



CENTRO UNIVERSITÁRIO DE BRASÍLIA – UnICEUB
PROGRAMA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

THAMIRES PEREIRA BRAGA DA SILVA
RAFAEL RAMOS AMARAL

METABOLÔMICA EM PLASMA DE PACIENTES COM CARCINOMA
HEPATOCELULAR (CHC)
AVALIAÇÃO DE BIOMARCADORES PELA ESPECTROMETRIA DE MASSAS

BRASÍLIA

2018



THAMIRES PEREIRA BRAGA DA SILVA

RAFAEL RAMOS AMARAL

**METABOLÔMICA EM PLASMA DE PACIENTES COM CARCINOMA
HEPATOCELULAR (CHC)
AVALIAÇÃO DE BIOMARCADORES PELA ESPECTROMETRIA DE MASSAS**

Relatório final de pesquisa de Iniciação Científica
apresentado à Assessoria de Pós-Graduação e
Pesquisa.

Orientação: Profa. Dra. Aline Maria Araújo Martins

BRASÍLIA

2018

*Aos nossos familiares, que nos deram suporte
e amparo durante todo esse processo.
À nossa orientadora, Dra. Aline Martins, pelas
oportunidades, experiências e confiança.*

AGRADECIMENTOS

Agradecemos nossos pais e familiares que permaneceram ao nosso lado e acreditaram na importância do trabalho e das vivências que ele nos proporcionou;

Agradecemos nossa orientadora, Dra. Aline Martins, por ter confiado em nossa capacidade e nos ensinado a partir de sua atitude otimista e perseverante, mesmo nos momentos mais difíceis;

Agradecemos à nossa colaboradora Raphaela Menezes, por nos guiar por seu laboratório e pelo auxílio com os dados coletados, sem os quais o trabalho não seria realizado;

Ao Dr. José Huygens Parente Garcia, por possibilitar nossa visita ao seu serviço e pela cordialidade e prestatividade;

A todos os amigos e aqueles que nos auxiliaram, de uma forma ou de outra, durante a realização desse trabalho.

“Is life worth living? It all depends on the liver”

(William James)

**METABOLÔMICA EM PLASMA DE PACIENTES COM CARCINOMA HEPATOCELULAR
(CHC)
AVALIAÇÃO DE BIOMARCADORES PELA ESPECTROMETRIA DE MASSAS**

Thamires Pereira Braga da Silva – UniCEUB, PIC voluntário

thamires.silva@sempreceub.com

Rafael Ramos Amaral – UniCEUB, PIC voluntário

rafael.ramos@sempreceub.com

Aline Maria Araújo Martins – UniCEUB, professor orientador

aline.martins@ceub.edu.br

O carcinoma hepatocelular (CHC) é a malignidade hepática primária mais comum e constitui um problema de saúde pública a nível mundial, sendo uma causa notável de morbidade e mortalidade. Entre os fatores de risco que predisõem o desenvolvimento dessa doença, a infecção prévia pelos vírus hepatite B e hepatite C desempenha importante papel, sendo este último mais propenso a evoluir a uma forma primária neoplásica (CHC). A cirrose e o uso abusivo de álcool também são prevalentes entre os que desenvolvem essa neoplasia. Atualmente, o diagnóstico do CHC é geralmente tardio, realizado pela biópsia e por exames de imagem, de acordo com os Critérios de Barcelona, de forma que os métodos de imagem e os marcadores séricos não têm sensibilidade suficiente para a detecção do CHC em estágios iniciais. Nesse trabalho, buscou-se caracterizar o perfil de lipídeos em plasma de pacientes com CHC por espectrometria de massas, correlacionando-os com dados clínicos dos pacientes para o estabelecimento de potenciais biomarcadores moleculares. Como resultado, demonstramos que pacientes com CHC apresentam perfil lipídico em plasma diferente do expresso em indivíduos não patológicos, sendo reflexo das alterações metabólicas tumorais típicas. A identificação de íons lipídicos de maior relevância revelou alteração principalmente da classe dos glicerofosfolipídios, sendo a fosfatidilcolina (PC) o lipídio mais abundante no grupo controle, e a fosfatidiletanolamina (PE) caracteristicamente equilibrada com a PC nos grupos com CHC. Verificou-se, assim, importante mudança da razão entre PC/PE entre os grupos patológico e não patológico. Esse estudo apresenta resultados que possibilitam a descoberta de possíveis biomarcadores séricos para o CHC, sugerindo a possibilidade de exames menos invasivos e de valor diagnóstico mais sensível e específico para essa neoplasia.

Palavras-Chave: Carcinoma hepatocelular. Espectrometria de massas. Metabolômica. Medicina translacional. Biomarcador.

LISTAS DE FIGURAS, TABELAS, QUADROS, GRÁFICOS, SÍMBOLOS E ABREVIACÕES

Figura 1.....	10
Figura 2.....	11
Figura 3.....	12
Figura 4.....	13
Figura 5.....	14
Figura 6.....	15
Figura 7.....	16
Figura 8.....	17
Figura 9.....	18
Figura 10	19
Figura 11.....	20
Figura 12.....	21
Figura 13.....	22
Figura 14.....	22
Figura 15.....	23

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO E OBJETIVOS.....	1
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	2
3. METODOLOGIA.....	4
3. a) Delineamento do estudo.....	4
3. b) População da pesquisa.....	4
3. c) Descrição da preparação de amostras e análise de metabólitos.....	7
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	9
5. CONCLUSÃO.....	26

1. INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

No mundo, o câncer de fígado é responsável pela morte de 745.500 pessoas por ano, representando a segunda principal causa de morte por câncer em homens no mundo e em países menos desenvolvidos (TORRE et al., 2015). Esta neoplasia está na 6ª colocação em número de incidências e no 3º lugar em número de mortes, demonstrando taxa de letalidade de 95% (NAGHAVI et al., 2015). A maioria (70 a 90%) das neoplasias primárias do fígado se refere ao carcinoma hepatocelular - CHC (LONDON; MCGLYNN, 2006) e este exhibe uma diminuição significativa na taxa de sobrevivência de 1 ano e de 5 anos, indo de 47% para 10% (ALTEKRUSE; MCGLYNN; REICHMAN, 2009).

Estima-se que a maioria desses óbitos, cerca de 60%, ocorra em países em desenvolvimento em função do envelhecimento da sua população, mas, sobretudo, pela falta de acesso ao diagnóstico precoce da doença (GLOBOCAN/IARC, 2012). O principal fator de risco para o câncer de fígado é a fibrose hepática avançada ou cirrose, decorrente das doenças crônicas do fígado, sobretudo devido às infecções virais que causam as hepatites B e C. O vírus da hepatite B (VHB) é um DNA vírus e o da hepatite C (VHC) é um RNA vírus, podendo ambos causar mutação gênica nos hepatócitos (LOK et al., 2009; YANG et al., 2011), sendo os oncogenes virais, os principais fatores etiológicos da gênese hepato-carcinogênica em diversos países do mundo (HSU et al. 1991; BRUIX; SHERMAN, 2005).

Embora existam ferramentas radiológicas e marcadores sorológicos para a detecção precoce de CHC, a Associação Americana para o Estudo de Doenças do Fígado (AASLD) e Associação Européia para o Estudo do Fígado (EASL) recomendam apenas o uso do ultrassom, em razão dos biomarcadores atuais demonstrarem acurácia subótima (BRUIX, 2010; EASL, 2012). Desse modo, a maioria dos CHC continua a ser diagnosticada para além de um estágio inicial, destacando a necessidade de biomarcadores mais precisos para favorecer a detecção precoce de CHC (ALTEKRUSE et al., 2012; MOURAD et al., 2014; NICOLE; AMIT, 2014).

Recentemente, Luo e colaboradores (2018) publicaram um estudo com 1448 participantes em que foram avaliados marcadores associados à hepatite B e cirrose hepática a partir da cromatografia líquida com espectrometria de massas, encontrando um painel de metabólitos que apresentou performance maior que a alfafetoproteína - marcador tradicional e de baixa sensibilidade para o câncer hepático (SAUZAY et al., 2016), o que corrobora para a possibilidade do rastreio do CHC por biomarcadores de forma mais eficaz. Outros estudos

recentes indicam, por utilização de método semelhante e também com infecções por hepatite C, resultados positivos para o uso de biomarcadores para prever o CHC antes de seu aparecimento na forma clínica (JEE, S. et al., 2018; LIU et al., 2018).

Nesse trabalho, buscamos caracterizar o perfil de lipídeos em plasma presentes em amostras de pacientes patológicos (CHC) e não patológicos (doadores, controle), na busca de possíveis marcadores de diferenciação de fenótipos patológicos, correlacionando-os com dados clínicos dos pacientes para o estabelecimento de potenciais biomarcadores moleculares.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

Os cientistas que fizeram os trabalhos mais marcantes sobre os aspectos biomoleculares do câncer nas últimas décadas, Hanahan e Weiberg (2000), sugeriram que o desenvolvimento das neoplasias ocorre por meio de seis principais alterações fisiológicas adquiridas pelas células cancerígenas na evasão bem-sucedida de mecanismos de defesa antitumorais. Essas características podem ser divididas na autossuficiência em sinais de crescimento, na insensibilidade a sinais de inibição de crescimento, na evasão à apoptose, no potencial de replicação ilimitado, na angiogênese sustentada e na capacidade de invadir tecidos e criar metástases.

O entendimento desses fatores é importante para que possamos entender como as células tumorais apresentam alterações em vias de síntese de proteínas, lipídeos e ácidos nucleicos (BAENKE et al., 2013), por exemplo, uma vez que a compreensão dessas vias pode ser fundamental para que se possa comparar as diferenças entre organismos com e sem acometimento neoplásico. Os oncogenes também desempenham um papel imprescindível nesse processo, uma vez que são responsáveis pela ativação de vias de sinalização de uma forma atípica e, conseqüentemente, pela alteração da biossíntese e da abundância de múltiplas formas de lipídeos, o que impacta diretamente no tráfico de membrana, ligação de complexos aplicados na sinalização celular e em numerosos processos críticos para a transformação celular (BAENKE et al., 2013).

Infelizmente, o diagnóstico do CHC ainda é realizado, na grande maioria dos casos, de forma tardia, quando a doença já se encontra em estágio avançado, com perda de funcionalidade do órgão, o que implica na limitação das opções de tratamento e da

expectativa de vida dos pacientes acometidos (BRUIX; SHERMAN, 2005). Atualmente, os Critérios de Barcelona são utilizados para definir a detecção da doença, incluindo as análises histopatológicas da biópsia e técnicas de imagem como a ultrassonografia, tomografia computadorizada espiral, ressonância nuclear magnética e a angiografia, sendo esses os métodos considerados mais confiáveis para detecção da doença (BRUIX, 2001). No entanto, a biópsia hepática não é um procedimento recomendável para os pacientes com CHC, uma vez que possibilita metástase física do tumor (JOYCE, 2014). Os exames de imagem e os marcadores séricos utilizados, como a alfafetoproteína (AFP), des- γ -carboxiprotrombina e a fração L3 da AFP, não possuem sensibilidade suficiente para detectar o CHC em estágios iniciais.

Sendo uma doença de difícil diagnóstico e manejo, o transplante hepático é com frequência a alternativa de melhor prognóstico para os pacientes com diagnóstico tardio. Na maioria dos casos, é ele que constitui o último recurso curativo para o CHC, havendo ainda recorrência, que acomete 10% a 20% dos receptores, apesar do uso de critérios rígidos na seleção de candidatos (VIVARELLI; RISALITI, 2011). Nesse sentido, sistemas de classificação, como Okuda et al. (1985), CLIP (*Cancer of the Liver Italian Program*), CUPI (*Chinese University Prognostic Index*), Child-Pugh e MELD (*Model for End-stage Liver Disease*) foram desenvolvidos para avaliação mais apurada da severidade da insuficiência hepática e sobrevida dos pacientes com CHC (DONATO et al., 1997; KAMATH et al., 2001; OKUDA et al., 1985; PUGH et al., 1973). No Brasil, os critérios de elegibilidade para o transplante de fígado em adultos e adolescentes maiores de 12 anos consideram no presente, além do diagnóstico por Critérios de Barcelona, os Critérios de Milão (MAZZAFERRO et al., 1996) e o índice MELD, que tem importância especialmente na organização da ordem de espera para o procedimento.

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

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

Essa investigação pode ser realizada por meio de técnicas de espectrometria de massas (MS), uma técnica instrumental capaz de identificar, quantificar e elucidar propriedades físico-químicas de compostos e moléculas a partir da conversão em íons em fase gasosa e separação de acordo com a razão massa/carga (m/z) do analito. Os espectrômetros de massas – basicamente constituídos por uma fonte de íons, um sistema de alto vácuo, um analisador de massas, um detector e um sistema de aquisição de dados – geram gráficos (espectro de massas) em sinais da abundância versus razão m/z de cada íon (FENG; WANG; CHEN, 2010; GAO et al., 2017; SARVARI et al., 2014; TALEB et al., 2017). A MS pode ser como instrumentos de ionização e dessorção a *laser* assistida por matriz por tempo de voo - MALDI TOF/TOF (do inglês, *matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight*), que representam importantes alternativas para o estudo neste cenário patológico.

MALDI TOF/TOF apresenta várias vantagens em aplicações clínicas como simplicidade, baixo consumo de amostra, aquisição de dados rápida, identificação precisa e alta frequência analítica em métodos de rotina. Técnica que permite a discriminação dos íons a partir de bases de dados ou por manuais de interpretação de espectro (HANASH, 2003). A busca de biomarcadores de câncer investigados por MALDI TOF/TOF já tem sido descrita para a identificação de moléculas associados ao câncer de mama, pele e próstata (YANG, 2015; FANIA 2015).

3. METODOLOGIA

a. Delineamento do estudo

Estudo prospectivo, não intervencionista, comparativo.

b. População da pesquisa

As amostras utilizadas no presente trabalho derivam de um acervo de 19 amostras de plasma sanguíneo coletadas entre 2015 e 2016 no Centro de Transplante de Fígado do Hospital Universitário Walter Cantídeo (HUWC/UFC) em Fortaleza/Ceará. Destes, 10 (dez) correspondem à pacientes hepatopatas terminais (CHC) e 9 (nove) à pacientes doadores (não patológicos, grupo controle, CTRL). As amostras foram coletadas no momento imediatamente anterior à realização do transplante no ambulatório (momento conhecido como coleta bioquímica T0), centrifugadas na presença de EDTA para obtenção de plasma do sangue total e congeladas em *superfreezer* a -80 o C até a realização dos procedimentos laboratoriais. O projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Ceará – COMEPE (026/08), segundo os critérios preconizados pela norma vigente para pesquisa com seres humanos regulamentado na Resolução 196/96 do Ministério da Saúde. As amostras foram posteriormente analisadas no Laboratório de Bioquímica e Química de Proteínas – LBPQ/UnB.

Critérios de inclusão e exclusão

Os critérios para inclusão ou exclusão do trabalho se referem a dois grupos: o de pacientes hepatopatas terminais (pacientes hepatopatas) e o grupo controle (pacientes doadores).

Entre o grupo de hepatopatas terminais encontram-se pacientes que, por apresentarem alto grau de disfunção hepática, estratificados pelo valor de MELD e pela presença de CHC no fígado, foram submetidos ao transplante de fígado. Foram consideradas 9 (nove) amostras desse grupo para a análise lipídômica. As diretrizes dispostas na Portaria MS-GM nº 2.600, de 21 de outubro de 2009 foram as aplicadas, uma vez que nelas estão os critérios adotados pelo país no caso de pacientes hepatopatas terminais candidatos ao transplante de fígado. As condições para a inclusão dos pacientes com CHC no estudo foram:

- Pacientes que apresentarem tumor hepático irresssecável;
- Pacientes que apresentarem até três nódulos (tumor primário) ≤ 3 cm ou tumor único ≤ 5 cm, sem comprometimento vascular e sem indicação de ressecção;
- Pacientes que não apresentarem co-morbidez (ex.: doenças metabólicas, diabetes, doenças cardíacas);
- Pacientes que não apresentarem metástase extra-hepática;
- Pacientes que obtenham MELD entre 12 e 24;

- Pacientes com inflamação crônica tecidual derivada da etiologia vírus da hepatite C (VHC);
- Pacientes na faixa etária de 50 a 65 anos, sem distinção de sexo.

As condições de exclusão para os pacientes com CHC foram:

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

No grupo de pacientes controle, encontram-se 9 (nove) pacientes doadores falecidos que não apresentavam comprometimento fisiológico do fígado, representando assim a situação não patológica do experimento. Estes pacientes foram diagnosticados com morte tronco-encefálica, porém, a partir da sustentação com aparelhos, permaneceram com suas funções fisiológicas ativas, de acordo com o preconizado pela Portaria MS-GM nº 2.600, de 21 de outubro de 2009.

Nos critérios de inclusão do grupo controle, foram colocados outros critérios além daqueles dispostos na Portaria, para melhor atender as finalidades desta pesquisa:

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

Como critérios de exclusão de pacientes doadores, foram elencados:

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

c. Descrição da preparação de amostras e análise de metabólitos

Preparo de amostras e extração de metabólitos

A extração dos lipídios foi feita de acordo com o protocolo modificado de Bligh e Dyer (1959). Primeiramente, foram diluídos 150 μ L de plasma em água Milli-Q[®] (1:1, v/v) e adicionados 190 μ L de CHCl₃ e 375 μ L de MeOH. Após homogeneização por vórtex durante 2 min, foram adicionados mais 190 μ L de CHCl₃ e 150 μ L de água MilliQ[®], homogeneizando novamente por vórtex por 1 min. Para induzir separação de fases, centrifugou-se a mistura a 14000g em temperatura ambiente durante 5 min. A fase orgânica inferior foi recuperada, liofilizada em concentrador rotatório SpeedVac[™] SC100 (Savant[™]) e reconstituída em 100 μ L de solução de CHCl₃ /MeOH (1:1, v/v). Uma gota (1 μ L) foi então aplicada em um poço da placa de MALDI e espontaneamente seca ao ar livre. Posteriormente, uma gota (1 μ L) de matriz DHB (2,5- ácido dihidroxibenzoico), preparada a uma concentração de 10mg/mL⁻¹ em MeOH, foi aplicada sobre a amostra e seca ao ar livre novamente. A calibração do espectrômetro foi realizada a partir de uma mistura de fosfolípidos e peptídeos composta por fosfatidilcolina (PC), esfingomielina (SM), oleil-PC, angiotensina I, angiotensina II, substância P, bombesina, substrato de renina, peptídeo do lobo intermediário semelhante à corticotropina (1-17 e 18-39) e somatostatina (28). Estes calibrantes foram adquiridos com o auxílio dado ao projeto pelo PIC UniCeub. Todos os reagentes químicos apresentavam grau de ultrapureza.

Análise por MALDI TOF/TOF

As amostras foram analisadas no por um espectrômetro de massas tipo Autoflex III MALDI-TOF/TOF (Bruker Daltonics) equipado com um *laser* de feixe inteligente de 334nm. Os dados de espectrometria de massas (MS), em ambas as etapas, foram adquiridos em modo

refletor positivo com faixa de aquisição para lipídeos entre 600-1200 m/z. A energia do *laser* foi ajustada logo acima do limite para a produção de íons, com extração tardia de 260ns a 20kV de ionização. Com uma média de 5000 tiros a laser (1000 tiros a laser em 5 posições diferentes no mesmo poço), os espectros de massas foram adquiridos em triplicatas técnicas e coletados manualmente.

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

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

Quimiometria

O *software* MetaboAnalyst 3.0[®] (<http://www.metaboanalyst.ca>) (XIA; WISHART, 2016) foi utilizado para análise desses dados, sendo primeiramente realizado o tratamento de informações por meio do alinhamento automático dos valores m/z, normalização por soma e centralização em média dividida pela raiz quadrada do desvio padrão de cada variável (escala de Pareto). Não foram considerados os picos que apareceram em menos que 50% das amostras de cada grupo. Análises univariadas, multivariadas, de agrupamento e de classificação foram realizadas. Inicialmente, o Teste t-student não paramétrico foi empregado para avaliar a significância estatística ($p < 0.05$) dos íons lipídicos adquiridos. Em sequência, a análise multivariada não supervisionada PCA permitiu observar a tendência de agrupamento das amostras. As análises multivariadas supervisionadas PLS-DA e Orthogonal PLS-DA avaliaram a covariância presente no conjunto de dados, sendo a segunda análise mais adequada ao modelo de biomarcadores devido a capacidade de distinguir variações de dados relevantes e irrelevantes para a predição de cenários. Análises não supervisionadas de agrupamento hierárquico e não hierárquico foram realizados para revelar semelhanças entre os grupos.

O dendograma baseou-se na distância euclidiana calculada pelo algoritmo Ward para minimizar perdas geradas pelo agrupamento. Já o *heatmap* utilizou correlação de Pearson calculada pelo algoritmo Ward a partir de dados gerados pelo *VIP score* (PLS-DA *imp. features*). A técnica K-means foi aplicada complementarmente para observar partições disjuntas. O método de classificação supervisionada Random Forest identificou os dados a partir de 7 preditores que combinam 500 alternativas de classificação cujas representações seguem o modelo de um fluxograma. Foram considerados espaços amostrais randomizados.

Identificação dos Padrões Moleculares (*molecular features*)

A análise PLS-DA permitiu a seleção de *molecular features* (padrões moleculares) que melhor contribuíram para a discriminação entre CHC e amostras não patológicas, eleitos a partir do *VIP score* (*imp. features*). No *software* FlexAnalysis (Versão 3.3; Bruker-Daltonik GmbH), em cada amostra avaliada em MS, selecionou-se a razão m/z correspondente a cada padrão molecular discriminativo para o respectivo cenário, com a finalidade de construir arquivos pertencentes a uma *peak list* de cada grupo do desenho experimental. Os dados adquiridos foram inseridos nas bases HMDB[®] e LIPID MAPS[®] para identificação (FAHY et al., 2009; WISHART et al., 2007). A mesma abordagem foi realizada após a obtenção dos dados de fragmentação (MS/MS), contudo foram selecionados os parâmetros m/z e intensidade relativa dos fragmentos discriminantes (íons precursores) para confirmação da identificação nos bancos de dados HMDB[®], LIPID MAPS[®], METLIN[™], MINE[®] e KEGG (janeiro/2018) a partir da ferramenta *on-line* CEU Mass Mediator[©] (GIL DE LA FUENTE et al., 2018).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Mediante a técnica MALDI-TOF/MS foi possível obter e identificar os espectros das amostras, com posterior elaboração de *scores plot* (Figura 1) pelo método *Principal Component Analysis* (PCA). Observa-se que os pontos se referem ao perfil lipídico dos pacientes, estando o grupo controle em vermelho e o grupo com CHC em verde. Como resultado, há caráter não discriminatório, já que os grupos se sobrepuseram, ilustrando um agrupamento desses perfis. Entretanto, esse é um teste inicial e seus achados corroboram a necessidade de análise também por outros métodos estatísticos.

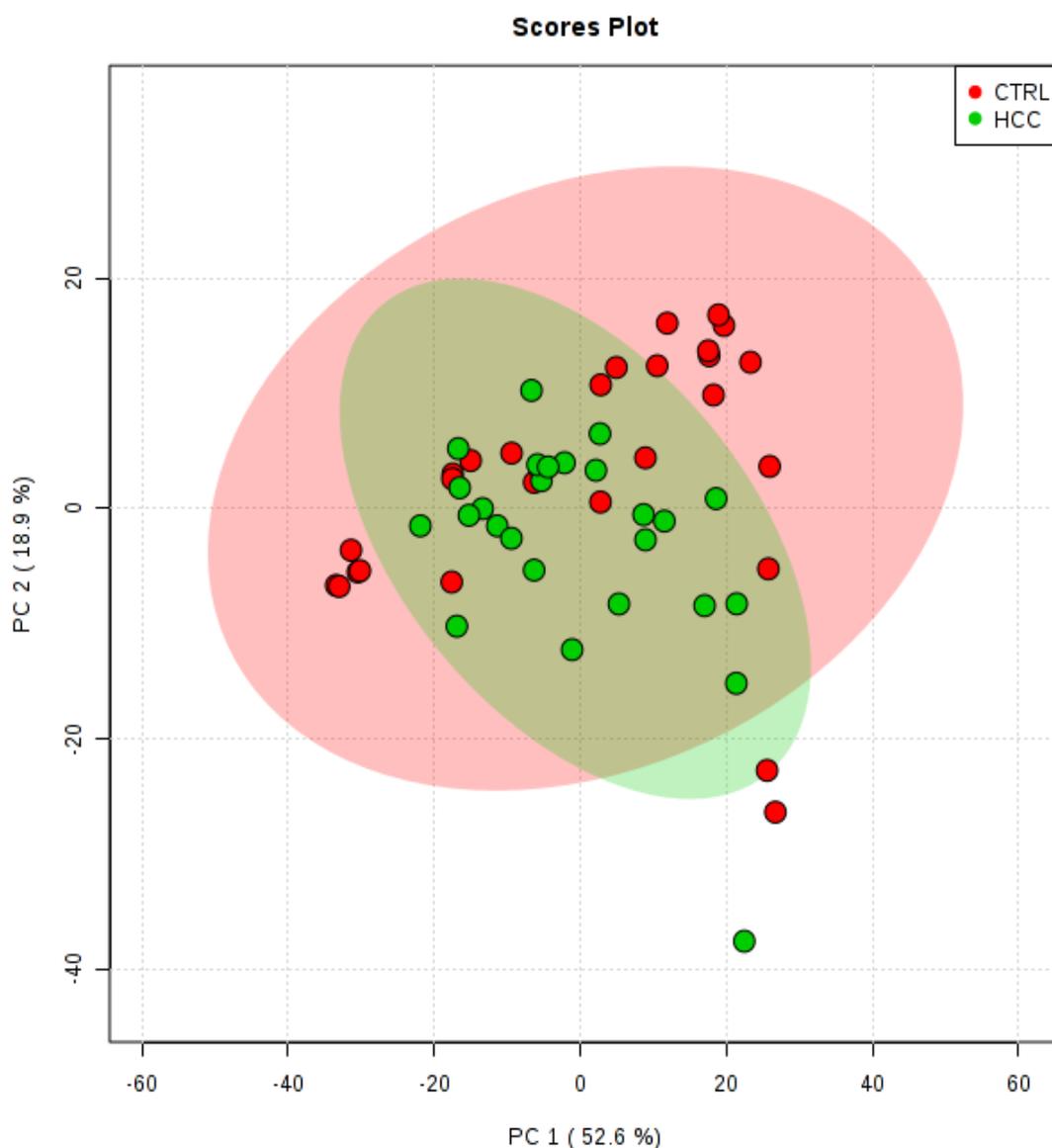


Figura 1: Análise PCA apresentando os *scores plot* dos lipídeos avaliados em plasma de pacientes com CHC e pacientes controle ($p < 0.05$). O percentual de cada eixo revela a variância explicada em cada projeção traçada, sendo que PC1 apresenta melhor representatividade dos dados analisados. Os pacientes pertencentes ao estudo foram analisados em triplicatas e representados em pequenas esferas vermelhas e verdes, de acordo com o cenário de origem. As regiões elípticas correspondem ao intervalo de 95% de confiança. Fonte: adaptado do *software* MetaboAnalyst.

Ainda em análise multivariada não supervisionada PCA, estimou-se o quanto cada variável influencia os componentes principais traçados, demonstrado pelos *loadings plot* da Figura 3. A estatística da análise não sofreu melhora posteriormente a retirada das

amostras fora da região de confiança, denotando que o afastamento atípico provavelmente se refere a variações inerentes aos indivíduos.

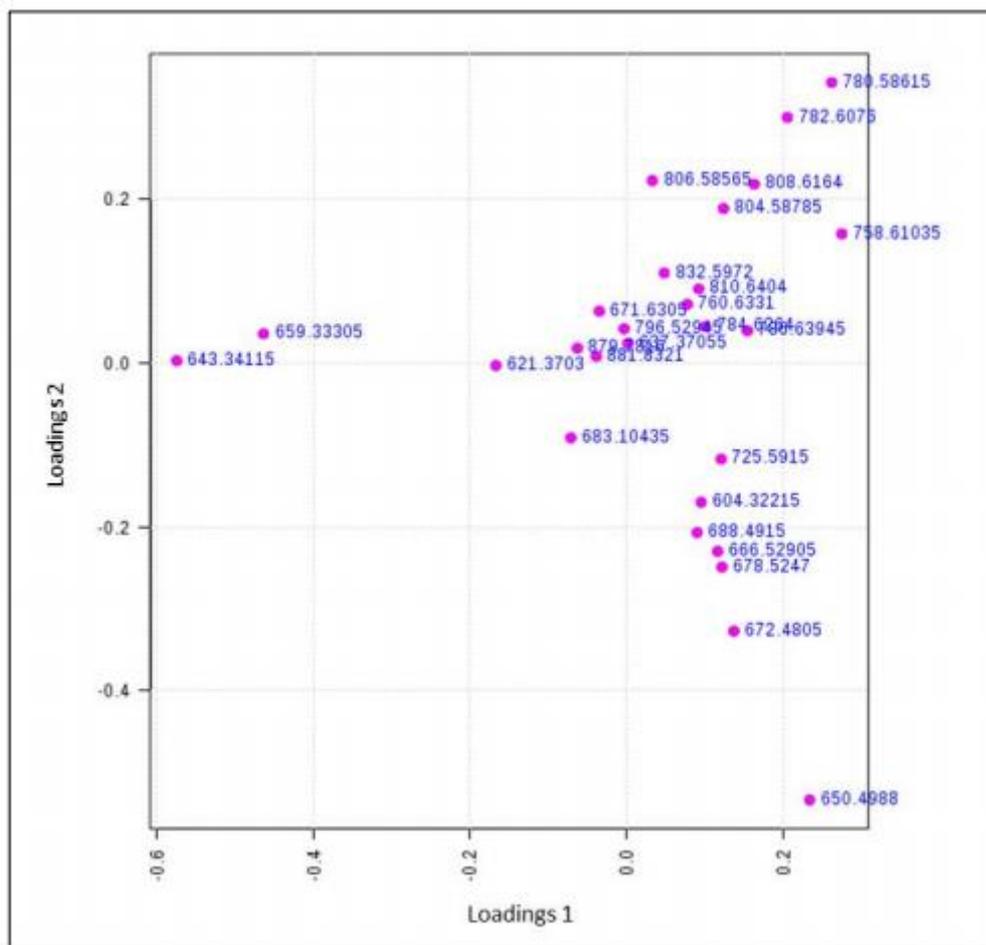


Figura 2: Análise PCA apresentando os *loadings plot* dos lipídeos avaliados em plasma de pacientes com CHC e pacientes controle ($p < 0.05$). A distribuição dos íons, representados em pequenas esferas rosa, demonstra a influência de cada variável sob os componentes principais traçados. Os íons de 643.34115 m/z, 659.33305 m/z e 650.4988 m/z apresentaram afastamento atípico do conjunto de dados. Fonte: adaptado do *software* MetaboAnalyst.

Em análise multivariada supervisionada PLS-DA (*Partial Least Squares – Discriminant Analysis*), o componente 2 do *scores plot* (Figura 4) demonstrou melhor representatividade dos dados analisados e pelo *loadings plot*, sendo possível avaliar a influência de cada variável (Figura 5). A validação cruzada do método PLS-DA para perfil lipídico evidenciou ligeira dissociação entre os cenários (Figura 6). A estatística da análise não sofreu melhora

posteriormente a retirada das amostras fora da região de confiança, denotando que o afastamento atípico provavelmente se refere a variações inerentes aos indivíduos.

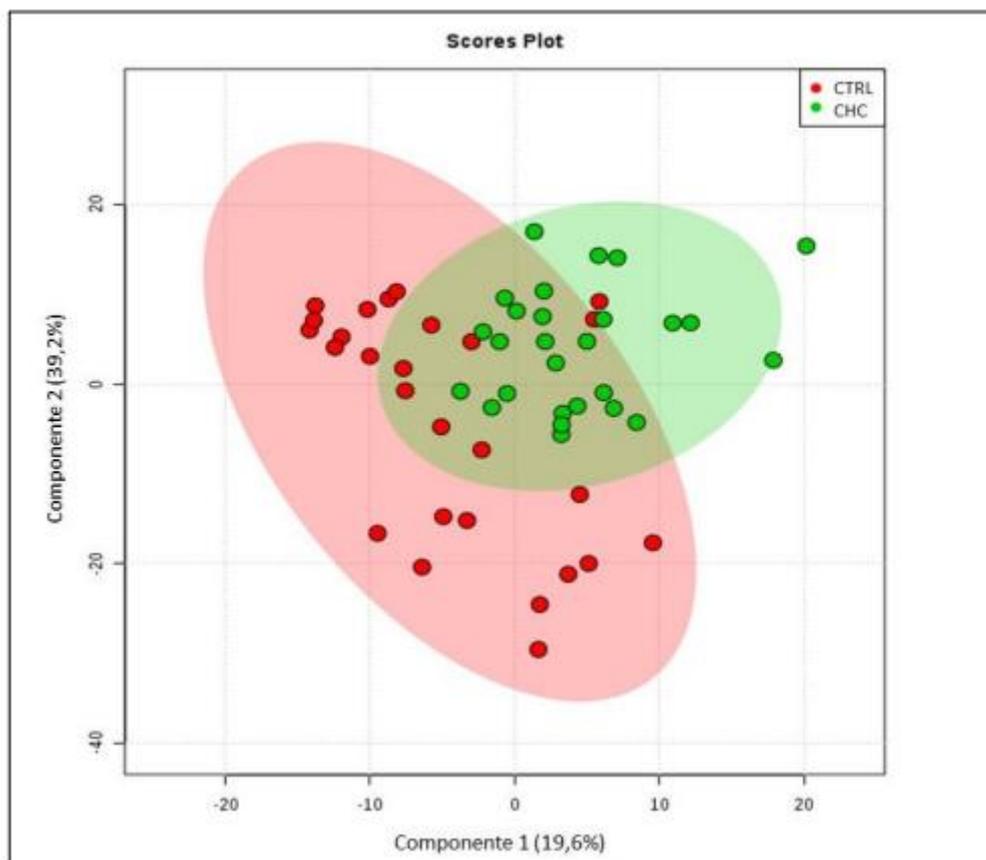


Figura 3: Análise por PLS-DA apresentando os *scores plot* dos lipídeos avaliados em plasma de pacientes com CHC e pacientes controle ($p < 0.05$). O percentual de cada eixo revela a covariância explicada em cada projeção traçada, sendo que o Componente 2 apresenta melhor representatividade dos dados analisados. Os pacientes pertencentes ao estudo analisados em triplicatas são representados em pequenas esferas vermelhas e verdes, de acordo com o cenário de origem. As regiões elípticas correspondem ao intervalo de 95% de confiança. Fonte: adaptado do *software* MetaboAnalyst.

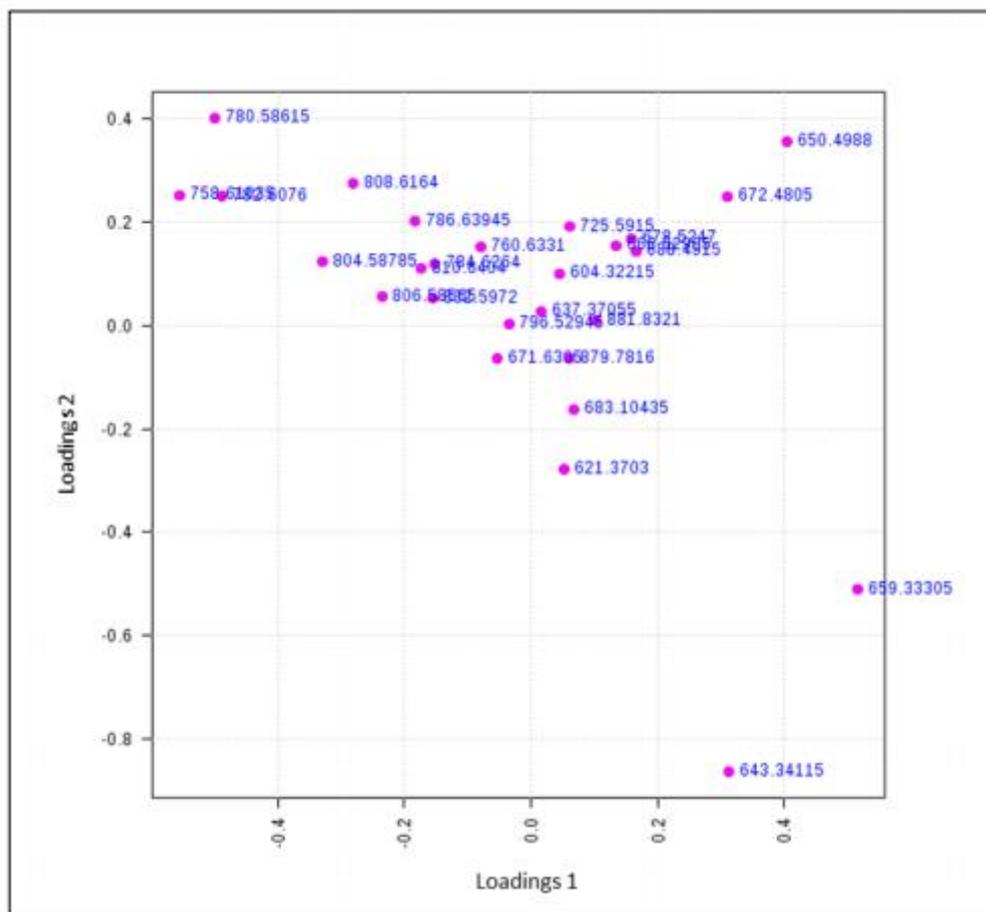


Figura 4: Análise PLS-DA apresentando os *loadings plot* dos lipídeos avaliados em plasma de pacientes com CHC e pacientes controle ($p < 0.05$). A distribuição dos íons, representados em pequenas esferas rosa, demonstra a influência de cada variável sob os componentes projetados. Os íons de 643.34115 m/z e 659.33305 m/z apresentaram afastamento atípico do conjunto de dados. Fonte: adaptado do *software* MetaboAnalyst.

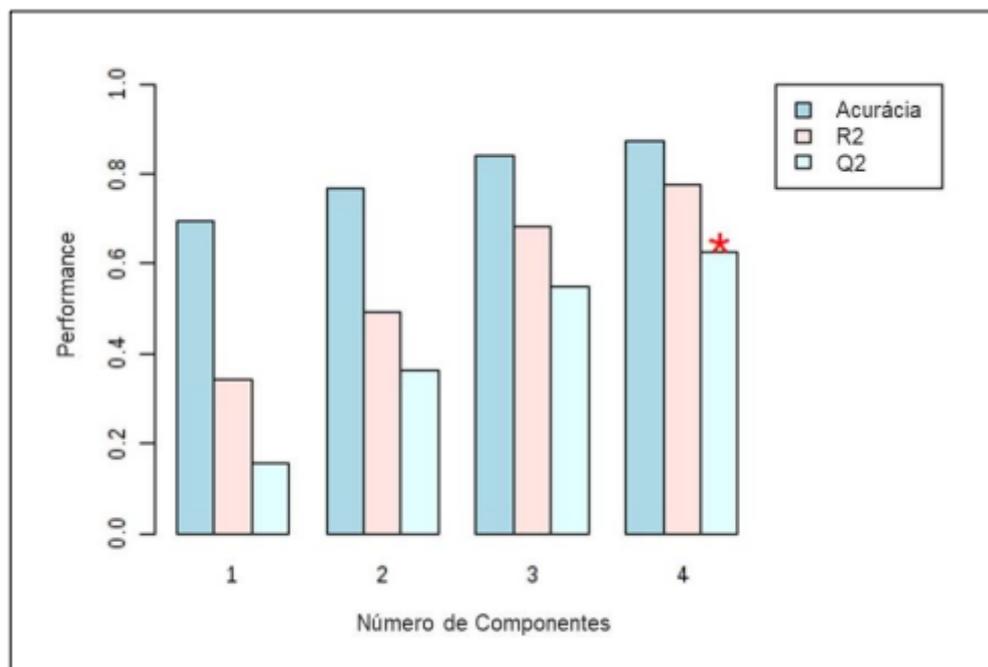


Figura 5: Análise por validação cruzada do método PLS-DA para perfil lipídico. O asterisco vermelho indica o conjunto de componentes com maior habilidade de predição (Q2).
Fonte: adaptado do *software* MetaboAnalyst.

Com maior direcionamento, realizou-se a *Orthogonal Partial Least Squares – Discriminant Analysis* (OPLS-DA), análise não paramétrica, muito utilizada para metabolômica. Ao se examinar o gráfico gerado (Figura 7), verifica-se separação do perfil dos dois grupos e esse fato decorre desse método ser mais adequado para esse tipo de análise biológica. Com isso, os resultados evidenciam significativa distinção entre o grupo controle e o grupo de pacientes com cirrose hepática C com câncer de fígado. Na Figura 8, observa-se a influência de cada variável para construção do modelo.

Antes consideradas secundárias ao câncer, as alterações metabólicas atualmente são reconhecidas como características tumorais típicas (HANAHAN; WEINBERG, 2011), e os achados do presente estudo reforçam as diferenças no perfil global dos lipídeos entre o cenário patológico e o não patológico. Verifica-se essa distinção como reflexo da reprogramação metabólica, uma vez que a intensa multiplicação das células tumorais, o estresse metabólico e a hipóxia geram instabilidade da membrana plasmática e oxidação lipídica por catabolismo severo e compensação de nutrientes, sendo as alterações no perfil

global de lipídeos frequentemente relatadas na literatura (CHEN et al., 2013; KRAUTBAUER et al., 2016; LI et al., 2017; LIN et al., 2017).

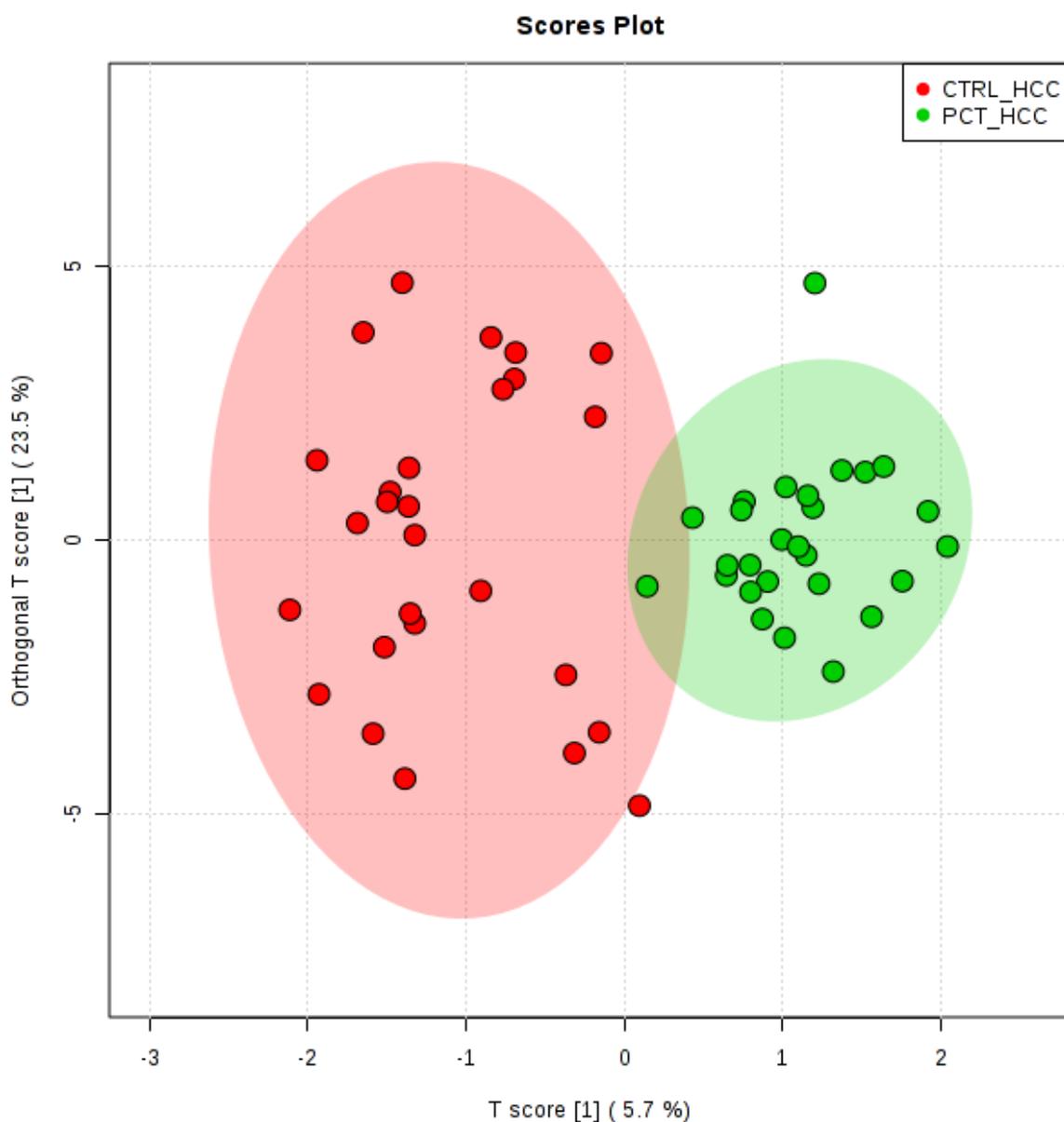


Figura 6: Análise *Orthogonal* PLS-DA apresentando os *scores plot* dos lipídeos avaliados em plasma de pacientes com CHC e pacientes controle ($p < 0.05$). O *score* de cada vetor revela a covariância explicada em cada projeção traçada, sendo que o vetor ortogonal representa variáveis estatisticamente não correlacionadas ao restante dos dados analisados. Na presença da hepatopatia, pacientes exibem perfil global de lipídeos alterado quando comparado a condição não patológica. Os pacientes analisados em triplicatas são representados em pequenas esferas vermelhas e verdes, de acordo com o cenário de origem.

As regiões elípticas correspondem ao intervalo de 95% de confiança. Fonte: adaptado do software MetaboAnalyst.

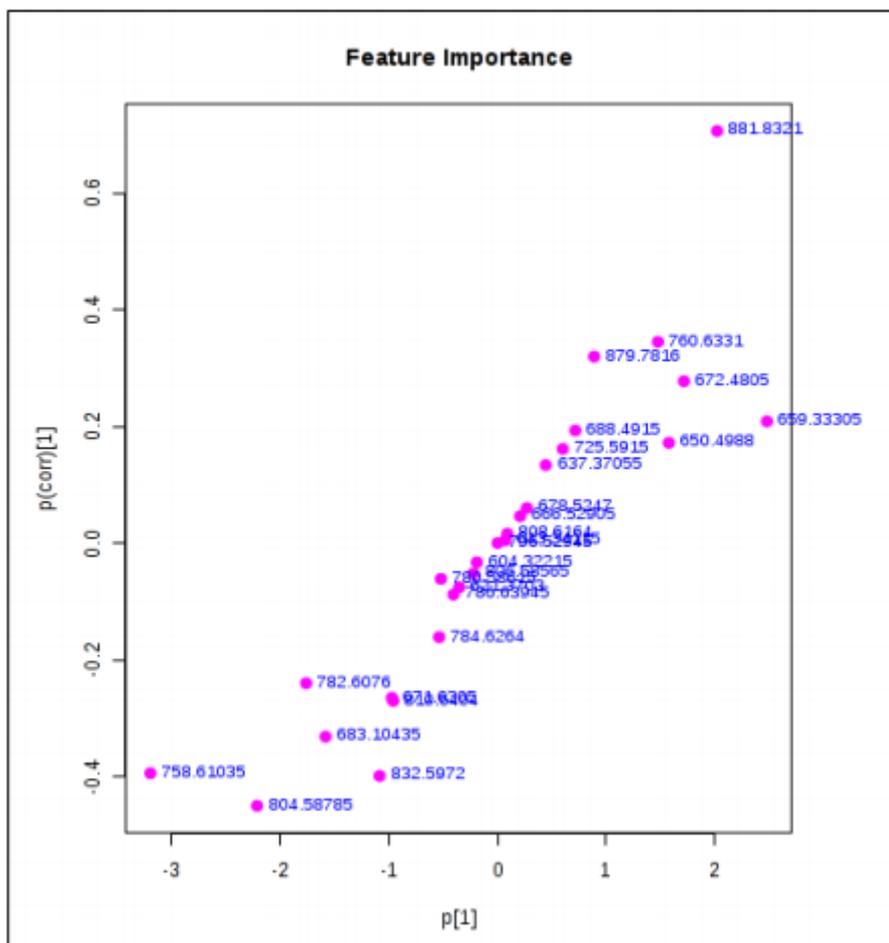


Figura 7: Análise por *Orthogonal* PLS-DA apresentando os *loadings* *S-plot* dos lipídeos avaliados em plasma de pacientes com CHC e pacientes controle ($p < 0.05$). A distribuição dos íons, representados em pequenas esferas rosa, demonstra a influência de cada variável para a construção do modelo, onde p representa o vetor de *loading* e $p(\text{corr})$ a combinação entre covariância e correlação. Os íons de 881.8321 m/z, 758.61035 m/z e 804.58785 m/z apresentaram afastamento atípico do conjunto de dados. Fonte: adaptado do software MetaboAnalyst.

A partir dos resultados da análise PLS-DA, foram analisados os íons com maior representatividade e contribuição para diferenciação entre amostras de pacientes com CHC e de pacientes controle. Baseado no grau de contribuição foi construída a Figura 9, onde 10 entre as 20 *molecular features* de maior *VIP score* apresentaram contribuição considerada

significativa (≥ 0.8). Para confirmação de *outliers*, selecionou-se variáveis do conjunto de dados de forma a excluir os íons de baixa contribuição (*VIP score* < 0.8) das análises. Os resultados indicaram que o potencial estatístico na discriminação dos cenários é maior quando considerada a distribuição total do conjunto de dados.

Nesse sentido, Passos-Castilho e colaboradores (2015) , utilizando-se também da técnica MALDI-TOF/MS, verificaram a presença de sete íons discriminativos, os quais tiveram habilidade para distinguir CHC de outras condições patológicas [hepatite C crônica, cirrose e CHC derivados de infecção viral por vírus da hepatite C (VHC)] a partir do perfil de lipídeos do plasma dos pacientes.

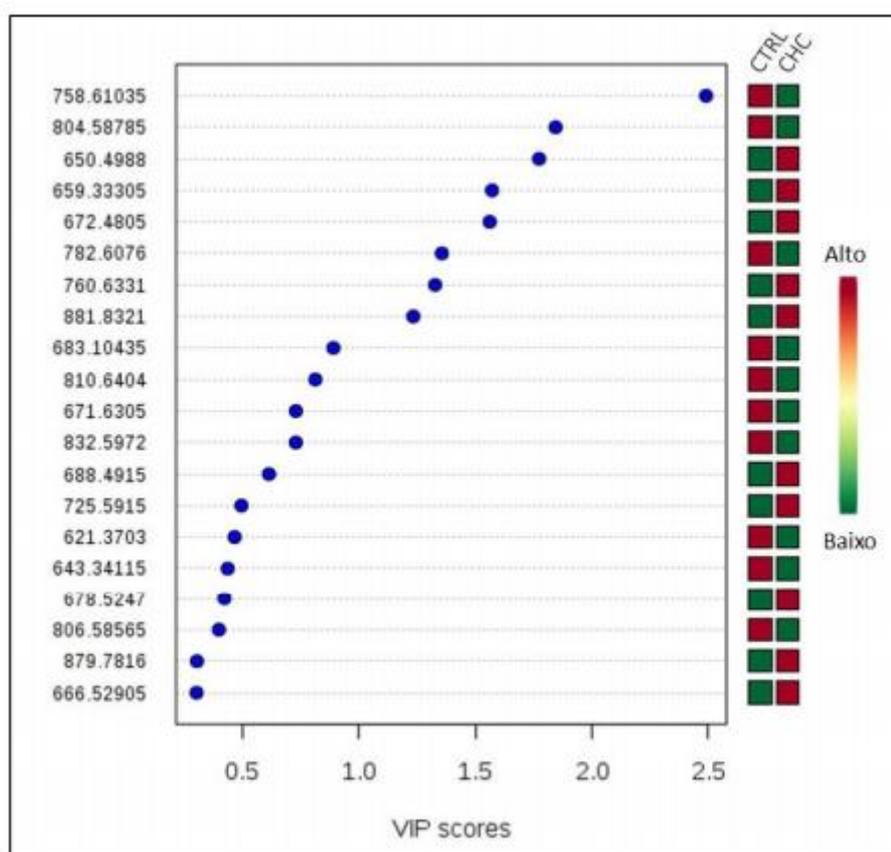


Figura 8: *VIP scores* dos lipídeos avaliados em plasma de pacientes com CHC e pacientes controle (PLS-DA imp. features, $p < 0.05$). Dentre as 20 *molecular features* de maior *VIP score*, 10 apresentam maior intensidade relativa de íons e 10 apresentam menor intensidade relativa de íons em pacientes com CHC. As caixas coloridas à direita indicam a intensidade relativa de cada *molecular feature* nos respectivos cenários. Fonte: adaptado do *software* MetaboAnalyst.

A média dos íons discriminativos encontrados nos dois cenários foi avaliada em relação às diferenças estatísticas por meio do teste univariado *T-student*, apresentando apenas três dentro do intervalo de erro padrão (círculo vermelho, Figura 10). Esse teste não representa o melhor tratamento de dados para o presente estudo, entretanto, os resultados foram insatisfatórios para a margem de erro desejada e sugere que o número de pacientes seja aumentado em cada grupo.

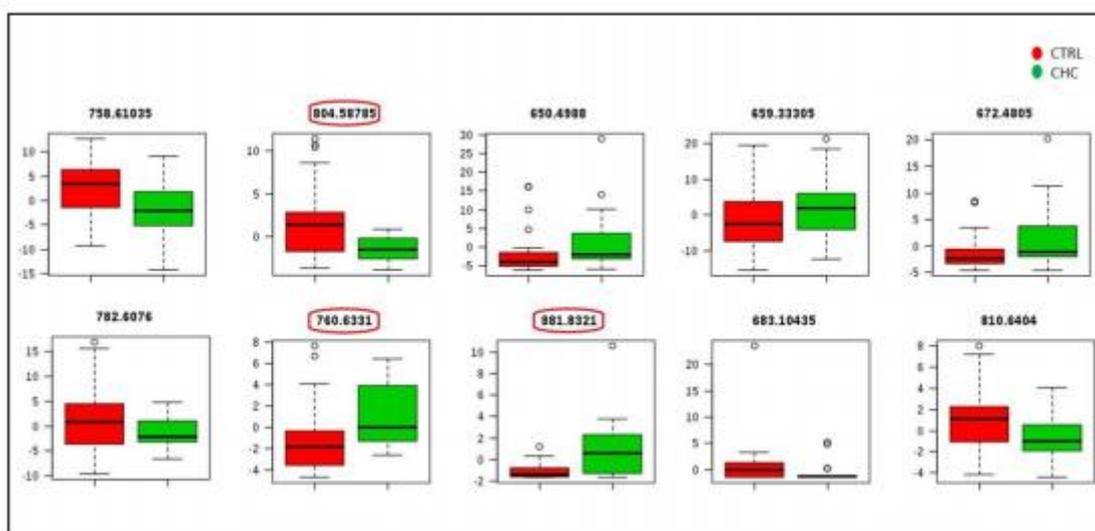


Figura 9: Box plot dos íons discriminantes de *VIP score* $\geq 0,8$ por teste T-student não paramétrico ($p < 0.05$). O diagrama apresenta a distribuição dos dados em quartis de acordo com a variável de interesse, permitindo ainda a observação de potenciais *outliers* plotados como pontos individuais fora dos limites superior ou inferior. Os círculos vermelhos destacam *molecular features* que obtiveram relevância estatística segundo o método matemático. Fonte: adaptado do *software* MetaboAnalyst.

Embasado no *VIP score*, agrupou-se os íons de forma hierárquica em *heatmap*, com visualização dos dados lipidômicos de forma simplificada (Figura 11). Numa outra análise (Figura 12), a partir da *Hierarchical Cluster Analyses* (HCA), a qual serve como teste de avaliação da técnica e para reclassificação de perfis moleculares (metabólitos apolares), agrupando os eventos parecidos entre si. Percebe-se ainda uma baixa homogeneidade, pois não há ainda sólida separação entre os grupos, estando alguns pacientes próprios (por suas características moleculares) de pacientes do cenário oposto. Logo, infere-se que eventos

isolados como CTRL_F_2 e RP@_2 são consequência de erro técnico (possível pipetagem) e os CTRL_ARS_1, CTRL_ARS_2, CTRL_ARS_3, por serem replicatas do mesmo paciente e estarem juntos, podem inferir possível hepatopatia, até então não identificada durante seleção do grupo.

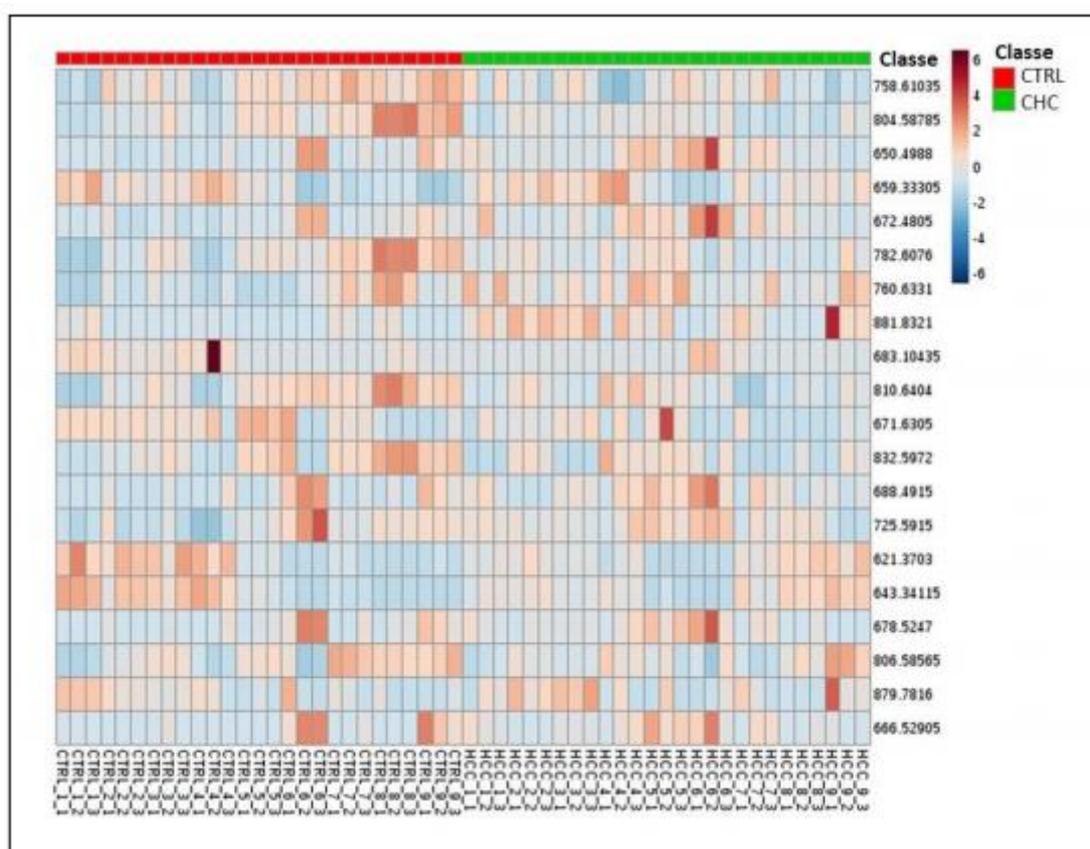


Figura 10: Análise HCA por agrupamento em *heatmap* dos íons discriminantes indicados pela análise PLS-DA (*imp. features*, $p < 0.05$). A intensidade relativa de cada *molecular feature* é apresentada para cada triplicata técnica analisada segundo a coloração indicada na escala lateral. As amostras, por sua vez, são agrupadas de acordo com o respectivo cenário. Fonte: adaptado do *software* MetaboAnalyst.

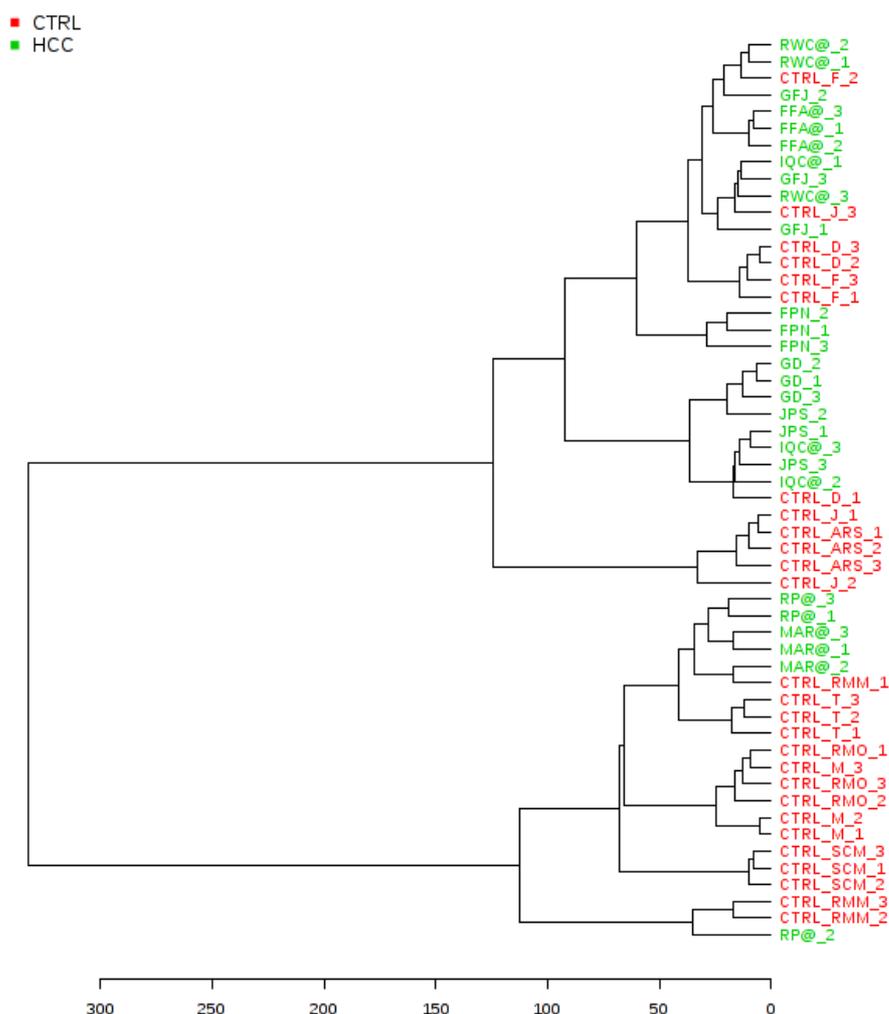


Figura 11: Análise HCA por agrupamento dos dados lipidômicos em dendrograma. Os arranjos exprimem a relação das amostras avaliadas em triplicatas técnicas em sistema hierárquico e a distância euclidiana os níveis de similaridade segundo perfil global de lipídeos. Fonte: adaptado do *software* MetaboAnalyst.

Utilizando-se o agrupamento K-means, os dados foram particionados em 6 grupos, onde cada amostra (em triplicata) pertence ao grupo mais próximo da média (Figura 13). No grupo 6 foram classificadas somente amostras pertencentes aos pacientes com CHC e nos grupos 2 e 4 apenas amostras controle. Os grupos 1, 3 e 5 apresentaram heterogeneidade.

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

Figura 12: Agrupamento K-means dos dados lipidômicos. O algoritmo particional encontrou diferenças significantes em até 6 grupos. Fonte: adaptado do *software* MetaboAnalyst.

O erro amostral aleatório foi aferido pelo método de análise Random Forest, o qual classifica o conjunto de dados (Figura 14), além de detectar potenciais *outliers* (Figura 15). Como resultado, a margem de erro foi aceitável, pois se manteve abaixo do limite considerado aceitável e as replicatas apontadas pela análise foram retiradas do conjunto de dados para confirmação de *outliers*, porém, a estatística da análise não sofreu melhora posteriormente a retirada das amostras fora da região de confiança, denotando que o afastamento atípico provavelmente se refere a variações inerentes aos indivíduos.

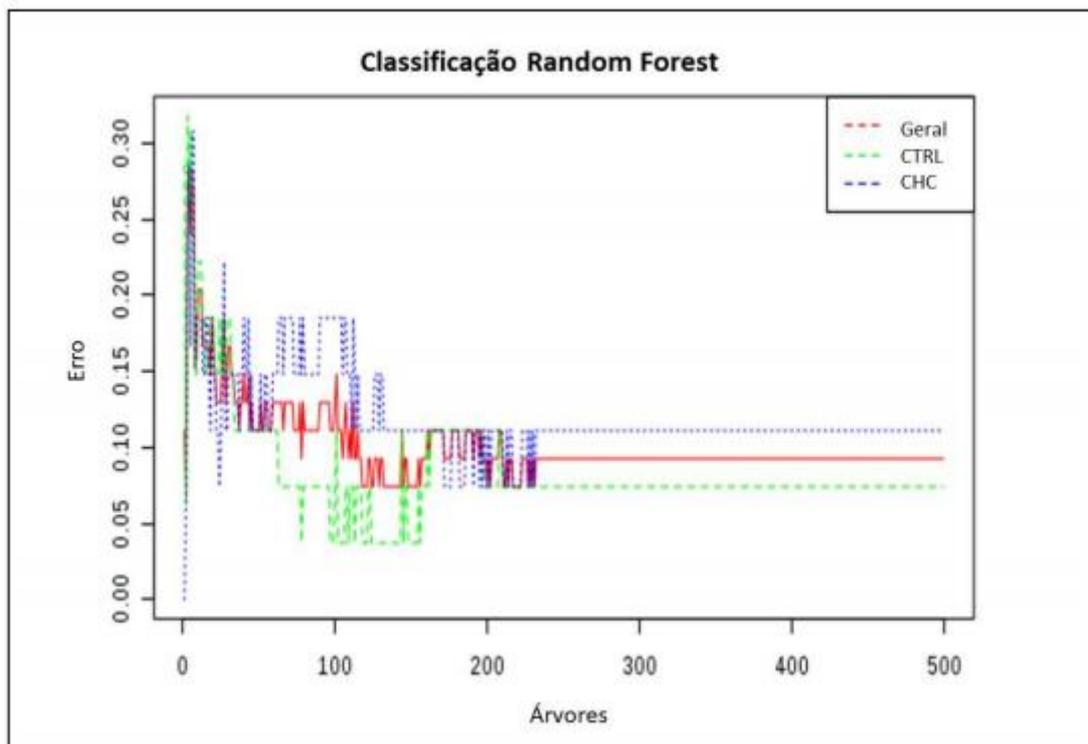


Figura 13: Classificação Random Forest do conjunto de dados lipidômicos. O erro amostral foi considerado < 0.2 conforme ampliaram-se as alternativas de fluxo classificatório. Fonte: adaptado do *software* MetaboAnalyst.

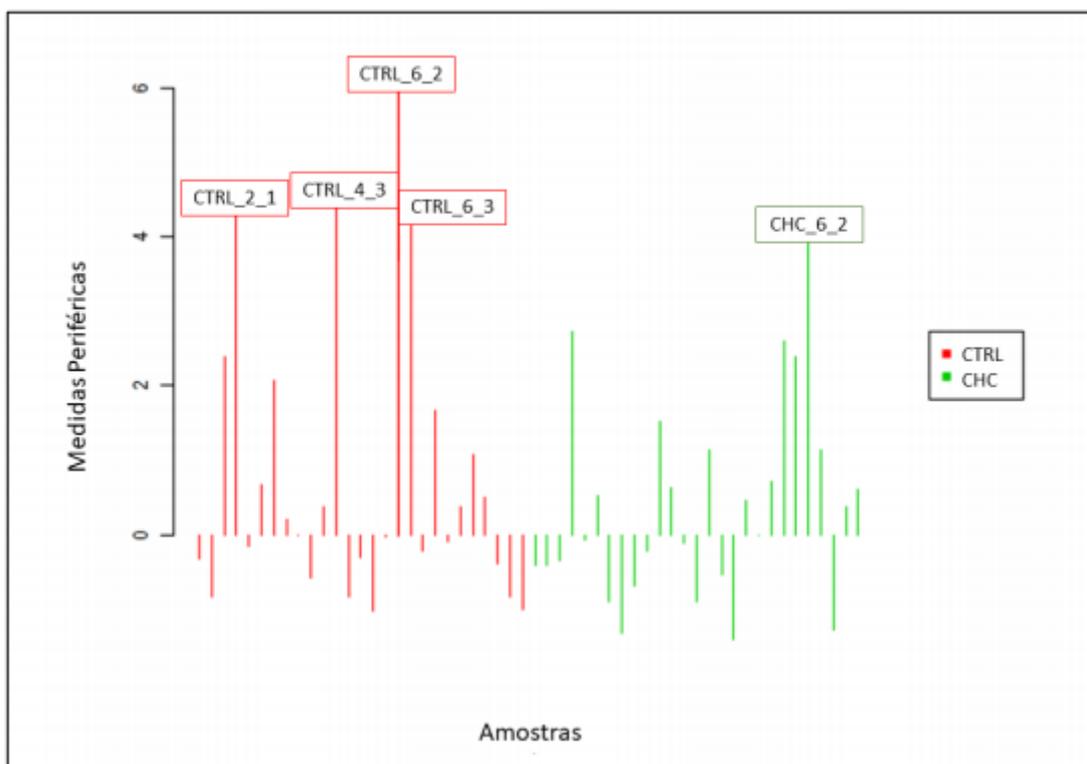


Figura 14: Potenciais *outliers* detectados por Random Forest na análise do perfil lipídico. O método classificatório indica desconformidade de 5 replicatas com afastamento atípico ≥ 4 do conjunto amostral. Fonte: adaptado do *software* MetaboAnalyst.

LIPIDÔMICA DE DESCOBERTA DE POSSÍVEIS BIOMARCADORES

Representando cada cenário, foram selecionadas as cinco *molecular features* mais representativas de acordo com as análises, a fim de serem identificadas em bases de dados. Detectou-se que dos 10 lípideos identificados, 9 pertencem à classe de glicerofosfolípideos (Figura 16), importante classe de lípideos estruturais das membranas biológicas. Em pacientes controle o lípideo mais abundante é a fosfatidilcolina, com 4 íons contribuintes. Por outro lado, em pacientes com CHC a fosfatidiletanolamina (PE) passou a contribuir igualmente a PC para a caracterização do cenário, havendo equilíbrio entre a prevalência.

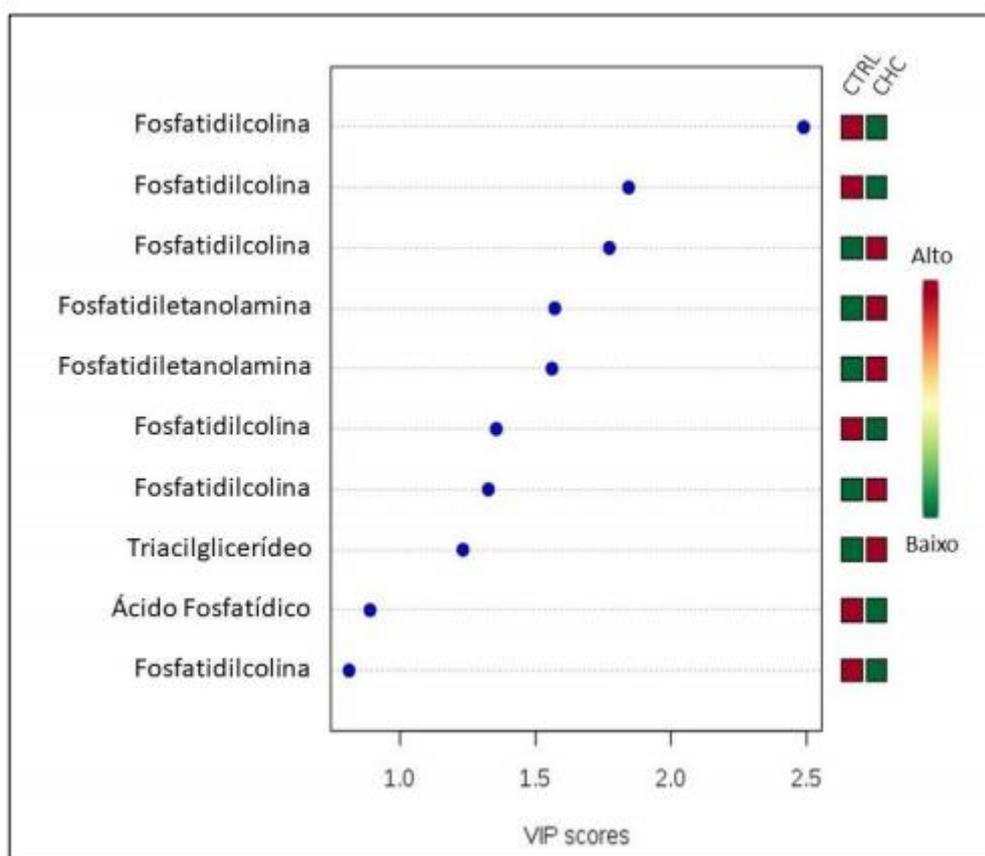


Figura 15: Identificação das *molecular features* de *VIP score* $\geq 0,8$ em plasma de pacientes com CHC e de pacientes controle. O reconhecimento dos íons lipídicos de maior

relevância evidenciou que a hepatopatia afeta principalmente a classe dos glicerofosfolípídeos. Os quadrados verdes e vermelhos indicam, respectivamente, baixa e alta intensidade relativa de cada *molecular feature*, comparando os cenários. Fonte: adaptado do *software* MetaboAnalyst.

Ressom et al. (2016), durante estudo multiômico para caracterização do CHC, identificou por GC-MS e LC-MS alteração na abundância de diversos metabólitos de diferentes classes, dentre eles os fosfolípídeos apresentaram regulação positiva em amostras de tecido hepático com CHC quando comparadas a tecidos cirróticos. De outro modo, em comparação ao tecido adjacente não tumoral, os fosfolípídeos fosfatidiletanolamina (PE), fosfatidilserina (PS) e fosfatidilinositol (PI) exibiram regulação negativa em tecidos de CHC enquanto fosfatidilcolina (PC) e lisofosfatidilcolina (LPC) não apresentaram alteração (KRAUTBAUER et al., 2016).

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

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

síntese de fosfolipídeos no CHC devido ao aumento de espécies saturadas e redução de espécies poliinsaturadas.

Tessitore et al. (2003) demonstraram que a enzima que produz PC a partir de PE hepática quando não há fornecimento adequado de colina pela dieta, a PE Nmetiltransferase (PEMT), apresenta atividade reduzida em amostras de tecido hepático com CHC se comparado ao tecido adjacente regular. Chen et al. (2013) observaram padrão semelhante em soro de pacientes com CHC como reflexo das condições do órgão e abundância reduzida de PCs poliinsaturadas, uma vez que a enzima é a principal via de síntese dessas espécies. Morita et al. (2013) avaliando linhagens celulares e tecido hepático com CHC por IMS (*Ion Mobility System*), RT-PCR (*Real Time Polymerase Chain Reaction*) e *Western Blotting* relataram aumento de PC saturados ou monoinsaturados na hepatopatia devido a superexpressão da enzima lisofosfatidilcolina aciltransferase 1, responsável pela conversão de lisofosfatidilcolina (LPC) em PC.

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

A prevalência de estruturas lipídicas saturadas ou monoinsaturadas no CHC pode estender-se além da classe de fosfolipídeos. Guan et al. (2017), analisando a composição de diversos triacilglicerídeos (TAGs) em fígado de pacientes com CHC submetidos à ressecção cirúrgica por UPLC-ESI-MS (*ultra performance liquid chromatography-electrospray ionization-*

tandem mass spectrometry), observaram espécies com mais de três insaturações em estado de regulação negativa enquanto espécies saturadas eram positivamente reguladas, o que demonstra a importância da avaliação da composição de TAGs nas doenças hepáticas em contraste a determinação por ensaios colorimétricos usuais na prática clínica. No presente trabalho, o TAG, classificado como glicerolípido, foi destacado entre os lipídeos de maior relevância em pacientes com CHC.

Composto por longa cadeia de ácidos graxos constituídas basicamente por hidrocarbonetos, os TAGs são uma das formas lipídicas mais adequadas para armazenamento energético e reserva de ácidos graxos essenciais e não essenciais para síntese de fosfolipídeos, tipicamente observada durante a expansão e disseminação tumoral (CHEN et al., 2013). Seu estoque para futura mobilização pode ocorrer sob a forma de gotículas lipídicas, cuja presença acentuada em células neoplásicas é associada a agressividade do tumor (ABRAMCZYK et al., 2015; DE GONZALO-CALVO et al., 2015).

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

5. CONCLUSÃO

O presente estudo sugere variação notável do perfil lipídico de pacientes com neoplasia hepática primária em comparação aos grupos controle, principalmente com alterações da classe dos glicerofosfolipídeos entre os acometidos pelo CHC. A razão encontrada entre as quantidades de PC e PE em pacientes hepatopatas ressalta o distúrbio do metabolismo lipídico, indicando também intensa proliferação celular no desenvolvimento do câncer, o que aponta para modificações e reprogramação na via de síntese dos

glicerofosfolípidos atribuíveis ao processo neoplásico. Esses resultados, analisados em conjunto ou individualmente, corroboram estudos anteriores e indicam a viabilidade do estudo e do desenvolvimento de eventuais biomarcadores séricos para o CHC, sugerindo a prospecção de exames menos invasivos e de valor diagnóstico mais sensível e específico para essa neoplasia.

6. REFERÊNCIAS

ABEL, S. et al. Altered lipid profile, oxidative status and hepatitis B virus interactions in human hepatocellular carcinoma. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, v. 81, n. 5–6, p. 391–399, nov. 2009.

ABRAMCZYK, H. et al. The role of lipid droplets and adipocytes in cancer. Raman imaging of cell cultures: MCF10A, MCF7, and MDA-MB-231 compared to adipocytes in cancerous human breast tissue. *The Analyst*, v. 140, n. 7, p. 2224–35, 7 abr. 2015.

ALTEKRUSE, SF.; MCGLYNN, KA.; REICHMAN, ME. Hepatocellular carcinoma incidence, mortality, and survival trends in the United States from 1975 to 2005. *Journal of clinical oncology*, v. 27, n. 9, p. 1485-1491, 2009.

ALTEKRUSE, SF; MCGLYNN, KA; DICKIE, LA; KLEINER, DE. Hepatocellular carcinoma confirmation, treatment, and survival in surveillance, epidemiology, and end results registries, 1992-2008. *Hepatology*, v.55, p. 476-82, 2012.

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

BLIGH, E. G.; DYER, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, v. 37, n. 8, p. 911–917, ago. 1959.

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

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

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

CHEN, S. et al. Serum lipid profiling of patients with chronic hepatitis B, cirrhosis, and hepatocellular carcinoma by ultra fast LC/IT-TOF MS. *Electrophoresis*, v. 34, n. 19, p. 2848–2856, jul. 2013.

DE GONZALO-CALVO, D. et al. Intratumor cholesteryl ester accumulation is associated with human breast cancer proliferation and aggressive potential: a molecular and clinicopathological study. *BMC Cancer*, v. 15, n. 1, p. 460, 9 dez. 2015.

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

EUROPEAN ASSOCIATION FOR THE STUDY OF THE LIVER; EUROPEAN ORGANISATION FOR RESEARCH AND TREATMENT OF CANCER. EASL-EORTC clinical practice guidelines: management of hepatocellular carcinoma. *Journal of Hepatology*, v. 56, n. 4, p. 908–943, abr. 2012.

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

FANIA, Chiara et al. A PSA-guided approach for a better diagnosis of prostatic adenocarcinoma based on MALDI profiling and peptide identification. *Clinica chimica acta*, v. 439, p. 42-49, 2015.

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

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

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

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

GLOBOCAN 2012. *International Journal of Cancer*, v. 136, n. 5, p. E359-386, 1 mar. 2015.

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

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

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

HANASH, Sam. Disease proteomics. **Nature**, v. 422, n. 6928, p. 226, 2003.

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

HSU, IC. et al. Mutational hot spot in the p53 gene in human hepatocellular carcinomas. *Nature*, v. 350, n. 6317, p. 427, 1991.

JEE, S. et al. Metabolomics profiles of hepatocellular carcinoma in a Korean prospective cohort: the Korean Cancer Prevention Study-II. *Cancer Prevention Research*, p. canprevres.0249.2017, 2018.

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

JOYCE, Daniel et al. Case Report: Post liver transplant presentation of needle-track metastasis of hepatocellular carcinoma following percutaneous liver biopsy. **BMJ case reports**, v. 2014, 2014.

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

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

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

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

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

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

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

LIU, Z. et al. Determination of candidate metabolite biomarkers associated with recurrence of HCV-related hepatocellular carcinoma. *Oncotarget*, v. 9, n. 5, p. 6245, 2018.

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

LOK, AS. et al. Incidence of hepatocellular carcinoma and associated risk factors in hepatitis C-related advanced liver disease. *Gastroenterology*, v. 136, n. 1, p. 138-148, 2009.

LONDON, WT.; MCGLYNN, K. A. Liver cancer. *Cancer epidemiology and prevention*, v. 3, p. 763-786, 2006.

LU, Y. et al. Comparison of hepatic and serum lipid signatures in hepatocellular carcinoma patients leads to the discovery of diagnostic and prognostic biomarkers. *Oncotarget*, v. 9, n. 4, p. 5032–5043, 12 jan. 2018.

LUO, P. et al. A Large-scale, multicenter serum metabolite biomarker identification study for the early detection of hepatocellular carcinoma. *Hepatology*, v. 67, n. 2, p. 662-675, 2018.

MAZZAFERRO, V. et al. Liver Transplantation for the Treatment of Small Hepatocellular Carcinomas in Patients with Cirrhosis. **New England Journal of Medicine**, v. 334, n. 11, p. 693–700, 14 mar. 1996.

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

MINISTÉRIO DA SAÚDE; INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA.
Estimativa 2018 - Incidência de Câncer no Brasil. [s.l: s.n.].

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

MOURAD, A., et al. Hepatocellular carcinoma screening in patients with compensated hepatitis C virus (HCV)-related cirrhosis aware of their HCV status improves survival: a modeling approach. *Hepatology*, v. 59, p. 1471-81, 2014.

NAGHAVI, M. et al. GBD 2013 Mortality and Causes of Death Collaborators. Global, regional, and national age-sex specific all-cause and cause-specific mortality for 240 causes of death, 1990-2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *Lancet*, v. 385, n. 9963, p. 117-71, 2015.

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

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

PUGH, R. N. et al. Transection of the oesophagus for bleeding oesophageal varices.

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

RICH, N.; SINGAL, AG. Hepatocellular carcinoma tumour markers: Current role and expectations. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, v. 28, p. 843-853, 2014.

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

SARVARI, J. et al. Comparative Proteomics of Sera From HCC Patients With Different Origins. **Hepatitis Monthly**, v. 14, n. 1, p. e13103, 2014.

SAUZAY, C. et al. Alpha-fetoprotein (AFP): A multi-purpose marker in hepatocellular carcinoma. *Clinica Chimica Acta*, v. 463, p. 39-44, 2016.

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

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

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

The British Journal of Surgery, v. 60, n. 8, p. 646–9, ago. 1973.

TORRE, L A. et al. Global cancer statistics, 2012. *CA: a cancer journal for clinicians*, v. 65, n. 2, p. 87-108, 2015.

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

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

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

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

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

YANG, JD. et al. Cirrhosis is present in most patients with hepatitis B and hepatocellular carcinoma. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, v. 9, n. 1, p. 64-70, 2011.

YANG, Juan et al. Identification of peptide regions of SERPINA1 and ENOSF1 and their protein expression as potential serum biomarkers for gastric cancer. ***Tumor Biology***, v. 36, n. 7, p. 5109-5118, 2015.