



**Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto  
Programa de Pós-graduação em Ciências da  
Saúde**

---

**ANDRÉ RODRIGUEIRO C P DE OLIVEIRA**

**Expressão e regulação do gene *VEGFA* por  
microRNAs em cirrose hepática e carcinoma  
hepatocelular**

**São José do Rio Preto  
2015**

ANDRÉ RODRIGUEIRO C P DE OLIVEIRA

Expressão e regulação do gene *VEGFA* por  
microRNAs em cirrose hepática e carcinoma  
hepatocelular

Tese apresentada à Faculdade de  
Medicina de São José do Rio Preto para  
obtenção do Título de Doutor no Curso  
de Pós-Graduação em Ciências da  
Saúde, Eixo Temático: Medicina e  
Ciências Correlatas.

Orientador: Prof. Dr. Renato Ferreira da Silva  
Coorientadora: Profa. Dra. Eny M. Goloni Bertollo

São José do Rio Preto  
2015

Oliveira, André Rodrigues Clavio Pereira  
Expressão e Regulação do gene *VEGFA* por microRNAs  
em cirrose hepática e carcinoma hepatocelular  
São José do Rio Preto, 2015  
84p

Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina de São José do  
Rio Preto – FAMERP  
Eixo Temático: Medicina e Ciências Correlatas

Orientador: Prof. Dr. Renato Ferreira da Silva  
Coorientadora: Profa. Dra. Eny M. Goloni Bertollo

1. Câncer de Fígado; 2. Doença do Fígado; 3. Expressão  
gênica; 4. MicroRNAs

ANDRÉ RODRIGUEIRO C P DE OLIVEIRA

Expressão e regulação do gene *VEGFA* por  
microRNAs em cirrose hepática e carcinoma  
hepatocelular

BANCA EXAMINADORA  
TESE PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE  
DOUTOR

Presidente e Orientador: Prof. Dr. Renato Ferreira da  
Silva

2º Examinador: Profa. Dra. Érika Cristina Pavarino

3º Examinador: Prof. Dr. William José Duca

4º Examinador: Prof. Dr. Luiz Augusto C. D'Albuquerque

5º Examinador: Prof. Dr. Marcelo Maia Caixeta de Melo

São José do Rio Preto, 27/11/2015.

---

## SUMÁRIO

DEDICATÓRIA.....	i
AGRADECIMENTOS.....	iii
LISTA DE FIGURAS.....	vii
LISTA DE TABELAS E QUADROS.....	ix
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	x
RESUMO.....	xiv
ABSTRACT.....	xvi
1. INTRODUÇÃO.....	2
1.1. OBJETIVOS.....	9
2. CASUÍSTICA E MÉTODOS.....	11
2.1. Predição computacional de miRNAs.....	11
2.2. Amostras.....	11
2.3. Extração de RNA total e Proteínas.....	12
2.4. Obtenção de DNA complementar (cDNA).....	12
2.5. Expressão do gene <i>VEGFA</i> e miRNAs.....	13
2.6. Quantificação de proteína <i>VEGFA</i> .....	13
2.7. Análise Estatística.....	14
3. ARTIGOS CIENTÍFICOS.....	16
3.1. ARTIGO 1: MicroRNAs related to proliferation, migration, angiogenesis and biomarkers of hepatocellular carcinoma.....	17

---

3.2. ARTIGO 2: Expressão elevada do miRNA hsa-miR-637, regulador do gene <i>VEGFA</i> , em cirrose hepática .....	34
3.3. ARTIGO 3: Expressão diferencial do gene <i>VEGFA</i> e miRNAs em carcinoma hepatocelular .....	49
4. CONCLUSÕES.....	71
5. REFERÊNCIAS .....	73
ANEXOS .....	79
ANEXO I – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO .....	79
ANEXO II – DOCUMENTO DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA .....	82
ANEXO III – QUESTIONÁRIO SOBRE DADOS SÓCIODEMOGRÁFICOS E SOBRE AS DOENÇAS .....	83

## **DEDICATÓRIA**

### **Aos meus pais Helio e Elsa**

Pelo incentivo, pela educação que me foi dada. Eu não seria nada sem vocês, obrigado por estarem sempre presentes. Obrigado por acreditarem e confiarem sempre. Eu os amo muito.

### **À minha irmã Juliana**

Obrigado por sempre acreditar e confiar, por estar sempre presente. Eu a amo muito.

### **Aos meus primos, em especial Aline, Melina e Samira**

Obrigado por estarem presentes nos momentos importantes e pelos conselhos. Amo vocês.

### **À minha tia Márcia Oliveira**

Obrigado por todo apoio, por confiar e acreditar que eu conseguiria. Obrigado por estar sempre presente. Eu a amo muito.

### **Aos meus tios e tias**

Obrigado pelo apoio e respaldo, família é a base de tudo. Amo vocês.

### **À minha avó Nair**

Obrigado por sempre me apoiar, obrigado por sempre me amar e por todo o carinho. Tenho certeza que enquanto a tinha por aqui, sempre fui

motivo de orgulho. É o exemplo de que não devemos desistir nunca. Eu a amo muito.

**Ao meu avô Honório**

Mesmo não o tendo conhecido, tenho certeza que foi parte crucial da educação que tenho hoje. Muito obrigado. Eu o amo.

**Aos meus avós Maria e Amadeu**

Obrigado por confiarem em mim, mesmo não entendendo muito bem todo o processo. Amo vocês.

## **AGRADECIMENTOS**

### **Ao Prof. Dr. Renato Ferreira da Silva**

Obrigado pela orientação, confiança, paciência, por transmitir os conhecimentos e por permitir que eu concretizasse este sonho.

### **À Profa. Dra. Eny Maria Goloni Bertollo**

Obrigado por aceitar a co-orientação, por todo o conhecimento transmitido, pela paciência e por auxiliar em todo o processo.

### **À Profa. Dra. Érika Cristina Pavarino**

Obrigado pelo conhecimento transmitido, pela paciência e por auxiliar em todo o processo.

### **À Profa. Dra. Elaine Sbroggio de Oliveira Rodini**

Obrigado por ter me orientado na graduação e transmitido todo o conhecimento que foi necessário para ingressar no doutorado direto.

### **À Profa. Dra. Márcia Maria Urbanin Castanhole-Nunes**

Obrigado pela paciência, pela colaboração no projeto, por sempre estar presente e todo o apoio.

### **À Profa. Dra. Patrícia Matos Biselli Chicote**

Obrigado por auxiliar em todo o processo, pelas dúvidas sanadas, por tornar o ambiente de trabalho sempre mais agradável.

**Ao Leonardo Prado Stuchi**

Obrigado por ajudar nas coletas e por participar do processo e pela amizade.

**À Camila Agren**

Obrigado por ajudar nas coletas, por participar do processo e pela amizade.

**Aos amigos Anelise, Ana Livia, Cláudia, Stéphanie, Gláucia, e todos os outros amigos do Bloco U6**

Obrigado por estarem presentes, pelas conversas agradáveis e por tornarem o ambiente de trabalho agradável.

**Aos funcionários do laboratório Dani, Carol e Lennon**

Obrigado pelo apoio técnico.

**Aos médicos e outros profissionais do Hospital de Base e ao Grupo de Estudos de Tumores do Fígado (GETF)**

Obrigado pela colaboração nas coletas e contribuições no estudo.

**Aos meus amigos de São José do Rio Preto, Sônia, Márcia, Jaqueline, Rafael, Cristiano, Flávia, Iara, Jessika e Miramaya**

Obrigado por tornar a vida na cidade nova mais agradável e por participarem das minhas conquistas, sem vocês teria sido mais difícil.

**Aos meus amigos de Bauru, Fernanda, Simony, Daiana, Isabel, ao  
nosso grupo de amigos e todos os outros amigos**

Obrigado por terem participado da minha vida, obrigado pelos conselhos, por todo o tempo que passamos juntos, por acreditarem e sempre confiarem em mim.

**Ao meu amigo Paulo Carducci que não está mais presente**

Obrigado por ter confiado e acreditado. Por ter me ajudado quando precisei. Você foi muito importante no tempo que estive em Bauru procurando me encontrar.

**A todos os professores**

Obrigado por todo o conhecimento transmitido. Não teria sido possível chegar até aqui sem o empenho de todos.

**Ao Hospital de Base, à FAMERP e à UPGEM**

Obrigado por fornecer a estrutura e apoio funcional para o desenvolvimento do projeto.

**Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da  
FAMERP**

Obrigado pela oportunidade oferecida.

**Às agências de amparo à pesquisa CAPES e FAPESP**

Obrigado pela oportunidade de fornecer a bolsa de doutorado e por financiar o meu projeto.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Imagem do ranking de miRNAs preditos para serem reguladores do gene VEGFA.....	11
--	----

### Artigo 1

Fig.1. MicroRNA biogenesis and RNA-induced gene silencing.....	33
--	----

### Artigo 2

Figura 1. Distribuição das amostras e quantificação relativa em ordem crescente. Valores abaixo de 1 mostram amostras com expressão diminuída, enquanto que valores acima de 1 mostram expressão aumentada do gene VEGFA.....	44
---	----

Figura 2. Gráfico com os valores de expressão do miRNAs em ordem crescente (escala logarítmica).....	46
--	----

Figura 3. Gráfico mostrando os valores de quantificação de proteínas em ordem crescente no tecido cirrótico.....	47
--	----

Figura 4. Gráfico mostrando os valores da quantificação de proteínas por ELISA em tecido controle (Ordem crescente).....	48
--	----

### Artigo 3

Figura 1. Organização das amostras e quantificação relativa em ordem crescente (Valor de referência: 1), onde as amostras acima de	
--	--

um mostraram expressão elevada e valores abaixo de um	
mostraram expressão diminuída.....	68
Figura 2. Gráfico da expressão dos miRNAs.....	69

## LISTA DE TABELAS E QUADROS

### **Artigo 1**

Table 1. The miRNAs related to proliferation, metastasis, angiogenesis, tumorigenesis and target genes in HCC.....	31
Table 2. The miRNAs found in circulation on organism blood vessels and their high or low serum level tumor biomarkers.....	32

### **Artigo 2**

Tabela 1. Lista de miRNAs e valores obtidos.....	45
--	----

### **Artigo 3**

Tabela 1. Idades dos pacientes, tipo de tumor coletado (resultado da análise anatomicopatológica), grau de Edmondson-Steiner, sorologia para Hepatites, presença ou ausência de Cirrose Hepática, tamanho do tumor e quantificação relativa (RQ).....	66
Tabela 2. MicroRNAs e os valores obtidos.....	67

### LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

$\mu\text{g}/\mu\text{L}$	Micrograma por microlitro
3'UTR	Região três linhas não traduzida
<i>API-5</i>	Gene inibidor de apoptose 5
BCLC	<i>Barcelona Clinic Liver Cancer</i>
<i>Beta-catenin</i>	Gene Beta-Catenina
bFGF	Fator de crescimento de fibroblastos básico
CAAE	Certificado de apresentação para apreciação ética
CAPES	Coordenação de aperfeiçoamento pessoal de nível superior
CCNE1	Proteína ciclina E1
<i>CCNE1</i>	Gene ciclina E1
CDC42	Proteína de ciclo de divisão celular 42
<i>CDC42</i>	Gene do ciclo de divisão celular 42
CDKN1B	Proteína inibidora de quinase dependente de ciclina 1B
<i>CDKN1B</i>	Gene inibidor de quinase dependente de ciclina 1B
cDNA	DNA complementar
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CH	Cirrose hepática
CHC	Carcinoma hepatocelular
CLL	Leucemia Linfocítica Crônica
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
Ct	Limite de ciclo
<i>ELISA</i>	Ensaio Imunoenzimático
<i>ET-1</i>	Endotelina 1

FAM	Corante amidita de fluoresceína
FAMERP	Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto
FAPESP	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
FUNFARME	Fundação Faculdade Regional de Medicina
G1	Primeiro <i>gap</i> (divisão celular)
<i>GAPDH</i>	Gene Desidrogenase gliceraldeído-3-fosfato
GETF	Grupo de Estudo de Tumores do Fígado
GPC3	Proteína glipicana 3
<i>GPC3</i>	Gene glipicano 3
HBV	Vírus da Hepatite B
HCC	<i>Hepatocellular carcinoma</i>
HCV	Vírus da Hepatite C
<i>HPRT1</i>	Gene hipoxantina fosforibosiltransferase 1
hsa	<i>Homo sapiens</i>
hsa-miR	MicroRNA da espécie <i>Homo sapiens</i>
<i>IGF</i>	Gene fator de crescimento semelhante à insulina
IGF1R	Receptor de fator de crescimento semelhante à insulina
IGF-II	Fator de crescimento semelhante à insulina 2
<i>IGF-II</i>	Gene fator de crescimento semelhante à insulina 2
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
IRS2	Substrato receptor da insulina 2
<i>MAPK/ERK</i>	Via de sinalização de proteínas quinases ativadas por mitógeno
MAT1A	Metionina adenosiltransferase 1 alpha

<i>MCC</i>	Gene com mutação em câncer colorretal
MELD	Modelo para doença terminal do fígado
MGB	Tipo de ligante de sonda
miR	microRNA
miRBase	Base de dados de microRNAs
mirDIP	Base de dados de microRNAs
miRNAs	microRNAs
miRs	microRNAs
MMP11	Metalopeptidase da matriz 11
<i>MMP-2</i>	Gene metalopeptidase da matriz 2
<i>MMP-3</i>	Gene metalopeptidase da matriz 3
mRNA	RNA mensageiro
MTSS1	Proteína supressora de metástase
<i>MTSS1</i>	Gene supressor de metástase
<i>NRP-2</i>	Gene Neuropilina 2
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
<i>PI3K</i>	Gene fosfoinositida 3 quinase
<i>PI3K/AKT</i>	Via de sinalização fosfoinositida 3 quinase
<i>PIGF;</i> <i>SUV39H1</i>	Gene Biossíntese de Fosfatidil Inositol Classe F
RAN-GTP	Proteína RAN GTPase
RISC	Complexo de silenciamento induzido por RNA
RNA	Ácido Ribonucléico
RNase III	Enzima polimerase de RNA

RNU44	RNA nucleico U44
RNU48	RNA nucleico U48
<i>RPLPO</i>	Gene proteína grande ribossomal
RQ	Quantificação Relativa
RT-qPCR	Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativa em Tempo Real
<i>STAT3</i>	Gene Estatina 3
stRNA	<i>Small temporal RNA</i>
TBP	Proteína de ligação TATA
<i>TGFβ</i>	Gene fator de crescimento de transformação beta
TGFβ	Proteína Fator de crescimento de transformação beta
TLE1	Proteína Intensificadora de divisão tipo transducina
<i>TLE1</i>	Gene Intensificador de divisão tipo transducina
TNFα	Proteína fator de necrose tumoral alfa
<i>TNRC6B</i>	Gene repetição de conteúdo de trinucleotídeo 6B
U6	RNA nucleico U6
<i>uPA</i>	Gene ativador de plasminogênio de uroquinase
UPGEM	Unidade de Pesquisa em Genética e Biologia Molecular
VAV2	Proto-oncogene de fator de troca de guanina 2
<i>VEGFA</i>	Fator de Crescimento Endotelial Vascular A
<i>WNT</i>	Via de sinalização tipo sem asas (homólogo de <i>Drosophila melanogaster</i> )

**RESUMO**

**Introdução:** O Carcinoma hepatocelular (CHC) é o tipo de tumor primário do fígado e o quinto tipo de câncer mais comum. A cirrose hepática (CH) e as hepatites virais são seus principais fatores de risco. Tecidos lesionados e em processo de crescimento necessitam de novos vasos sanguíneos, ou seja, processo angiogênico, que é iniciado por meio da secreção de fatores de crescimento endoteliais vasculares. Este é produzido a partir do gene *VEGFA* e regulado por RNA não codificante, o microRNA, que é constituído por uma fita simples de aproximadamente 22 nucleotídeos e tem a função de ligação ao mRNA, para inibição da tradução de proteínas. **Objetivos:** Quantificar a expressão do gene *VEGFA* e 17 miRNAs preditos como seus reguladores em CHC e cirrose hepática; avaliar a expressão do gene *VEGFA* em relação à expressão dos miRNAs e quantificar a expressão das proteínas *VEGFA* em CHC e cirrose hepática. **Casuística e métodos:** Foram coletadas 16 amostras de tecido de CHC, 23 amostras de tecido cirrose hepática e 12 amostras de tecido hepático normal para controle. A extração de RNA e proteínas totais foi realizada por meio do kit *mirVana PARIS*. A quantificação do mRNA do gene *VEGFA* e dos 17 miRNAs selecionados preditos como reguladores do gene foi realizada por meio da técnica de PCR quantitativa em tempo real. Para os miRNAs foram utilizadas placas customizadas *TaqMan miRNA custom plates*. A análise estatística foi realizada por teste t de uma amostra, teste de Wilcoxon e teste de Mann-Whitney. **Resultados:** O gene *VEGFA* foi encontrado em expressão diminuída em CHC e há correlação negativa entre a expressão e a extensão do tumor. O miRNA hsa-miR-637 mostrou significância e sua expressão foi encontrada diminuída nas amostras (média=0,2003, p=0,0004) em CH,

---

enquanto que os miRNAs hsa-miR-15b (mediana 0,04015;  $p=0,0005$ ), hsa-miR-125b (mediana 0,01876;  $p=0,0005$ ), hsa-miR-423 (mediana 0,02650;  $p=0,0005$ ), hsa-miR-424 (mediana 0,00462;  $p=0,0156$ ), hsa-miR-494 (mediana 0,00877;  $p=0,0010$ ), hsa-miR-497 (mediana 0,04487;  $p=0,0005$ ), hsa-miR-612 (mediana 0,00679;  $p=0,0039$ ) e hsa-miR-637 (mediana 0,00166;  $p=0,0039$ ) estão em expressão diminuída em CHC. **Conclusão:** A expressão do gene *VEGFA* encontra-se diminuída em CHC. O microRNA hsa-miR-637 encontra-se em expressão diminuída em CH. Os miRNAs hsa-miR-15b, hsa-miR-125b, hsa-miR-423, hsa-miR-424, hsa-miR-494, hsa-miR-497, hsa-miR-612 e hsa-miR-637 encontram-se em expressão diminuída em CHC. A expressão das proteínas *VEGFA* está diminuída em carcinoma hepatocelular, corroborando com o encontrado para a expressão gênica em CHC.

**ABSTRACT**

**Introduction:** Hepatocellular carcinoma (HCC) is a primary liver tumor and the sixth most common type of cancer. Liver cirrhosis (LC) and viral hepatitis are their main risk factors. Injured tissues and development process tissues need new blood vessels, i. e., angiogenic process, that initiates by means of vascular endothelial growth factors secretion, that is translated by *VEGFA* gene and regulated by non-coding RNA, miRNA, that consists of a single strand of approximately 22 nucleotides and has the function of binding to mRNA strand, to inhibit protein translation. **Objectives:** To quantify *VEGFA* gene expression and 17 miRNAs predicted as its regulator in HCC and liver cirrhosis; to assess *VEGFA* gene expression in relation to miRNAs expression and quantify *VEGFA* protein expression in HCC and liver cirrhosis tissues. **Patients and methods:** Sixteen samples of HCC tissue, 23 samples of liver cirrhosis tissue and 12 samples of normal liver tissue were collected. Total RNA and proteins were isolated by mirVana PARIS kit. *VEGFA* gene mRNA quantification and 17 miRNAs predicted as regulators expression was performed by real time quantitative PCR. Customized plates, TaqMan miRNA custom plate, were used for miRNAs. Statistical analysis was performed by one sample t test, Wilcoxon tests and Mann-Whitney test. **Results:** *VEGFA* gene expression was found down-regulated in HCC and there is negative correlation between gene expression and tumor extension. MicroRNA hsa-miR-637 has showed significance and was down-regulated on samples (mean 0.2003, p=0.0004) in LC, whereas miRNAs hsa-miR-15b (median 0.04015; p=0.0005), hsa-miR-125b (median 0.01876; p=0.0005), hsa-miR-423 (median 0.02650; p=0.0005), hsa-miR-424 (median 0.00462; p=0.0156), hsa-miR-494 (median 0.00877; p=0.0010), hsa-miR-497

(median 0.04487;  $p=0.0005$ ), hsa-miR-612 (median 0.00679;  $p=0.0039$ ) and hsa-miR-637 (median 0.00166;  $p=0.0039$ ) are down-regulated in HCC. **Conclusions:** *VEGFA* gene expression is down-regulated in HCC. MicroRNA hsa-miR-637 is down-regulated in LC. MicroRNAs hsa-miR-15b, hsa-miR-125b, hsa-miR-423, hsa-miR-424, hsa-miR-494, hsa-miR-497, hsa-miR-612 e hsa-miR-637 are down-regulated in HCC. VEGFA protein expression is low in HCC, corroborating to gene expression found in HCC.

# ***Introdução***

---

## 1. INTRODUÇÃO

O Carcinoma Hepatocelular (CHC) foi a quinta neoplasia mais comum e a terceira causa de morte por câncer do mundo em 2004, no ano de 2012 já era a segunda causa de morte mais comum (Llovet *et al.*, 2004; Ferlay *et al.*, 2015). No ano de 2008, o CHC foi a causa de 6995 óbitos (INCA, 2011), verifica-se que no Brasil sua incidência está relacionada à hepatite C e à região Sudeste (Venook *et al.*, 2010). É responsável por aproximadamente um milhão de mortes por ano no mundo (Murray & Lopez, 1997). O CHC é um tipo de tumor primário do fígado, ou seja, aquele que tem sua origem no próprio órgão, e ocorre em mais de 80% dos casos de câncer de fígado, porém os dados sobre este tumor ainda carecem de pesquisas (Venook *et al.*, 2010).

A sobrevivência média dos pacientes com esse tipo de câncer é de 23 meses (Cillo *et al.*, 2006). Segundo a Clínica de Câncer de Fígado de Barcelona (*Barcelona Clinic Liver Cancer, BCLC*), o estadiamento de tumores é utilizado para selecionar a terapia primária e adjuvante, para estimar o prognóstico e também avaliar os resultados do tratamento. CHC é um caso particular em oncologia, uma vez que seu prognóstico não se baseia somente no estadio do tumor, mas também na doença hepática subjacente. A cirrose hepática relaciona-se ao CHC na maioria dos casos, e seu surgimento também está relacionado com esta doença que, simultaneamente, determina a aplicabilidade e eficácia dos tratamentos. Considera-se que o estadiamento apropriado para o CHC deveria incluir quatro aspectos relacionados: Estadio do tumor, grau de alteração da função hepática, situação geral do paciente e eficácia do tratamento (Bruix *et al.*, 2001).

Pacientes em um estadio muito inicial (Estadio 0) e nas fases iniciais (Estadio A) primeiramente são tratados por ressecção se apresentam único tumor, ausência de hipertensão portal clinicamente relevante e bilirrubina normal. O transplante é considerado em pacientes com pelo menos 3 nódulos menores que 3 cm ou com único tumor menor do que 5 cm e alteração na função hepática. Quando existe longo tempo de espera, são recomendados ressecção adjuvante e tratamento percutâneo. Transplante hepático de doador vivo também pode ser considerado. Tratamentos percutâneos, quer de injeção percutânea de etanol ou de radiofrequência, são aplicáveis a pequenos tumores de CHC não cirúrgicos. Pacientes assintomáticos com tumores multinodulares não invasivos (Estadio B) são os melhores candidatos para quimioembolização. Pacientes com tumores avançados (Estadio C) mostrando envolvimento vascular, disseminação extra-hepática ou alterações físicas, são tratados por agentes antitumorais, como liarozole, que aumenta o nível intratumoral do ácido retinóico endógeno. E por fim, pacientes em estágio terminal (Estadio D) com estado físico muito prejudicado ou carga tumoral elevada, recebem tratamento sintomático (Llovet *et al*, 2004; Conte, 2000). Recentemente, uma atualização no sistema de estadiamento incluiu o tratamento com Sorafenibe para o estágio avançado (Estadio C), sendo considerado tratamento de primeira linha em pacientes com CHC que não podem ser tratados com terapias potencialmente mais efetivas (Bruix & Sherman, 2011).

O surgimento do tumor não provém de uma causa específica, sendo, portanto, multifatorial. Entretanto, a cirrose hepática é considerada o fator principal para o desenvolvimento do CHC (Fattovich *et al.*, 2004). A cirrose

hepática representa a fase terminal da fibrose do parênquima hepático, com formação de nódulos de regeneração e distorção da rede vascular, que tem como consequência alterações da função e do fluxo sanguíneo e hepático. Tal afecção traduz o estadió final de muitas doenças hepáticas caracterizadas por destruição celular crônica (Nguyen & Lingappa, 2006). Além disso, doenças crônicas do fígado, em particular, infecções pelo vírus da hepatite B (HBV) e C (HCV), toxinas como o álcool e aflatoxina, que provocam alterações no DNA das células hepáticas, também são fatores de risco e participam ativamente da carcinogênese hepática. (Fattovich *et al.*, 2004; Carrilho *et al.*, 2010; Branco *et al.*, 2007).

Os tumores são grupos de células mitóticas que não têm uma organização bem definida, porém do ponto de vista da angiogênese, eles são vistos como um novo órgão. Portanto a vascularização tem um papel importante na formação e crescimento do tumor (Shojaei & Ferrara, 2008). Pesquisas revelaram que o CHC secreta fatores de crescimento endoteliais, e a excessiva expressão tem associação com a vascularização, tamanho do tumor e a presença de fatores no plasma sanguíneo pode ser um importante marcador para a metástase do CHC (Suzuki *et al.*, 1996; Jin-no *et al.*, 1998; Moon *et al.*, 2003).

O fator de crescimento endotelial vascular A (VEGFA) é o primeiro fator angiogênico induzido por hipóxia (Tammela *et al.*, 2005), que suscita a proliferação, brotamento, migração e formação da matriz endotelial (Ferrara, Gerber & LeCouter, 2003). Estes dados demonstram que o VEGFA tem uma participação importante na formação de tumores.

O gene *VEGFA* consiste de oito éxons e sete íntrons com aproximadamente 14kb em comprimento (Houck *et al.*, 1991). O pré-RNA mensageiro deste gene é agrupado diferentemente para formar duas famílias de proteínas, cada uma com múltiplas isoformas de diferentes números de aminoácidos. As famílias são denominadas *VEGFAa*, que é pró-angiogênica, e *VEGFAb*, que é anti-angiogênica (Ladomery *et al.*, 2007). A literatura demonstra que o gene *VEGFAa* é altamente expresso em tumores, enquanto que *VEGFAb* é menor que 50% na maioria dos casos. A versão pró-angiogênica é necessária para o crescimento de tumores em modelos animais, portanto este é um alvo considerável para novas terapias contra o câncer em modelos pré-clínicos (Biselli-Chicote *et al.*, 2012).

A inibição de *VEGFA* tem se mostrado efetiva em muitos tipos de câncer, onde esse bloqueio é uma rota para a redução no crescimento tumoral, assim como no aumento das taxas de sobrevivência. Terapias anti-*VEGF* também têm mostrado benefícios clínicos em câncer colorretal, carcinoma renal, câncer de pulmão, de mama e de fígado (Sorafenibe) e estão em fase III de testes clínicos em outros tipos de tumores (Biselli-Chicote *et al.*, 2012; Bruix & Sherman, 2011).

A alteração de fatores reguladores da expressão gênica pode reduzir ou elevar a expressividade e com isso, levar à formação de tumores, assim como seu crescimento e proliferação. Os microRNAs são fitas simples, de aproximadamente 22 nucleotídeos, que têm a função de regulação gênica ligando-se ao RNA mensageiro (mRNA) alvo, por sequência homóloga, completa ou parcial, levando-o à degradação ou inativação, respectivamente (Chekulaeva & Filipowicz, 2009; Li *et al.*, 2013; Lu *et al.*, 2015). O funcionamento dos miRNAs

---

ainda não está bem esclarecido, sendo, portanto, alvo de muitos estudos científicos atualmente. Tem-se verificado que eles são responsáveis pelo crescimento celular, diferenciação e apoptose, através do controle da expressão gênica e conseqüentemente têm sido relacionados ao surgimento de tumores (Bartel, 2004; Caporali & Emanuelli, 2011). Estes mecanismos têm se tornado foco da ciência biomédica nos últimos anos e descritos como componentes essenciais em alguns processos regulatórios em todos os aspectos de vida, incluindo desenvolvimento e processos fisiológicos e patológicos, investigados também como biomarcadores para doenças e alvos terapêuticos. As terapias baseadas em miRNAs estão progredindo rapidamente, devido ao alto grau de integração entre cientistas acadêmicos e industriais (Emanuelli, 2011).

Os miRNAs são geralmente genes transcritos pela RNA polimerase II no núcleo para formar grandes microRNAs primários (Pri-miRNAs), que são selados (7MGpppG) e poliadenilados (AAAAA). Essas transcrições de pri-miRNA são processadas pela RNase III enzima Drosha e seu cofator, Pasha, para liberar o produto precursor que é constituído por aproximadamente 70 nucleotídeos, o pré-miRNA. A RAN-GTP e a exportina-5 transportam o pré-miRNA ao citoplasma. Posteriormente, outra enzima RNase III, reduz o pré-miRNA para gerar um transiente com aproximadamente 22 nucleotídeos. Essa fita simples é então amadurecida e se liga a um RNA mensageiro (mRNA) para impedir que haja a tradução de proteína (Caporali & Emanuelli, 2011; Esquela-Kerscher & Slack, 2006).

O primeiro miRNA, *lin-4*, foi descoberto em 1993, sendo inicialmente descrito como stRNA (*Small Temporal RNA*) por ser expresso de forma

transiente e regular temporalmente ao desenvolvimento de *Caenorhabditis elegans*. O mecanismo de atuação dos miRNAs, no momento de sua descoberta, foi associado à atividade anti-senso de *lin-4* que inibia a expressão de *lin-14* (Lee *et al.*, 1993). Entretanto, hoje se reconhece que os miRNAs atuam ligando-se à região 3' não traduzida (UTR) dos mRNAs alvo, inibindo a tradução de proteínas (Kim, 2005).

Através da predição computacional e outras técnicas, pôde-se perceber que existem alguns miRNAs responsáveis pela regulação do gene *VEGFA*, dentre eles os miR-15b, miR-16, miR-20a e miR-20b foram detectados como repressores desse gene em tumor nasofaríngeo e a regulação em carcinoma espinocelular foi verificada pelo miR-206 e miR-125b em CHC (Hua *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2011; Zhao *et al.*, 2011; Yan *et al.*, 2010). Em CHC foram observadas expressões diminuídas dos miRNAs let-7, 1, 23b, 26a, 29, 34a, 101, 122, 124, 125a, 125b, 130a, 139, 145, 150, 193b, 195, 199a-1, 199a-2, 199b, 200a, 200b, 223, 375, 602 e expressões aumentadas dos miRNAs 17-5p, 18a, 92a, 106-25, 21, 30d, 151, 181b-1, 135a, 221, 222, 224, 373 e 483-3p, onde verificou-se que estes têm relações diretas com aspectos clínicos e patológicos e relações entre expressão de miRNAs e o vírus da Hepatite C como um dos fatores para o surgimento do tumor (Gramantieri *et al.*, 2008; Lin *et al.*, 2008; Varnholt, 2008; Varnholt *et al.*, 2008; Negrini *et al.*, 2011).

Os miRNAs estão estritamente relacionados ao desenvolvimento vascular, manutenção e também relacionados a doenças. A pesquisa em biologia vascular ainda é recente, mas a revolução que os miRNAs têm produzido na comunidade científica traz tendência a um rápido avanço do

conhecimento e a promessa de uma futura demanda por diagnósticos e terapêuticas baseados em miRNAs (Emanuelli, 2011).

### **1.1.OBJETIVOS**

1. Analisar quantitativamente a expressão do mRNA do gene VEGF em amostras de cirrose hepática e carcinoma hepatocelular;
2. Quantificar os níveis de expressão dos 17 miRNAs preditos para serem reguladores do gene *VEGFA* em amostras de cirrose hepática;
3. Avaliar a expressão dos 17 miRNAs em carcinoma hepatocelular;
4. Avaliar a expressão do gene *VEGFA* em relação à expressão dos miRNAs e verificar dentre os miRNAs preditos, o mais provável para interação com o gene *VEGFA*;
5. Quantificar a proteína VEGFA em cirrose hepática e carcinoma hepatocelular para validação da expressão gênica.

# ***Casuística e Métodos***

---

## 2. CASUÍSTICA E MÉTODOS

### 2.1. Predição computacional de miRNAs

Os miRNAs foram selecionados na base de dados mirDIP (<http://ophid.utoronto.ca/mirDIP>), utilizando-se a característica de regiões conservadas entre espécies. Foram selecionados os 17 miRNAs com *score* mais altos, isto é, os que tinham maiores chances para serem reguladores do gene *VEGFA* (Figura 1).

Gene Symbol	Links	microRNA	Source	Score (orig)	Score (std)	Rank
VEGFA	<a href="#">i2D</a> <a href="#">GC</a>	hsa-mir-1	microRNA.org	100.0	100.0	Top 1%
VEGFA	<a href="#">i2D</a> <a href="#">GC</a>	hsa-mir-1255a	microRNA.org	100.0	100.0	Top 1%
VEGFA	<a href="#">i2D</a> <a href="#">GC</a>	hsa-mir-1255b	microRNA.org	100.0	100.0	Top 1%
VEGFA	<a href="#">i2D</a> <a href="#">GC</a>	hsa-mir-125b	microRNA.org	100.0	100.0	Top 1%
VEGFA	<a href="#">i2D</a> <a href="#">GC</a>	hsa-mir-15b	microRNA.org	100.0	100.0	Top 1%
VEGFA	<a href="#">i2D</a> <a href="#">GC</a>	hsa-mir-206	microRNA.org	100.0	100.0	Top 1%
VEGFA	<a href="#">i2D</a> <a href="#">GC</a>	hsa-mir-423-3p	microRNA.org	100.0	100.0	Top 1%
VEGFA	<a href="#">i2D</a> <a href="#">GC</a>	hsa-mir-424	microRNA.org	100.0	100.0	Top 1%
VEGFA	<a href="#">i2D</a> <a href="#">GC</a>	hsa-mir-452	microRNA.org	100.0	100.0	Top 1%
VEGFA	<a href="#">i2D</a> <a href="#">GC</a>	hsa-mir-494	microRNA.org	100.0	100.0	Top 1%
VEGFA	<a href="#">i2D</a> <a href="#">GC</a>	hsa-mir-497	microRNA.org	100.0	100.0	Top 1%
VEGFA	<a href="#">i2D</a> <a href="#">GC</a>	hsa-mir-576-5p	microRNA.org	100.0	100.0	Top 1%
VEGFA	<a href="#">i2D</a> <a href="#">GC</a>	hsa-mir-612	microRNA.org	100.0	100.0	Top 1%
VEGFA	<a href="#">i2D</a> <a href="#">GC</a>	hsa-mir-637	microRNA.org	100.0	100.0	Top 1%
VEGFA	<a href="#">i2D</a> <a href="#">GC</a>	hsa-mir-874	microRNA.org	100.0	100.0	Top 1%
VEGFA	<a href="#">i2D</a> <a href="#">GC</a>	hsa-mir-889	microRNA.org	100.0	100.0	Top 1%
VEGFA	<a href="#">i2D</a> <a href="#">GC</a>	hsa-mir-920	microRNA.org	100.0	100.0	Top 1%

Figura 1. Imagem do ranking de miRNAs preditos para serem reguladores do gene *VEGFA* (2012).

### 2.2. Amostras

As amostras foram coletadas em cirurgias de biópsias, cirurgias de videolaparoscopias e cirurgias de transplantes realizados no Centro Cirúrgico do Hospital de Base de São José do Rio Preto (FAMERP/FUNFARME), pelo Departamento de Cirurgia, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Renato Ferreira da Silva, após autorização e assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo I). O presente trabalho foi previamente aprovado pelo Comitê

de Ética em Pesquisa sob CAAE n. 0206.0.140.000-11 (Anexo II). As informações epidemiológicas e sócio demográficas foram coletadas por entrevista do paciente e consulta de prontuário (Anexo III).

Foram coletadas 51 amostras, dentre elas 16 amostras de tecido tumoral, 23 amostras de tecido cirrótico e 12 amostras de tecido hepático normal de pacientes submetidos a cirurgias no fígado sem apresentar carcinoma hepatocelular ou cirrose hepática. Estas amostras foram armazenadas em solução *RNAlater* (Life Technologies), em temperatura -20°C até o momento da extração.

### **2.3. Extração de RNA total e Proteínas**

O RNA total e proteínas foram extraídos utilizando-se o kit MirVana PARIS (Life Technologies), segundo protocolo fornecido. A quantificação de RNA total foi realizada no aparelho Picodrop Pico200 e foram levadas em consideração as razões 230/280 e 260/280 para garantir a pureza e precipitação de sais, respectivamente. A proteína total das amostras foi quantificada no equipamento Nanodrop (Thermo Scientific), utilizando-se o método *BCA Protein Assay* (Pierce) e armazenadas em temperatura -80°C para posterior utilização em análise de expressão gênica, de miRNAs e proteínas.

### **2.4. Obtenção de DNA complementar (cDNA)**

O cDNA foi obtido por meio de ciclagem em termociclador de PCR, utilizando-se o kit *High Capacity* (Life Technologies) para a quantificação da expressão do gene *VEGFA* e kit *TaqMan miRNA Reverse Transcription* (Life Technologies) para os miRNAs.

## 2.5. Expressão do gene *VEGFA* e miRNAs

A expressão do gene *VEGFA* foi quantificada, em triplicatas, utilizando-se *primers* e sondas TaqMan fornecidas pela empresa Life Technologies, segundo as informações do fabricante, no equipamento StepOnePlus (Applied Biosystems). Foi realizada a curva padrão para teste dos controles endógenos, onde os genes *GAPDH*, *RPLPO*, *HPRT1* e *TBP* foram testados, após estes testes os melhores controles selecionados foram *GAPDH*, *RPLPO* e *HPRT1*. A expressão dos miRNAs foi realizada em placas customizadas contendo sondas e *primers* TaqMan miRNA *Custom Plates* (Life Technologies), foram utilizadas 10 placas para controle, 17 placas para cirrose hepática e 13 placas para CHC, uma amostra por placa em quadruplicata, totalizando 40 placas customizadas com os miRNAs preditos. Os valores de *cycle threshold* (Ct) foram obtidos e o método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ , de Livak e Schmittgen (2001), foi utilizado para calcular a quantificação relativa.

## 2.6. Quantificação de proteína *VEGFA*

O teste para quantificação de proteína *VEGFA* utilizado foi o Ensaio Imunoenzimático com anticorpos específicos – *ELISA Duo Set* (R&D Systems), em que a placa foi sensibilizada com anticorpos de captura por um período overnight (mantida por 12 horas em temperatura ambiente), após esta etapa, foram realizadas três lavagens com tampão de lavagem e preparação com reagente diluente por uma hora em temperatura ambiente, em seguida os padrões e as amostras de proteína, com concentração de  $2\mu\text{g}/\mu\text{L}$ , foram inseridas nos poços, em duplicatas. Foi repetida a lavagem, adicionado anticorpo

de detecção e incubado em temperatura ambiente por 2 horas. Após três lavagens, foi adicionada estreptavidina e mantida por 20 minutos em ausência de luz. Essa placa foi então lavada novamente e adicionada solução de substrato por 20 minutos. Com isso, a solução nos poços adquiriu uma cor azulada característica. A solução de parada foi adicionada para dar uma coloração amarelada. A análise foi realizada por espectrofotômetro com filtro de 450nm, por meio do *software* SkanIt (Thermo Scientific), utilizando-se sete padrões, também em duplicata, como via de comparação para o cálculo da concentração de proteína VEGFA nas amostras.

## 2.7. Análise Estatística

O *software GraphPad Prism* foi utilizado para executar os testes estatísticos. As amostras *outlier* foram excluídas por meio do teste de Grubbs. Foi realizado o teste de D'Agostino e Pearson, no qual foi testada a normalidade. O teste t de uma amostra, que avalia a média, foi utilizado para amostras na normalidade, e para as que não passaram no teste de normalidade foi utilizado o teste de Wilcoxon, que avalia a mediana. Avaliação da expressão gênica em relação ao tamanho dos tumores foi realizada por meio de Mann-Whitney. Para avaliar a correlação entre a expressão do gene *VEGFA* e a expressão dos miRNAs foi utilizado o teste de correlação de Spearman. A correção para múltiplos testes dos miRNAs, para controle de falso positivo, foi realizada por meio do método de Benjamini & Hochberg (1995). Somente valores de p menores que 0,05 (bicaudal) foram considerados significantes.

# ***Artigos Científicos***

---

### 3. ARTIGOS CIENTÍFICOS

Os resultados estão apresentados em forma de artigos. No total estão apresentados três artigos, um foi submetido e os outros dois encontram-se redigidos e aguardam contribuição da banca.

**Artigo 1:** MicroRNAs related to proliferation, migration, angiogenesis and biomarkers of hepatocellular carcinoma

**Autores:** André Rodrigues Clavio Pereira de Oliveira, Patrícia Matos Biselli-Chicote, Márcia Maria Urbanin Castanhole, Érika Cristina Pavarino, Renato Ferreira da Silva, Eny Maria Goloni-Bertollo.

**Periódico:** Annals of Hepatology

**Artigo 2:** Expressão do gene *VEGFA* e miRNAs preditos em cirrose hepática

**Autores:** André Rodrigues C. P. de Oliveira, Márcia M. U. Castanhole-Nunes, Patrícia M. Biselli-Chicote, Érika C. Pavarino, Eny M. Goloni-Bertollo, Renato Ferreira da Silva.

**Periódico:** Journal of Hepatology

**Artigo 3:** Expressão diferencial do gene *VEGFA* e miRNAs em carcinoma hepatocelular

**Autores:** André Rodrigues C. P. de Oliveira, Márcia M. U. Castanhole-Nunes, Patrícia M. Biselli-Chicote, Érika C. Pavarino, Eny M. Goloni-Bertollo, Renato Ferreira da Silva.

**Periódico:** Hepatology

### **3.1.ARTIGO 1: MicroRNAs related to proliferation, migration, angiogenesis and biomarkers of hepatocellular carcinoma**

André Rodrigueiro Clavisio Pereira de Oliveira<sup>1</sup>, Patrícia Matos Biselli-Chicote<sup>2</sup>, Márcia Maria Urbanin Castanhole<sup>3</sup>, Érika Cristina Pavarino<sup>4</sup>, Renato Ferreira da Silva<sup>5</sup>, Eny Maria Goloni-Bertollo<sup>6</sup>

São José do Rio Preto Medical School – FAMERP/FUNFARME, Molecular Biology and Genetics Research Unit (UPGEM), Liver Tumors Study Group (GETF), Brazil

<sup>1</sup>rodrigueiro@gmail.com

<sup>2</sup>patriciabiselli@famerp.br

<sup>3</sup>marcinha.uc@gmail.com

<sup>4</sup>erika@famerp.br

<sup>5</sup>renatosilva@famerp.br

<sup>6</sup>eny.goloni@famerp.br

#### **Abstract**

Genes have direct regulators, which inactivate messenger RNA (mRNA), decreasing gene expression. These regulators include the microRNAs (miRNAs, miRs). The miRNA functioning is not well explained yet, and therefore, is the subject of several ongoing studies. They may be responsible for cellular growth, differentiation and apoptosis, through control of gene expression and consequently have been associated to tumorigenesis. Hepatocellular carcinoma

(HCC) is the fifth more common neoplasia and third death cause by cancer among the world, and it is responsible for at least one million deaths a year. HCC is a primary tumor of the liver and occurs in more than 80% of liver cancer cases; however, this tumor data needing more researches. The miRNA role in HCC has been studied and altered expressions were found, as well as its involvement in genes related to tumor onset, proliferation and progression. This review shows findings about miRNA involvement in this type of cancer.

Keywords: mRNA, miRNA, tumorigenesis, epigenetics, liver cancer

### **MicroRNAs**

Genes have direct regulators that inactivate messenger RNA (mRNA), decreasing gene expression; these regulators are microRNAs (miRNAs, miRs). MiRNAs are single-stranded, of approximately 22 nucleotides of non-coding RNA, present in animals and plants. It has been found that miRNA are responsible for cellular growth, differentiation and apoptosis, through control of gene expression and consequently have been associated to tumorigenesis.<sup>1,2</sup>

First found miRNA, lin-4, discovered in 1993, initially described as stRNA (Small Temporal RNA) by being transiently expressed temporally regulator. The physiology of miRNAs, when discovered, was associated to anti-sense activity of lin-4 that inhibited lin-14 expression.<sup>3</sup> However, currently is recognized that miRNAs act by binding at 3'untranslated (3'UTR) region of the target mRNA, inhibiting its protein translation.<sup>4</sup>

The miRNAs are, in general, genes transcribed by RNA polymerase II at the nucleus, and form big primary microRNAs (Pri-miRNAs) that are sealed (7MGpppG) and polyadenilated (AAAAA). These transcriptions of pri-miRNA are

processed by Drosha RNase III enzyme and its cofactor, Pasha, to release the precursor product that is approximately 70 nucleotides long, the pre-miRNA. RAN-GTP and exportin-5 transport pre-miRNA to cytoplasm. Subsequently, another RNase III dicer enzyme reduces it to a transient double-stranded chain of approximately 22 nucleotides that is separated generating two single-stranded chains. This chain is matured, associated to a protein complex (RISC) and it is bound to a mRNA to inhibit the translation to a protein.<sup>2,5</sup> Two kinds of single-stranded chains are produced, miR-3p and miR-5p, that are complementary and, in general, one is used in regulation while the other is degraded. It has been believed that miR-3p participated of the gene expression regulation and miR-5p was degraded, however currently it is known that any chain may be functional and 5p has an important biological role (Fig. 1).<sup>6</sup>

Mature miRNA is capable of regulating gene expression after transcription, by binding to a target mRNA by partial or integral complementarity, mainly leading to inhibit the translation or degradation of mRNA.<sup>7</sup>

These mechanisms have become the aim of biomedical science in the last years and described as essential component in some regulatory process in all aspects of life, including development and physiological and pathological processes, investigated as biomarkers for diseases and therapeutic targets. miRNA based therapies are progressing rapidly, due to the high level of interaction of academic and industrial scientists.<sup>8</sup>

Actually, miRNA already sequenced are cataloged in a database, miRBase ([www.mirbase.org](http://www.mirbase.org)), which is in its 20th version, published in June 2013 and it is the main database. There are 24521 mature products in 206 species in

miRBase. The official nomenclature for Human miRNAs contains the initials of the species in which it is found, in this case, Homo sapiens (hsa) and the number of identification and tabulation, for example, has-miR-1. Others databases used identifies predicted regions for miRNA binding to mRNA, based on bioinformatics tools and information proved by studies.

First evidence of miRNAs involvement in cancer has emerged in Chronic Lymphocytic Leukemia (CLL) studies, where the presence of a chromosomal deletion in 13q14 region is frequent. It was observed that this region contains two miRNA genes, miR-15a and miR-16-1. This suggest that cancer onset may had relations to these microRNAs.<sup>6</sup>

### **Hepatocellular Carcinoma**

Hepatocellular Carcinoma (HCC) is the fifth most common neoplasia and the third death cause by cancer in the world, and it is responsible by approximately one million deaths a year.<sup>9-11</sup> HCC is a primary liver tumor and occurs in more than 80% of liver cancer cases, although data about this tumor still need more research.<sup>12</sup>

Average survival of patients with this type of cancer is 23 months.<sup>13</sup> According to Barcelona Clinic Liver Cancer (BCLC), tumor staging selects primary and adjuvant therapy, to estimate the prognosis and assess treatment outcome. HCC is a particular case in oncology, since its prognosis is not based only on tumor stage, but also in the underlying liver disease. Presence of cirrhosis is associated to HCC in the most cases, and determines the applicability and efficacy of treatment.

Tumor development is not due to a specific cause, and therefore, multifactorial. However, liver cirrhosis is considered the major factor for HCC development.<sup>14</sup> Cirrhosis represents end-stage fibrosis of hepatic parenchyma with formation of regeneration nodules and distortion of vasculature that alters the hepatic blood flow and the liver function. This condition reflects the terminal stage of many liver diseases characterized by chronic cellular destruction.<sup>15</sup> Furthermore, chronic liver diseases, in particular, B (HBV) and C (HCV) hepatitis infections, toxins like alcohol and aflatoxin, that causes alterations in DNA of hepatic cells, are also risk factors and actively participate of this tumor carcinogenesis.<sup>14,16</sup>

HCC staging should include four related aspects: tumor stage; abnormal liver function level; patient general situation; and treatment efficacy.<sup>17</sup> Patients in a very initial stage (Stage 0) and in initial phases (Stage A) are firstly treated by resection if they present only one tumor, absence of clinically significant portal hypertension and normal bilirubin concentration. In patients with at least three nodules smaller than 3 centimeters or only one tumor smaller than 5 centimeters and altered liver function, the transplantation is considered. When there is a long waiting for transplantation, it is recommended adjuvant resection and percutaneous treatment. Living donor liver transplantation may also be considered. Percutaneous treatment, by ethanol percutaneous injection or radiofrequency, is applicable to small non-surgical tumors. Asymptomatic patients with non-invasive multinodular tumors (Stage B) are the best candidates to chemoembolization. Patients with advanced tumors (Stage C) showing vascular involvement, extra hepatic spread or physical changes are treated by

antitumor agents, such as liazorole, which increases intratumoral level of endogenous retinoic acid or sorafenib, an antiangiogenic agent. Finally, patients in terminal stage (Stage D) with impaired physical status or tumor burden, receive symptomatic treatment.<sup>9,18</sup>

The miRNAs role in HCC has been studied and alterations on expression of genes codifying miRNAs were found, as well as the involvement of these miRNAs with genes related to tumor onset, proliferation and progression. This review shows findings about miRNA role in this type of cancer.

#### **MiRNAs related to proliferation, migration, angiogenesis and biomarkers of HCC tumors**

The miRNA hsa-miR-615-5p was observed to be expressed in HCC tissues as well as cirrhotic tissues and undetectable in healthy hepatic tissue. This miRNA, in low expression in tumor, acts directly in IGF-II gene, and may bind in 5 regions of 3'UTR of its mRNA. This gene encodes a main mitogen in HCC, which is frequently over expressed and associated to proliferation and migration of tumor cells.<sup>19</sup> Hsa-miR-145 is low expressed in HCC and has its targets on IGF (IRS2 and IGF1R) signal pathway.<sup>20</sup> The miRNA hsa-miR-219-5p is downregulated in primary HCC, while its target, GPC3, is overexpressed. This gene has a direct relation with cellular growth, differentiation and metastasis, being a potential biomarker for HCC, since it is not present in any other type of cancer.<sup>21</sup> Hsa-miR-214 was observed in low expression and was associated to beta-catenin gene expression, which is related to tumor growth.<sup>22</sup> Another miRNA, hsa-miR-182 is responsible by regulating MTSS1 gene that is a metastasis suppressor in HCC.<sup>23</sup> Hsa-miR-26a is low expressed and is related

to IL-6 gene that is over expressed, causing tumor growth and increasing the probability of tumor metastasis.<sup>24</sup>

Wu et al. (2013) verified over expression of hsa-miR-27a and classified it as oncogenic, since it is associated with proliferation, migration and invasion of tumor cells.<sup>25</sup> However, hsa-miR-27a has not been related with any gene. A study of Yang et al. (2013) showed that hsa-miR-485-3p, hsa-miR-495 e hsa-miR-664 have altered expression in HCC and suggest that these miRNAs could be potential regulators of MAT1A gene, a antitumor gene that showed low expression in the presence of these miRNAs, and contributed to tumor growth, invasion and metastasis.<sup>26</sup> Also related to tumorigenesis, hsa-miR-494, which has its target on MCC gene mRNA, and hsa-miR-657, which has TLE1 gene as target, were observed over expressed in HCC.<sup>27,28</sup> Hsa-miR-452 is over expressed, being responsible for inhibition of CDKN1B gene that is related, mainly, to proliferation and migration of HCC cells.<sup>29</sup> Hsa-miR-7 was found in low expression in HCC and it was associated to CCNE1 gene. Experiments have shown that over expression of miR-7 may keep tumor cells in G1 mitosis phase, preventing its proliferation and metastasis.<sup>30</sup>

The local blood vessels sustain tumor proliferation; consequently, vascular growth factors liberation has an important role in this process. The over expression of these factors is directly related to tumor progression and proliferation, as well as aggressiveness and prognosis.<sup>31</sup> Hsa-miR-125a was observed in over expression in HCC and is associated with the inhibited of MMP11 gene and VEGFA gene expression.<sup>32</sup> Hsa-miR-195 was found low expressed in HCC and showed to upregulate VEGF-A gene, and pro-metastatic

factors VAV2 and CDC42, increasing tumor proliferation and metastasis.<sup>32,33</sup> Low expression of hsa-miR-26a revealed over expression of VEGFA gene in HCC, showing the association with angiogenesis.<sup>34,35</sup> Related to another growth factor, hsa-miR-125b is low expressed in HCC and acts as regulator of PIGF gene, which is responsible for tumor blood vessels proliferation, when in over expression.<sup>36,37</sup>

The Hsa-miR-18b down expression in HCC and/or overexpression of TNRC6B gene it is associated of inhibited cell proliferation and promoted cell adhesion ability, leading to metastasis. This makes hsa-miR-18b an important biomarker for this type of cancer<sup>38</sup> (Table 1).

Many studies indicated miRNAs as potential and specific biomarkers for identification of cancer factors. Hsa-miR-1 was revealed as biomarker of general survival, which high serum levels were associated to higher survival rate; hsa-miR-122a was found in low serum levels in HCC patients; while hsa-miR-483-5p and hsa-miR-500a were found in higher serum levels in liver cancer patients, revealing these miRNAs as potential biomarkers for HCC (VEGF, CCNE1, TNRC6B, MMP11, GPC3 and others genes)<sup>39-41</sup> (Table 2).

### **Conclusions and Perspectives**

Studies about miRNA regulation and expression in liver cancer are important for bringing new knowledge over emergence mechanisms, growth, proliferation and progression of HCC. Moreover, miRNAs studies allow their use as tumor biomarkers, both in serum and in tissue levels, and may facilitate diagnosis in relation to tumor aggressiveness. Concepts about miRNAs may lead

to new treatment and improve the prognosis of patients affected by this type of neoplasia, yielding new therapies against cancer.

#### Acknowledgements

To Liver Tumor Study Group (GETF) and its contributors Dr. Rita de Cássia M. A. da Silva, Dr. William José Duca, Dr. Paulo Arroyo Junior. To Molecular Biology and Genetics Research Unit (UPGEM) and its contributors Leonardo Prado Stuchi and Camila Agren. FAPESP, CNPq, CAPES for financial support and FAMERP/FUNFARME for support.

#### References

1. Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism and function. *Cell* 2004;116:281-97.
2. Caporali A, Emanuelli C. MicroRNA regulation in angiogenesis. *Vascular Pharmacology* 2011;55:79-86.
3. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 1993;75:843-8.
4. Kim VN. MicroRNA biogenesis: Coordinated cropping and dicing. *Nature* 2005;6:376-85.
5. Esquela-Kerscher A, Slack FJ. Oncomirs – microRNAs with a role in cancer. *Nature* 2006;6:259-69.
6. Iorio MV, Croce CM. MicroRNA dysregulation in cancer: diagnostics, monitoring and therapeutics. A comprehensive review. *EMBO Molecular Medicine* 2012;4:143-59.

7. Chekulaeva M, Filipowicz W. Mechanisms of miRNA-mediated post-transcriptional regulation in animal cells. *Current Opinion in Cell Biology* 2009;21:452-60.
8. Emanuelli C. MicroRNAs in vascular biology, an introduction to the vascular pharmacology special issue on microRNAs. *Vascul.Pharmacol.* 2011;55:59.
9. Llovet JM, Fuster J, Bruix J. The Barcelona approach: diagnosis, staging, and treatment of hepatocellular carcinoma. *Liver Transplantation* 2004;10(2):S115-20.
10. Murray CJL, Lopez AD. Mortality by cause for eight regions of the world: global burden of disease study. *Lancet* 1997;349:1269-76.
11. Wong C, Ng IOL. Molecular pathogenesis of hepatocellular carcinoma. *Liver International* 2008; 28:160-74.
12. Venook AP, Papandreou C, Junji F, Guevara LL. The incidence and epidemiology of hepatocellular carcinoma: a global and regional perspective. *The Oncologist* 2010;15(4):5-13.
13. Cillo U, Vitale A, Grigoletto F, Farinati F, Brolese A, Zanusi G, et al. Prospective validation of the barcelona clinic liver cancer staging system. *Journal of Hepatology* 2006;44:723-31.
14. Fattovich G, Stroffolini T, Zagni I, Donato, F. Hepatocellular carcinoma in cirrhosis: incidence and risk factors. *Gastroenterology* 2004;127:535-50.
15. Nguyen T, Lingappa, V. Liver disease. In *Pathophysiology of Disease: An Introduction to Clinical Medicine*, 5th ed., McPhee S.J., Ganong W. F. editors. McGraw-Hill 2006.

16. Carrilho FJ, Kikuchi L, Branco F, Goncalves, CS, Mattos AA. Clinical and epidemiological aspects of hepatocellular carcinoma in Brazil. *CLINICS* 2010;65(12):1285-90.
17. Bruix J, Sherman M, Llovet JM, Beugrand M, Lencioni R, Burroughs AK, et al. Clinical management of hepatocellular carcinoma. Conclusions of the Barcelona-2000 EASL Conference. *Journal of Hepatology*, 2001;35:421-30.
18. Bruix J, Sherman M. Management of hepatocellular carcinoma: an update. *Hepatology*, 2011;53(3):1020-2.
19. El Tayebi HM, Hosny KA, Esmat G, Breuhahn K, Abdelaziz AI. miR-615-5p is restrictedly expressed in cirrhotic and cancerous liver tissues and its overexpression alleviates the tumorigenic effects in hepatocellular carcinoma. *FEBS Letters* 2012;586:3309-16.
20. Law PTY, Ching AKK, Chan AWH, Wong QW, Wong CK, To KF, et al. MiR-145 modulates multiple components of the insulin-like growth factor pathway in hepatocellular carcinoma. *Carcinogenesis* 2012;33(6):1134-41.
21. Huang N, Lin J, Ruan J, Su N, Qing R, Liu F, et al. miR-219-5p inhibits hepatocellular carcinoma cell proliferation by targeting glypican-3. *FEBS Letters* 2012;586:884-91.
22. Wang X, Chen J, Li F, Lin Y, Zhang X, Lv Z, et al. miR-214 inhibits cell growth in hepatocellular carcinoma through suppression of beta-catenin. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2012; 428(4):525-31.
23. Wang J, Li J, Shen J, Wang C, Yang L, Zhang X. MicroRNA-182 downregulates metastasis suppressor 1 and contributes to metastasis of hepatocellular carcinoma. *BMC Cancer* 2012;12:227.

24. Yang X, Liang L, Zhang X, Jia HL, Qin Y, Zhu X, et al. MicroRNA-26a suppresses tumor growth and metastasis of human hepatocellular carcinoma by targeting interleukin-6-stat3 pathway. *Hepatology* 2013;58:158-70.
25. Wu X, Li Y, Liu D. MiR-27a as an oncogenic microRNA of hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma. *Asia Pacific J Cancer Prev*, 2013;14(2):885-9.
26. Yang H, Cho ME, Li TWH. MicroRNAs regulate methionine adenosyltransferase 1A expression in hepatocellular carcinoma. *The Journal of Clinical Investigation* 2013;123(1):285-98.
27. Lim L, Balakrishnan A, Huskey N, Jones KD, Jodari M, Ng R, et al. MiR-494 within an oncogenic microRNA megacluster regulates G1/S transition in liver tumorigenesis through suppression of MCC. *Hepatology* 2013; DOI10.1002/hep.26662
28. Zhang L, Yang L, Liu X, Chen W, Chang L, Chen L, et al. MicroRNA-657 promotes tumorigenesis in hepatocellular carcinoma by targeting transducin-like enhancer protein 1 through nuclear factor kappa B pathways. *Hepatology* 2013;57:1919-30.
29. Zheng Q, Sheng Q, Jiang C, Shu J, Chen J, Nie Z, et al. MicroRNA-452 promotes tumorigenesis in hepatocellular carcinoma by targeting cyclin-dependent kinase inhibitor 1B. *Mol Cell Biochem* 2014; DOI 10.1007/s11010-013-1940-z.
30. Zhang X, Hu S, Zhang X, Wang L, Zhang X, Yan B, et al. MicroRNA-7 arrests cell cycle in G1 phase by directly targeting CCNE1 in human hepatocellular

- carcinoma cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2014;443(3):1078-84.
31. Biselli-Chicote PM, Oliveira ARCP, Pavarino EC, Goloni-Bertollo EM. VEGF gene alternative splicing: pro- and anti-angiogenic isoforms in cancer. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology* 2012;138(3):363-70.
32. Bi Q, Tang S, Xia L, Du R, Fan R, Gao L, et al. Ectopic expression of miR-125a inhibits the proliferation and metastasis of hepatocellular carcinoma by targeting MMP11 and VEGF. *PLOS One* 2012;7(6):e40169.
33. Wang R, Zhao N, Li S, Fang JH, Chen MX, Yang J, et al. MicroRNA-195 suppresses angiogenesis and metastasis of hepatocellular carcinoma by inhibiting the expression of VEGF, VAV2 and CDC42. *Hepatology* 2013; 58:642-53.
34. Chai Z, Kong J, Zhu X, et al. MicroRNA-26a inhibits angiogenesis by down-regulating VEGFA through the PIK3C2a/Akt/HIF-1a pathway in hepatocellular carcinoma. *PLOS one* 2013;DOI 10.1371/journal.pone.0077957
35. Yang X, Zhang X, Lu X, Jia HL, Liang L, Dong QZ, et al. MicroRNA-26a suppresses angiogenesis in hepatocellular carcinoma by targeting HGF-cMet pathway. *Hepatology* 2013;doi: 10.1002/hep.26941.
36. Alpini G, Glaser SS, Zhang J, Francis H, Han Y, Gong J et al. Regulation of placenta growth factor by microRNA-125b in hepatocellular cancer. *Journal of Hepatology* 2011;55:1339-1345.
37. Fan DN, Tsang FH, Tam AH, Au SLK, Wong CCL, Wei L, et al. Histone Lysine Methyltransferase, suppressor of variegation 3-9 homolog 1, promotes

hepatocellular carcinoma progression and is negatively regulated by microRNA-125b. *Hepatology* 2013;57:637-47.

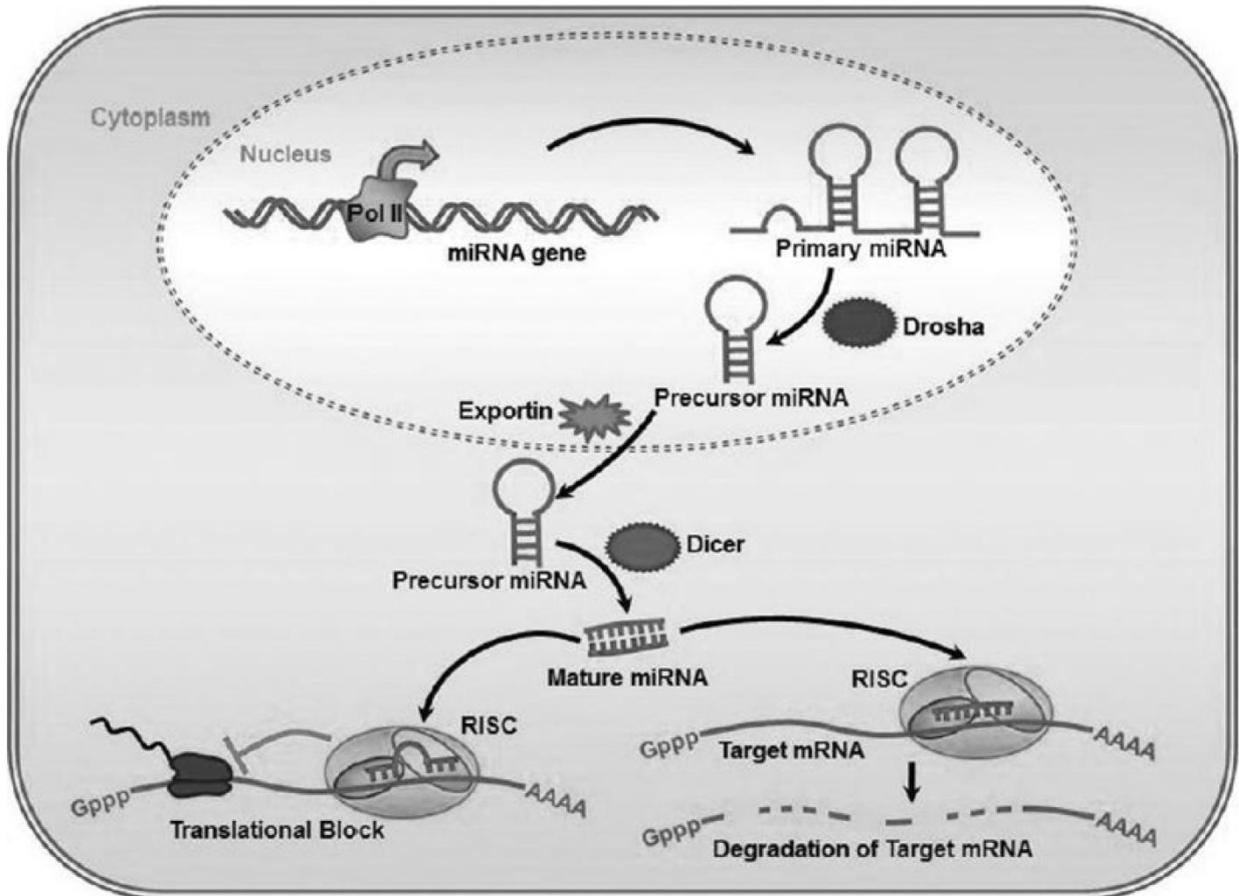
38. Murakami Y, Tamori A, Itami S, Tanahashi T, Toyoda H, Tanaka M, et al. The expression level of miR-18b in hepatocellular carcinoma is associated with the grade of malignancy and prognosis. *BMC Cancer* 2013;13:99.
39. Köberle V, Kronenberger B, Pleli T, Trojan J, Imelmann E, Oberhag JP, et al. Serum microRNA-1 and microRNA-122 are prognostic markers in patients with hepatocellular carcinoma. *European Journal of Cancer* 2013;10.1016/j.ejca.2013.06.002.
40. Luo J, Chen M, Huang H, Yuan T, Zhang M, Zhang K, et al. Circulating microRNA-122a as a diagnostic marker for hepatocellular carcinoma. *Oncotargets and Therapy* 2013;6:577-83.
41. Zhang Z, Ge S, Wang X, Yuan Q, Yan Q, Ye H, et al. Serum miR-483-5p as a potential biomarker to detect hepatocellular carcinoma. *Hepatology International* 2013;7(1):199-207.
42. Joshi SR, McLendon JM, Comer BS, Gerthoffer WT. MicroRNAs-control of essential genes: Implications for pulmonary vascular disease. *Pulmonary circulation*. 2011;1:357-64.

Table 1. The miRNAs related to proliferation, metastasis, angiogenesis, tumorigenesis and target genes in HCC.

<b>MiRNAs</b>	<b>Target Gene</b>	<b>HCC relation</b>
miR-7	<i>CCNE1</i>	Proliferation and metastasis
miR-18b	<i>TNRC6B</i>	Proliferation and adhesion loss
miR-25b	<i>IL-6</i>	Growth and metastasis
miR-26a	<i>VEGFA</i>	Growth and angiogenesis
miR-27a	-----	Proliferation, migration and invasion
miR-125a	<i>MMP11; VEGFA</i>	Angiogenesis
miR-125b	<i>PIGF; SUV39H1</i>	Angiogenesis and progression
miR-145	<i>IGF</i>	Proliferation and migration
miR-182	<i>MTSS1</i>	Metastasis
miR-195	<i>VEGFA; VAV2; CDC42</i>	Angiogenesis and metastasis
miR-214	<i>Beta-catenin</i>	Growth
miR-219-5p	<i>GPC3</i>	Growth, differentiation and metastasis
miR-452	<i>CDKN1B</i>	Proliferation and migration
miR-485-3p	<i>MAT1A</i>	Growth, invasion and metastasis
miR-494	<i>MCC</i>	Tumorigenesis
miR-495	<i>MAT1A</i>	Growth, invasion and metastasis
miR-615-5p	<i>IGF-II</i>	Proliferation and migration
miR-657	<i>TLE1</i>	Tumorigenesis
miR-664	<i>MAT1A</i>	Growth, invasion and metastasis

Table 2. The miRNAs found in circulation on organism blood vessels and their high or low serum level tumor biomarkers.

<b>MiRNA</b>	<b>Serum Level</b>
miR-1	Low
miR-122a	Low
miR-483-5p	High
miR-500a	High

Fig.1. MicroRNA biogenesis and RNA-induced gene silencing.<sup>42</sup>

### **3.2. ARTIGO 2: Expressão elevada do miRNA hsa-miR-637, regulador do gene *VEGFA*, em cirrose hepática**

André Rodrigues C. P. de Oliveira, Márcia M. U. Castanhole-Nunes, Patrícia M. Biselli-Chicote, Érika C. Pavarino, Eny M. Goloni-Bertollo, Renato Ferreira da Silva.

#### **Resumo**

A Cirrose hepática (CH) é constituída por nódulos regenerativos envoltos por fibroses, com perda de função hepática. Os principais fatores de risco são as hepatites B e C, a doença alcoólica do fígado e esteatose hepática não alcoólica. A angiogênese é o processo de formação de novos vasos a partir de vasos pré-existentes, relacionada aos tecidos em desenvolvimento e em processo de cura. Neste processo são liberados fatores de crescimento, como o fator de crescimento endotelial vascular, codificado pelo gene *VEGFA*. Os processos regulatórios são importantes no surgimento de doenças, estes processos são realizados por miRNAs, fitas simples de aproximadamente 22 nucleotídeos, com função de inibição da tradução de proteínas, tendo como alvo o RNA mensageiro (mRNA). O objetivo deste trabalho foi avaliar a expressão do gene *VEGFA* e 17 miRNAs nas amostras de CH e nas amostras de tecido hepático normal e a possível relação dos miRNAs com o gene estudado. Foram coletadas 12 amostras de tecido hepático normal e 23 amostras de CH. Foi realizada extração de RNA e proteínas, qPCR para quantificar a expressão do gene *VEGFA* e dos 17 miRNAs, ELISA para expressão da proteína VEGFA e análise estatística. A expressão do gene *VEGFA* não foi significativa para as amostras de CH e somente o miRNA hsa-miR-637 mostrou significância e sua

expressão foi encontrada diminuída nas amostras (média=0,2003, p=0,0004).

**Conclusão:** O microRNA hsa-miR-637 encontra-se em expressão diminuída em CH.

### **Introdução**

Cirrose hepática é uma doença do fígado heterogênea, último estágio de fibrose do fígado, que tem como principais fatores de risco as hepatites B e C, doença alcoólica do fígado e esteatose hepática não alcoólica, sendo a hepatite C a causa majoritária. Define-se por nódulos em regeneração, envoltos por fibroses, em processo de cura, que leva a substituição do tecido hepático e perda de função, devido à injúria crônica do fígado.<sup>1,2,3</sup>

As complicações relacionadas a esta doença são ascite, varizes esofágicas e encefalopatia. O prognóstico está relacionado ao estágio da doença e é avaliado por escalas padronizadas, como Modelo para doença hepática terminal MELD e Child-Pugh. O tratamento envolve abstinência de álcool, dieta específica e transplante de fígado.<sup>4,5</sup>

A angiogênese é o processo de formação de novos vasos a partir de vasos já existentes e está relacionada a tecidos em desenvolvimento, tecidos prejudicados e em processo de cura, tumores, entre outros, ocorrendo por mecanismos relacionados à hipóxia, processos inflamatórios, alterações na expressão gênica e nos processos regulatórios pós-transcricionais e epigenéticos. Os tecidos que necessitam novos vasos secretam os fatores de crescimento endoteliais vasculares, conhecidos por VEGFA, que são traduzidos por mRNA e gene homônimos. Sabe-se que o gene *VEGFA* está relacionado a processos patológicos, assim como tumorigênese e processos oncogênicos.<sup>6</sup>

Os processos regulatórios pós-transcricionais são realizados por RNAs não codificantes, os miRNAs, que são fitas simples, de aproximadamente 22 nucleotídeos e têm função de inibição da tradução de proteínas, ligando-se ao RNA mensageiro (mRNA) alvo, por sequência homóloga, completa ou parcial, levando-o à degradação ou somente inibição, respectivamente.<sup>7,8,9</sup> Os miRNAs regulam o fator VEGFA nos tecidos, e suas alterações de expressão têm relação com a patogenicidade e crescimento de tecidos doentes.<sup>10</sup>

O objetivo deste trabalho foi avaliar a expressão do gene *VEGFA* e de 17 miRNAs preditos para serem seus reguladores, em 2013, em amostras de cirrose hepática em relação a amostras de tecido hepático.

### **Pacientes e Métodos**

**Amostras.** O total de 35 amostras, 12 amostras de tecido hepático e 23 amostras de tecido cirrótico, foi coletado em cirurgias de videolaparoscopia, transplantes de fígado e biópsias realizadas no Centro Cirúrgico do Hospital de Base de São José do Rio Preto (FAMERP/FUNFARME), após assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (aprovado previamente pelo Comitê de Ética em Pesquisa – CEP/FAMERP sob CAAE n. 0206.0.140.000-11). No momento da coleta, o material foi inserido em criotubo contendo RNAlater (Life Technologies), para preservação de RNA e proteínas. Os criotubos foram armazenados em geladeira a 4°C por período overnight, após este período, o excesso de RNAlater foi retirado e então o tecido foi armazenado em freezer - 20°C até a próxima etapa.

**Análise de miRNAs *in silico*.** Os miRNAs foram selecionados a partir da base de dados *MicroRNA Data Integration Portal* (mirDIP –

---

<http://ophid.utoronto.ca/mirDIP>), em 2013, utilizando-se como característica de previsão as regiões conservadas entre espécies, para caráter evolutivo. Foram então selecionados como preditos para serem reguladores do gene *VEGFA*, os 17 miRNAs com score mais alto (100).

**Extração de RNA total e proteínas totais.** O RNA e proteínas totais foram extraídos utilizando-se o kit mirVana PARIS (Life Technologies), seguindo protocolo fornecido pelo fabricante. A quantificação de RNA total foi realizada no equipamento Picodrop P200 e as razões 230/280 e 260/280 foram utilizadas para indicar pureza e contaminação por sais precipitados, respectivamente. A proteína total das amostras foi quantificada pelo método *BCA Protein Assay* (Pierce) no equipamento NanoDrop (Thermo Scientific). Durante a extração e quantificação as amostras foram mantidas em gelo, e foram, posteriormente, armazenadas em freezer -80°C para evitar a degradação.

**Transcriptase reversa.** O RNA total foi submetido à técnica de PCR para obtenção de DNA complementar (cDNA) para a expressão do gene *VEGFA*, utilizando-se o kit High Capacity (Life Technologies), segundo informações fornecidas pelo fabricante. Para a expressão dos miRNAs foi utilizado o kit TaqMan miRNA Reverse Trascrption (Life Technologies), de acordo com o protocolo fornecido e ciclagem em termociclador para amplificação das amostras.

**RT-qPCR.** A PCR quantitativa em tempo real foi realizada a partir do cDNA obtido na etapa anterior. Para o gene *VEGFA*, foram utilizados primers e sonda, fornecidos pela empresa Life Technologies (Hs00900055\_m1), que abrangiam todas as isoformas do gene. A curva padrão foi realizada em triplicata

para selecionar os controles endógenos, onde foram testados os genes *RPLPO*, *GAPDH*, *TBP* e *HPRT1*. O gene *TBP* mostrou-se não efetivo para este tecido, utilizando-se os controles endógenos *RPLPO*, *GAPDH* e *HPRT1*. Foram solicitadas e produzidas pela empresa Life Technologies, 27 placas customizadas contendo primers e sondas para os 17 miRNAs preditos como reguladores do gene *VEGFA* em quadruplicata, sendo 17 placas para amostras de cirrose hepática e 10 placas para amostras de controle. O Cycle Threshold (Ct) obtido foi avaliado segundo o método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ , onde se obteve a quantificação relativa.<sup>11</sup>

**Quantificação de proteína VEGFA.** O teste para quantificação de proteínas utilizadas foi o Ensaio Imunoenzimático com anticorpos específicos – ELISA Duo Set (R&D Systems), conforme instruções do fabricante.

**Análise Estatística.** O software GraphPad Prism foi utilizado para executar os testes estatísticos. A exclusão de *outlier* foi realizada por meio do teste de Grubbs. Foram realizados os testes de normalidade de D'Agostino e Pearson, teste t ou teste de Wilcoxon, e teste de Mann-Whitney. Foi realizado o teste de correlação de Spearman para verificar a relação entre as expressões do gene *VEGF* e dos miRNAs. A correção para múltiplos testes dos miRNAs foi realizada por meio do método de Benjamini & Hochberg (1995), para controle de falso positivo.<sup>12</sup> Somente valores de p menores que 0,05 foram considerados.

## Resultados

**Expressão do gene VEGFA.** O resultado da expressão foi obtido em 11 de 12 amostras utilizadas como controle. Nas 23 amostras de CH obteve-se o *Cycle threshold* (Ct). Após o teste de Grubbs, duas amostras mostraram-se como

*outlier* e foram removidas. O conjunto de dados para cirrose hepática não apresentou distribuição normal, portanto foi utilizado Teste de Wilcoxon. O grupo controle teve seu valor de Ct definido em 1 e a comparação não mostrou diferença significativa na expressão do gene *VEGFA*, com mediana de RQ=0,5249 e valor de  $p=0,673$  (Figura 1).

**Expressão de miRNAs.** Foi realizado o teste de expressão de miRNAs em 17 amostras de cirrose hepática e 10 amostras de controle, em quadruplicatas. Os miRNAs hsa-miR-576-5p e 920 não mostraram expressão nos tecidos. As amostras *outlier* foram omitidas e após os cálculos estatísticos para normalidade e significância (Tabela 1), foi aplicado o método de Benjamini e Hochberg para avaliação de falsos positivos em múltiplos testes e somente o miRNA hsa-miR-637 mostrou  $p$  relativo significativo. Este miRNA apresentou expressão reduzida nas amostras, com média de RQ=0,2003 e valor de  $p=0,0004$  (Figura 2).

**Correlação entre a expressão dos miRNAs e o gene *VEGFA*.** O teste de correlação de Spearman não mostrou correlação negativa significativa entre a expressão dos miRNAs e do gene *VEGFA*.

**Quantificação de proteínas.** Foi realizada a técnica de ELISA em 16 amostras de tecido cirrótico e nove amostras de tecido controle (Figuras 3 e 4). A expressão da proteína *VEGFA* não mostrou significância ( $p=0,5119$ ) em tecido cirrótico, com mediana de 9,351ng/mL, enquanto que o tecido normal apresentou mediana de 9,081ng/mL.

### **Discussão**

A Expressão do gene *VEGFA* nas amostras de cirrose hepática (CH) mostrou-se diminuída em relação ao tecido controle, porém não significativa. Von Marschall et al. (2001) encontrou expressão positiva do gene *VEGFA* em 73% das amostras testadas de tecido cirrótico e esse aumento pode estar relacionado a um estágio de formação de um tecido fibroso, onde as células expressam o *VEGFA*.<sup>14</sup> Yang et al. (2014) verificou que o aumento da expressão de *VEGFA* em ratos, provocou maior velocidade no reparo do tecido e maior atividade fibrogênica, ou seja, a expressão provocou aumento da fibrose. No entanto, nas amostras analisadas, a expressão do gene *VEGFA* indica que a formação de novos vasos nestas não está diretamente relacionada ao gene estudado.

Assim como no presente estudo, o miRNA hsa-miR-637 foi encontrado em expressão diminuída também em linhagens de carcinoma hepatocelular e, em níveis ideais, foi relatado como responsável pela inibição da formação do tumor.<sup>16</sup> Sua expressão diminuída em células de glioma, outro tipo de tumor, foi associada ao prognóstico ruim, por promover o crescimento, migração e invasão destas células. A expressão diminuída do hsa-miR-637 pode estar relacionada ao surgimento de tumor no tecido cirrótico, uma vez que este é o principal fator de risco para CHC e também um estágio pré-câncer.<sup>17</sup>

### **Conclusão**

O microRNA hsa-miR-637 encontra-se em expressão diminuída em CH.

Estudos com biomarcadores podem auxiliar no diagnóstico e prognóstico da doença, enquanto que o estudo da interação dos miRNAs com genes alvo

podem auxiliar no desenvolvimento de novas terapias adjuvantes no tratamento da cirrose hepática.

### **Referências**

1. Schuppan D, Afdhal NH. Liver cirrhosis. *Lancet* 2008;371(9615):838-851.
2. Raphe R, Duca WJ, Arroyo-Jr PC, Silva RC, Silva RF. Hepatocellular carcinoma: risk factors, diagnosis, staging and treatment in a Referral Centre. *Journal of Cancer Therapy* 2013;4:384-393.
3. Sabbagh C, Cosse C, Chauffert B, Nguyen-Khac E, Joly J, Yzet T et al. Management of colon cancer in patients with cirrhosis: a review. *Surg Oncol* 2015;24(3):187-193.
4. Befeler AS, Palmer DE, Hoffman M, Longo W, Solomon H, Di Bisceglie AM. The safety of intra-abdominal surgery in patients with cirrhosis. Model for end-stage liver disease score is superior to child-turcotte-pugh classification in predicting outcome. *Arch Surg* 2005;140(7):650-654.
5. Forrest E. Alcohol and the liver. *Medicine* 2015;43(10):581-584.
6. Mendonça F, Soares R. Obesity and cancer phenotype: is angiogenesis a missed link? *Life Sci* 2015;139:16-23.
7. Chekulaeva M, Filipowicz W. Mechanisms of miRNA-mediated post-transcriptional regulation in animal cells. *Current Opinion in Cell Biology* 2009;21:452-460.
8. Li M, Fu W, Wo L et al. miR-128 targets genes in tumorigenesis and metastasis. *Experimental Cell Research* 2013;319:3059-3064.

- 
9. Lu Y, Zhang L, Waye MMY et al. miR-218 mediates tumorigenesis and metastasis: perspectives and implications. *Experimental Cell Research* 2015;224:173-182.
  10. Wang W, Zhang E, Lin C. MicroRNAs in tumor angiogenesis. *Life Sci* 2015;136:28-35.
  11. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real time PCR quantitative and the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  method. *Methods* 2001;25(4):402-408.
  12. Benjamini Y, Hochberg Y. Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *J R Statist Soc B* 1995;57(1):289-300.
  13. Von Marschall Z, Cramer T, Höcker M, Finkenzeller G, Wiedenmann B, Rosewicz S. Dual mechanism of vascular endothelial growth factor upregulation by hypoxia in human hepatocellular carcinoma. *Gut* 2001;48:87-96.
  14. Fernández M, Semela D, Bruix J, Colle I, Pinzani M, Bosch J. Angiogenesis in liver disease. *J Hepatol* 2009;50:604-620.
  15. Yang L, Kwon J, Popov Y, Gajdos GB, Ordog T, Brekken RA et al. Vascular endothelial growth factor promotes fibrosis resolution and repair in mice. *Gastroenterol* 2014;146:1339-1350.
  16. Zhang JF, He ML, Fu WM, Wang H, Chen LZ, Zhu X et al. Primate-specific microRNA-637 inhibits tumorigenesis in hepatocellular carcinoma by disrupting signal transducer and activator of transcription 3 signaling. *Hepatology* 2011;54(6):2137-2148.

17. El-Serag HB. Hepatocellular Carcinoma. N Engl J Med 2011;365:1118-1127.

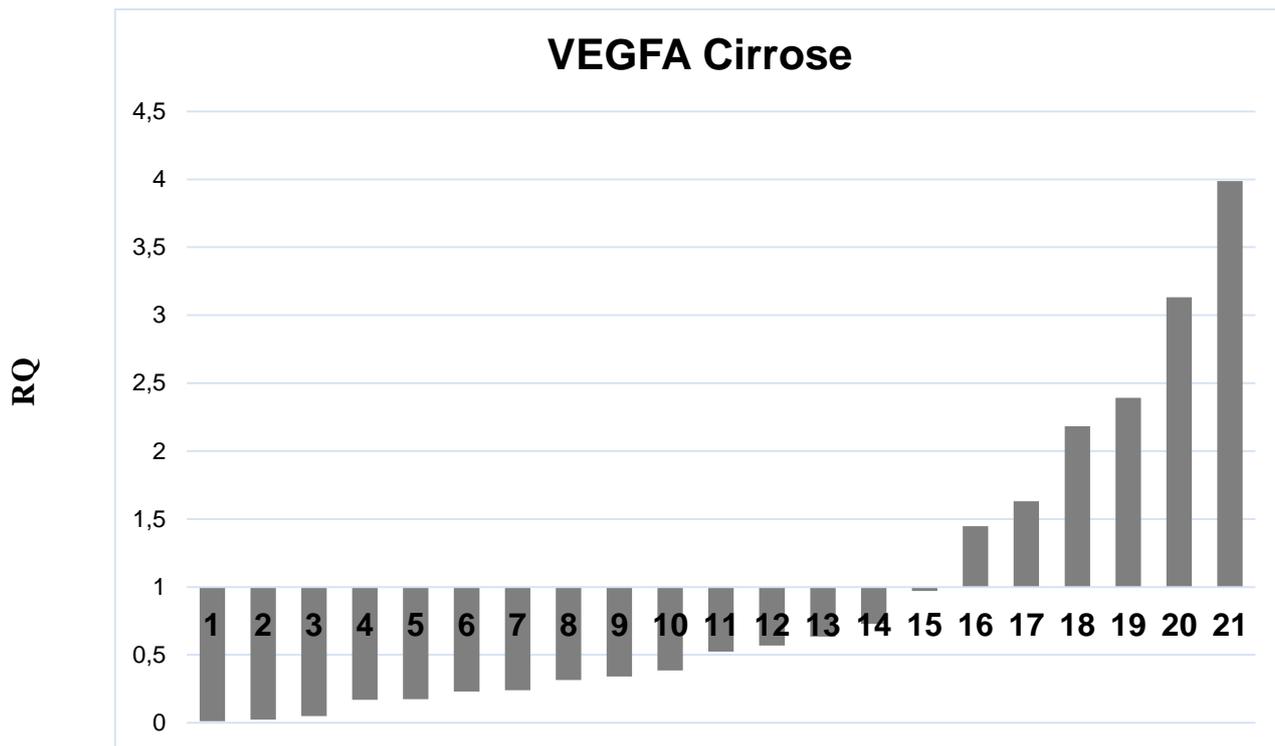


Figura 1. Distribuição das amostras e quantificação relativa em ordem crescente. Valores abaixo de 1 mostram amostras com expressão diminuída, enquanto que valores acima de 1 mostram expressão aumentada do gene *VEGFA*.

Tabela 1. Lista de miRNAs e valores obtidos.

MiRNAs	RQ		Significante
	(Média ou Mediana)	Valor de P	
hsa-miR-1	0,0972	0,0625	Não
hsa-miR-1255b	0,716	0,6953	Não
hsa-miR-125b	0,1539	0,3133	Não
hsa-miR-15b	0,1472	0,0833	Não
hsa-miR-206	0,02271	<b>0,0156</b>	Sim
hsa-miR-423	0,1638	0,4212	Não
hsa-miR-424	0,3637	0,1309	Não
hsa-miR-494	0,04581	0,1514	Não
hsa-miR-497	0,1827	0,2412	Não
hsa-miR-612	1,132	0,3594	Não
hsa-miR-637	0,2003	<b>0,0004</b>	Sim
hsa-miR-889	0,1888	0,0625	Não
hsa-miR-452	1,317	0,1034	Não

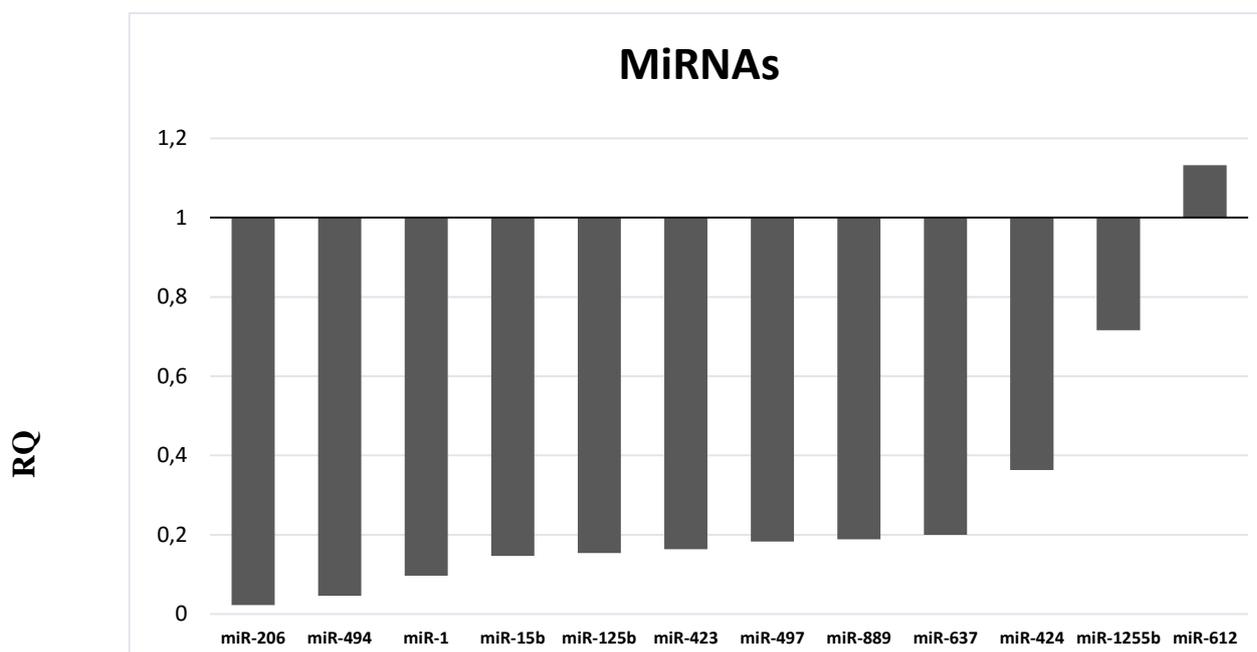


Figura 2. Gráfico com os valores de expressão dos miRNAs em ordem crescente.

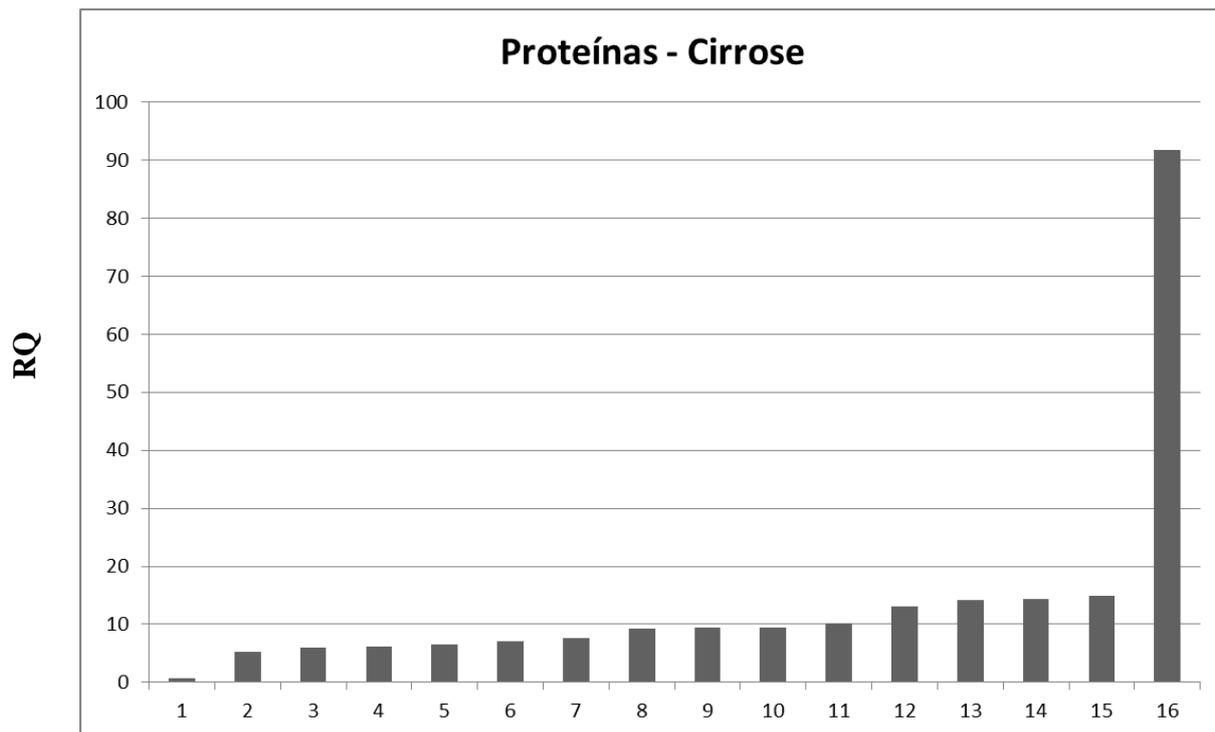


Figura 3. Gráfico mostrando os valores de quantificação de proteínas em ordem crescente no tecido cirrótico.

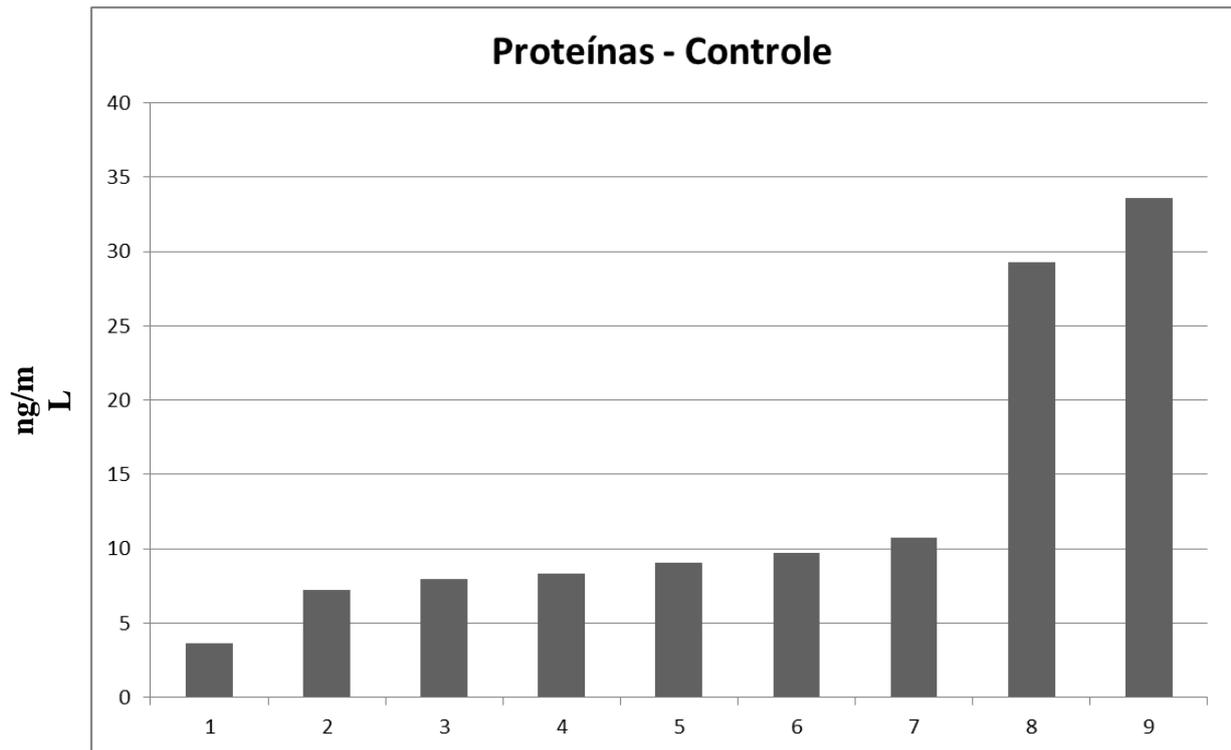


Figura 4. Gráfico mostrando os valores da quantificação de proteínas por ELISA em tecido controle (Ordem crescente).

### 3.3.ARTIGO 3: Expressão diferencial do gene *VEGFA* e miRNAs em carcinoma hepatocelular

André Rodrigues C. P. de Oliveira, Márcia M. U. Castanhole-Nunes, Patrícia M. Biselli-Chicote, Érika C. Pavarino, Eny M. Goloni-Bertollo, Renato Ferreira da Silva.

#### **Resumo**

O Carcinoma hepatocelular (CHC) é o sexto tipo de câncer mais comum no mundo e a segunda causa de morte mais comum. Os principais fatores de risco são a cirrose hepática e as hepatites virais. O tecido é altamente vascularizado e secreta fatores de crescimento, como o VEGFA, proveniente do gene *VEGFA*, que atrai vasos sanguíneos para o tumor, no processo angiogênico. Os miRNAs são reguladores dos genes, ligando-se ao RNA mensageiro (mRNA) para inibir a tradução de proteínas e são fitas simples com aproximadamente 22 nucleotídeos. O objetivo do trabalho foi avaliar a expressão do gene *VEGFA* e 17 miRNAs preditos como reguladores deste gene em CHC. Foram coletadas 12 amostras de tecido hepático normal e 16 amostras de CHC. A extração de RNA e proteínas totais foi realizada por meio do kit mirVana PARIS, a técnica de PCR quantitativa em tempo real foi utilizada para quantificar a expressão dos miRNAs e do gene *VEGFA*. A expressão de proteína VEGFA foi realizada pelo ensaio imunoenzimático ELISA. A análise estatística foi avaliada por meio dos testes de Wilcoxon, Mann-Whitney e correlação de Spearman. O gene *VEGFA* foi encontrado em expressão reduzida em CHC, assim como a expressão de proteínas. Foi encontrada expressão diminuída para

os miRNAs hsa-miR-15b (mediana de RQ=0,04015; p=0,0005), hsa-miR-125b (mediana de RQ=0,01876; p=0,0005), hsa-miR-423 (mediana de RQ=0,02650; p=0,0005), hsa-miR-424 (mediana de RQ=0,00462; p=0,0156), hsa-miR-494 (mediana de RQ=0,00877; p=0,0010), hsa-miR-497 (mediana de RQ=0,04487; p=0,0005), hsa-miR-612 (mediana de RQ=0,00679; p=0,0039), hsa-miR-1255b (mediana de RQ=0,0063; p= 0,0078) e hsa-miR-637 (mediana de RQ=0,00166; p=0,0039). Não foi encontrada correlação entre os miRNAs e a expressão do gene *VEGFA*. **Conclusão:** O gene *VEGFA* encontra-se em expressão diminuída nas amostras de CHC e o tamanho do tumor é inversamente proporcional à expressão do gene. Os miRNAs hsa-miR-15b, hsa-miR-125b, hsa-miR-423, hsa-miR-424, hsa-miR-494, hsa-miR-497, hsa-miR-612, hsa-miR-1255b e hsa-miR-637 encontram-se em expressão diminuída em CHC.

### **Introdução**

O Carcinoma Hepatocelular (CHC) é o sexto tipo de câncer mais comum no mundo e a segunda causa de morte mais comum, com alta malignidade. É mais frequente em países em desenvolvimento, onde 83% dos casos ocorreram principalmente na Ásia, em 2012.<sup>1,2</sup> A cirrose hepática, o consumo de álcool, a exposição às aflatoxinas, a infecção por hepatites B e C, a hepatite autoimune e a esteatose hepática não alcoólica são fatores de risco importantes para o surgimento do CHC.<sup>3,4,5</sup> A prevenção baseia-se na vacinação contra Hepatite B e o uso de agentes que reduzem a carcinogênese em pacientes com maiores chances de desenvolver a doença (Bupathi et al., 2015).<sup>6</sup> A maioria dos pacientes é do gênero masculino, ocorrendo por volta da quinta década de vida

---

do paciente, sendo a infecção por hepatite C a causa majoritária para cirrose hepática e consequente desenvolvimento do tumor (Raphe et al., 2013).<sup>7</sup>

O tecido de CHC é altamente vascularizado, portanto o processo angiogênico representa papel importante na formação, proliferação e metástase do tumor.<sup>8</sup> O gene *VEGFA* produz o fator de crescimento endotelial vascular A, que é um importante mitógeno da matriz endotelial e atua na formação de novos vasos no tumor.<sup>9</sup> Foi relatado que a expressão de *VEGFA* em CHC aumenta conforme o desenvolvimento do tumor e que a maioria dos tumores expressam este fator de crescimento e sua oncogenicidade foi comprovada, uma vez que ele aumenta a proliferação celular.<sup>6,10</sup>

A alteração de fatores reguladores da expressão gênica pode reduzir ou elevar a expressividade e com isso, levar à formação de tumores, assim como seu crescimento e proliferação. Os microRNAs são fitas simples, de aproximadamente 22 nucleotídeos, que têm a função de regulação gênica ligando-se ao RNA mensageiro (mRNA) alvo, por sequência homóloga, completa ou parcial, levando-o à degradação ou inativação, respectivamente.<sup>11,12,13</sup> O modelo de regulação por miRNAs é modificado por alterações na expressão gênica, onde podem ocorrer desequilíbrios que podem aumentar a carcinogênese nos tecidos.<sup>14</sup>

O objetivo do presente estudo foi avaliar a expressão do gene *VEGFA* e 17 miRNAs preditos na base de dados mirDIP (<http://ophid.utoronto.ca/mirDIP/>) em 2013 como seus reguladores com ranking máximo em conservação entre espécies.

## **Pacientes e Métodos**

**Análise de miRNAs *in silico*.** Os miRNAs foram escolhidos baseados na base de dados de predição mirDIP ([ophid.utoronto.ca/mirDIP/](http://ophid.utoronto.ca/mirDIP/)), que pesquisa em diversas bases, no início do projeto, em 2013. Foram selecionados 17 miRNAs preditos para serem reguladores do gene *VEGFA*, selecionando a característica de regiões conservadas entre espécies. Os alvos escolhidos apresentavam score máximo na predição. De acordo com a escolha dos miRNAs, as placas foram customizadas pela Life Technologies.

**Amostras.** O número amostral total foi de 28, sendo 16 amostras de tecido de Carcinoma Hepatocelular (HCC) e 12 controles, em que todas foram coletadas, com assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa sob CAAE n. 0206.0.140.000-11, em cirurgias de transplantes, biópsias e videolaparoscopia em pacientes com história de CHC e sem história de doenças do fígado (Controle). As cirurgias foram realizadas no Departamento de Cirurgia da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto e Hospital de Base – Hospital Escola – (FAMERP/FUNFARME). Após a coleta, as amostras foram armazenadas em RNAlater (Life Technologies), segundo informações do fabricante e mantidas em freezer -20°C até o momento da extração de RNA e proteína.

**Extração de RNA e proteínas.** O RNA total e proteínas foram extraídos utilizando-se o kit MirVana PARIS (Life Technologies), segundo protocolo fornecido. A quantificação de RNA total foi realizada no aparelho Picodrop Pico200 e foram levadas em consideração as razões 230/280 e 260/280 para garantir a pureza e precipitação de sais, respectivamente. A proteína total das amostras foi quantificada no equipamento Nanodrop (Thermo Scientific),

---

utilizando-se o método BCA Protein Assay (Pierce). As amostras de ácido ribonucleico e proteínas foram armazenadas em freezer -80°C para posterior utilização em análise de expressão gênica, de miRNAs e proteínas.

**Transcriptase reversa.** O cDNA para expressão do gene *VEGFA* foi obtido utilizando-se o kit High Capacity (Life Technologies), segundo informações fornecidas pelo fabricante, a partir da mistura da solução de reagentes e amostras de RNA e ciclagem em termociclador para amplificação das amostras utilizando primers randômicos. Para os miRNAs foi utilizado o kit TaqMan MiRNA Reverse Transcription (Life Technologies), de acordo com protocolo fornecido e ciclagem em termociclador para amplificação das amostras.

**RT-qPCR.** A PCR quantitativa em tempo real foi realizada em termociclador StepOnePlus (Applied Biosystems), em triplicata, utilizando-se o primers e sonda fornecidos pela empresa Life Technologies para gene *VEGFA* (Hs00900055\_m1), para as 18 isoformas de mRNA que são transcritas. Foram utilizados três controles endógenos que foram validados por meio da curva padrão no tecido, *HPRT1*, *GAPDH* e *RPLPO*, utilizando-se os kits fornecidos pela Life Technologies (corante FAM e sonda MGB). A expressão dos 17 miRNAs preditos para serem reguladores do gene *VEGFA* foi realizada por meio de placas customizadas TaqMan MiRNA Custom Plates (Applied Biosystems) contendo os miRNAs hsa-miR-1, hsa-miR-15b, hsa-miR-125b, hsa-miR-206, hsa-miR-423-3p, hsa-miR-424, hsa-miR-452, hsa-miR-494, hsa-miR-497, hsa-miR-576-5p, hsa-miR-612, hsa-miR-637, hsa-miR-874, hsa-miR-889, hsa-miR-920, hsa-miR-1255a e hsa-miR-1255b. Os testes foram realizados em

quadruplicada, uma placa por amostra, utilizando-se três controles endógenos (RNU44, U6 e RNU48). Foi obtido o *Threshold Cycle* (Ct) e o método utilizado para quantificação relativa foi  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ .<sup>15</sup>

**Quantificação de proteína VEGFA.** O teste para quantificação de proteína VEGFA utilizado foi o Ensaio Imunoenzimático com anticorpos específicos – ELISA Duo Set (R&D Systems), em que a placa foi sensibilizada com anticorpos de captura por um período overnight (mantida por 12 horas em temperatura ambiente), após esta etapa, foram realizadas três lavagens com tampão de lavagem e preparação com reagente diluente por uma hora em temperatura ambiente, em seguida os padrões e as amostras de proteína, com concentração de  $2\mu\text{g}/\mu\text{L}$ , foram inseridos nos poços, em duplicatas. Foi repetida a lavagem, adicionado anticorpo de detecção e incubado em temperatura ambiente por 2 horas. Após três lavagens, foi adicionada estreptavidina e mantida por 20 minutos em ausência de luz. Essa placa foi então lavada novamente e adicionada solução de substrato por 20 minutos. Com isso, a solução nos poços adquiriu uma cor azulada característica. A solução de parada foi adicionada para dar uma coloração amarelada. A análise foi realizada por espectrofotômetro (Thermo Scientific) com filtro de 450nm, por meio do software SkanIt (Thermo Scientific), utilizando-se sete padrões, também em duplicata, como via de comparação para o cálculo da concentração de proteína VEGFA nas amostras.

**Análise Estatística.** O software GraphPad Prism foi utilizado para executar os testes estatísticos. Foram realizados os testes de grubbs para detecção de *outliers*, de normalidade de D’Agostino e Pearson, teste t ou teste

de Wilcoxon e teste de Mann-Whitney. O teste de correlação de Spearman foi utilizado para avaliar a correlação entre a expressão do gene *VEGFA* e as expressões dos miRNAs. A correção para múltiplos testes dos miRNAs foi realizada por meio do método de Benjamini & Hochberg (1995), para controle de falso positivo, e somente valores de p menores que 0,05 foram considerados significantes.

### **Resultados**

**Dados obtidos dos tumores.** A mediana das idades dos pacientes foi de 57 anos (50%). Os tumores obtidos eram do tipo Carcinoma Hepatocelular trabecular em sua maioria (62,5%), grau de Edmondson-Steiner II em 63,6%, dados estes obtidos dos resultados de anatomia patológica. Em relação ao tamanho, 50% dos tumores coletados eram menores que 2,05cm (mediana). A cirrose hepática acometeu 93,75% dos pacientes, onde 18,75% apresentaram sorologia positiva para Hepatite B, 43,75% para Hepatite C, 12,5% para hepatite alcoólica, 6,25% para autoimune e 18,75% tinham outro tipo de doença ou somente CHC. (Tabela 1).

**Expressão do gene *VEGFA*.** Das 16 amostras coletadas de CHC e 12 amostras de tecido hepático saudável, foi possível obter resultados de Ct em todas as amostras tumorais e em 11 para o grupo controle. O conjunto de dados para o CHC apresentou distribuição normal, portanto utilizou-se o teste t de uma amostra.

Ao comparar o grupo de tumor com o grupo normal, verificou-se diferença significativa na expressão do gene *VEGFA* ( $p < 0,0001$ ), com média de

RQ=0,3448 demonstrando a diminuição da expressão nessas amostras (Figura 1).

A expressão do gene *VEGFA* foi correlacionada negativamente com a extensão do tumor ( $r = -0,642$ ;  $p = 0,015$ ), de acordo com a Correlação se Spearman, e a mediana dos tamanhos tumorais foi 2,05cm.

**Expressão de miRNAs.** Foi realizado um total de 23 placas customizadas, contendo uma amostra cada, sendo 13 amostras de CHC e 10 amostras de controle. Não foi possível determinar a expressão dos miRNAs hsa-miR-576-5p e 920, devido a não amplificação das amostras. A análise da expressão dos 15 miRNAs relacionados com o gene *VEGFA* restantes demonstrou resultados em 13 miRNAs (Tabela 2)

A expressão diminuída foi observada nos miRNAs hsa-miR-15b (mediana 0,04015;  $p=0,0005$ ), hsa-miR-125b (mediana 0,01876;  $p=0,0005$ ), hsa-miR-423 (mediana 0,02650;  $p=0,0005$ ), hsa-miR-424 (mediana 0,00462;  $p=0,0156$ ), hsa-miR-494 (mediana 0,00877;  $p=0,0010$ ), hsa-miR-497 (mediana 0,04487;  $p=0,0005$ ), hsa-miR-612 (mediana 0,00679;  $p=0,0039$ ), hsa-miR-1255b (mediana 0,0063;  $p= 0,0078$ ) e hsa-miR-637 (mediana 0,00166;  $p=0,0039$ ) (Figura 2).

**Correlação entre a expressão do gene *VEGFA* e os miRNAs.** Não foi observada correlação negativa entre a expressão do gene *VEGFA* e a expressão dos miRNAs.

**Quantificação de proteína *VEGFA*.** Obteve-se quantificação de proteínas suficiente para nove amostras de controle e 13 amostras tumorais. O conjunto de dados mostrou diferença significativa ( $p=0,0209$ ) entre a expressão

de proteína VEGFA nas amostras de CHC (mediana=6,422ng/mL) e controle (mediana=9,081ng/mL).

### **Discussão**

A mediana das idades dos pacientes encontrada foi de 57 anos. Nos EUA, a média dos diagnósticos é de 65 anos, na Índia, é de 40 a 70 anos e o risco cumulativo para a idade de 75 anos mundial é de 1,6 para homens e 0,6 para mulheres.<sup>1,17,18</sup> A incidência de cirrose hepática encontrada foi de 93,75% dos pacientes estudados, sendo considerado o estágio pré-câncer que representa o maior fator de risco para CHC.<sup>19</sup>

A expressão do gene *VEGFA* mostrou-se reduzida na maioria das amostras tumorais e o resultado da expressão de proteínas corrobora com o achado. Foi observado que em tumores de tamanho maior que 2,05cm, a expressão de *VEGFA* estava diminuída, e em tumores de tamanho menor, a expressão do gene estava elevada. Yamaguchi et al (1998) também observou esse contraste do tamanho do tumor com a expressão gênica, onde em tumores maiores que 3cm foi encontrada expressão negativa. A expressão aumentada de *VEGFA* foi relatada em tumores, porém não há referência do tamanho tumoral e poucos estudos avaliam este dado.<sup>6,10,21</sup> Esta relação inversa pode ocorrer pela necessidade de formação de novos vasos para o crescimento do tumor menor e hipóxia, enquanto tumores maiores podem secretar outros fatores de crescimento não avaliados neste trabalho, como TGF $\beta$ , bFGF, TNF $\alpha$ , IL-8.<sup>22</sup>

O hsa-miR-15b foi encontrado em expressão diminuída. Na insuficiência aguda do fígado, reduções do nível deste miR sugerem a redução do processo de apoptose, contribuindo para a sobrevivência e proliferação de

células tumorais.<sup>23</sup> Esse miRNA em expressão reduzida foi observado por Wu et al (2014) e também relacionado com a proliferação do tumor. Foi observado, como regulador do gene *VEGFA* em carcinoma nasofaríngeo em condições de hipóxia, onde a expressão deste gene foi reduzida com a expressão aumentada do miRNA em questão.<sup>25,26</sup> Em gliomas, o miR-15b também foi responsável por reduzir a angiogênese, porém com outros genes (*NRP-2* e *MMP-3*) como alvo.<sup>27</sup> Chung et al. (2010) relatou que este miRNA em alta expressão diminui o risco de recorrência de CHC após ressecção, mostrando que é um importante marcador de prognóstico para este tipo de tumor.

Na literatura, o miR-125b foi encontrado em expressão diminuída em CHC, o que aumentou o crescimento das células *in vitro*. O aumento da expressão em testes reprimiu a invasão celular e metástase tumoral e também relacionou o baixo nível ao prognóstico ruim.<sup>29,30</sup>

O hsa-miR-423 em expressão elevada aumentou a proliferação celular em linhagens de câncer de mama e CHC<sup>31,32</sup>, sugerindo um marcador de bom prognóstico neste estudo.

O hsa-miR-424 foi encontrado em expressão diminuída em CHC por Yu et al. (2014) e neste estudo, nestes níveis, foi demonstrado que a supressão da migração e invasão celular não ocorreu, contribuindo para o desenvolvimento do tumor. Chamorro-Jorganes et al. (2011) relatou que este miRNA é responsável pela regulação da angiogênese, tendo como alvo o gene *VEGFR2* nas células endoteliais.

O hsa-miR-494 foi relacionado ao ciclo celular em CHC e sua supressão reduz a transformação celular. Em câncer gástrico sua expressão diminuída foi correlacionada ao prognóstico ruim.<sup>35,36</sup>

O hsa-miR-497 foi encontrado em expressão diminuída em CHC e câncer de mama, e relacionado como supressor do crescimento celular, proliferação, invasão e indução da apoptose.<sup>37,38,39</sup> Em câncer de ovário, sua expressão aumentada foi relacionada à supressão da expressão do gene *VEGFA*.<sup>40</sup>

O hsa-miR-612 suprime as células tronco e a cascata de invasão local e metástase em CHC.<sup>41,42</sup> Este miRNA encontrado em expressão diminuída, pode ser um marcador importante para este tipo de câncer.

O hsa-miR-637 foi observado em expressão diminuída em CHC. Zhang et al. (2011) relacionou o nível elevado à inibição do crescimento e apoptose de CHC e linhagens celulares, portanto este dado pode revelar prognóstico ruim para pacientes com expressão diminuída deste miRNA.

O hsa-miR-1255b não foi encontrado em nenhum estudo funcional na literatura pesquisada.

Os miRNAs encontrados, apesar de não apresentarem relação direta aparente com o gene *VEGFA*, são importantes biomarcadores tumorais, uma vez que foram relatados na literatura como reguladores nas funções de crescimento, proliferação, metástase e invasão das células tumorais. A expressão alterada pode influenciar no prognóstico de CHC, podendo habilitar perfis de expressão para este tumor, relacionando-os ao surgimento do câncer e à sobrevida dos pacientes, direcionando a detecção e o tratamento.

A expressão do gene *VEGFA*, assim como destes miRNAs foi observada em níveis reduzidos, o que não sugere uma interação, porém testes em outros tecidos podem revelar alguma relação, devido aos diversos perfis de expressão encontrados nos diferentes tecidos.

### **Conclusão**

O gene *VEGFA* encontra-se em expressão diminuída nas amostras tumorais estudadas e o tamanho dos tumores é inversamente proporcional à sua expressão. Os miRNAs hsa-miR-15b, hsa-miR-125b, hsa-miR-423, hsa-miR-424, hsa-miR-494, hsa-miR-497, hsa-miR-612, hsa-miR-1255b e hsa-miR-637 encontram-se em expressão diminuída em CHC.

A relação direta ou indireta dos miRNAs com o gene *VEGFA* pode trazer conhecimentos importantes a respeito de novas terapias e alvos terapêuticos, assim como o surgimento de novos biomarcadores relacionados a diagnóstico e prognóstico em carcinoma hepatocelular.

### **Referências**

- 1- Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R et al. Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer* 2015;136(5):E359-E386.
- 2- Gomaa AI, Waked I. Recent advances in multidisciplinary management of hepatocellular carcinoma. *World J Hepatol* 2015;7(4):673-687.
- 3- El-Serag HB. Epidemiology of viral hepatitis and hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 2012;142:1264-1273.
- 4- Kar P. Risk Factors for hepatocellular carcinoma in india. *J Clin Exp Hepatol* 2014;4:S34-S42.

- 5- Bodzin AS, Butsutil RW. Hepatocellular carcinoma: Advances in diagnosis, management, and long-term outcome. *World J Hepatol* 2015;7(9):1157-1167.
- 6- Bupathi M, Kaseb A, Meric-Bernstam F et al. Hepatocellular carcinoma: where there is unmet need. *Molecular Oncology* 2015;doi:10.1016/j.molonc.2015.06.005
- 7- Raphe R, Duca WJ, Arroyo-Jr PC, Silva RC, Silva RF. Hepatocellular carcinoma: risk factors, diagnosis, staging and treatment in a referral centre. *Journal of Cancer Therapy* 2013;4:384-393.
- 8- Haratake J, Scheuer PJ. An immunohistochemical and ultrastructural study of the sinusoids of hepatocellular carcinoma. *Cancer* 1990;65(9):1985-1993.
- 9- Biselli-Chicote PM, Oliveira AR, Pavarino EC et al. *VEGF* gene alternative splicing: pro- and anti-angiogenic isoforms in cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* 2012;138(3):363-370.
- 10-Llovet JM. Focal gains of *VEGFA*: candidate predictors of sorafenib response in hepatocellular carcinoma. *Cancer Cell* 2014;25:560-562.
- 11-Chekulaeva M, Filipowicz W. Mechanisms of miRNA-mediated post-transcriptional regulation in animal cells. *Current Opinion in Cell Biology* 2009;21:452-460.
- 12-Li M, Fu W, Wo L et al. miR-128 targets genes in tumorigenesis and metastasis. *Experimental Cell Research* 2013;319:3059-3064.

- 13-Lu Y, Zhang L, Waye MMY et al. miR-218 mediates tumorigenesis and metastasis: perspectives and implications. *Experimental Cell Research* 2015;224:173-182.
- 14-Wang W, Zhang E, Lin C. MicroRNAs in tumor angiogenesis. *Life Sci* 2015;136:28-35.
- 15-Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real time PCR quantitative and the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  method. *Methods* 2001;25(4):402-408.
- 16-Benjamini Y, Hochberg Y. Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *J R Statisc Soc B* 1995;57(1):289-300.
- 17-Acharia SK. Epidemiology of hepatocellular carcinoma in india. *J Clin Exp Hepatol* 2014;4(s3):S27-S33.
- 18-Lafaro KJ, Demirjian AN, Pawlik TM. Epidemiology of hepatocellular carcinoma. *Surg Oncol Clin N Am* 2015;24(1):1-17.
- 19-EI-Serag HB. Hepatocellular Carcinoma. *N Engl J Med* 2011;365:1118-1127.
- 20-Yamaguchi R, Yano H, Iemura A et al. Expression of vascular endothelial growth fator in human hepatocelular carcinoma. *Hepatology* 1998;28(1):68-77.
- 21-Von Marschall Z, Cramer T, Höcker M, Finkenzeller G, Wiedenmann B, Rosewicz S. Dual mechanism of vascular endothelial growth factor upregulation by hypoxia in human hepatocellular carcinoma. *Gut* 2001;48:87-96.

- 22-Jeng K, Chang C, Jeng W et al. Heterogeneity of hepatocellular carcinoma contributes to cancer progression. *Critical Review in Oncology/Hematology* 2015;94:337-347.
- 23-An F, Gong B, Wang H et al. miR-15b and miR-16 regulate TNF mediated hepatocyte apoptosis via BCL2 in acute liver failure. *Apoptosis* 2012;17(7):702-716.
- 24-Wu C, Yen C, Chou R et al. Downregulation of microRNA-15b by hepatitis B virus X enhances hepatocellular carcinoma proliferation via fucosyltransferase 2-induced Globo H expression. *International Journal of Cancer* 2014;134(7):1638-1647.
- 25-Hua Z, Lv Q, Ye W et al. MiRNA-directed regulation of VEGF and other angiogenic factors under hypoxia. *PLOS One* 2006;1:e116.
- 26-Madanecki P, Kapoor N, Bebok Z et al. Regulation of angiogenesis by hypoxia: the role of microRNA. *Cell Mol Biol Lett* 2013;18(1):47-57.
- 27-Zheng X, Chopp M, Lu Y et al. MiR-15b and miR-152 reduce glioma cell invasion and angiogenesis via NRP-2 and MMP-3. *Cancer Letters* 2013;329:146-154.
- 28-Chung GE, Yoon J, Myung SJ et al. High expression of microRNA-15b predicts a low risk of tumor recurrence following curative resection of hepatocellular carcinoma. *Oncology Reports* 2010;23:113-119.
- 29-Alpini G, Glaser SS, Zhang J et al. Regulation of placenta growth factor by microRNA-125b in hepatocellular cancer. *J Hepatol* 2011;55:1339-1345.

- 30-Bi Q, Tang S, Xia L et al. Ectopic expression of miR-125a inhibits the proliferation and metastasis of hepatocellular carcinoma by targeting MMP11 and VEGF. *PLOS One* 2012;7(6):e40169.
- 31-Zhao H, Gao A, Zhang Z et al. Genetic analysis and preliminary function study of miR-423 in breast cancer. *Tumor Biol* 2015;doi:10.1007/s13277-015-3126-7.
- 32-Lin J, Huang S, Wu S et al. MicroRNA-423 promotes cell growth and regulates G1/S transition by targeting p21Cip1/Waf1 in hepatocellular carcinoma. *Carcinogenesis* 2011;32(11):1641-1647.
- 33-Yu L, Ding G, He c et al. MicroRNA-424 is down regulated in hepatocellular carcinoma and suppresses cell migration and invasion through c-Myb. *PLOS One* 2014;9(3):e91661.
- 34-Chamorro-Jorganes A, Araldi E, Penalva LOF et al. MicroRNA-16 and microRNA-424 regulate cell-autonomous angiogenic functions in endothelial cells via targeting vascular endothelial growth factor receptor-2 and fibroblast growth factor receptor-1. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2011;31:2595-2606.
- 35-He W, Li Y, Chen X et al. miR-494 acts as an anti-oncogene in gastric carcinoma by targeting c-myc. *Journal of gastroenterology and hepatology* 2014;29(7):1427-1434.
- 36-Lim L, Balakrishnan A, Huskey N et al. MicroRNA-494 within an oncogenic microRNA megacluster regulates G<sub>1</sub>/S transition in liver tumorigenesis through suppression of mutated in colorectal cancer. *Hepatology* 2014;59:202-215.

- 37-Li D, Zhao Y, Liu C et al. Analysis of miR-195 and miR-497 expression, regulation and role in breast cancer. *Clin Cancer Res* 2011;17(7):1722-1730.
- 38-Shen L, Li J, Xu L et al. MiR-497 induces apoptosis of breast cancer cells by targeting Bcl-w. *Experimental and Therapeutic Medicine* 2012;3(3):475-480.
- 39-Furuta M, Kozaki K, Tanimoto K et al. The tumor-suppressive miR-497-195 cluster targets multiple cell-cycle regulators in hepatocellular carcinoma. *PLOS One* 2013;8(3):e60155.
- 40-Wang W, Ren F, Wu Q et al. MicroRNA-497 suppresses angiogenesis by targeting vascular endothelial growth factor A through the PI3K/AKT and MAPK/ERK pathways in ovarian cancer. *Oncology Reports* 2014;32(5):2127-2133.
- 41-Tao Z, Wan J, Zeng L et al. MiR-612 suppresses the invasive-metastatic cascade in hepatocellular carcinoma. *J Exp Med* 2013;210(4):789-803.
- 42-Tang J, Tao Z, Wen D et al. MiR-612 suppresses the stemness of liver cancer via Wnt/ $\beta$ -catenin signaling. *Biochem Biophys Res Commun* 2007;282(4):2135-2143.
- 43-Zhang J, He M, Fu W. Primate-specific microRNA-637 inhibits tumorigenesis in hepatocellular carcinoma by disrupting signal transducer and activator of transcription 3 signaling. *Hepatology* 2011;54:2137-2148.

Tabela 1. Idades dos pacientes, tipo de tumor coletado (resultado da análise anátomopatológica), grau de Edmondson-Steiner, sorologia para Hepatites, presença ou ausência de cirrose hepática, tamanho do tumor e quantificação relativa (RQ).

Amostr	Idade	CHC	Grau	Hepatite	Cirrose	Tamanho	RQ
T1	47	Trabecular	2	B	Sim	1,4	7,272163356
T2	69	Trabecular	3	B	Sim	3,1	0,592220031
T3	58	---	-	C	Sim	2,5	0,17669101
T4	59	Trabecular	2	B	Sim	1,4	0,221014041
T5	49	Trabecular	2	C	Sim	2,8	0,227456308
T6	64	Moderadamente diferenciado	-	Hemocromatose	Sim	4,3	0,422348391
T7	56	Trabecular	3	Alcoólica	Sim	2	0,110050369
T8	25	Hepatocelular	-	Doença de Wilson	Sim	1,4	3,029667303
T9	53	Hepatocelular	-	C	Sim	1	1,853736083
T10	48	Trabecular	2	C	Sim	8,5	0,081823197
T11	63	Trabecular	3	C	Sim	1,3	2,864153882
T12	70	Moderadamente diferenciado	4	C	Sim	5	0,338445223
T13	74	---	-	Ausente	Não	3,8	0,062046144
T14	57	Trabecular	2	Auto-imune	Sim	1,2	1,980410758
T15	56	Trabecular	2	Alcoólica	Sim	2,1	0,247036803
T16	63	Trabecular	2	C	Sim	2	0,090409508

Tabela 2. MiRNAs e os valores obtidos.

MiRNAs	Mediana/Média de RQ	Valor de P	Significante
hsa-miR-1	0,00731	0,0625	Não
hsa-miR-1255b	0,00639	0,0078	Sim
hsa-miR-125b	0,01876	0,0005	Sim
hsa-miR-15b	0,04015	0,0005	Sim
hsa-miR-206	0,00174	1,0000	Não
hsa-miR-423	0,02650	0,0005	Sim
hsa-miR-424	0,00462	0,0156	Sim
hsa-miR-494	0,00877	0,0010	Sim
hsa-miR-497	0,04487	0,0005	Sim
hsa-miR-612	0,00679	0,0039	Sim
hsa-miR-637	0,00166	0,0039	Sim
hsa-miR-889	0,00309	0,1250	Não
hsa-miR-452	1,366	0,1960	Não

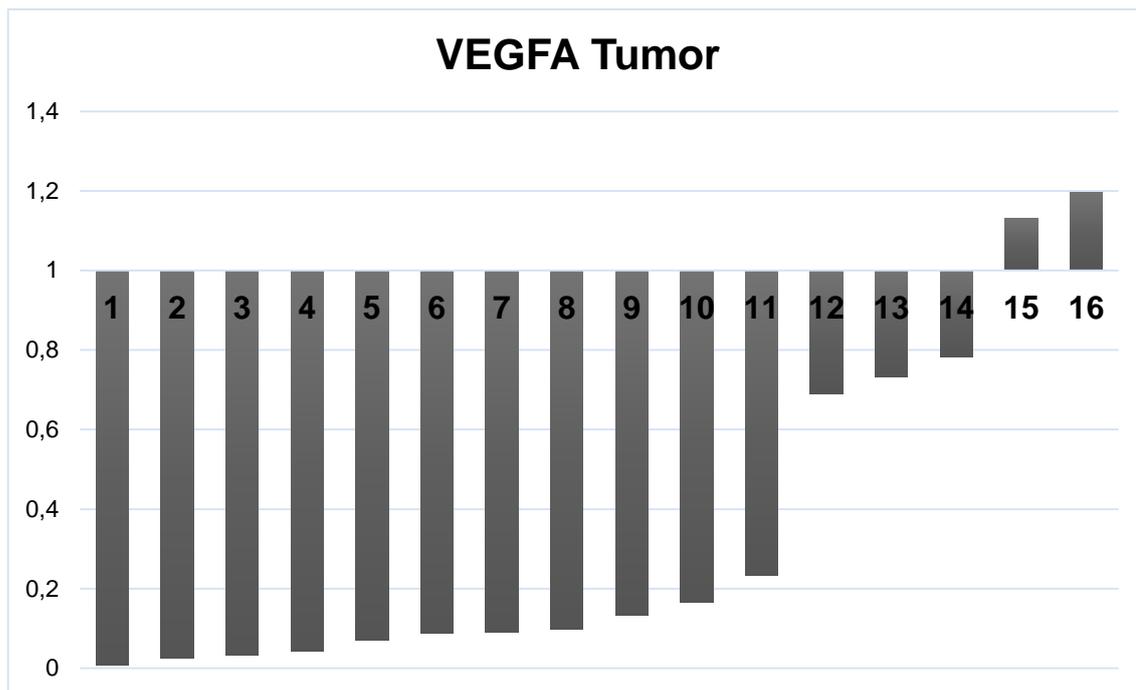


Figura 1. Organização das amostras e quantificação relativa em ordem crescente (Valor de referência: 1), onde as amostras acima de um mostraram expressão elevada e valores abaixo de um mostraram expressão diminuída.

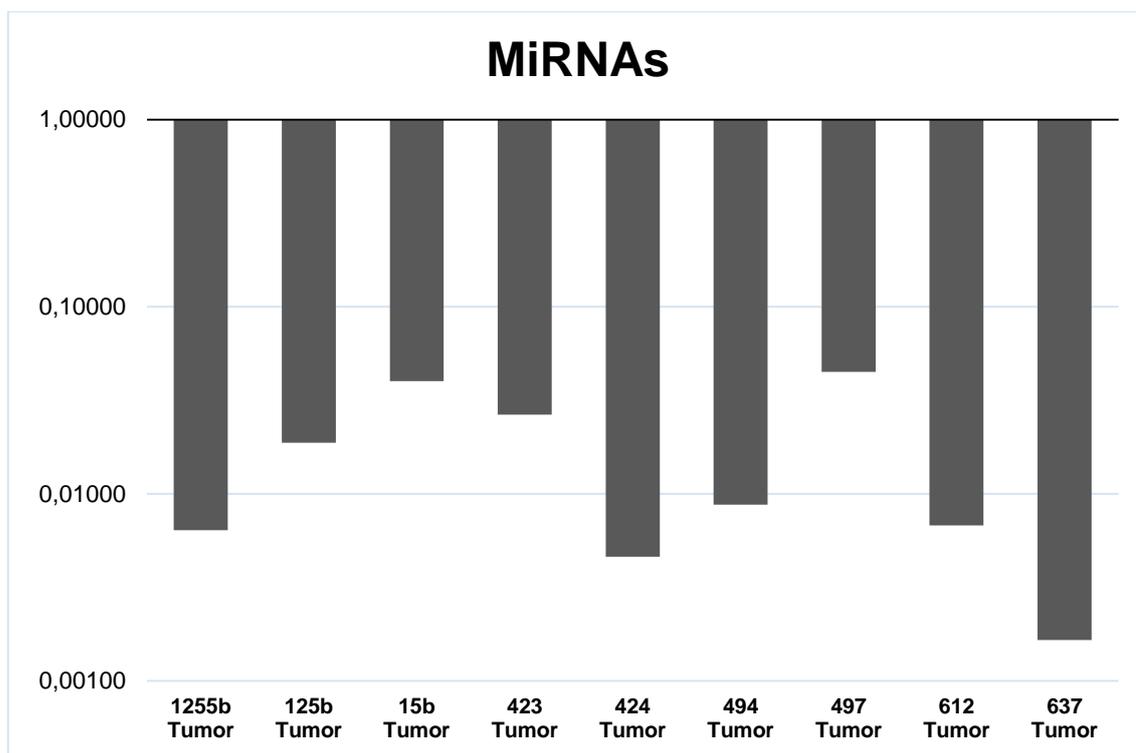


Figura 2. Gráfico da expressão dos miRNAs.

## ***Conclusões***

---

#### **4. CONCLUSÕES**

- 1- O gene *VEGFA* encontra-se em expressão reduzida em Carcinoma Hepatocelular;
- 2- O microRNA hsa-miR-637 encontra-se em expressão diminuída em CH;
- 3- Os miRNAs hsa-miR-15b, hsa-miR-125b, hsa-miR-423, hsa-miR-424, hsa-miR-494, hsa-miR-497, hsa-miR-612, hsa-miR-1255b e hsa-miR-637 encontram-se em expressão diminuída em CHC; e
- 4- A expressão das proteínas *VEGFA* está diminuída em carcinoma hepatocelular, corroborando com o encontrado para a expressão gênica.

## ***Referências***

---

## 5. REFERÊNCIAS

1. Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism and function. *Cell* 2004;116:281-97.
2. Bates DO, MacMillan PP, Manjaly JG *et al.* The endogenous anti-angiogenic family of splice variants of VEGF, VEGF<sub>xxx</sub>b, are down regulated in pre-eclamptic placentae at term. *Clin Sci* 2006;110:575-85.
3. Biselli-Chicote PM, Oliveira ARCP, Pavarino EC *et al.* VEGF gene alternative splicing: pro- and anti-angiogenic isoforms in cancer. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2012;138(3):363-70.
4. Branco F, Mattos AA, Coral GP *et al.* Occult hepatitis B virus infection in patient with chronic liver disease to hepatitis C virus and hepatocellular carcinoma in Brazil. *Arq Gastroenterol*, 2007;44:58-63.
5. Bruix J, Sherman M. Management of hepatocellular carcinoma: an update. *Hepatology*, 2011;53(3):1020-2.
6. Bruix J, Sherman M, Llovet JM *et al.* Clinical management of hepatocellular carcinoma. Conclusions of the Barcelona-2000 EASL Conference. *Journal of Hepatology*, 2001;35:421-30.
7. Caporali A, Emanuelli C. MicroRNA regulation in angiogenesis. *Vascular Pharmacology* 2011;55:79-86.
8. Carrilho FJ, Kikuchi L, Branco F *et al.* Clinical and epidemiological aspects of hepatocellular carcinoma in Brazil. *CLINICS* 2010;65(12):1285-90.
9. Chekulaeva M, Filipowicz W. Mechanisms of miRNA-mediated post-transcriptional regulation in animal cells. *Current Opinion in Cell Biology* 2009;21:452-460.

- 
10. Cillo U, Vitale A, Grigoletto F *et al.* Prospective validation of the barcelona clinic liver cancer staging system. *Journal of Hepatology* 2006;44:723-31.
  11. Conte VP. Carcinoma hepatocelular parte 2 tratamento. *Arquivos de Gastroenterologia* 2000;37(2):133-43.
  12. Emanuelli C. MicroRNAs in vascular biology, an introduction to the vascular pharmacology special issue on microRNAs. *Vascul. Pharmacol.* 2011;55:59.
  13. Esquela-Kerscher A, Slack FJ. Oncomirs – microRNAs with a role in cancer. *Nature* 2006;6:259-69.
  14. Fattovich G, Stroffolini T, Zagni I *et al.* Hepatocellular carcinoma in cirrhosis: incidence and risk factors. *Gastroenterology* 2004;127:535-50.
  15. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R *et al.* Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer* 2015;136(5):E359-E386.
  16. Ferrara N, Gerber H, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nature Med* 2003;9(6):669-76.
  17. Gramantieri L, Fornari F, Callegari E *et al.* MicroRNA involvement in hepatocellular carcinoma. *J Cell Mol Med* 2008;12(6A):2189-204.
  18. Houck SJ, Ferrara N, Winer J *et al.* The vascular endothelial growth factor family: identification of a fourth molecular species and characterization of alternative splicing of RNA. *Mol Endocrinol* 1991;5:1806-14.
  19. Hua Z, Lv Q, Ye W *et al.* MiRNA-directed regulation of VEGF and other angiogenic factors under hypoxia. *Plos One* 2006;1(1):e116.

20. Jin-no K, Tanimizu M, Hyodo I *et al.* Circulating vascular endothelial growth factor (VEGF) is a possible tumor marker for metastasis in human hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol* 1998;33:376-82.
21. Karaa ZS, Iacovini JS, Bastide A *et al.* The VEGF IRESes are differentially susceptible to translation inhibition by miR-16. *RNA* 2009;15:249-54.
22. Kim VN. MicroRNA biogenesis: Coordinated cropping and dicing. *Nature* 2005;6:376-85.
23. Lodomery MR, Harper SJ, Bates DO. Alternative splicing in angiogenesis: the vascular endothelial growth factor paradigm. *Cancer Lett* 2007;249:133-42.
24. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 1993;75:843-8.
25. Li M, Fu W, Wo L *et al.* miR-128 targets genes in tumorigenesis and metastasis. *Experimental Cell Research* 2013;319:3059-3064.
26. Lin CJ, Gong H, Tseng H *et al.* MiR-122 targets an anti-apoptotic gene, *bcl-w*, in human hepatocellular carcinoma cell lines. *Biochemical and Biophysical Res Com* 2008;375:315-20.
27. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  method. *Methods* 2001;25(4):402-8.
28. Llovet JM, Fuster J, Bruix J. The Barcelona approach: diagnosis, staging, and treatment of hepatocellular carcinoma. *Liver Transplantation* 2004;10(2):S115-20.

29. Lu Y, Zhang L, Waye MMY et al. miR-218 mediates tumorigenesis and metastasis: perspectives and implications. *Experimental Cell Research* 2015;224:173-182.
30. Ministério da Saúde (Brasil). Secretaria de Atenção à Saúde. Instituto Nacional do Câncer (INCA). Câncer de fígado. Disponível em <[http://www.inca.gov.br/conteudo\\_view.asp?id=330](http://www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=330)> Acesso em: 09.out.2011.
31. Moon WS, Rhyu KH, Kang MJ *et al.* Overexpression of VEGF and angiopoietin 2: a key to high vascularity of hepatocellular carcinoma? *Mod Pathol* 2003;16(6):552-57.
32. Murray CJL, Lopez AD. Mortality by cause for eight regions of the world: global burden of disease study. *Lancet* 1997;349:1269-76.
33. Negrini M, Gramantieri L, Sabbioni S, Croce CM. microRNA involvement in hepatocellular carcinoma. *Anti-cancer agents in medical chemistry* 2011;11:500-521.
34. Nguyen T, Lingappa, V. Liver disease. In *Pathophysiology of Disease: An Introduction to Clinical Medicine*, 5th ed., McPhee S.J., Ganong W. F. editors. McGraw-Hill 2006.
35. Okuda K, Ohtsuki T, Obata H *et al.* Natural history of hepatocellular carcinoma and prognosis in relation to treatment. *Cancer* 1985;56:918-28.
36. Shojaei F, Ferrara N. Role of the microenvironment in tumor growth and in refractoriness/resistance to anti-angiogenic therapies. *Drug Resistance Updates* 2008;11:219-30.

- 
37. Suzuki K, Hayashi N, Miyamoto Y *et al.* Expression of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor in human hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* 1996;56:3004-9.
  38. Tammela T, Enholm B, Alitalo K *et al.* The biology of vascular endothelial growth factors. *Cardiovascular Res* 2005;65:550-63.
  39. Varnholt H. The role of microRNAs in primary liver cancer. *Annals of Hepatology* 2008;7(2):104-13.
  40. Varnholt H, Drebbler U, Schulze F *et al.* MicroRNA gene expression profile of hepatitis C virus-associated hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2008;47(4):1223-32.
  41. Venook AP, Papandreou C, Junji F *et al.* The incidence and epidemiology of hepatocellular carcinoma: a global and regional perspective. *The Oncologist* 2010;15(4):5-13.
  42. Yan H, Wu J, Liu W *et al.* MicroRNA-20a overexpression inhibited proliferation and metastasis of pancreatic carcinoma cells. *Human Gene Therapy* 2010;21:1723-34.
  43. Zhang T, Liu M, Wang C *et al.* Down-regulation of miR-206 promotes proliferation and invasion of laryngeal cancer by regulating VEGF expression. *Anticancer Res* 2011;31(11):3859-63.
  44. Zhao Y, Xie P, Fan H. Genomic profiling of microRNAs and proteomics reveals an early molecular alteration associated with tumorigenesis induced by MC-LR in mice. *Environ Sci Technol* 2012;46(1):34-41.

***Anexos***

---

## ANEXOS

### ANEXO I – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

#### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

(Conselho Nacional de Saúde, resolução 196/96)

Título da Pesquisa: **Expressão e Regulação do Gene VEGF por miRNAs em Carcinoma Hepatocelular.**

Pesquisador Responsável: \_\_\_\_\_

Eu.....,

RG....., nascido(a) em ...../...../..... e domiciliado(a) à

....., município de

....., usuário (a) (ou responsável legal pelo usuário

.....,

declaro que consinto em participar como voluntário (a) do projeto de pesquisa

**“Expressão e Regulação do Gene VEGF por miRNAs em Carcinoma Hepatocelular”** e que também fui satisfatoriamente esclarecido(a) que:

A) o objetivo do estudo é investigar o material genético de tumores de pacientes com carcinoma hepatocelular; B) durante a cirurgia, o médico irá remover o tumor e um pedaço dele não será usado para diagnóstico e poderá ser congelado e posteriormente utilizado para estudo genético/molecular. A obtenção deste fragmento não implicará em riscos adicionais na sua cirurgia e não resultará em aumento no tempo de operação ou na extensão da cirurgia; C) será utilizado um grupo controle com as margens dos tumores (tecidos aparentemente normais); D) o material será identificado no laboratório por código

formado por números e letras e, portanto, minha privacidade e identidade serão preservadas e autorizo o armazenamento do material coletado, o qual será utilizado para outro projeto somente mediante aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Instituição; E) todas as informações obtidas por meio da história clínica e os resultados serão mantidos em sigilo e que estes, só serão utilizados para divulgação em reuniões e revistas científicas; F) se eu concordar em participar desta pesquisa e se eu concordar com a retirada e uso do material, do modo descrito acima, não terei quaisquer benefícios ou direitos financeiros sobre os eventuais resultados decorrentes da pesquisa. Se eu não concordar, ou decidir retirar meu consentimento em qualquer momento, minha decisão não influenciará, de modo algum, o meu tratamento; G) esse estudo é importante porque pode colaborar para o conhecimento científico dos mecanismos envolvidos no desenvolvimento do tumor; H) Os resultados serão divulgados após a conclusão do estudo em forma de artigos científicos ou trabalhos apresentados em congressos.

Declaro que, após ter convenientemente esclarecido pelo pesquisador, consinto em participar livre e espontaneamente deste estudo sem que tenha sido submetido a qualquer tipo de pressão. Assim, consinto em participar do projeto de pesquisa em questão.

RG do prontuário médico:

Data:...../...../..... Assinatura:.....

Declaração de responsabilidade: Expliquei a natureza, objetivos, riscos e benefícios deste estudo. Coloquei-me a disposição para perguntas e respondi a todas. Obtive o consentimento de maneira livre e me coloquei à disposição para

esclarecimento de qualquer dúvida sobre o estudo pelo endereço abaixo indicado.

Pesquisador responsável:

Data:...../...../.....

Assinatura:.....

ANEXO II – DOCUMENTO DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA



**FACULDADE DE MEDICINA DE SÃO JOSÉ DO RIO PRETO**

Autarquia Estadual - Lei n.º 8899 de 27/09/94

Parecer n.º 010/2012

**COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA**

O Protocolo CEP 6228/2011 sob a responsabilidade de **André Rodrigues Clavio Pereira de Oliveira** com o título "Expressão e Regulação do Gene VEGF por miRNAs em Carcinoma Hepatocelular" está de acordo com a resolução do CNS 196/96 e foi **aprovado por esse CEP**.

Lembramos ao senhor(a) pesquisador(a) que, no cumprimento da Resolução 251/97, o Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos (CEP) **deverá receber relatórios semestrais sobre o andamento do Estudo**, bem como a qualquer tempo e a critério do pesquisador nos casos de relevância, além do envio dos relatos de eventos adversos, com certeza para conhecimento deste Comitê. **Salientamos ainda, a necessidade de relatório completo ao final do Estudo.**

São José do Rio Preto, 03 de fevereiro de 2012.

  
Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. **Beatriz Barco Tavares Jontaz Irigoyen**  
Vice-Presidente do CEP/FAMERP

---

**ANEXO III – QUESTIONÁRIO SOBRE DADOS SÓCIODEMOGRÁFICOS E  
SOBRE AS DOENÇAS**

**Questionário**

**Dados Gerais e demográficos:**

Nome: \_\_\_\_\_ Sexo: \_\_\_\_\_

Prontuário: \_\_\_\_\_

Local e data de Nascimento: \_\_\_\_\_

Endereço:

Rua: \_\_\_\_\_ Nº: \_\_\_\_\_ Fone: \_\_\_\_\_

Bairro: \_\_\_\_\_ Cidade: \_\_\_\_\_ CEP: \_\_\_\_\_

Etnia: \_\_\_\_\_ Ocupação: \_\_\_\_\_ Escolaridade: \_\_\_\_\_

Data da coleta: \_\_\_\_\_

**HISTÓRICO MÉDICO**

**Fatores de risco:**

( ) Cirrótico            ( ) Vírus B                    ( ) Vírus C

( ) Esteatohepatite    ( ) Álcool > 20gr/dia    ( ) Fumo, por quanto tempo: \_\_\_\_\_

( ) Hemocromatose    ( ) Doença de Wilson    ( ) Hepatite autoimune

( ) Viveu no campo, se sim, por quanto tempo \_\_\_\_\_

( ) Outra doença hepática, qual \_\_\_\_\_

( ) Diabetes mellitus há \_\_\_\_\_ anos;

Peso: \_\_\_\_\_ Altura: \_\_\_\_\_ IMC: \_\_\_\_\_

Qual foi o maior peso?\_\_\_\_\_ Há quanto tempo?\_\_\_\_\_  
Por quanto tempo?\_\_\_\_\_

**Dados do Tumor:**

**Diagnostico:**( ) Imagem ( ) Imagem + alfa feto ( ) Biopsia

( ) Dosagem de alfa feto:\_\_\_\_\_

( ) Localização – segmentos:\_\_\_\_\_

Tipo: ( ) nodular: nº. de nódulos:\_\_\_\_\_ Diâmetro dos nódulos\_\_\_\_\_

( ) infiltrativo

( ) Invasão vascular

**Tratamento recebido:**

Transplante ( )      Ressecção ( )      Quimioembolização (TACE) ( )

Alcoolização ( )      Sorafenibe ( )      RF (Radio Freqüência) ( )

Medidas de suporte ( )

( ) Metástase,

onde\_\_\_\_\_

Responsável pela

entrevista:\_\_\_\_\_