantidas nessa solução por 10 min à temperatura ambiente. A lavagem com etanol 96% foi repetida quatro vezes. As últimas lavagens consistiram na incubação das lâminas em cuba contendo etanol 70% por 10 min à temperatura ambiente, sendo repetidas também quatro vezes.

Por fim, as lâminas foram retiradas da cuba e procedeu-se a secagem em estufa a 60 °C por 20 minutos. O material seco foi então ressuspenso em 150 μ L em água ultra-pura (obtida em Milli-Q - Millipore) e submetido a sucessivas etapas de congelamento (com nitrogênio líquido) e

descongelamento (5x) e a três ciclo de sonicação. As proteínas obtidas foram quantificadas e submetidas à digestão com tripsina. Como houve um baixo rendimento proteico, as amostras foram agrupadas em *pools* com a seguinte denominação: D (*pool* das amostras do fígado dos doadores); RT (*pool* das amostras de tumor dos pacientes com recidiva do CHC após transplante hepático); RST (*pool* das amostras de fígado cirrótico dos pacientes com recidiva do CHC após transplante hepático); SRT (*pool* das amostras de tumor dos pacientes que não recidivaram após transplante hepático); SRST (*pool* das amostras de fígado cirrótico dos pacientes que não recidivaram após transplante hepático).

4.3.4 Preparo de amostras para a fase analítica

Uma etapa de dessalinização foi realizada antes da parte analítica por espectrometria de massas. Os peptídeos 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 ponteiros 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 coletadas 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™.

4.3.5 Análise *label-free* por uPLC-MS/MS

Após dessalinização, as amostras já em forma de peptídeos foram quantificadas quanto à sua concentração por meio de 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 3µl 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. Esta é uma importante etapa para garantir a qualidade analítica do experimento.

As amostras foram analisadas por um sistema cromatográfico RLSCnano-UPLC Dionex Ultimate 3000 (Thermo Fisher Scientific) acoplado a um espectrômetro de massas LTQ-Orbitrap Elite (Thermo Fisher Scientific). Da fração de proteínas extraídas e processadas, foi injetado 0,8 µg de peptídeos em pré-coluna *home-made* (100 µm de diâmetro interno x 3 cm de comprimento). Posteriormente, esses peptídeos foram fracionados em coluna analítica *home-made* (75 µm de diâmetro interno x 24 cm de comprimento) com partículas C18 Reprosil Pur de 3 µm e poros de 120Å (Dr. Maich GmbH). O gradiente linear de eluição entre os solventes A (ácido fórmico 0,1% em água) e B (ácido fórmico 0,1% em acetonitrila) foi composto de 2% a 35% de B durante 155 min.

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 no analisador Orbitrap. Cada varredura foi seguida por MS2 dos 20 íons mais intensos, acima do sinal mínimo requerido de 3000, no analisador *ion trap* pelo método de dissociação induzida por colisão (CID). A reanálise de íons já fragmentados foi inibida por exclusão dinâmica, favorecendo a identificação de peptídeos menos abundantes.

4.3.6 Análise e processamento de dados

Os espectros foram processados pelo *software* Progenesis QI (<http://www.nonlinear.com/progenesis/qi>) (Nonlinear Dynamics©), em que 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 do filtro Anova ($p \leq 0.05$) garantiu a triagem de eventos estatisticamente significativos, no intervalo de confiança de 95%. Estes tiveram seus espectros de MS2 aceitos para exportação e identificação na plataforma Peaks® Studio 7.0 (<http://www.bioinfor.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 (novembro/2019), acurácia MS1 de 10 ppm; acurácia MS2 de 0,5 Da; até 2 locais de clivagem perdidos; carbamidometilação de cisteínas como modificação fixa; oxidação de metionina como modificação variável.

O número de proteínas, grupos de proteínas e número de peptídeos foram filtrados com FDR inferior a 1%. Além disso foram ativados os módulos de busca por modificações do banco Unimod com base em padrões de fragmentação, bem como busca de mutações pontuais. A lista de identificações foi exportada novamente para o *software* Progenesis QI, em que se aplicaram também às identificações de proteína o filtro Anova ($p \leq 0.05$).

Com base na análise comparativa entre os grupos RT vs. SRT e RST vs. SRST, foram identificadas as proteínas exclusivamente expressas nos grupos RT e RST. Os genes relativos a estas proteínas foram analisados utilizando o servidor miRNet 2.0 através de busca por microRNA em banco de microRNAs de fígado humano (CHANG *et al.*, 2020), identificando assim as proteínas mais relevantes tendo por base suas regulações pelos microRNAs e suas interações com vias de sinalização e processos biológicos.

5. RESULTADOS

Os pacientes recidivados após transplante hepático apresentaram valores de AFP maiores que o grupo que não recidivou. Além disso, foi observado uma maior taxa de invasão microvascular, maior número de nódulos no explante e um maior volume tumoral no explante (tabela 02).

Tabela 2 - Características clínico-patológicas dos pacientes com recidiva e não recidiva após transplante hepático

CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-PATOLÓGICAS	RECIDIVA (N=8)	NÃO RECIDIVA (N=13)	
Idade em anos (mediana)	57,5 (52 – 66)	60 (44 – 66)	$p = 1,00$
Sexo masculino	05 (62,5%)	09 (69%)	$p = 1,00$
Grau de diferenciação			$p = 0,25$
Moderado	07 (87,5%)	12 (92,3%)	
Pouco	01	01	
Número de nódulos no explante (mediana)	3,0 (1-8)	1,0 (1-2)	$p = 0,006$
Volume total do tumor no explante (cm ³) (mediana)	5,10 (3,1 – 8,5)	2,50 (1,5 – 4,2)	$p < 0,001$
Invasão microvascular	03 (37,5%)	zero	$p = 0,042$
AFP em ng/ml (mediana)	194	16,7	$p = 0,037$
IIQ	21,7 - 749	4,32 – 75,2	

AFP : Alfafetoproteína; IIQ: intervalo interquartil

Foram encontradas 2944 proteínas no experimento, divididas em 580 proteínas no cenário tumor recidivado após transplante hepático (RT); 761 proteínas no cenário de tumor não recidivado após transplante hepático (SRT); 584 proteínas no cenário do fígado cirrótico do paciente com recidiva após transplante hepático (RST); 580 no cenário do fígado cirrótico do paciente que não apresentou recidiva após transplante hepático (SRST) e 439 proteínas no cenário do tecido hepático do doador (D). Foi observado que, analisando todos os cenários em conjunto, não houve nenhuma proteína exclusiva do cenário do CHC que recidivou após transplante hepático (RT). O fígado cirrótico do paciente com tumor que recidivou (RST) apresentou 91 proteínas exclusivas, já o cenário do CHC que não apresentou recidiva (SRT) obteve 248 proteínas exclusivas. O fígado cirrótico do paciente com CHC que não recidivou (SRST) não apresentou nenhuma proteína exclusiva e os doadores, considerados os fígados não-patológicos, apresentaram 123 proteínas exclusivas. No total, foram 178 proteínas em comum a todos os cenários (Figura 5).

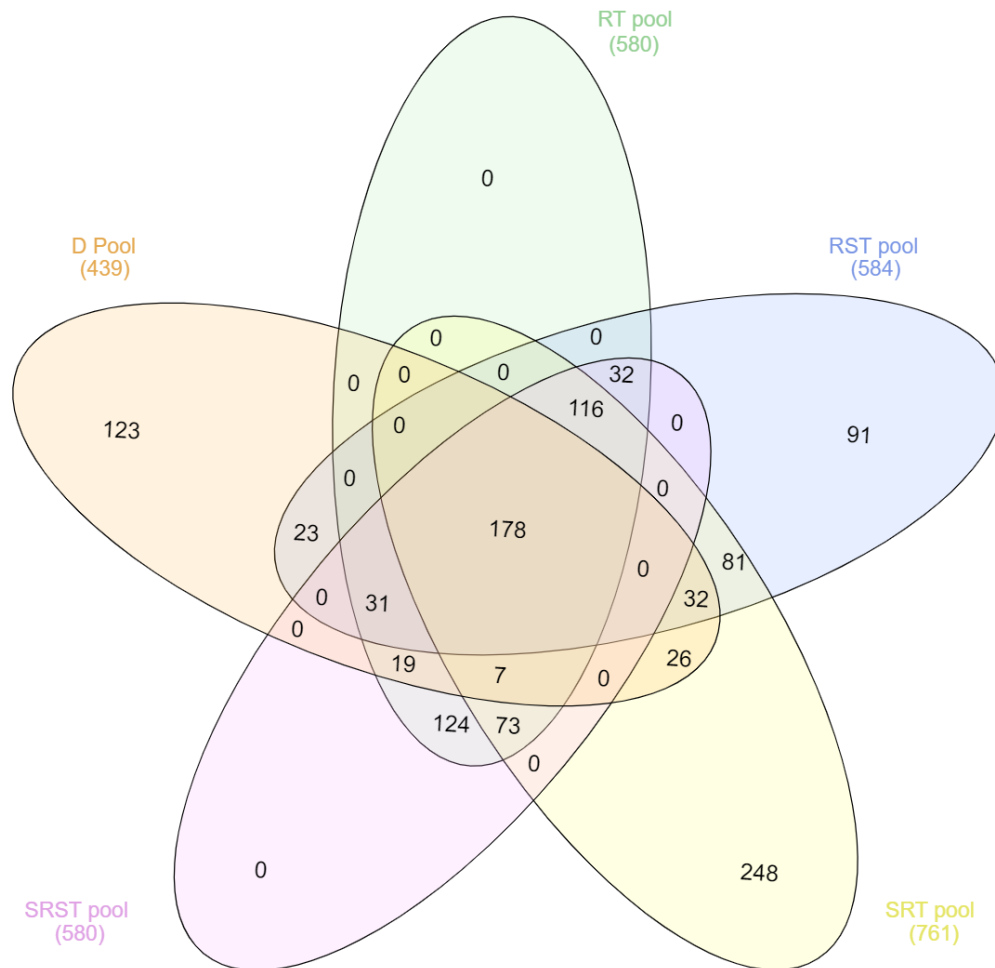


Figura 5. Diagrama de Venn demonstrando todos os cenários do experimento.

Analisando a comparação do cenário do tumor que recidivou após transplante hepático com o tumor que não recidivou, vimos que houve 206 proteínas exclusivas no RT, 374 proteínas em comum aos dois cenários e 387 proteínas exclusivas no SRT (Figura 6).

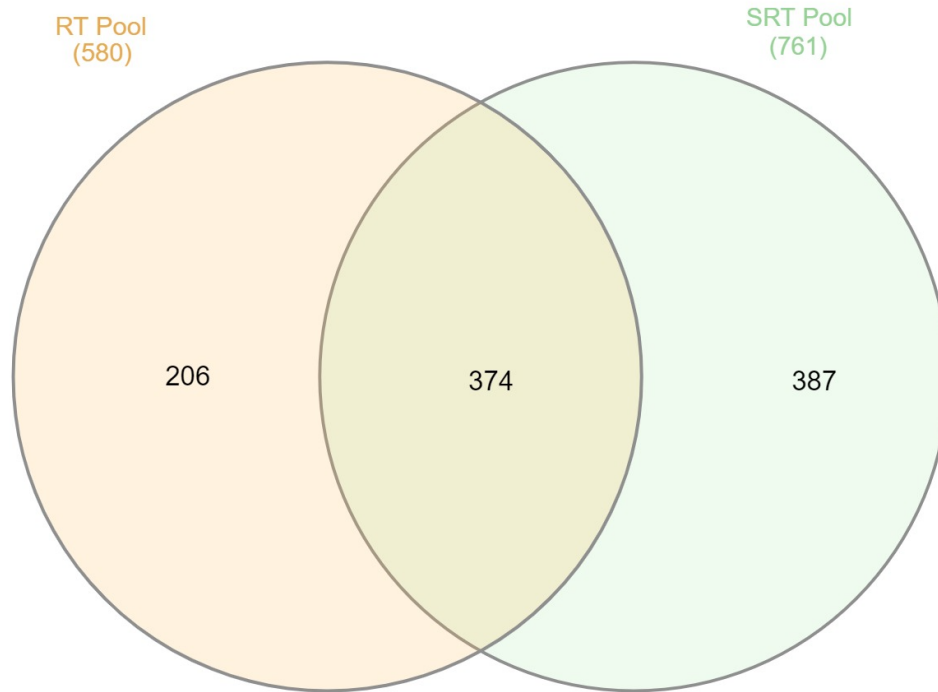


Figura 6 - Diagrama de Venn: RT vs SRT

Na comparação do fígado cirrótico do paciente com tumor que apresentou recidiva com o fígado cirrótico do paciente com tumor que não recidivou, foram observadas 227 proteínas exclusivas no RST, 223 proteínas exclusivas no SRST e 357 proteínas em comum (Figura 7).

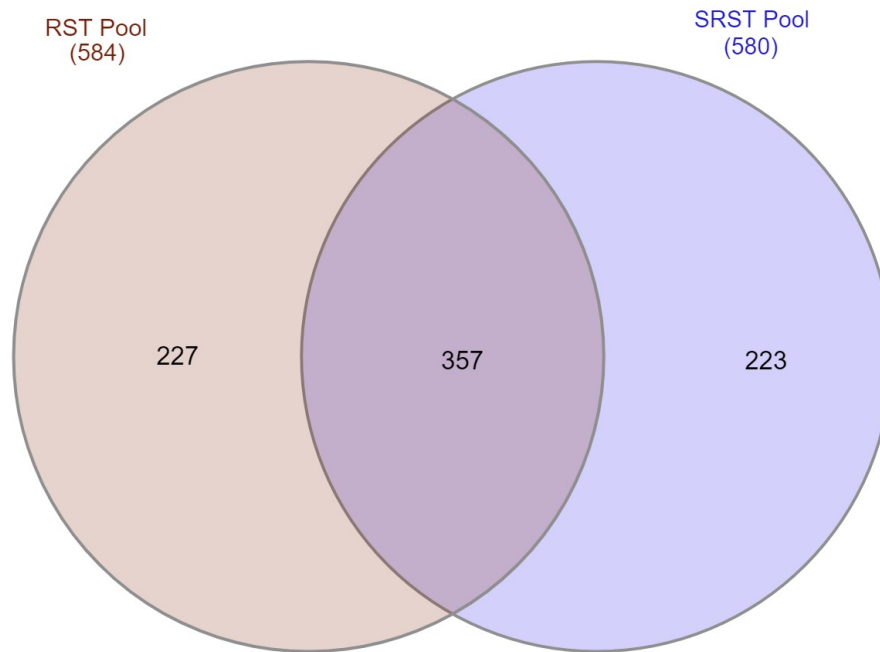


Figura 7 - Diagrama de Venn: RST vs SRST

Após estes primeiros dados, foram analisadas quais proteínas exclusivas do cenário do tumor que recidivou após transplante hepático seriam mais relevantes. Baseado em bancos de dados de microRNAs e suas regulações nas expressões das proteínas encontradas, observaram-se 9 proteínas com alta relevância quanto a sua interação em vias de sinalização e quanto à regulação gênica pelos microRNAs: Fosfoglicerato Deidrogenase (PHGDH), Serina Hidroximetiltransferase (SHMT2), Fator de ADP-Ribosilação 4 (ARF4), Sequestossomo 1 (SQSTM1), Filamina A (FLNA), *Heat Shock Protein* família D membro 1 (HSPD1), Miosina II não muscular (MYH9), Substrato C-Quinase rico em alanina miristoilada (MARCKS), Translocase da camada interna da mitocôndria (TIMM-13) (Figura 8).

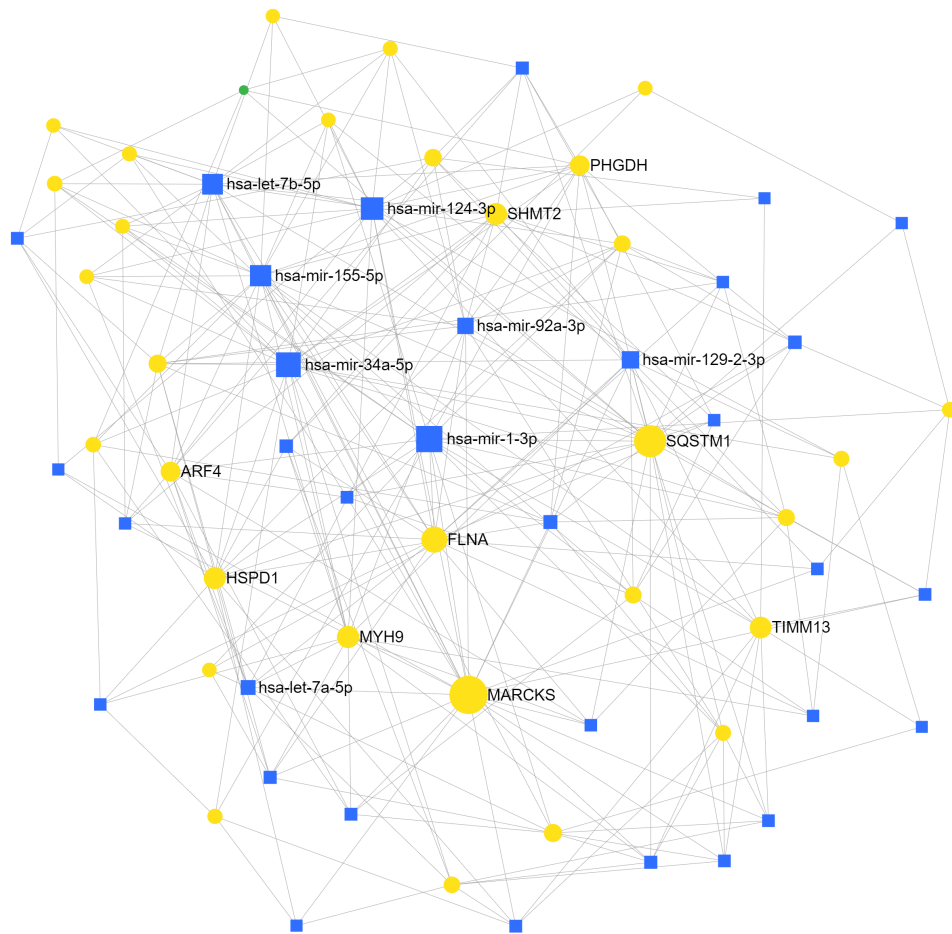


Figura 8 - Diagrama de relação entre proteínas e miRNAs exclusivos do tumor que apresentou recidiva após transplante hepático. Círculo amarelo: proteínas; quadrado azul: microRNAs. Quanto maior o círculo ou o quadrado, maior a relevância quanto às interações com vias de sinalização e processos biológicos.

Foram analisadas também quais proteínas do fígado cirrótico do paciente com tumor que recidivou após o transplante hepático seriam mais relevantes. Baseado em banco de dados de microRNAs e suas regulações nas expressões das proteínas encontradas, observaram-se 15 proteínas com alta relevância quanto a sua interação em vias de sinalização e quanto à regulação gênica pelos microRNAs: Filamina A (FLNA), “Heat Shock Protein” família D membro 1 (HSPD1), Fibronectina 1 (FN1), Fator de crescimento derivado do hepatoma (HDGF), Calnexina (CANX), Guanina Deaminase (GDA), Cadeia alfa-2 do colágeno tipo 4 (COL4A2), Proteína tipo 4 associada a microtúbulo (EML4), Calreticulina (CALR), Alfa-1 antitripsina (SERPINA1), Serina/treonina quinase associada aos microtúbulos (GWL/ MASTL),

Diidropteridina redutase quinoide (QDPR), Beta-2 Microglobulina (B2M), Transgelina (TAGLN), Superóxido Dismutase 1 (SOD1) (Figura 9).

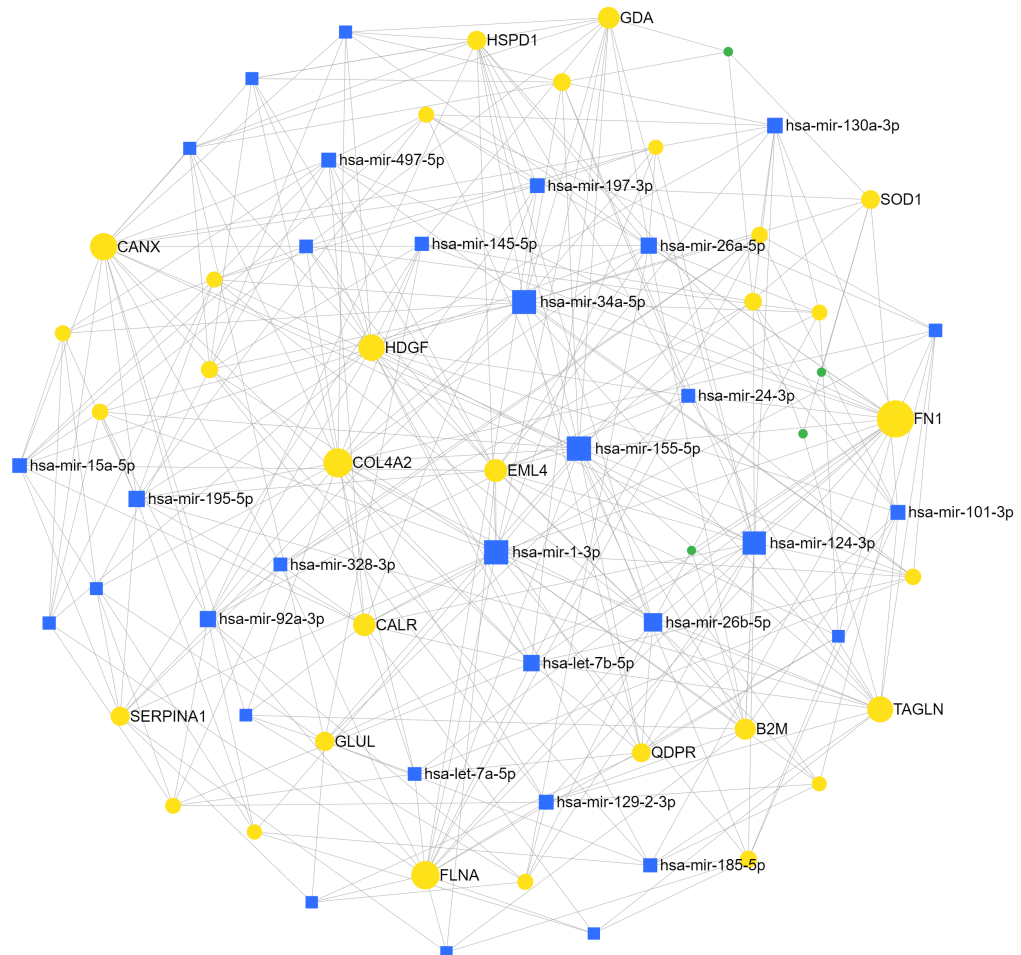


Figura 9 - Diagrama de relação entre proteínas e miRNAs exclusivas do fígado cirrótico do paciente com recidiva após transplante hepático. Círculo amarelo: proteínas; quadrado azul: microRNAs. Quanto maior o círculo ou o quadrado, maior a relevância quanto as interações com vias de sinalização e processos biológicos.

Analisando as proteínas exclusivas de cada cenário, observou-se que os principais processos biológicos envolvidos com o tumor que recidivou pós-transplante hepático são os descritos a seguir: estresse oxidativo, divisão/adesão/motilidade celular e metabolismo mitocondrial (Tabela 3).

Tabela 3 - Relação entre processos biológicos e proteínas exclusivas do tumor recidivado.

PROCESSO BIOLÓGICO	PROTEÍNA
ESTRESSE OXIDATIVO / METABOLISMO CELULAR	Fosfoglicerato Deidrogenase (PHGDH)
	Serina Hidroximetiltransferase (SHMT2)
DIVISÃO/ADESÃO/MOTILIDADE CELULAR	Sequestossomo 1 (SQSTM1)
	Fator de ADP-Ribosilação 4 (ARF4)
	Filamina A (FLNA)
	Miosina II não muscular (MYH9), Substrato C-Quinase rico em alanina miristoilada (MARCKS)
METABOLISMO MITOCONDRIAL	Heat Shock Protein família D membro 1 (HSPD1)
	Translocase da camada interna da mitocôndria (TIMM-13)

Analisando as proteínas exclusivas do cenário do fígado cirrótico do paciente com tumor que apresentou recidiva após transplante hepático, observamos que os processos biológicos relacionados são os seguintes: metabolismo dos aminoácidos, adesão/divisão/motilidade celular, estresse oxidativo, sinalização celular e resposta imunológica (Tabela 4).

Tabela 4 - Relação entre processos biológicos e proteínas exclusivas do fígado cirrótico do paciente com recidiva do tumor após transplante hepático

PROCESSO BIOLÓGICO	PROTEÍNA
METABOLISMO DOS AMINOÁCIDOS E CELULAR	Calnexina (CANX)
	Calreticulina (CALR)
	Guanina Deaminase (GDA)

	Alfa-1 antitripsina (SERPINA1)
	Diidropteridina redutase quinoide (QDPR)
ADESÃO/DIVISÃO/MOTILIDADE CELULAR	Filamina A (FLNA)
	Fibronectina 1 (FN1)
	Cadeia alfa-2 do colágeno tipo 4 (COL4A2)
	Proteína tipo 4 associada a microtúbulo (EML4)
	Serina/treonina quinase associada aos microtúbulos (GWL/ MASTL)
	Transgelina (TAGLN)
ESTRESSE OXIDATIVO	Superóxido Dismutase 1 (SOD1)
SINALIZAÇÃO CELULAR	Fator de crescimento derivado do hepatoma (HDGF)
RESPOSTA IMUNOLÓGICA	Beta-2 Microglobulina (B2M)

6. DISCUSSÃO

6.1 Importância dos efetores moleculares exclusivos do cenário do CHC recidivado após transplante hepático comparado ao cenário do CHC não recidivado

Na comparação da análise proteômica do cenário do CHC recidivado após transplante hepático com o cenário do CHC que não recidivou foram identificadas 206 proteínas exclusivas do cenário da recidiva. Após análise da interação das proteínas e regulação gênica pelos microRNAs,

identificamos 09 proteínas mais relevantes, que são: PHGDH, SHMT2, ARF4, SQSTM1, FLNA, HSPD1, MYH9, MARCKS e TIMM13.

A enzima Fosfoglicerato Deidrogenase (PHGDH) participa da transformação de 3-fosfoglicerato em serina, que irá participar de outras reações para formação de NADPH. Este faz parte do balanço redox (SAMANTA *et al.*, 2016). Além desta função, a serina fornece carbono para o metabolismo anabólico e reações de metilação no organismo (REID; ALLEN; LIU, 2018). Em estudo com células de CHC, foi observado que a PHGDH está associada a resistência ao tratamento com sorafenibe. Isto ocorre principalmente devido a diminuição do efeito dos radicais livres produzidos pelo sorafenibe em decorrência da ação do NADPH produzido na atividade desta enzima (WEI *et al.*, 2019). Em outros estudos, a PHGDH está relacionada à proliferação celular e metástases (LIU *et al.*, 2017; LI *et al.*, 2020). Pacientes com alta expressão de PHGDH apresentaram pior sobrevida e maior taxa de recorrência (LI *et al.*, 2020). Em nosso estudo, foi demonstrado que a PHGDH estava presente exclusivamente no cenário de recidiva do CHC. Esta observação provavelmente está relacionada a um desequilíbrio das espécies reativas do oxigênio, favorecendo a formação de metástases e a recidiva do tumor.

SHMT2 é uma enzima localizada na mitocôndria e envolvida na conversão de serina em glicina com liberação de carbono e formação de 10-metileno tetraidrofolato (THF), substância importante na síntese de purinas e o crescimento/proliferação celular. Somando-se a esta função, a transformação de 10 metileno-THF em 10-formil-THF produz NADPH que atua no balanço do estresse oxidativo (TONG *et al.*, 2020). Em análise gênica e proteica de amostras de CHC, foi visto que os níveis de SHMT2 foram maiores em tecido tumoral comparado com tecido sem tumor. Estes níveis tinham correlação com o grau de diferenciação dos CHCs, e mostraram-se como fator prognóstico independente na sobrevida global (JI *et al.*, 2019). Foi observado ainda que a inibição de SHMT2 em células de CHC diminuíram a proliferação e migração celular (JI *et al.*, 2019) (WOO *et al.*, 2016). Estes dados mostram a correlação desta proteína com o risco de recidiva e metástases no CHC supostamente embasado pela desregulação do estresse oxidativo e produção de substrato para proliferação celular, corroborando nossos achados.

Fator 4 de Ribosilação do ADP (ARF4) é uma proteína que regula o transporte dos endossomas para o complexo de Golgi (NAKAI *et al.*, 2013). ARFs estão envolvidos em vários processos celulares, incluindo trânsito de vesículas, citocinese, adesão celular e invasão da célula tumoral, e são ativadores da fosfolipase D (PLD). ARF4 está relacionada ao processo de metástases

e invasão do câncer de mama *in vitro* (JANG *et al.*, 2012) e a proliferação do câncer de ovário (WU *et al.*, 2018). Neste experimento foi observado que esta proteína estava exclusivamente expressa no cenário do CHC recidivado em acordo com o observado em outros tumores. São necessários mais estudos quanto ao seu papel no CHC, mas provavelmente está relacionada ao processo de invasão e formação de metástases devido às alterações na adesão e motilidade celular.

A sequestossomo 1 (SQSTM1) é uma proteína que se liga a ubiquitina p62 e serve como uma base de sinalização para vários processos celulares. A SQSTM1 está envolvida na resposta ao estresse oxidativo e funciona como receptor de cargas ubiquitinadas para autofagia (KATISURAGI; ICHIMURA; KOMATSU, 2015). No CHC, estudo mostrou que a expressão de SQSTM1 estava relacionada à resistência a drogas e maior proliferação celular (SAITO *et al.*, 2016). Neste estudo, esta proteína estava presente exclusivamente no cenário de recidiva tumoral, sugerindo correlação com recidiva e formação de metástases. Em cânceres gástrico e ovarianos, a alta expressão desta proteína esteve relacionada a melhor prognóstico (KIM *et al.*, 2019; WANG *et al.*, 2018). Existem dados conflitantes dependendo do tumor observado, mas os achados neste experimento podem estar relacionados ao distúrbio do estresse oxidativo e no processo de apoptose, dependente da autofagia.

A FLNA é uma proteína estrutural do citoesqueleto que tem papel fundamental na estrutura celular e em sua motilidade. Ela é capaz de ancorar filamentos de actina a locais de ligação da célula e à matriz extracelular (DJINOVIC-CARUGO; CARUGO, 2010). Estas características podem estar relacionadas a uma maior tendência a proliferação, invasividade e formação de metástases. Em estudo com células de CHC, foi observado uma superexpressão de FLNA nos tumores com alto potencial de metástases (AI *et al.*, 2011). Em tumores de colo uterino, foi observado também que esta proteína estava associada a metástases linfonodais e invasão parametrial (JIN; PEI; WEN, 2016). Em outro estudo, foi observado que a expressão desta proteína estava associada a recorrência precoce do CHC após hepatectomia (DONADON *et al.*, 2018). Esses resultados corroboram o achado neste trabalho.

A *Heat Shock Protein Family D member 1* também conhecida como HSP60, é uma proteína da família *chaperone* localizada na mitocôndria que pode funcionar como molécula sinalizadora do sistema imune inato. Esta proteína é peça fundamental na condensação e montagem das proteínas recém chagadas na mitocôndria (ARYA; MALLIK; LAKHOTIA, 2007). Em amostras de tecido de CHC foi observado uma menor expressão de HSP60 ao nível de mRNA e níveis

proteicos quando comparados com tecido hepático sem tumor do mesmo paciente. Além disso, foi demonstrado que uma baixa expressão de HSP60 está correlacionada a pior diferenciação tumoral, maiores níveis de AFP e pior sobrevida global. Em nível celular, foi observado que HSP60 induz a diferenciação celular, além de inibir invasão e migração de células de CHC. Entretanto, esta proteína não tem efeito na proliferação e apoptose (ZHANG *et al.*, 2016). Existem dados conflitantes na literatura, visto que outro estudo mostrou que HSP60 está associado a crescimento e proliferação tumoral além de efeito anti-apoptótico (HUANG *et al.*, 2018). Neste estudo, a mesma encontra-se relacionada ao cenário do tumor recidivado após transplante hepático, provavelmente conexa a uma maior produção de proteínas defeituosas que estimulam a invasão e migração celular.

A miosina II não-muscular (NMM-II) é uma proteína codificada pelo gene da Cadeia 9 da Miosina Pesada (MYH9) e pertence à superfamília das miosinas. A NMM-II é um hexâmero formado por duas cadeias pesadas, duas cadeias leves regulatórias e duas cadeias leves essenciais (WANG; LIU; YANG, 2019). Foi descoberto que a proteína codificada pelo gene MYH9 tem importante papel no câncer como uma citocina envolvida na reorganização do citoesqueleto, na formação de pseudópodes celulares, e migração. A função desta proteína depende principalmente da família Rho GTPase (Proteína G). A alta expressão desta proteína é comumente encontrada em tumores de pulmão de pequenas células, tumores de mama, leucemias, câncer gástrico, câncer de esôfago e outros tumores malignos (WANG; LIU; YANG, 2019). No CHC, a miosina não muscular funciona como substrato de quinases que facilitam o processo de migração de células malignas (CHEN *et al.*, 2016). Isto corrobora o achado desta proteína no cenário de recidiva tumoral pós-transplante, facilitando a formação de metástases.

As interações diretas do substrato C-quinase rico em alanina miristoilada (MARCKS) com o citoesqueleto têm sido implicadas na regulação da migração celular bem como na regulação de secreção de mucina pelo epitélio brônquico. A MARCKS apresenta similaridade com outra proteína que regula as atividades da proteína do Retinoblastoma (Rb). A Rb está envolvida na regulação do ciclo celular (EL AMRI; FITZGERALD; SCHOLESSER, 2018). A MARCKS está superexpressa em tecidos de CHCs e está relacionado à migração e invasão celular (SONG *et al.*, 2015). Além dessas observações, foi visto que esta proteína tem relação com a renovação das células iniciadoras do câncer (CHEN *et al.*, 2018). Esses dados confirmam os achados do nosso estudo, em que esta proteína esteve exclusivamente presente no CHC no cenário de recidiva quando comparado ao cenário sem recidiva.

A Translocase da camada Interna da mitocôndria (TIMM13) está envolvida no transporte de metabólitos do citoplasma para camada interna da mitocôndria. Esta proteína mostrou-se como fator prognóstico no câncer de endométrio, sendo a alta expressão relacionada a melhor sobrevida. No câncer de pâncreas, esta proteína também se comportou como fator prognóstico sendo a alta expressão dela relacionada a melhor sobrevida. Já no CHC, esta proteína não se mostrou fator prognóstico (EXPRESSION...,2020). Neste estudo está expressa apenas no cenário dos tumores que recidivaram, podendo ter papel na formação de metástases devido a um distúrbio na regulação do metabolismo mitocondrial.

6.2 Importância dos efetores moleculares exclusivos do cenário do fígado cirrótico dos pacientes que apresentaram recidiva após transplante hepático comparado aos que não recidivaram.

Na comparação da análise proteômica do cenário do fígado cirrótico do paciente com CHC recidivado após transplante hepático com o cenário do fígado cirrótico do paciente com CHC que não recidivou, identificamos 227 proteínas exclusivas do cenário da recidiva. Após análise da interação das proteínas e regulação gênica pelos miRNAs, identificamos 15 proteínas mais importantes, que são: FLNA, HSPD1, FN1, HDGF, CANX, GDA, COL4A2, EML4, CALR, SERPINA1, GWL/ MASTL, QDPR, B2M, TAGLN, SOD1.

A Fibronectina 1 (FN1) é uma glicoproteína da matriz extracelular que se liga a integrinas. Elas são importantes na adesão celular, crescimento, migração, e diferenciação além de participar de processos importantes como a cicatrização e desenvolvimento embrionário (PANKOV; YAMADA, 2002). No carcinoma hepatocelular (CHC) foi encontrado uma alta expressão de FN1. Somando-se a isso, foi observado que a expressão desta proteína promove uma maior invasividade e migração celular (KRISHNAN *et al.*, 2020). Estes dados corroboram nosso achado de relação de FN1 com o cenário de recidiva tumoral.

O fator de crescimento derivado do Hepatoma (HDGF) é uma proteína de ligação a heparina que pertence à família de fatores de crescimento chamada proteínas relacionadas ao HDGF (KISHIMA *et al.*, 2002). O HDGF regula a expressão gênica da transição epitélio-mesenquimal e ciclo celular por meio das vias de sinalização PI3K-AKT e beta-catenina (LIU *et al.*, 2019), processo que facilita a invasividade e formação de metástases. A expressão de HDGF é

significativamente maior em tecidos humanos de CHC comparado ao fígado adjacente não tumoral (YOSHIDA *et al.*, 2003). A inibição do HDGF mostrou redução do crescimento tumoral em estudo *in vivo* (ENOMOTO *et al.*, 2015). Foi observado que a inibição do HDGF levou à diminuição da capacidade de metástases e crescimento celular do CHC (YANG *et al.*, 2016). Estes dados nos levam a acreditar que esta proteína esteja relacionada a recorrência, em acordo com nossos achados.

Calnexina é uma proteína predominante do retículo endoplasmático que atua ajudando no enovelamento das proteínas para determinar sua funcionalidade ou degradação. Ela pode se localizar na superfície celular, mas sua importância nesta localização não é muito conhecida (BEDARD *et al.*, 2005). Estudo em animais mostrou que a CANX estava relacionada à degradação de matriz extracelular no câncer de mama e hepático (ROS *et al.*, 2020). Este processo pode facilitar a formação de metástases e levar a recorrência. Em nosso estudo foi demonstrado que esta proteína estava presente exclusivamente no fígado cirrótico do paciente com tumores que recidivaram, sugerindo que ela tenha algum papel na promoção do evento de degradação e remodelamento tecidual.

A guanina Deaminase (GDA), também conhecida como guanase, participa do metabolismo dos nucleotídeos, transformando guanina em xantina. Em estudos com câncer gástrico foi demonstrado que esta enzima estava com atividade aumentada no tecido tumoral comparado com tecido normal adjacente (DURAK *et al.*, 1994), podendo estar relacionada a promoção desta neoplasia. Neste estudo vimos que esta proteína estava presente exclusivamente no fígado cirrótico do paciente com tumor recidivado, podendo estar relacionada à promoção de recidiva e metástases através de um distúrbio no metabolismo dos nucleotídeos com formação de substrato para proliferação celular.

A cadeia alfa-2 do colágeno tipo 4 (COL4A2) é uma proteína fundamental na composição da membrana basal. Ela participa ainda da interação intercelular e entre a célula e a matriz extracelular por meio de fatores de crescimento e receptores da superfície celular (PARKIN *et al.*, 2011). Já foi demonstrado que os tumores triplo negativos de mama apresentam uma maior expressão de COL4A2 comparado aos tumores não triplo negativos. A inativação desta proteína diminuiu a proliferação e migração celular e inibiu o crescimento por meio da indução da apoptose de tumores triplo negativos (JINGSONG *et al.*, 2017). No CHC foi observado que a alta expressão do COL4A2 está relacionada a uma menor sobrevida livre de progressão (LIU *et al.*, 2020).

Baseado nos dados da literatura, espera-se que esta proteína facilite a recorrência do CHC, corroborando os achados descritos aqui.

A proteína tipo 4 associada a microtúbulo (EML4) é uma proteína que faz parte da família das proteínas associadas aos microtúbulos que são envolvidas no processo de atuação dos microtúbulos na mitose e na ligação destes ao cinetocoro (CHEN *et al.*, 2015). Esta proteína é bastante estudada no câncer de pulmão e quando há uma fusão dos genes EML4 e ALK (*Anaplastic Lymphoma Kinase*) há uma melhor resposta e melhor sobrevida livre de progressão com o uso de crizotinibe (BAYLISS *et al.*, 2016). Neste experimento esta proteína esteve presente exclusivamente no fígado cirrótico dos pacientes com tumores recidivados, podendo estar relacionada a uma maior proliferação celular e divisão celular, promovendo o ambiente necessário para recidiva tumoral.

A calreticulina (CALR) é uma proteína do retículo endoplasmático de ligação ao cálcio que ajuda no enovelamento das proteínas que são excretadas ou incorporadas à membrana plasmática. Funciona como um sistema de controle de qualidade celular, não permitindo a exportação precoce de proteínas malformadas do retículo endoplasmático (FUCIKOVA *et al.*, 2021). No CHC, foi observado que a inibição da CALR levou a uma diminuição da proliferação celular, invasividade e aumento da apoptose *in vitro*. Este efeito se dá provavelmente pela via de sinalização PI3K/AKT. Em experimento utilizando tecido de tumores ressecados foi observado que a expressão da proteína calreticulina foi maior no CHC comparado com tecido não tumoral adjacente além de apresentar correlação com metástases, em similaridade com nossos resultados (FENG *et al.*, 2015). Considerando sua função, a maior atuação desta proteína levaria a uma proteção dos tumores ao processo apoptótico.

A Alfa-1 Antitripsina (AAT) é uma glicoproteína de fase aguda sintetizada principalmente no fígado e é a principal proteína sanguínea depois da albumina e imunoglobulinas. A AAT é bem caracterizada como um controlador da lesão pulmonar por meio do seu efeito inibitório sobre as serina proteases neutrofílicas (JANCIAUSKIENE *et al.*, 2018). Parece ter papel biológico na homeostase, reparo e regeneração tecidual. É proposto que o acúmulo desta proteína intracelular no fígado possa levar ao dano celular contribuindo com a carcinogênese (CARLSON *et al.*, 1989). Em estudo com pacientes portadores de CHC foi visto que a alfa-1 antitripsina estava superexpressa no sangue dos pacientes metastáticos e pode servir como possível marcador prognóstico (QIN *et al.*, 2013). Estudo com células de tumores de mama mostrou que esta proteína estava

correlacionada com maior invasividade e migração tumoral (ZHAO *et al.*, 2018). Neste experimento esta proteína esteve presente exclusivamente do fígado cirrótico dos pacientes com tumores recidivados, dando suporte a uma provável correlação desta proteína com o desenvolvimento da recorrência do CHC decorrente por meio de uma desregulação homeostática e do reparo tecidual, ocasionado por um estado inflamatório crônico.

A serina/treonina quinase associada aos microtúbulos (MASTL) é uma quinase essencial para a condensação correta do cromossomo e progressão do ciclo celular por meio da mitose e meiose (FATIMA; SINGH; DHAWAN, 2020). Investigando a função da MASTL no CHC foi observado que a superexpressão desta proteína estimulou a proliferação celular e progressão do ciclo celular. Além disso, foi descrito na literatura sua maior expressão em tecido tumoral quando comparado ao tecido não tumoral adjacente (CAO *et al.*, 2019). Neste estudo foi visto que esta proteína está presente apenas no fígado cirrótico do paciente com tumor que recidivou comparado ao microambiente do tumor que não recidivou, podendo ter papel importante no desenvolvimento da recidiva, por meio de um favorecimento de eventos de divisão celular no tecido.

A diidropteridina redutase quinoide (QDPR) é uma enzima que faz parte do processo de reciclagem da tetraidropterina (B4H). Esta substância é utilizada pela fenilalanina hidroxilase e óxido nítrico sintase (XU *et al.*, 2014). Um estudo mostrou o papel desta enzima no metabolismo do folato, substância fundamental nos processos de proliferação celular (ZHENG *et al.*, 2018). Neste experimento, a QDPR esteve presente exclusivamente no cenário do fígado cirrótico do paciente com tumor recidivado, podendo estar relacionado ao processo de metástases e recidiva, por aumentar o suporte de folato necessário para proliferação celular.

A beta-2 microglobulina (B2M) é o componente extracelular do complexo de histocompatibilidade maior tipo I (MHC 1) que está presente em todas as células nucleadas do corpo humano. Estas moléculas são importantes para que o sistema imune reconheça a si mesmo e desenvolvam linfócitos T CD8+ (ROBERTS; ORDWAY; ORME, 1993). Em experimentos de expressão de proteínas no soro de pacientes com CHC foi observado uma maior expressão de B2M em comparação com controles sadios. Isso sugere que esta proteína poderia ser usada como biomarcador diagnóstico (KUANG *et al.*, 2018). Em outro estudo foi demonstrado que esta proteína poderia ser usada como biomarcador para progressão para cirrose e CHC, em pacientes infectados com vírus da hepatite C (OUDA *et al.*, 2015). Em nossos resultados, a beta-2 microglobulina esteve associada ao fígado cirrótico do paciente com CHC recidivado, podendo

exercer algum papel na promoção da formação de metástases e recorrência do tumor, por meio de uma resposta imune ineficaz em reconhecer e destruir células tumorais.

Transgelina (TAGLN) é uma proteína do citoesqueleto que se liga à actina. Esta proteína é considerada um marcador gênico das células do músculo liso vascular (ASSINDER; STANTON; PRASAD, 2009). Além disso foi demonstrado que esta proteína funciona como um supressor da MMP9, efêtor importante na destruição da matriz extracelular (NAIR; SOLWAY; BOYD, 2006). Estudos com tecidos de tumores colorretais mostraram que a expressão desta proteína foi menor nos tecidos tumorais em comparação ao tecido normal adjacente. A inibição desta proteína levou ao aumento da proliferação celular, suprimiu a apoptose e aumentou a capacidade de invasão das células de tumor colorretal. Foi observado ainda que houve um aumento da expressão da MMP9 (LI *et al.*, 2013). No câncer de bexiga foi observada uma maior expressão desta proteína (por meio de testes imuno-histoquímicos) em comparação com tecido normal de bexiga. Foi observado ainda que a alta expressão da TAGLN estava associado a uma alta taxa de metástases pós-operatórias, além de menor sobrevida global. Experimentos *in vitro* mostraram que esta proteína promove a migração e invasividade das células do câncer de bexiga metastático (CHEN *et al.*, 2019) Neste estudo, a TAGLN está presente exclusivamente no fígado cirrótico do paciente com tumor recidivado, indicando um possível papel desta proteína na promoção da recidiva tumoral corroborando dados da literatura. Esta proteína pode propiciar um ambiente ideal para proliferação e migração das células do CHC.

A superóxido dismutase 1 (SOD1) é uma enzima responsável pela conversão de superóxido em oxigênio e peróxido de hidrogênio, portanto exercendo atividade antioxidante. Dentre todas as superóxidos dismutases, SOD1 representa a principal forma citosólica e entrega 80% de toda atividade desta enzima (WATANABE *et al.*, 2014). Em células de mamíferos, a deleção de SOD1 leva a morte celular pelo acúmulo de metabólitos do estresse oxidativo (INOUE *et al.*, 2010). Em estudos com carcinoma de pulmão, houve uma superexpressão tanto do mRNA, quanto proteico de SOD1 no tecido tumoral, comparado com tecido normal adjacente. Foi observado ainda que alta expressão de SOD1 foi fator prognóstico independente para pior sobrevida nestes pacientes. Em análises com células de tumores de pulmão foi observado que a alta expressão de SOD1 está correlacionado à invasão, migração e proliferação celular (LIU *et al.*, 2020). No câncer de mama foi visto que a superexpressão de SOD1 estava associada a maior proliferação celular e maior capacidade de formar metástases (LI *et al.*, 2020). Estudo em modelos animais mostrou que a

deleção de SOD1 levou à formação de CHC em até 70% dos animais (ELCHURI *et al.*, 2005). Este dado vai de encontro aos achados em outros tumores, mas demonstra o possível efeito do acúmulo de radicais livres no desenvolvimento do CHC. Neste estudo, observa-se que esta proteína estava presente exclusivamente no cenário do fígado cirrótico do paciente com CHC recidivado, podendo também estar relacionada ao desenvolvimento de metástases e recidiva tumoral.

Este estudo apresenta como limitação, o fato de não ter sido possível calcular a quantidade de proteínas individualmente de cada paciente, como foi planejado inicialmente, devido ao baixo rendimento na aquisição de proteínas. Portanto, as amostras foram analisadas em *pools*, não sendo possível determinar qual proteína estaria superexpressa e qual estaria com expressão diminuída em cada indivíduo. Além do baixo rendimento na extração das proteínas de material parafinado já conhecido, levanta-se a hipótese que as condições de armazenamento dos blocos e a qualidade do formol e da parafina utilizado para confecção dos blocos, podem ter diminuído ainda mais o rendimento do processo. Outro ponto fraco foi a ausência de validação interna e validação externa. Um ponto que torna os achados aqui descritos relevantes é o fato de terem sido analisados pacientes com seguimentos de mais de 5 anos que não recidivaram, comprovando que eles representavam realmente este cenário. Podemos citar ainda como fator de inovação o uso de amostras de blocos de parafina, pois isso facilitaria a aquisição de dados clínicos em coortes retrospectivas diminuindo tempo e custo dos estudos.

Esses dados suportam e adicionam conhecimento ao entendimento dos processos relacionados à recidiva deste tumor. Esta informação é importante uma vez que pode auxiliar a desenvolver critérios para seleção de pacientes para o transplante hepático, além de tratamentos adjuvantes ou neoadjuvantes do CHC.

7. CONCLUSÃO

Houve diferença entre o perfil proteico encontrado no cenário de carcinomas hepatocelulares que recidivaram após transplante hepático comparado aos que não recidivaram. Identificaram-se também diferenças entre o cenário do fígado cirrótico do paciente com tumor recidivado comparado ao do paciente com tumor que não recidivou.

Considerando o cenário do tumor recidivado, as proteínas fazem parte principalmente dos processos de divisão/adesão/motilidade celular. No fígado cirrótico do paciente com recidiva do tumor, as principais vias foram de divisão/adesão/motilidade celular, seguida por alterações no metabolismo celular e no regime de aminoácidos.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABOU-ALFA, G. K.; MEYER, T.; CHENG, A. L.; EL-KHOUEIRY, A. B. *et al.*. Cabozantinib in Patients with Advanced and Progressing Hepatocellular Carcinoma. *N Engl J Med*, 379, n. 1, p. 54-63, Jul 5 2018.

AEBERSOLD, R.; MANN, M. Mass spectrometry-based proteomics. *Nature*, 422, n. 6928, p. 198-207, Mar 13 2003.

AI, J.; HUANG, H.; LV, X.; TANG, Z. *et al.*. FLNA and PGK1 are two potential markers for progression in hepatocellular carcinoma. *Cell Physiol Biochem*, 27, n. 3-4, p. 207-216, 2011.

ARYA, R.; MALLIK, M.; LAKHOTIA, S. C. Heat shock genes - integrating cell survival and death. *J Biosci*, 32, n. 3, p. 595-610, Apr 2007.

ASSINDER, S. J.; STANTON, J. A.; PRASAD, P. D. Transgelin: an actin-binding protein and tumour suppressor. *Int J Biochem Cell Biol*, 41, n. 3, p. 482-486, Mar 2009.

BAYLISS, R.; CHOI, J.; FENNELL, D. A.; FRY, A. M. *et al.*. Molecular mechanisms that underpin EML4-ALK driven cancers and their response to targeted drugs. *Cell Mol Life Sci*, 73, n. 6, p. 1209-1224, Mar 2016.

BEDARD, K.; SZABO, E.; MICHALAK, M.; OPAS, M. Cellular functions of endoplasmic reticulum chaperones calreticulin, calnexin, and ERp57. *Int Rev Cytol*, 245, p. 91-121, 2005.

BODZIN, A. S.; LUNSFORD, K. E.; MARKOVIC, D.; HARLANDER-LOCKE, M. P. *et al.*. Predicting Mortality in Patients Developing Recurrent Hepatocellular Carcinoma After Liver

Transplantation: Impact of Treatment Modality and Recurrence Characteristics. *Ann Surg*, 266, n. 1, p. 118-125, Jul 2017.

BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO DE HEPATITES VIRAIS 2019 / Departamento de Doenças de Condições Crônicas e Infecções Sexualmente Transmissíveis - aids.gov.br

BRUIX, J.; QIN, S.; MERLE, P.; GRANITO, A. *et al.* Regorafenib for patients with hepatocellular carcinoma who progressed on sorafenib treatment (RESORCE): a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet*, 389, n. 10064, p. 56-66, Jan 7 2017.

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

BRUIX, J.; TAKAYAMA, T.; MAZZAFERRO, V.; CHAU, G. Y. *et al.* Adjuvant sorafenib for hepatocellular carcinoma after resection or ablation (STORM): a phase 3, randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet Oncol*, 16, n. 13, p. 1344-1354, Oct 2015.

CAO, L.; LI, W. J.; YANG, J. H.; WANG, Y. *et al.* Inflammatory cytokine-induced expression of MASTL is involved in hepatocarcinogenesis by regulating cell cycle progression. *Oncol Lett*, 17, n. 3, p. 3163-3172, Mar 2019.

CARLSON, J. A.; ROGERS, B. B.; SIFERS, R. N.; FINEGOLD, M. J. *et al.* Accumulation of PiZ alpha 1-antitrypsin causes liver damage in transgenic mice. *J Clin Invest*, 83, n. 4, p. 1183-1190, Apr 1989.

CATHERMAN, A. D.; SKINNER, O. S.; KELLEHER, N. L. Top Down proteomics: facts and perspectives. *Biochem Biophys Res Commun*, 445, n. 4, p. 683-693, Mar 21 2014.

CHANG, M. H.; YOU, S. L.; CHEN, C. J.; LIU, C. J. *et al.* Decreased incidence of hepatocellular carcinoma in hepatitis B vaccinees: a 20-year follow-up study. *J Natl Cancer Inst*, 101, n. 19, p. 1348-1355, Oct 7 2009.

- CHANG, L.; ZHOU, G.; SOUFAN, O.; XIA, J. miRNet 2.0: network-based visual analytics for miRNA functional analysis and systems biology. *Nucleic Acids Res*, 48, n. W1, p. W244-w251, Jul 2 2020.
- CHEN, D.; ITO, S.; YUAN, H.; HYODO, T. *et al.* EML4 promotes the loading of NUDC to the spindle for mitotic progression. *Cell Cycle*, 14, n. 10, p. 1529-1539, 2015.
- CHEN, Y.; YU, Y.; SUN, S.; WANG, Z. *et al.* Bradykinin promotes migration and invasion of hepatocellular carcinoma cells through TRPM7 and MMP2. *Exp Cell Res*, 349, n. 1, p. 68-76, Nov 15 2016.
- CHEN, Z.; HE, S.; ZHAN, Y.; HE, A. *et al.* TGF- β -induced transgelin promotes bladder cancer metastasis by regulating epithelial-mesenchymal transition and invadopodia formation. *EBioMedicine*, 47, p. 208-220, Sep 2019.
- CHEN, Z.; LIU, Y.; YAO, L.; GUO, S. *et al.* The long noncoding RNA lncZic2 drives the self-renewal of liver tumor-initiating cells via the protein kinase C substrates MARCKS and MARCKSL1. *J Biol Chem*, 293, n. 21, p. 7982-7992, May 25 2018.
- CHONG, P. K.; LEE, H.; LOH, M. C.; CHOONG, L. Y. *et al.* Upregulation of plasma C9 protein in gastric cancer patients. *Proteomics*, 10, n. 18, p. 3210-3221, Sep 2010.
- COSTA, P. E.; VASCONCELOS, J. B.; COELHO, G. R.; BARROS, M. A. *et al.* Ten-year experience with liver transplantation for hepatocellular carcinoma in a Federal University Hospital in the Northeast of Brazil. *Transplant Proc*, 46, n. 6, p. 1794-1798, Jul-Aug 2014.
- DE LOPE, C. R.; TREMOSINI, S.; FORNER, A.; REIG, M. *et al.* Management of HCC. *J Hepatol*, 56 Suppl 1, p. S75-87, 2012.
- DJINOVIC-CARUGO, K.; CARUGO, O. Structural portrait of filamin interaction mechanisms. *Curr Protein Pept Sci*, 11, n. 7, p. 639-650, Nov 2010.

DONADON, M.; DI TOMMASO, L.; SOLDANI, C.; FRANCESCHINI, B. *et al.*. Filamin A expression predicts early recurrence of hepatocellular carcinoma after hepatectomy. *Liver Int*, 38, n. 2, p. 303-311, Feb 2018.

DURAK, I.; CETIN, R.; CANBOLAT, O.; CETIN, D. *et al.*. Adenosine deaminase, 5'-nucleotidase, guanase and cytidine deaminase activities in gastric tissues from patients with gastric cancer. *Cancer Lett*, 84, n. 2, p. 199-202, Sep 15 1994.

DUSEJA, A. Staging of hepatocellular carcinoma. *J Clin Exp Hepatol*, 4, n. Suppl 3, p. S74-79, Aug 2014.

EASL Clinical Practice Guidelines: Management of hepatocellular carcinoma. *J Hepatol*, 69, n. 1, p. 182-236, Jul 2018.

EL AMRI, M.; FITZGERALD, U.; SCHLOSSER, G. MARCKS and MARCKS-like proteins in development and regeneration. *J Biomed Sci*, 25, n. 1, p. 43, May 22 2018.

ELCHURI, S.; OBERLEY, T. D.; QI, W.; EISENSTEIN, R. S. *et al.*. CuZnSOD deficiency leads to persistent and widespread oxidative damage and hepatocarcinogenesis later in life. *Oncogene*, 24, n. 3, p. 367-380, Jan 13 2005.

ENOMOTO, H.; NAKAMURA, H.; LIU, W.; IWATA, Y. *et al.*. Down-regulation of HDGF Inhibits the Growth of Hepatocellular Carcinoma Cells In Vitro and In Vivo. *Anticancer Res*, 35, n. 12, p. 6475-6479, Dec 2015.

EXPRESSION of TIMM13 in cancer – Summary – The Human Protein Atlas. Disponível em: <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000099800-TIMM13/pathology>. Acessado em Dez.2020

FATIMA, I.; SINGH, A. B.; DHAWAN, P. MASTL: A novel therapeutic target for Cancer Malignancy. *Cancer Med*, 9, n. 17, p. 6322-6329, Sep 2020.

FENG, J. T.; LIU, Y. K.; SONG, H. Y.; DAI, Z. *et al.*. Heat-shock protein 27: a potential biomarker for hepatocellular carcinoma identified by serum proteome analysis. *Proteomics*, 5, n. 17, p. 4581-4588, Nov 2005.

FENG, R.; YE, J.; ZHOU, C.; QI, L. *et al.* Calreticulin down-regulation inhibits the cell growth, invasion and cell cycle progression of human hepatocellular carcinoma cells. *Diagn Pathol*, 10, p. 149, Aug 27 2015.

FENN, J. B.; MANN, M.; MENG, C. K.; WONG, S. F. *et al.* Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science*, 246, n. 4926, p. 64-71, Oct 6 1989.

FINN, R. S.; QIN, S.; IKEDA, M.; GALLE, P. R. *et al.* Atezolizumab plus Bevacizumab in Unresectable Hepatocellular Carcinoma. *N Engl J Med*, 382, n. 20, p. 1894-1905, May 14 2020.

FORNER, A.; LLOVET, J. M.; BRUIX, J. Hepatocellular carcinoma. *Lancet*, 379, n. 9822, p. 1245-1255, Mar 31 2012.

FUCIKOVA, J.; SPISEK, R.; KROEMER, G.; GALLUZZI, L. Calreticulin and cancer. *Cell Res*, 31, n. 1, p. 5-16, Jan 2021.

FUJIKI, M.; TAKADA, Y.; OGURA, Y.; OIKE, F. *et al.* Significance of des-gamma-carboxy prothrombin in selection criteria for living donor liver transplantation for hepatocellular carcinoma. *Am J Transplant*, 9, n. 10, p. 2362-2371, Oct 2009.

GLOBOCAN 2018, *International Agency for Research on Cancer* 2018. <https://gco.iarc.fr>

HAMEED, B.; MEHTA, N.; SAPISOCHIN, G.; ROBERTS, J. P. *et al.* Alpha-fetoprotein level > 1000 ng/mL as an exclusion criterion for liver transplantation in patients with hepatocellular carcinoma meeting the Milan criteria. *Liver Transpl*, 20, n. 8, p. 945-951, Aug 2014.

HANN, H. W.; JAIN, S.; PARK, G.; STEFFEN, J. D. *et al.* Detection of urine DNA markers for monitoring recurrent hepatocellular carcinoma. *Hepatoma Res*, 3, p. 105-111, 2017.

HUANG, W.; LI, T.; YANG, W.; CHAI, X. *et al.* Analysis of DNA methylation in plasma for monitoring hepatocarcinogenesis. *Genet Test Mol Biomarkers*, 19, n. 6, p. 295-302, Jun 2015.

HUANG, Y. H.; LIN, K. H.; YU, J. S.; WU, T. J. *et al.* Targeting HSP60 by subcutaneous injections of jetPEI/HSP60-shRNA destabilizes cytoplasmic survivin and inhibits hepatocellular carcinoma growth. *Mol Carcinog*, 57, n. 9, p. 1087-1101, Sep 2018.

INOUE, E.; TANO, K.; YOSHII, H.; NAKAMURA, J. *et al.*. SOD1 Is Essential for the Viability of DT40 Cells and Nuclear SOD1 Functions as a Guardian of Genomic DNA. *J Nucleic Acids*, 2010, Aug 5 2010.

JANCIAUSKIENE, S.; WRENGER, S.; IMMENSCHUH, S.; OLEJNICKA, B. *et al.*. The Multifaceted Effects of Alpha1-Antitrypsin on Neutrophil Functions. *Front Pharmacol*, 9, p. 341, 2018.

JANG, S. Y.; JANG, S. W.; KO, J. Regulation of ADP-ribosylation factor 4 expression by small leucine zipper protein and involvement in breast cancer cell migration. *Cancer Lett*, 314, n. 2, p. 185-197, Jan 28 2012.

JI, L.; TANG, Y.; PANG, X.; ZHANG, Y. Increased Expression of Serine Hydroxymethyltransferase 2 (SHMT2) is a Negative Prognostic Marker in Patients with Hepatocellular Carcinoma and is Associated with Proliferation of HepG2 Cells. *Med Sci Monit*, 25, p. 5823-5832, Aug 5 2019.

JIN, Y. Z.; PEI, C. Z.; WEN, L. Y. FLNA is a predictor of chemoresistance and poor survival in cervical cancer. *Biomark Med*, 10, n. 7, p. 711-719, Jul 2016.

JINGSONG, H.; HONG, G.; YANG, J.; DUO, Z. *et al.*. siRNA-mediated suppression of collagen type iv alpha 2 (COL4A2) mRNA inhibits triple-negative breast cancer cell proliferation and migration. *Oncotarget*, 8, n. 2, p. 2585-2593, Jan 10 2017.

KATSURAGI, Y.; ICHIMURA, Y.; KOMATSU, M. p62/SQSTM1 functions as a signaling hub and an autophagy adaptor. *Febs j*, 282, n. 24, p. 4672-4678, Dec 2015.

KHALILI, K.; KIM, T. K.; JANG, H. J.; HAIDER, M. A. *et al.*. Optimization of imaging diagnosis of 1-2 cm hepatocellular carcinoma: an analysis of diagnostic performance and resource utilization. *J Hepatol*, 54, n. 4, p. 723-728, Apr 2011.

KIERNAN, U. A. Biomarker rediscovery in diagnostics. *Expert Opin Med Diagn*, 2, n. 12, p. 1391-1400, Dec 2008.

KIM, J. S.; BAE, G. E.; KIM, K. H.; LEE, S. I. *et al.*. Prognostic Significance of LC3B and p62/SQSTM1 Expression in Gastric Adenocarcinoma. *Anticancer Res*, 39, n. 12, p. 6711-6722, Dec 2019.

KISHIMA, Y.; YAMAMOTO, H.; IZUMOTO, Y.; YOSHIDA, K. *et al.*. Hepatoma-derived growth factor stimulates cell growth after translocation to the nucleus by nuclear localization signals. *J Biol Chem*, 277, n. 12, p. 10315-10322, Mar 22 2002.

KRISHNAN, M. S.; RAJAN KD, A.; PARK, J.; ARJUNAN, V. *et al.*. Genomic analysis of Vascular Invasion in Hepatocellular Carcinoma (HCC) Reveals Molecular Drivers and Predictive Biomarkers. *Hepatology*, Nov 3 2020.

KUANG, Z.; HUANG, R.; YANG, Z.; LV, Z. *et al.*. Quantitative screening of serum protein biomarkers by reverse phase protein arrays. *Oncotarget*, 9, n. 66, p. 32624-32641, Aug 24 2018.

KUDO, M.; FINN, R. S.; QIN, S.; HAN, K. H. *et al.*. Lenvatinib versus sorafenib in first-line treatment of patients with unresectable hepatocellular carcinoma: a randomised phase 3 non-inferiority trial. *Lancet*, 391, n. 10126, p. 1163-1173, Mar 24 2018.

LAURSEN, L. A preventable cancer. *Nature*. 2014 Dec 4;516(7529):S2-3.

LI, K.; LIU, T.; CHEN, J.; NI, H. *et al.*. Survivin in breast cancer-derived exosomes activates fibroblasts by up-regulating SOD1, whose feedback promotes cancer proliferation and metastasis. *J Biol Chem*, 295, n. 40, p. 13737-13752, Oct 2 2020.

LI, Q.; QIU, J.; YANG, H.; SUN, G. *et al.* Kinesin family member 15 promotes cancer stem cell phenotype and malignancy via reactive oxygen species imbalance in hepatocellular carcinoma. *Cancer Lett*, 482, p. 112-125, Jul 10 2020.

LI, Q.; SHI, R.; WANG, Y.; NIU, X. TAGLN suppresses proliferation and invasion, and induces apoptosis of colorectal carcinoma cells. *Tumour Biol*, 34, n. 1, p. 505-513, Feb 2013.

LIU, C.; WANG, L.; JIANG, Q.; ZHANG, J. *et al.*. Hepatoma-Derived Growth Factor and DDX5 Promote Carcinogenesis and Progression of Endometrial Cancer by Activating β -Catenin. *Front Oncol*, 9, p. 211, 2019.

LIU, S.; LI, B.; XU, J.; HU, S. *et al.*. SOD1 Promotes Cell Proliferation and Metastasis in Non-small Cell Lung Cancer via an miR-409-3p/SOD1/SETDB1 Epigenetic Regulatory Feedforward Loop. *Front Cell Dev Biol*, 8, p. 213, 2020.

LIU, S.; SUN, Y.; JIANG, M.; LI, Y. *et al.*. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase promotes liver tumorigenesis by modulating phosphoglycerate dehydrogenase. *Hepatology*, 66, n. 2, p. 631-645, Aug 2017.

LIU, Y.; ZHANG, J.; CHEN, Y.; SOHEL, H. *et al.*. The correlation and role analysis of COL4A1 and COL4A2 in hepatocarcinogenesis. *Aging (Albany NY)*, 12, n. 1, p. 204-223, Jan 5 2020.

LLOVET, J. M.; BRU, C.; BRUIX, J. Prognosis of hepatocellular carcinoma: the BCLC staging classification. *Semin Liver Dis*, 19, n. 3, p. 329-338, 1999.

LLOVET, J. M.; BRUIX, J. Systematic review of randomized trials for unresectable hepatocellular carcinoma: Chemoembolization improves survival. *Hepatology*, 37, n. 2, p. 429-442, Feb 2003.

LLOVET, J. M.; RICCI, S.; MAZZAFERRO, V.; HILGARD, P. *et al.*. Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med*, 359, n. 4, p. 378-390, Jul 24 2008.

LLOVET, J. M.; SCHWARTZ, M.; MAZZAFERRO, V. Resection and liver transplantation for hepatocellular carcinoma. *Semin Liver Dis*, 25, n. 2, p. 181-200, 2005.

LO, C. M.; NGAN, H.; TSO, W. K.; LIU, C. L. *et al.*. Randomized controlled trial of transarterial lipiodol chemoembolization for unresectable hepatocellular carcinoma. *Hepatology*, 35, n. 5, p. 1164-1171, May 2002.

LOK, A. S.; SEEFF, L. B.; MORGAN, T. R.; DI BISCEGLIE, A. M. *et al.*. Incidence of hepatocellular carcinoma and associated risk factors in hepatitis C-related advanced liver disease. *Gastroenterology*, 136, n. 1, p. 138-148, Jan 2009.

LU, X. Y.; CHEN, D.; GU, X. Y.; DING, J. *et al.*. Predicting Value of ALCAM as a Target Gene of microRNA-483-5p in Patients with Early Recurrence in Hepatocellular Carcinoma. *Front Pharmacol*, 8, p. 973, 2018.

MAILEY, B.; ARTINYAN, A.; KHALILI, J.; DENITZ, J. *et al.*. Evaluation of absolute serum alpha-fetoprotein levels in liver transplant for hepatocellular cancer. *Arch Surg*, 146, n. 1, p. 26-33, Jan 2011.

MALINCHOC, M.; KAMATH, P. S.; GORDON, F. D.; PEINE, C. J. *et al.*. A model to predict poor survival in patients undergoing transjugular intrahepatic portosystemic shunts. *Hepatology*, 31, n. 4, p. 864-871, Apr 2000.

MARSH JW.; DVORCHIK I.; SUBOTIN M.; BALAN V. *et al.* The prediction of risk of recurrence and time to recurrence of hepatocellular carcinoma after orthotopic liver transplantation: a pilot study. *Hepatology*. 1997 Aug;26(2):444-50.

MARTINS, A. M. A.; GARCIA, J. H. P.; EBERLIN, M. N. Mass Spectrometry as a Clinical Integrative Tool to Evaluate Hepatocellular Carcinoma: Moving to the Mainstream. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol*, 13, n. 9, p. 821-825, Sep 2019.

MAZZAFERRO, V.; BHOORI, S.; SPOSITO, C.; BONGINI, M. *et al.*. Milan criteria in liver transplantation for hepatocellular carcinoma: an evidence-based analysis of 15 years of experience. *Liver Transpl*, 17 Suppl 2, p. S44-57, Oct 2011.

MAZZAFERRO, V.; LLOVET, J. M.; MICELI, R.; BHOORI, S. *et al.* Predicting survival after liver transplantation in patients with hepatocellular carcinoma beyond the Milan criteria: a retrospective, exploratory analysis. *Lancet Oncol*, 10, n. 1, p. 35-43, Jan 2009.

MAZZAFERRO, V.; REGALIA, E.; DOCI, R.; ANDREOLA, S. *et al.* Liver transplantation for the treatment of small hepatocellular carcinomas in patients with cirrhosis. *N Engl J Med*, 334, n. 11, p. 693-699, Mar 14 1996.

MITCHELL, D. G.; BRUIX, J.; SHERMAN, M.; SIRLIN, C. B. LI-RADS (Liver Imaging Reporting and Data System): summary, discussion, and consensus of the LI-RADS Management Working Group and future directions. *Hepatology*, 61, n. 3, p. 1056-1065, Mar 2015.

MITTAL, S.; SADA, Y. H.; EL-SERAG, H. B.; KANWAL, F. *et al.* Temporal trends of nonalcoholic fatty liver disease-related hepatocellular carcinoma in the veteran affairs population. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 13, n. 3, p. 594-601.e591, Mar 2015.

NAGAI, K.; URANBILEG, B.; CHEN, Z.; FUJIOKA, A. *et al.* Identification of novel biomarkers of hepatocellular carcinoma by high-definition mass spectrometry: Ultrahigh-performance liquid chromatography quadrupole time-of-flight mass spectrometry and desorption electrospray ionization mass spectrometry imaging. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 34 Suppl 1, n. Suppl 1, p. e8551, Apr 2020.

NAIR, R. R.; SOLWAY, J.; BOYD, D. D. Expression cloning identifies transgelin (SM22) as a novel repressor of 92-kDa type IV collagenase (MMP-9) expression. *J Biol Chem*, 281, n. 36, p. 26424-26436, Sep 8 2006.

NAKAI, W.; KONDO, Y.; SAITOH, A.; NAITO, T. *et al.* ARF1 and ARF4 regulate recycling endosomal morphology and retrograde transport from endosomes to the Golgi apparatus. *Mol Biol Cell*, 24, n. 16, p. 2570-2581, Aug 2013.

OUDA, S. M.; KHAIRY, A. M.; SOROUR, A. E.; MIKHAIL, M. N. Serum Beta-2 Microglobulin: a Possible Marker for Disease Progression in Egyptian Patients with Chronic HCV Related Liver Diseases. *Asian Pac J Cancer Prev*, 16, n. 17, p. 7825-7829, 2015.

PANKOV, R.; YAMADA, K. M. Fibronectin at a glance. *J Cell Sci*, 115, n. Pt 20, p. 3861-3863, Oct 15 2002.

PARKIN, J. D.; SAN ANTONIO, J. D.; PEDCHENKO, V.; HUDSON, B. *et al.* Mapping structural landmarks, ligand binding sites, and missense mutations to the collagen IV heterotrimers predicts major functional domains, novel interactions, and variation in phenotypes in inherited diseases affecting basement membranes. *Hum Mutat*, 32, n. 2, p. 127-143, Feb 2011.

PATTERSON, S. D.; AEBERSOLD, R. H. Proteomics: the first decade and beyond. *Nat Genet*, 33 Suppl, p. 311-323, Mar 2003.

QIN, X.; CHEN, Q.; SUN, C.; WANG, C. *et al.* High-throughput screening of tumor metastatic-related differential glycoprotein in hepatocellular carcinoma by iTRAQ combines lectin-related techniques. *Med Oncol*, 30, n. 1, p. 420, Mar 2013.

REID, M. A.; ALLEN, A. E.; LIU, S.; LIBERTI, M. V. *et al.* Serine synthesis through PHGDH coordinates nucleotide levels by maintaining central carbon metabolism. *Nat Commun*, 9, n. 1, p. 5442, Dec 21 2018.

ROBERTS, A. D.; ORDWAY, D. J.; ORME, I. M. *Listeria monocytogenes* infection in beta 2 microglobulin-deficient mice. *Infect Immun*, 61, n. 3, p. 1113-1116, Mar 1993.

ROS, M.; NGUYEN, A. T.; CHIA, J.; LE TRAN, S. *et al.* ER-resident oxidoreductases are glycosylated and trafficked to the cell surface to promote matrix degradation by tumour cells. *Nat Cell Biol*, 22, n. 11, p. 1371-1381, Nov 2020.

SAITO, T.; ICHIMURA, Y.; TAGUCHI, K.; SUZUKI, T. *et al.* p62/Sqstm1 promotes malignancy of HCV-positive hepatocellular carcinoma through Nrf2-dependent metabolic reprogramming. *Nat Commun*, 7, p. 12030, Jun 27 2016.

SAMANTA, D.; PARK, Y.; ANDRABI, S. A.; SHELTON, L. M. *et al.* PHGDH Expression Is Required for Mitochondrial Redox Homeostasis, Breast Cancer Stem Cell Maintenance, and Lung Metastasis. *Cancer Res*, 76, n. 15, p. 4430-4442, Aug 1 2016.

SAPISOCHIN, G.; BRUIX, J. Liver transplantation for hepatocellular carcinoma: outcomes and novel surgical approaches. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 14, n. 4, p. 203-217, Apr 2017.

SCICCHITANO M.S.; DALMAS D.A.; BOYCE R.W.; THOMAS H.C. *et al.*. Protein extraction of formalin-fixed, paraffin-embedded tissue enables robust proteomic profiles by mass spectrometry. *J Histochem Cytochem.* 2009 Sep;57(9):849-60. doi: 10.1369/jhc.2009.953497. Epub 2009 May 26. PMID: 19471015; PMCID: PMC2728129.

SCHUBERT, O. T.; RÖST, H. L.; COLLINS, B. C.; ROSENBERGER, G. *et al.*. Quantitative proteomics: challenges and opportunities in basic and applied research. *Nat Protoc*, 12, n. 7, p. 1289-1294, Jul 2017.

SHAH, T. R.; MISRA, A. 8 - Proteomics. *In: MISRA, A. (Ed.). Challenges in Delivery of Therapeutic Genomics and Proteomics.* London: Elsevier, 2011. p. 387-427.

SHRUTHI, B. S.; VINODHKUMAR, P.; SELVAMANI. Proteomics: A new perspective for cancer. *Adv Biomed Res*, 5, p. 67, 2016.

SILVA, M. A.; HEGAB, B.; HYDE, C.; GUO, B. *et al.*. Needle track seeding following biopsy of liver lesions in the diagnosis of hepatocellular cancer: a systematic review and meta-analysis. *Gut*, 57, n. 11, p. 1592-1596, Nov 2008.

SONG, J.; WANG, Q.; LUO, Y.; YUAN, P. *et al.* miR-34c-3p inhibits cell proliferation, migration and invasion of hepatocellular carcinoma by targeting MARCKS. *Int J Clin Exp Pathol*, 8, n. 10, p. 12728-12737, 2015.

SOTIROPOULOS, G. C.; MOLMENTI, E. P.; LOSCH, C.; BECKEBAUM, S. *et al.*. Meta-analysis of tumor recurrence after liver transplantation for hepatocellular carcinoma based on 1,198 cases. *Eur J Med Res*, 12, n. 10, p. 527-534, Oct 30 2007.

SUN, Y.; ZANG, Z.; XU, X.; ZHANG, Z. *et al.* Differential proteomics identification of HSP90 as potential serum biomarker in hepatocellular carcinoma by two-dimensional electrophoresis and mass spectrometry. *Int J Mol Sci*, 11, n. 4, p. 1423-1433, Mar 31 2010.

TAKETOMI, A.; SANEFUJI, K.; SOEJIMA, Y.; YOSHIKAWA, T. *et al.*. Impact of des-gamma-carboxy prothrombin and tumor size on the recurrence of hepatocellular carcinoma after living donor liver transplantation. *Transplantation*, 87, n. 4, p. 531-537, Feb 27 2009.

TAMURA, S.; KATO, T.; BERHO, M.; MISIAKOS, E. P. *et al.*. Impact of histological grade of hepatocellular carcinoma on the outcome of liver transplantation. *Arch Surg*, 136, n. 1, p. 25-30; discussion 31, Jan 2001.

TONG, J.; KRIEGER, J. R.; TAYLOR, P.; BAGSHAW, R. *et al.*. Cancer proteome and metabolite changes linked to SHMT2. *PLoS One*, 15, n. 9, p. e0237981, 2020.

TOSO, C.; MAZZAFERRO, V.; BRUIX, J.; FREEMAN, R. *et al.*. Toward a better liver graft allocation that accounts for candidates with and without hepatocellular carcinoma. *Am J Transplant*, 14, n. 10, p. 2221-2227, Oct 2014.

TOSO, C.; MEEBERG, G.; HERNANDEZ-ALEJANDRO, R.; DUFOUR, J. F. *et al.*. Total tumor volume and alpha-fetoprotein for selection of transplant candidates with hepatocellular carcinoma: A prospective validation. *Hepatology*, 62, n. 1, p. 158-165, Jul 2015.

TREVISANI, F.; D'INTINO, P. E.; MORSELLI-LABATE, A. M.; MAZZELLA, G. *et al.*. Serum alpha-fetoprotein for diagnosis of hepatocellular carcinoma in patients with chronic liver disease: influence of HBsAg and anti-HCV status. *J Hepatol*, 34, n. 4, p. 570-575, Apr 2001.

UKA K.; AIKATA H.; TAKAKI S.; SHIRAKAWA H. *et al.* Clinical features and prognosis of patients with extrahepatic metastases from hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol*. 2007 Jan 21;13(3):414-20.

VON FELDEN, J.; SCHULZE, K.; KRECH, T.; EWALD, F. *et al.*. Circulating tumor cells as liquid biomarker for high HCC recurrence risk after curative liver resection. *Oncotarget*, 8, n. 52, p. 89978-89987, Oct 27 2017.

WANG, J.; GARBUTT, C.; MA, H.; GAO, P. *et al.*. Expression and role of autophagy-associated p62 (SQSTM1) in multidrug resistant ovarian cancer. *Gynecol Oncol*, 150, n. 1, p. 143-150, Jul 2018.

WANG, Y.; LIU, S.; ZHANG, Y.; YANG, J. Myosin Heavy Chain 9: Oncogene or Tumor Suppressor Gene? *Med Sci Monit*, 25, p. 888-892, Jan 31 2019.

WATANABE, K.; SHIBUYA, S.; OZAWA, Y.; NOJIRI, H. *et al.*. Superoxide dismutase 1 loss disturbs intracellular redox signaling, resulting in global age-related pathological changes. *Biomed Res Int*, 2014, p. 140165, 2014.

WEI, L.; LEE, D.; LAW, C. T.; ZHANG, M. S. *et al.*. Genome-wide CRISPR/Cas9 library screening identified PHGDH as a critical driver for Sorafenib resistance in HCC. *Nat Commun*, 10, n. 1, p. 4681, Oct 15 2019.

WIESNER, R.; EDWARDS, E.; FREEMAN, R.; HARPER, A. *et al.*. Model for end-stage liver disease (MELD) and allocation of donor livers. *Gastroenterology*, 124, n. 1, p. 91-96, Jan 2003.

WONG, G. L.; CHAN, H. L.; MAK, C. W.; LEE, S. K. *et al.*. Entecavir treatment reduces hepatic events and deaths in chronic hepatitis B patients with liver cirrhosis. *Hepatology*, 58, n. 5, p. 1537-1547, Nov 2013.

WU, Q.; REN, X.; ZHANG, Y.; FU, X. *et al.*. MiR-221-3p targets ARF4 and inhibits the proliferation and migration of epithelial ovarian cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 497, n. 4, p. 1162-1170, Mar 18 2018.

XU, F.; SUDO, Y.; SANECHIKA, S.; YAMASHITA, J. *et al.*. Disturbed biopterin and folate metabolism in the Qdpr-deficient mouse. *FEBS Lett*, 588, n. 21, p. 3924-3931, Nov 3 2014.

YANG, G. Y.; ZHANG, A. Q.; WANG, J.; LI, C. H. *et al.*. Hepatoma-derived growth factor promotes growth and metastasis of hepatocellular carcinoma cells. *Cell Biochem Funct*, 34, n. 4, p. 274-285, Jun 2016.

YANG, J. D.; KIM, W. R.; COELHO, R.; METTLER, T. A. *et al.*. Cirrhosis is present in most patients with hepatitis B and hepatocellular carcinoma. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 9, n. 1, p. 64-70, Jan 2011.

YAO, F. Y. Expanded criteria for liver transplantation in patients with hepatocellular carcinoma. *Hepatol Res*, 37 Suppl 2, p. S267-274, Sep 2007.

YOSHIDA, K.; NAKAMURA, H.; OKUDA, Y.; ENOMOTO, H. *et al.*. Expression of hepatoma-derived growth factor in hepatocarcinogenesis. *J Gastroenterol Hepatol*, 18, n. 11, p. 1293-1301, Nov 2003.

YU, L.-R.; STEWART, N. A.; VEENSTRA, T. D. Chapter 8 - Proteomics: The Deciphering of the Functional Genome. *In: GINSBURG, G. S. e WILLARD, H. F. (Ed.). Essentials of Genomic and Personalized Medicine. San Diego: Academic Press, 2010. p. 89-96.*

ZHANG, J.; ZHOU, X.; CHANG, H.; HUANG, X. *et al.*. Hsp60 exerts a tumor suppressor function by inducing cell differentiation and inhibiting invasion in hepatocellular carcinoma. *Oncotarget*, 7, n. 42, p. 68976-68989, Oct 18 2016.

ZHANG, W.; PENG, P.; OU, X.; SHEN, K. *et al.*. Ovarian cancer circulating extracellular vesicles promote coagulation and have a potential in diagnosis: an iTRAQ based proteomic analysis. *BMC Cancer*, 19, n. 1, p. 1095, Nov 12 2019.

ZHAO, Z.; MA, J.; MAO, Y.; DONG, L. *et al.*. Silence of α 1-Antitrypsin Inhibits Migration and Proliferation of Triple Negative Breast Cancer Cells. *Med Sci Monit*, 24, p. 6851-6860, Sep 27 2018.

ZHENG, Y.; LIN, T. Y.; LEE, G.; PADDOCK, M. N. *et al.*. Mitochondrial One-Carbon Pathway Supports Cytosolic Folate Integrity in Cancer Cells. *Cell*, 175, n. 6, p. 1546-1560.e1517, Nov 29 2018.

ZHU, A. X.; PARK, J. O.; RYOO, B. Y.; YEN, C. J. *et al.*. Ramucirumab versus placebo as second-line treatment in patients with advanced hepatocellular carcinoma following first-line therapy with

sorafenib (REACH): a randomised, double-blind, multicentre, phase 3 trial. *Lancet Oncol*, 16, n. 7, p. 859-870, Jul 2015.

9.ANEXOS

9.1 Aprovação pelo comitê de ética HUWC

UFC - HOSPITAL
UNIVERSITÁRIO WALTER
CANTÍDIO DA UNIVERSIDADE



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Elaborado pela Instituição Coparticipante

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Proteômica dos Efetores da Recorrência do Hepatocarcinoma Celular após Transplante Hepático: estudo do perfil global de proteínas e das vias de sinalização de possíveis marcadores

Pesquisador: Walyson Silva Surimã

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 65223917.9.3001.5045

Instituição Proponente: UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.275.202

Apresentação do Projeto:

Projeto de mestrado. Departamento de cirurgia. Orientador: Dr Huygenes.

O carcinoma hepatocelular (CHC) é a quinta causa de câncer e a segunda causa de morte relacionada ao câncer entre homens adultos, no mundo. O transplante hepático é destinado aos pacientes com CHC precoces e não candidatos a hepatectomia. A recorrência pós-transplantes pode chegar até cerca de 25% em 5 anos. Vários fatores clínico-patológicos estão associados à recorrência de CHC após transplante. A associação dos fatores clínico-patológicos e o comportamento biológico do CHC ainda é pouco conhecida. Na tentativa de identificar novos biomarcadores, as técnicas baseadas em estudos utilizando proteômica tem se mostrado úteis e versáteis plataformas analíticas. Tendo em vista o mal prognóstico e taxas significativas de recorrência do CHC, mesmo após transplante hepático, é de suma importância tentar identificar um perfil de efetores moleculares e correlacionar com sobrevida e recorrência, sendo talvez, no futuro, uma importante ferramenta na seleção de pacientes para terapias adjuvantes. Hipótese: Existe diferença de perfil proteico global entre CHC de pacientes que recorrem e os que não recorrem após transplante hepático. Metodologia: Serão realizados estudos com um acervo de 300 peças histológicas coletados 100 correspondem aos tecido de carcinomas hepatocelulares explantados, 100 correspondem ao tecido não tumoral de explantes e 100 de pacientes doadores

Endereço: Rua Capitão Francisco Pedro, nº 1290

Bairro: RodolfoTeófilo

CEP: 60.430-370

UF: CE

Município: FORTALEZA

Telefone: (85)3366-8613

Fax: (85)3281-4961

E-mail: cephuwc@huwc.ufc.br

UFC - HOSPITAL
UNIVERSITÁRIO WALTER
CANTÍDIO DA UNIVERSIDADE



Continuação do Parecer: 2.275.202

(não-patológicos, grupo controle). O acervo contempla peças entre 2006 e 2015 do Centro de Transplante de Fígado do Hospital Universitário Walter Cantídeo (HUWC/UFC) e Hospital São Carlos (HSC) em Fortaleza/Ceará que serão submetidos ao preparo de amostras para análise proteômica por espectrometria de massas.

As amostras serão coletadas no arquivo histopatológico do Departamento de Patologia da Universidade Federal do Ceará (UFC) e do Laboratório PATHUS. Orçamento: R\$ 5.500,00

Cronograma: Jan/2017 a Abril/2018.

Objetivo da Pesquisa:

OBJETIVO PRINCIPAL

Realizar análise proteômica de pacientes com carcinoma hepatocelular transplantados e obter um perfil molecular global de efetores associados à recorrência do CHC após transplante de fígado realizado no HUWC e HSC de 2006 a 2015.

OBJETIVO SECUNDÁRIO:

Correlacionar dados da curva de sobrevida com perfil molecular encontrado.

Analisar conjuntamente as alterações clínico-patológicas com perfil global dos principais efetores (marcadores) encontrados no experimento.

Descrever as vias de sinalização dos possíveis marcadores encontrados no experimento

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Não foram descritos riscos e benefícios no corpo do projeto.

Nas informações básicas do projeto o pesquisador cita:

"Riscos: Não se aplica"

"Benefícios: Determinar perfil proteômico através de espectrometria de massa relacionado a recorrência e, no futuro, determinar grupos prognósticos para escolha de terapias adjuvantes"

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Pesquisa exequível

Endereço: Rua Capitão Francisco Pedro, nº 1290

Bairro: RodolfoTeófilo

CEP: 60.430-370

UF: CE

Município: FORTALEZA

Telefone: (85)3366-8613

Fax: (85)3281-4961

E-mail: cephuwc@huwc.ufc.br

UFC - HOSPITAL
UNIVERSITÁRIO WALTER
CANTÍDIO DA UNIVERSIDADE



Continuação do Parecer: 2.275.202

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

O pesquisador apresentou: termo de dispensa do TCLE; termo de compromisso de utilização de prontuários; Carta de anuência do chefe do serviço; Autorização do chefe do laboratório de proteômica da Unifor e do chefe do laboratório Pathus; declaração de concordância dos pesquisadores; Fiel depositário; Autorização do serviço de patologia; cronograma e orçamento.

Recomendações:

Sem recomendações

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

PARA DISCUTIR NA REUNIÃO CEP: APROVAR, MAS PEDIR P PESQUISADOR ESCREVER RISCOS E BENEFÍCIOS DO PROJETO

Considerações Finais a critério do CEP:

Pesquisa exequível. Pesquisador deverá apresentar relatório ao término da pesquisa.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_P ROJETO_861081.pdf	06/04/2017 10:40:44		Aceito
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_P ROJETO_861081.pdf	02/03/2017 10:41:43		Aceito
Outros	CV_DrWalyson_atual.pdf	02/03/2017 10:29:48	Walyson Silva Surimã	Aceito
Outros	09_Fiel_depositario.pdf	02/03/2017 10:29:15	Walyson Silva Surimã	Aceito
Declaração de Pesquisadores	07_Declaracao_de_concordancia.pdf	02/03/2017 10:28:55	Walyson Silva Surimã	Aceito
Outros	05_Autorizacao_tx.pdf	02/03/2017 10:28:45	Walyson Silva Surimã	Aceito
Outros	05_Autorizacao_patologia.pdf	02/03/2017 10:28:22	Walyson Silva Surimã	Aceito
Outros	05_Autorizacao_drajosenilia.pdf	02/03/2017 10:28:01	Walyson Silva Surimã	Aceito
Cronograma	08_CRONOGRAMA.pdf	02/03/2017 10:27:37	Walyson Silva Surimã	Aceito
Orçamento	04_ORCAMENTO.pdf	02/03/2017 10:27:13	Walyson Silva Surimã	Aceito
Outros	_CARTA_APRECIACAO_CEP_UFC_M ODELO.pdf	02/03/2017 10:25:48	Walyson Silva Surimã	Aceito
Projeto Detalhado	02_PROJETO_DE_MESTRADO_proteo	02/03/2017	Walyson Silva	Aceito

Endereço: Rua Capitão Francisco Pedro, nº 1290
Bairro: RodolfoTeófilo **CEP:** 60.430-370
UF: CE **Município:** FORTALEZA
Telefone: (85)3366-8613 **Fax:** (85)3281-4961 **E-mail:** cephuwc@huwc.ufc.br

**UFC - HOSPITAL
UNIVERSITÁRIO WALTER
CANTÍDIO DA UNIVERSIDADE**



Continuação do Parecer: 2.275.202

/ Brochura Investigador	mica_corrigeo.docx	10:24:55	Surimã	Aceito
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_861081.pdf	23/02/2017 12:49:38		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	03_Declaracao_dispensa_tcle.pdf	23/02/2017 12:47:28	Walyson Silva Surimã	Aceito
Outros	11_Carta_de_anuencia.pdf	23/02/2017 12:33:14	Walyson Silva Surimã	Aceito
Declaração de Pesquisadores	10_TERMO_DE_COMPROMISSO2.pdf	23/02/2017 12:32:45	Walyson Silva Surimã	Aceito
Declaração de Pesquisadores	10_TERMO_DE_COMPROMISSO1.pdf	23/02/2017 12:32:35	Walyson Silva Surimã	Aceito
Outros	06_CV_DRHUYGENS.pdf	23/02/2017 12:31:23	Walyson Silva Surimã	Aceito
Outros	06_CV_DRALINE.pdf	23/02/2017 12:31:02	Walyson Silva Surimã	Aceito
Outros	06_CV_DRWALYSON.pdf	23/02/2017 12:30:47	Walyson Silva Surimã	Aceito
Outros	05_Declaracao_de_autorizacao_unifor.pdf	23/02/2017 12:29:07	Walyson Silva Surimã	Aceito
Outros	05_Autorizacao_local_pathus.pdf	23/02/2017 12:28:19	Walyson Silva Surimã	Aceito
Folha de Rosto	01_Folha_de_rosto_drwalyson.pdf	23/02/2017 12:27:11	Walyson Silva Surimã	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

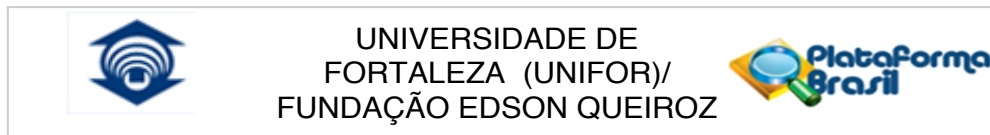
Não

FORTALEZA, 14 de Setembro de 2017

Assinado por:
Maria de Fatima de Souza
(Coordenador)

Endereço: Rua Capitão Francisco Pedro, nº 1290
Bairro: RodolfoTeófilo **CEP:** 60.430-370
UF: CE **Município:** FORTALEZA
Telefone: (85)3366-8613 **Fax:** (85)3281-4961 **E-mail:** cephuwc@huwc.ufc.br

9.2 Aprovação pelo comitê de ética UNIFOR



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Elaborado pela Instituição Coparticipante

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Proteômica dos Efeitos da Recorrência do Hepatocarcinoma Celular após Transplante Hepático: estudo do perfil global de proteínas e das vias de sinalização de possíveis marcadores

Pesquisador: Walyson Silva Surimã

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 65223917.9.3002.5052

Instituição Proponente: UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

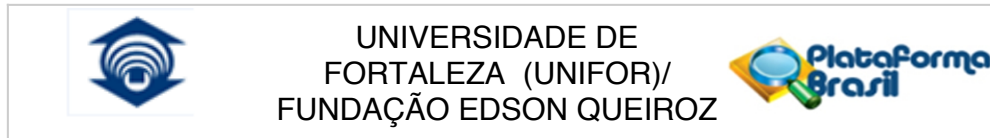
DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.033.051

Apresentação do Projeto:

Introducao: O carcinoma hepatocelular (CHC) e a quinta causa de cancer e a segunda causa de morte relacionada ao cancer entre homens adultos, no mundo. As taxas de incidencia do CHC vem aumentando em muitas partes do mundo. Dentre os principais fatores de risco para desenvolvimento do CHC estao a infeccao pelo virus da hepatite B , hepatite cronica pelo virus da hepatite C , hemocromatose hereditaria e cirroses. O tratamento do CHC e determinado pela extensao da carga tumoral e da severidade da doenca hepatica. O transplante hepatico e destinado aos pacientes com CHC precoces e nao candidatos a hepatectomia. A sobrevida dos pacientes transplantados pelos Critérios de Milao sao de 84 % em 1 ano e 70% em 5 anos. A recorrencia pos-transplantes pode chegar ate cerca de 25% em 5 anos. Varios fatores clinico-patologicos estao associados a recorrencia de CHC apos transplante. A associacao dos fatores clinico-patologicos e o comportamento biologico do CHC ainda e pouco conhecida. Na tentativa de identificar novos biomarcadores, as tecnicas baseadas em estudos utilizando proteomica tem se mostrado uteis e versateis plataformas analiticas. Tendo em vista o mal prognostico e taxas significativas de recorrencia do CHC, mesmo apos transplante hepatico, e de suma importancia tentar identificar um perfil de efetores moleculares e correlacionar com sobrevida e recorrencia , sendo talvez, no futuro, uma importante ferramenta na selecao de pacientes para terapias adjuvantes. Hipotese:

Endereço: Av. Washington Soares 1321 Bloco da Reitoria
Bairro: sala da VRPPG - Edson Queiroz **CEP:** 60.811-905
UF: CE **Município:** FORTALEZA
Telefone: (85)3477-3122 **Fax:** (85)3477-3056 **E-mail:** coetica@unifor.br



Continuação do Parecer: 2.033.051

Básicas do Projeto	ETO_861081.pdf	12:49:38		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	03_Declaracao_dispensa_tcle.pdf	23/02/2017 12:47:28	Walyson Silva Surimã	Aceito
Outros	11_Carta_de_anuencia.pdf	23/02/2017 12:33:14	Walyson Silva Surimã	Aceito
Declaração de Pesquisadores	10_TERMO_DE_COMPROMISSO2.pdf	23/02/2017 12:32:45	Walyson Silva Surimã	Aceito
Declaração de Pesquisadores	10_TERMO_DE_COMPROMISSO1.pdf	23/02/2017 12:32:35	Walyson Silva Surimã	Aceito
Outros	06_CV_DRHUYGENS.pdf	23/02/2017 12:31:23	Walyson Silva Surimã	Aceito
Outros	06_CV_DRALINE.pdf	23/02/2017 12:31:02	Walyson Silva Surimã	Aceito
Outros	06_CV_DRWALYSON.pdf	23/02/2017 12:30:47	Walyson Silva Surimã	Aceito
Outros	05_Declaracao_de_autorizacao_unifor.pdf	23/02/2017 12:29:07	Walyson Silva Surimã	Aceito
Outros	05_Autorizacao_local_pathus.pdf	23/02/2017 12:28:19	Walyson Silva Surimã	Aceito
Folha de Rosto	01_Folha_de_rosto_drwalyson.pdf	23/02/2017 12:27:11	Walyson Silva Surimã	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

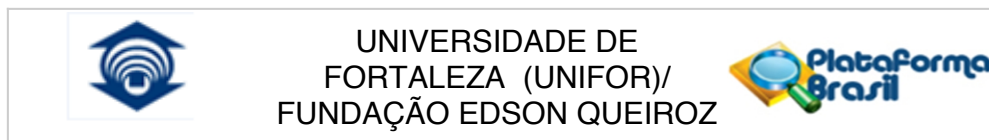
Necessita Apreciação da CONEP:

Não

FORTALEZA, 26 de Abril de 2017

Assinado por:
ALDO ANGELIM DIAS
(Coordenador)

Endereço: Av. Washington Soares 1321 Bloco da Reitoria
Bairro: sala da VRPPG - Edson Queiroz **CEP:** 60.811-905
UF: CE **Município:** FORTALEZA
Telefone: (85)3477-3122 **Fax:** (85)3477-3056 **E-mail:** coetica@unifor.br



Continuação do Parecer: 2.033.051

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os termos de apresentação obrigatória foram incluídos.

Recomendações:

Após a leitura da versão apresentada, não há recomendações ao pesquisador sobre o projeto de pesquisa analisado.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

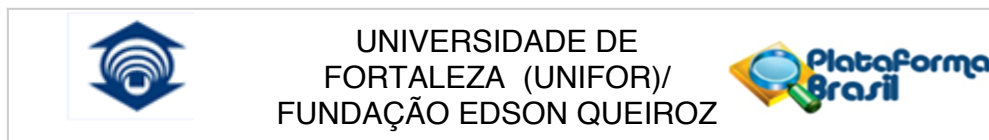
Recomendo Aprovação ao projeto de pesquisa visto atender, na íntegra, às determinações da Res. CNS/MS 466/12 e diretrizes.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_861081.pdf	06/04/2017 10:40:44		Aceito
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_861081.pdf	02/03/2017 10:41:43		Aceito
Outros	CV_DrWalyson_atual.pdf	02/03/2017 10:29:48	Walyson Silva Surimã	Aceito
Outros	09_Fiel_depositario.pdf	02/03/2017 10:29:15	Walyson Silva Surimã	Aceito
Declaração de Pesquisadores	07_Declaracao_de_concordancia.pdf	02/03/2017 10:28:55	Walyson Silva Surimã	Aceito
Outros	05_Autorizacao_tx.pdf	02/03/2017 10:28:45	Walyson Silva Surimã	Aceito
Outros	05_Autorizacao_patologia.pdf	02/03/2017 10:28:22	Walyson Silva Surimã	Aceito
Outros	05_Autorizacao_drajosenilia.pdf	02/03/2017 10:28:01	Walyson Silva Surimã	Aceito
Cronograma	08_CRONOGRAMA.pdf	02/03/2017 10:27:37	Walyson Silva Surimã	Aceito
Orçamento	04_ORCAMENTO.pdf	02/03/2017 10:27:13	Walyson Silva Surimã	Aceito
Outros	_CARTA_APRECIACAO_CEP_UFC_MODELO.pdf	02/03/2017 10:25:48	Walyson Silva Surimã	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	02_PROJETO_DE_MESTRADO_proteomica_corrigido.docx	02/03/2017 10:24:55	Walyson Silva Surimã	Aceito
Informações	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_P	23/02/2017		Aceito

Endereço: Av. Washington Soares 1321 Bloco da Reitoria
Bairro: sala da VRPPG - Edson Queiroz **CEP:** 60.811-905
UF: CE **Município:** FORTALEZA
Telefone: (85)3477-3122 **Fax:** (85)3477-3056 **E-mail:** coetica@unifor.br



Continuação do Parecer: 2.033.051

Existe diferença de perfil proteico global entre CHC de pacientes que recorrem e os que não recorrem após transplante hepático. Objetivos: Realizar análise proteômica de pacientes com carcinoma hepatocelular transplantados e obter um perfil molecular global de efetores associados a recorrência do CHC após transplante de fígado realizado no HUWC e HSC de 2006 a 2015. Material e métodos: Serão realizados estudos com um acervo de 300 peças histológicas coletadas de 100 pacientes transplantados e de 100 doadores entre 2006 e 2015 no Centro de Transplante de Fígado do Hospital Universitário Walter Cantídio (HUWC/UFC) e Hospital São Carlos (HSC) em Fortaleza/Ceará que serão submetidos ao preparo de amostras para análise proteômica por espectrometria de massas (Synapt HDMS- nanoESI-Qq-oeTOF) (Waters, Manchester, RU), análise de dados (ProteinLynxGlobalServer v.2.4 (PLGS) e processamento estatístico (SPSS 12.0 (SPSS, Chicago, IL) e MetaboAnalyst)..

Objetivo da Pesquisa:

Realizar análise proteômica de pacientes com carcinoma hepatocelular transplantados e obter um perfil molecular global de efetores associados a recorrência do CHC após transplante de fígado realizado no HUWC e HSC de 2006 a 2015.

Objetivo Secundário:

Correlacionar dados da curva de sobrevivência com perfil molecular encontrado. Analisar conjuntamente as alterações clínico-patológicas com perfil global dos principais efetores (marcadores) encontrados no experimento. Descrever as vias de sinalização dos possíveis marcadores encontrados no experimento.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Segundo o autor do projeto de pesquisa, a pesquisa não apresenta riscos.

Benefícios:

Coleta de amostra de

Determinar perfil proteômico através de espectrometria de massa relacionado a recorrência e, no futuro, determinar grupos prognósticos para escolha de terapias adjuvantes.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Pesquisa de relevância que busca realizar análise proteômica de pacientes com carcinoma hepatocelular transplantados e obter um perfil molecular global de efetores associados a recorrência desse tipo de câncer após transplante de fígado realizado no HUWC e HSC de 2006 a 2015.

Endereço: Av. Washington Soares 1321 Bloco da Reitoria
Bairro: sala da VRPPG - Edson Queiroz **CEP:** 60.811-905
UF: CE **Município:** FORTALEZA
Telefone: (85)3477-3122 **Fax:** (85)3477-3056 **E-mail:** coetica@unifor.br

