

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE
PORTO ALEGRE – UFCSPA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIAS**

Andressa de Freitas Alves

**Avaliação da variabilidade genética
de selenoproteínas na
suscetibilidade ao carcinoma
hepatocelular**

UFCSPA

**Universidade Federal de Ciências da Saúde
de Porto Alegre**

**Porto Alegre
2021**

Andressa de Freitas Alves

Avaliação da variabilidade genética de selenoproteínas na suscetibilidade ao carcinoma hepatocelular

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biociências da Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre como requisito para a obtenção do grau de Doutora.

Orientadora: Dr(a). Silvana de Almeida
Coorientadoras: Dr(a). Marilu Fiegenbaum
Dr(a). Márcia Giovenardi

**Porto Alegre
2021**

Catálogo na Publicação

Alves, Andressa de Freitas

Avaliação da variabilidade genética de selenoproteínas na suscetibilidade ao carcinoma hepatocelular / Andressa de Freitas Alves. -- 2021.

97 f. : il., graf., tab. ; 30 cm.

Tese (doutorado) -- Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Programa de Pós-Graduação em BioCiências, 2021.

Orientador(a): Silvana de Almeida ; coorientador(a): Marilu Fiegenbaum, Márcia Giovenardi.

1. Carcinoma hepatocelular. 2. Selenoproteínas. 3. Estresse oxidativo. 4. SNPs. I. Título.

INSTITUIÇÃO E FONTES FINANCIADORAS

Instituições:

Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA)

Laboratório de Biologia Molecular da UFCSPA

Irmãdade Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre (ISCOMPA)

Fontes financiadoras:

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) – nº
408864/2016-8

Programa de Bolsas da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível
Superior - Brasil (CAPES).

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a minha família, cujo apoio, amor, carinho e insistência na minha educação foram o que me permitiram chegar até aqui. O caminho foi árduo e cheio de dúvidas, mas vocês me ajudaram a carregar a bagagem mesmo que através de pequenos detalhes.

À minha orientadora, e também amiga, prof^a Silvana de Almeida que despertou meu interesse pela biologia molecular desde a graduação e foi muito mais que minha professora nesses últimos anos. Obrigada por toda a dedicação, *paciência* (porque eu sei que eu incomodada às vezes), carinho, amizade, parceria, apoio e tudo mais.

Às minhas coorientadoras prof^a Márcia Giovenardi e prof^o Marilu Fiegenbaum, obrigada por tudo que me ensinaram e por terem estado ao meu lado durante essa jornada.

Às técnicas do laboratório de Biologia Molecular, Grasiela Agnes, Marília Zandoná e Carmela Tagliari, obrigada por terem estendido a mão sempre que eu precisei e por toda a paciência.

Às minhas alunas de iniciação científica, Vitória Foigt, Luísa Comarú e Pâmela Victoria, pelo auxílio no dia a dia da pesquisa, pelas conversas e risadas e por terem me permitido aprender a ensinar.

Aos meus colegas de grupo de pesquisa, Mirelen Rodrigues, Vanessa Feistauer, Lariana Szczesny e Gabriel Tassi, obrigada pela amizade, parceria, risadas, conversas e auxílio no laboratório e nas reuniões.

A todas as pessoas que me auxiliaram de alguma forma para a construção desse trabalho: Vanessa Baldissera, Tatiane Jacobsen, Edson Cordeiro do Valle, Douglas Collioni, Ana Carolina de Moura, Aline Moraes e todos os colaboradores desse estudo.

Aos meus amigos e familiares que torceram pela minha felicidade e crescimento pessoal e profissional.

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| LISTA DE ABREVIATURAS | 6 |
| LISTA DE FIGURAS | 8 |
| LISTA DE TABELAS | 9 |
| RESUMO | 10 |
| ABSTRACT | 12 |
| 1.INTRODUÇÃO | 14 |
| 1.1. Carcinoma Hepatocelular | 14 |
| 1.1.1. Epidemiologia..... | 14 |
| 1.1.2. Fatores de risco para o CHC..... | 15 |
| 1.1.3. Diagnóstico e Prognóstico do CHC..... | 17 |
| 1.1.4. Patogênese e aspectos moleculares..... | 18 |
| 1.2. Estresse oxidativo e selenoproteínas | 22 |
| 1.2.1. Selenoproteínas..... | 22 |
| 1.2.2. Alterações genéticas de selenoproteínas..... | 25 |
| 2. OBJETIVOS | 31 |
| 2.1. Objetivo geral | 31 |
| 2.2. Objetivos específicos | 31 |
| 3.ARTIGOS CIENTÍFICOS | 32 |
| 3.1. Artigo científico 1 | 32 |
| 3.1. Artigo científico 2 | 49 |
| 4. DISCUSSÃO | 70 |
| 5.CONCLUSÕES | 73 |
| 6.REFERÊNCIAS | 75 |
| ANEXOS | 82 |

LISTA DE ABREVIATURAS

A: Adenina

BCLC: Barcelona Clinic Liver Cancer

CHC: carcinoma hepatocelular

C: Citosina

DNA, ácido desoxirribonucleico

ECOG OS: Eastern Cooperative Oncology Group performance status.

EFSec: fator de alongação transcricional Sec-específico

eIF4a3: fator eucariótico de iniciação tradução

G, guanina

GPx: glutationa peroxidase

GPX1 ou 4: glutationa peroxidase 1 ou 4

GWAS: Genome-wide association studies

L30: proteína ribossomal L30

LOH: perda de heterozigosidade

MAF: minor allele frequency

mRNA: RNA mensageiro

NASH: esteato-hepatite não alcóolica

RNA: ácido ribonucléico

ROS: espécies reativas de oxigênio

SBP2: proteína 2 de ligação a SECIS

Se: selênio

Sec: selenocisteína

SECIS: sequência de inserção de Sec

SelP: selenoproteína P

SEP15: 15 kDa selenoproteína

SNP: polimorfismo de nucleotídeo único

SOD2: superóxido dismutase 2

VHB: vírus da hepatite B

VHC: vírus da hepatite C

T: timina

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Sistema de estadiamento do CHC proposto pelo Barcelona Clinic Liver Cancer (BCLC). Abreviaturas: ECOG PS, Eastern Cooperative Oncology Group performance status, usado para avaliar o nível do paciente em termos de habilidade de autocuidado, atividades diárias e atividades físicas. Figura traduzida de Forner et al., 2018 (1)..... **18**
- Figura 2.** Fatores envolvidos no desenvolvimento e progressão do CHC. Figura traduzida de Klungboonkrong et al (2)..... **19**
- Figura 3.** Esquema da síntese de selenoproteínas. Abreviaturas: Sec, selenocisteína; SECIS, sequência de inserção de Sec; SBP2, proteína 2 de ligação a SECIS; EFSec, fator de alongação transcricional Sec-específico; L30, proteína ribossomal L30; eIF4a3, fator eucariótico de iniciação tradução. Figura produzida por Labunskyy et al (3)..... **23**

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Comparação da expressão gênica de selenoproteínas na literatura.....**27**

Tabela 2. Evidências da literatura sobre os SNPs das selenoproteínas.....**29**

RESUMO

Introdução: O carcinoma hepatocelular é uma neoplasia primária do fígado, classificada como a terceira causa de morte por câncer no mundo. Qualquer condição que leve a uma doença hepática crônica, configura-se como um agente oncogênico em potencial. O estresse oxidativo é uma das condições estudadas devido à ligação entre o acúmulo de espécies reativas de oxigênio e danos ao DNA. As selenoproteínas, por sua vez, desempenham papel antioxidante no corpo, combatendo esse efeito. Alterações na estrutura e/ou expressão dessas proteínas podem estar ligadas à suscetibilidade do organismo aos efeitos do estresse oxidativo, incluindo a carcinogênese.

Objetivo: Avaliar a influência da variabilidade genética e da expressão das selenoproteínas na suscetibilidade ao carcinoma hepatocelular.

Metodologia: Foram realizados dois estudos. No primeiro estudo foi avaliada a expressão gênica de enzimas antioxidantes (GPX1, GPX4, SEP15, SelP, SOD1, SOD2, GSR, CAT e NRF2) em tecidos tumorais e não tumorais de pacientes com CHC, além de pacientes saudáveis. As análises foram realizadas experimentalmente por RT-qPCR em pacientes com carcinoma hepatocelular e por bioinformática em pacientes dos bancos de dados TCGA e GTEx. No segundo estudo foi realizada a genotipagem por qPCR dos SNPs *GPX1* rs1050450, *GPX1* rs3448, *GPX4* rs713041, *SEP15* rs5845, *SEP15* rs5859, *SELENOP* rs7579 e *SELENOP* rs3877899 em pacientes caso e controle, assim como foi realizada em pacientes do TCGA por ferramentas de bioinformática. As taxas de perda de heterozigosidade estimada foram calculadas pelo pacote de R HWE-LOH. Ambos os estudos foram aprovados pelo CEP da UFCSPA (nº 2.400.119 e nº 2.315.844).

Resultados: As análises de bioinformática detectaram diferença significativa entre os grupos caso x controle e tumor x peritumor na expressão de grande parte dos genes estudados. Em comparação ao tecido peritumoral, a expressão de *GPX4* estava aumentada ($p=0,02$) e a de *SOD2* diminuída ($p=0,04$) no tecido tumoral nos dados experimentais. A baixa expressão de *GPX1* ($p=0,006$), *GPX4* ($p=0,01$), *SELENOP* ($p=0,006$), *SOD1* ($p=0,007$), *CAT* ($p<0,001$), e *NFE2L2* ($p<0,001$), e alta

expressão de *GSR* ($p < 0,001$), foram associados com menor sobrevida em 12 meses nos pacientes do TCGA. Além disso, foram encontradas diferenças significativas nas frequências genóticas de todos os SNPs estudados, exceto para o rs3448, entre casos e controles ($p < 0,05$), na amostra experimental. Tanto a amostra experimental quanto os dados do TCGA apresentaram tendência a perda do genótipo heterozigoto em amostras tumorais, sendo que as análises de perda heterozigosidade estimada revelaram taxas variadas (8-41%) nas mesmas amostras. A perda de heterozigosidade para o SNP rs713041 do gene *GPX4* foi associada com características clínico-patológicas como a etiologia (consumo de álcool, $p = 0,04$) e o grau histológico (tumores pouco diferenciados, $p = 0,02$).

Conclusões: Tanto alterações na expressão gênica quanto nos genes de selenoproteínas parecem ter papel importante no desenvolvimento e progressão do carcinoma hepatocelular.

Palavras-chave: Carcinoma hepatocelular; Estresse oxidativo; Selenoproteínas; SNPs; Perda de heterozigosidade.

ABSTRACT

Introduction: Hepatocellular carcinoma is a primary liver cancer, ranked as the third leading cause of cancer death worldwide. Any condition that leads to chronic liver disease is a potential oncogenic agent. Oxidative stress is one of the conditions studied due to the link between the accumulation of reactive oxygen species and DNA damage. Selenoproteins, in turn, play an important antioxidant role against oxidative stress. Changes in the structure and/or expression of these proteins may be linked to susceptibility to oxidative stress effects, including carcinogenesis.

Aim: Evaluate the influence of genetic variability and gene expression of selenoproteins in hepatocellular carcinoma.

Methodology: Two studies were conducted. In the first study, the gene expression of antioxidant enzymes (GPX1, GPX4, SEP15, SelP, SOD1, SOD2, GSR, CAT and NRF2) was evaluated in tumoral and non-tumoral tissues of patients with HCC as well as healthy patients. Analyzes were performed experimentally by RT-qPCR in patients with hepatocellular carcinoma and by bioinformatics in patients from TCGA and GTEx databases. In the second study, the genotyping by qPCR of SNPs *GPX1* rs1050450, *GPX1* rs3448, *GPX4* rs713041, *SEP15* rs5845, *SEP15* rs5859, *SELENOP* rs7579 and *SELENOP* rs3877899 was performed in case and control patients, as well as it was performed in TCGA patients using bioinformatics tools. Estimated loss of heterozygosity rates were calculated by the R HWE-LOH package. Both studies were approved by UFCSPA's Ethics Committee (No. 2,400,119 and No. 2,315.844).

Results: Bioinformatics analyzes detected a significant difference in the expression in most of studied genes between tumoral x peritumoral tissues and case x control groups. Regarding the peritumoral tissue, the expression of *GPX4* was increased ($p=0.02$) as well as *SOD2* was decreased ($p=0.04$) in tumoral tissue in the experimental data. The low expression of *GPX1* ($p=0.006$), *GPX4* ($p=0.01$), *SELENOP* ($p=0.006$), *SOD1* ($p=0.007$), *CAT* ($p<0.001$), and *NFE2L2* ($p<0.001$), and high expression of *GSR* ($p<0.001$), were associated with lower 12-month overall survival in TCGA sample. Furthermore, significant differences were found genotype

frequencies of all SNPs studied, except for rs3448, between case and control groups in experimental sample ($p < 0.05$). Both the experimental sample and the TCGA data showed a trend towards loss of the heterozygous genotype in tumoral samples, and the estimated loss of heterozygosity analysis revealed varying rates (8-41%) in the same samples. Loss of heterozygosity for the rs713041 SNP of the *GPX4* gene was associated with clinicopathological characteristics such as etiology (alcohol consumption, $p = 0.04$) and histological grade (poorly differentiated tumors, $p = 0.02$).

Conclusions: Both changes in gene expression and genetic alterations in selenoproteins seem to play an important role in the development and progression of hepatocellular carcinoma.

Keywords: hepatocellular carcinoma; selenoproteins; oxidative stress; SNPs; loss of heterozygosity.

1.INTRODUÇÃO

1.1. Carcinoma Hepatocelular

1.1.1. Epidemiologia

O carcinoma hepatocelular (CHC) é o principal tipo de tumor primário do fígado, representando de 70 a 90% dessas malignidades, e ocupando o sétimo lugar na lista de cânceres mais comuns do mundo (4–6). As taxas de incidência para o CHC variam regionalmente uma vez que estão intimamente relacionadas com a exposição aos principais fatores de risco para o desenvolvimento da doença. Os continentes asiático e africano apresentam as maiores taxas, em média 20 casos/100.000 habitantes, no entanto, regiões como a América do Norte e Europa, que antes apresentavam baixas taxas, vêm demonstrando um crescimento nos últimos anos (1,5,6). De um modo geral, segundo dados de 2020 do GLOBOSCAN, a incidência média na América do Norte e do Sul foi de, respectivamente, 10.1 casos/100.000 habitantes e 5.4 casos/100.000 habitantes para o sexo masculino (6). No Brasil, os dados sobre a incidência de CHC ainda são escassos, mas coortes realizadas em São Paulo (7) e Porto Alegre (8) apresentaram uma incidência cumulativa estimada de 2,9% e 2,6%, respectivamente.

Uma grande variação das taxas de incidência do CHC também é vista entre diferentes populações étnicas que vivem numa mesma região. Nos Estados Unidos, por exemplo, encontram-se taxas altas entre indivíduos descendentes de asiáticos e nativos americanos, intermediárias entre hispânicos e negros, e baixas taxas entre indivíduos brancos. Uma possível explicação para isso seriam as diferenças na prevalência e tempo de exposição aos fatores de risco para o CHC, seja por questão de hábitos ou status social, entre as etnias (4,9). Além disso, estudos epidemiológicos indicam que a incidência de CHC é maior em homens do que em mulheres, apresentando-se de 2 a 4 vezes maior no sexo masculino. As causas dessa disparidade ainda são desconhecidas, mas hipóteses apontam para a diferença da exposição aos fatores de risco, sendo maior em homens, e também pelo possível efeito protetor do estrogênio sobre os hepatócitos (5,6,9).

Em 2020, a taxa de mortalidade mundial para o CHC foi de 830.000 mortes/906.000 casos, configurando-o como a terceira causa de morte por câncer no mundo (6). Já no Brasil, segundo dados de 2019 do INCA, o CHC apresenta-se como a sexta causa de morte por câncer, em homens, e a oitava em mulheres (10).

1.1.2. Fatores de risco para o CHC

O CHC é um câncer heterogêneo que geralmente se desenvolve a partir de uma doença crônica do fígado, estando, em grande parte das vezes, associado à cirrose. Os principais fatores de risco incluem infecções pelos vírus da hepatite B (VHB) e hepatite C (VHC), consumo exagerado de álcool, intoxicação pela aflotoxina B1 e, cada vez mais presente, a esteato-hepatite não alcóolica (NASH). Outras condições que afetam o fígado como a obesidade e a diabetes podem servir como fatores de risco, mas possuem um menor impacto global (4,9). As etiologias também variam geograficamente, sendo que a infecção pelo VHB é o principal responsável em áreas com maior incidência, enquanto que o VHC está mais associado a áreas com menor incidência (5). No Brasil, de uma forma geral, o VHC apresenta-se como principal etiologia, seguido da infecção pelo VHB e o consumo excessivo de álcool (8,11,12).

A cirrose está presente em cerca de 80 a 90% dos casos de CHC, estando, muitas vezes, acompanhada de fibrose moderada a avançada. As causas para a cirrose podem ser diversas, mas destacam-se as causadas pelos vírus da hepatite que abrangem 80% dos casos de cirrose mundialmente (9). A cirrose é resultado de proliferação celular em nódulos em regeneração, cujos efeitos podem desencadear modificações como a alteração funcional de proteínas regulatórias (13). Além de por si ser uma condição pré-maligna, a cirrose promove maior suscetibilidade ao fígado perante outros tipos de agente oncogênicos externos, uma vez que as células estão mais suscetíveis à alterações no DNA (14). Por isso, é também considerada como um marcador de carcinogênese persistente mediada pelo dano hepático e inflamação crônica (9).

A infecção pelo vírus da hepatite B (VHB) é considerada um dos principais fatores de risco para o CHC, uma vez que abrange cerca de 80% dos casos

mundialmente. O VHB tem principal destaque como fator de risco em áreas de altas taxas de incidência como África Subsaariana e Leste Asiático (4,5,9). Nessas áreas, o principal método de transmissão é via vertical, enquanto que em áreas de baixas incidências como Noroeste da Europa, Oceania, América do Sul e do norte a via sexual (horizontal) e a transmissão por transfusão são as mais comuns (9). Estima-se que a integração do VHB no DNA do hospedeiro induza ao dano, levando a um risco aumentado de CHC e que o conteúdo de carga viral e a duração da infecção contribuam para um risco acumulado de efeito prolongado. Além disso, o VHB pode causar prejuízos de forma indireta ao ativar vias de inflamação (2).

O vírus da hepatite C (VHC), por sua vez, apresenta-se como um fator de risco importante para o CHC, estando presente de 10 a 20% dos casos, sendo a causa mais comum em países desenvolvidos como Estados Unidos, países da Europa e Japão, em que as taxas variam de 30-90% (5,9). A principal via de contaminação pelo vírus, quando relacionado ao CHC, se dá por transmissão através de sangue contaminado ou compartilhamento de agulhas (4,9). Contrariamente ao VHB, o mecanismo de desenvolvimento tumoral pelo VHC ainda não está totalmente esclarecido. Aponta-se que o vírus possa agir de duas maneiras: a indireta, em que o vírus induz a inflamação hepática e a fibrose; e a direta, em que a expressão de proteínas virais do VHC promoveria mutações e transformação maligna nas células infectadas (2,5,9).

O álcool é considerado um fator de risco bem estabelecido para o CHC, principalmente pelo fato de propiciar o desenvolvimento de uma doença alcoólica do fígado, em particular a cirrose, e de seu efeito sinérgico com a infecção por VHB ou VHC (5,9). O consumo crônico de álcool¹ está associado ao aumento de estresse oxidativo e a inflamação, assim como, aumento de danos ao DNA (9,15). Outra substância também apontada como um fator de risco é a aflotoxina B1, uma micotoxina derivada do fungo *Aspergillus* sp, cujo papel relacionado ao CHC se deve ao fato de possuir um potente efeito hepatocarcinogênico (5,9).

¹Nota: Não há consenso nos estudos na forma de descrição do consumo de álcool como etiologia, mas o consumo de 80g/dia de álcool, por mais de dez anos, já foi associado com o aumento em 5 vezes do risco de carcinoma hepatocelular (15).

A prevalência de esteato-hepatite não alcoólica (NASH) associada ao CHC tem crescido nos últimos anos, especialmente em países ocidentais. Os mecanismos pelos quais a NASH atua como um fator de risco geralmente são associados à indução inflamatória da cirrose. Além disso, também é sugerido que o NASH possa atuar de maneira sinérgica com outros fatores de risco do CHC (4,5,9).

1.1.3. Diagnóstico e Prognóstico do CHC

Os métodos de rastreio e vigilância são o padrão para o manejo do CHC, sendo que já foram publicados cerca de dez diretrizes sobre o assunto no mundo todo, cada uma baseada na epidemiologia e prevalência de fatores de risco da região. De modo geral, o rastreio é preferencialmente realizado através de exames de imagem como a ultrassonografia, uma vez que é um procedimento bem tolerado e apresenta sensibilidade de 60-90% (1,4,16). O diagnóstico do CHC é realizado através de exames de imagem (tomografia computadorizada com contraste e/ou ressonância magnética), podendo também estar associado a detecção de marcadores tumorais no sangue (como a alfa-fetoproteína) e a biópsia. No entanto, a presença das características típicas na imagem radiológica, em duas diferentes modalidades, já é suficiente para o diagnóstico (1,16,17).

O prognóstico do CHC é desfavorável, uma vez que apenas uma minoria dos pacientes é diagnosticada nas etapas iniciais do câncer. A média de sobrevida dos pacientes é de 11 meses (5). Uma série de classificações pode ser utilizada para o estadiamento da doença, dependendo da severidade da cirrose e do grau de envolvimento tumoral. Parâmetros como o TNM², que avaliam o local do tumor, o acometimento linfático e a ocorrência de metástases; e a classificação Child-Pugh, que avalia exames laboratoriais como bilirrubina e albumina total, podem ser incorporados nos critérios para o estadiamento do CHC (1,16,17). Um dos principais sistemas de estadiamento é o proposto pela Barcelona Clinic Liver Cancer (BCLC) (Figura 1) em que os pacientes são classificados em estágio precoce, inicial, intermediário, avançado e terminal, e sendo indicado o melhor tipo de tratamento para cada estágio (1,16,17).

²Nota: O sistema TNM estadia o câncer através de informações sobre o Tumor primário, os linfonodos e as Metástases. É utilizado para a determinação da extensão do câncer.

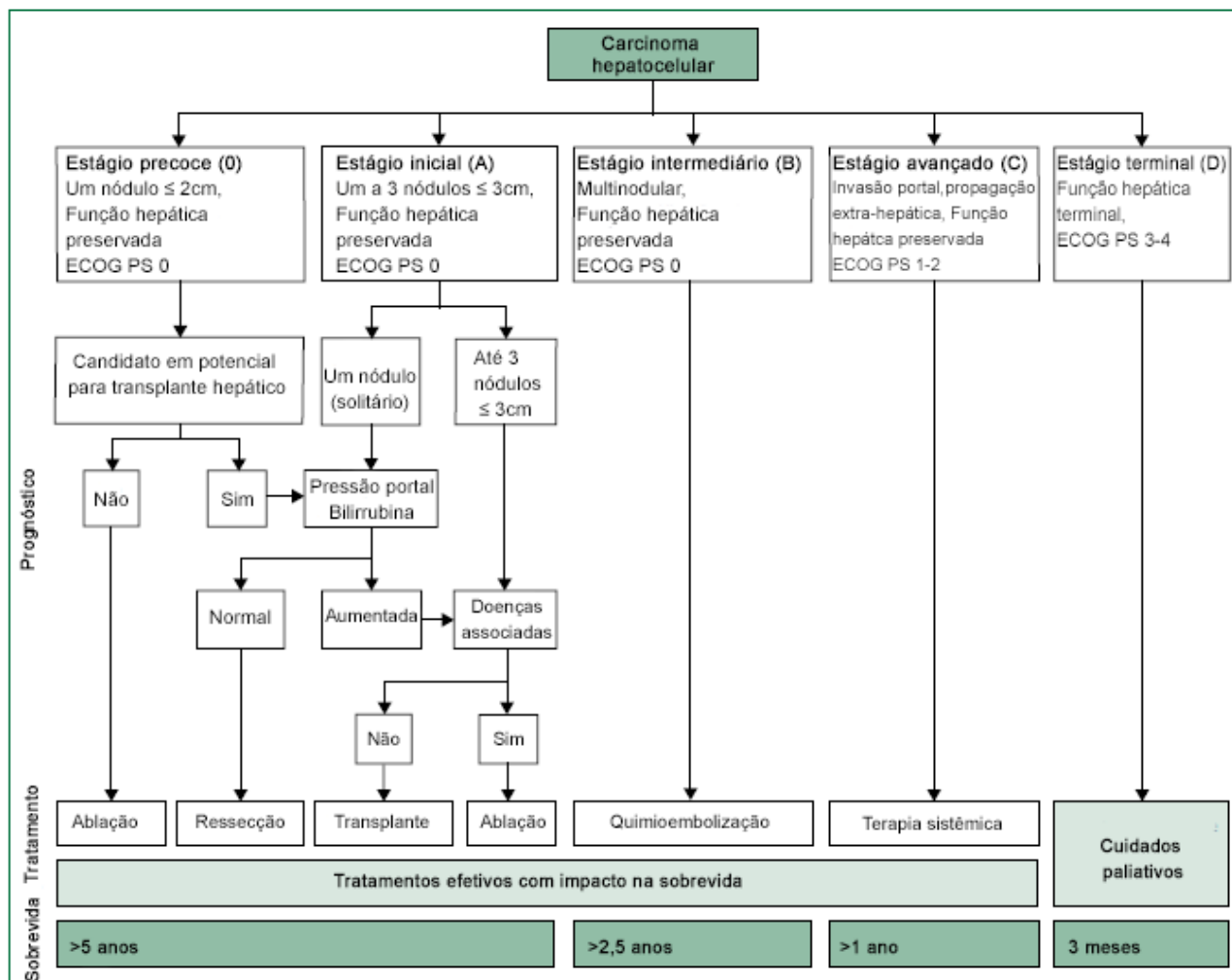
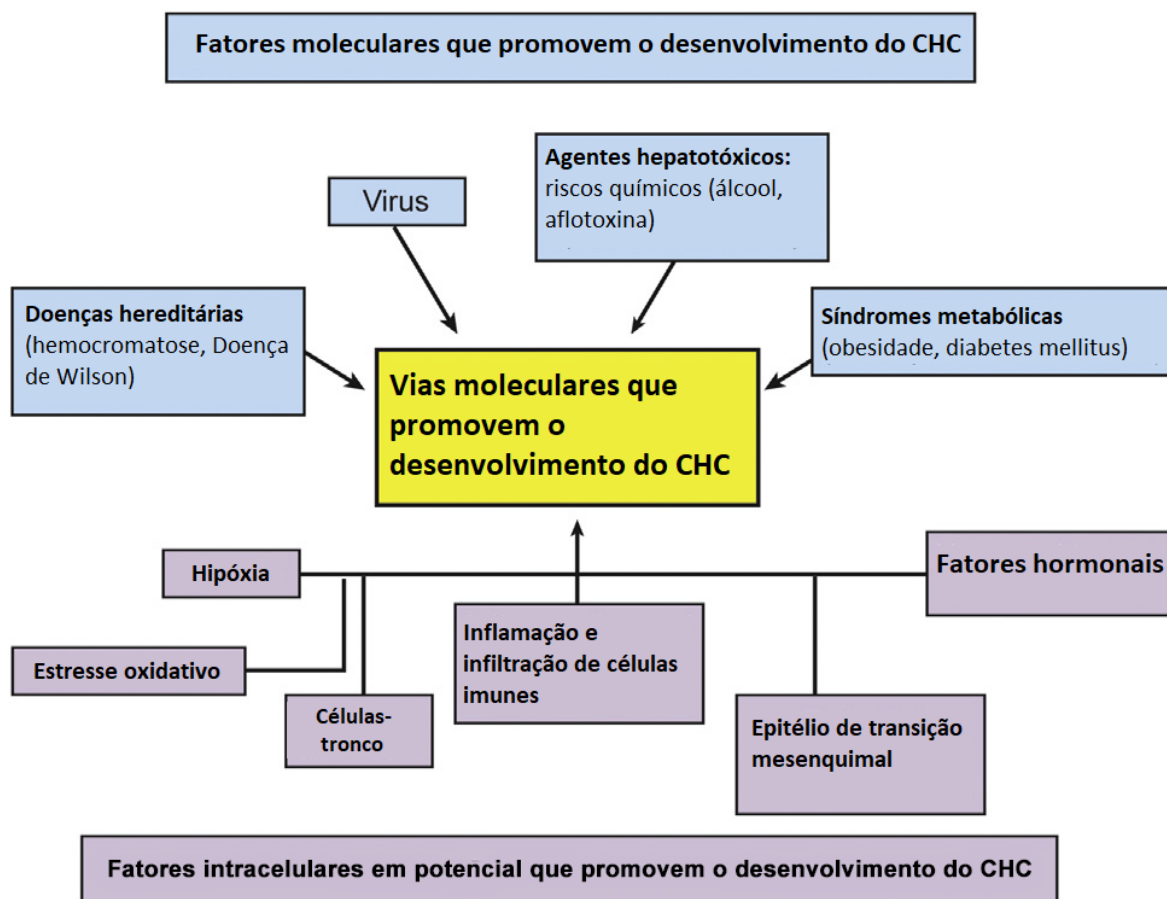


Figura 1. Sistema de estadiamento do CHC proposto pelo Barcelona Clinic Liver Cancer (BCLC). Abreviaturas: ECOG PS, Eastern Cooperative Oncology Group performance status, usado para avaliar o nível do paciente em termos de habilidade de autocuidado, atividades diárias e atividades físicas. Figura traduzida de Forner et al., 2018 (1).

1.1.4. Patogênese e aspectos moleculares

A hepatocarcinogênese é caracterizada por um processo complexo e com várias etapas que envolvem tanto fatores intrínsecos quanto extrínsecos. A evolução tumoral do CHC ainda não foi completamente elucidada, mas é pressuposto que ocorra uma série de mudanças (Figura 2) que envolvem fatores como o microambiente tumoral, o estresse oxidativo, as vias imunes e inflamatórias, a hipóxia, além da ocorrência de várias alterações moleculares como ativação de citocinas e danos ao DNA (2,18). Por sua vez, esses fatores parecem ser

influenciados por agentes extrínsecos ao organismo como a exposição aos principais fatores de risco: infecções virais, desordens metabólicas, doenças hereditárias, agentes químicos, entre outros (2).



CCF
©2015

Figura 2. Fatores envolvidos no desenvolvimento e progressão do CHC. Figura traduzida de Klungboonkrong et al (2).

Na grande maioria dos casos (90%), o CHC irá se desenvolver a partir de uma doença crônica hepática e da cirrose. Nesse caso, os fatores extrínsecos citados provocam uma ação continuada de dano e regeneração ao fígado que culminam na formação de uma doença crônica de base (18,19). Nessa etapa pré-maligna, o ambiente tecidual é inundado de células inflamatórias, citocinas e fatores de crescimento que favorecem a transformação de nódulos hiperplásicos de hepatócitos regenerativos em lesões que, posteriormente, progridem para a formação de nódulos displásicos (18–20). Por sua vez, os nódulos displásicos

podem evoluir ao estabelecimento do CHC em si, com posterior aquisição da capacidade de invasão tecidual, formação de novos capilares (angiogênese) e ação metastática (19,20).

A transformação maligna, e posterior evolução tumoral, no CHC é acompanhada de variações genéticas e eventos genômicos. O acúmulo de mudanças genéticas e epigenéticas participa e tem influência em todas as etapas da carcinogênese (iniciação, promoção e progressão) (18,21), sendo que, no CHC, os principais tipos de alterações genéticas relatadas podem ser divididas em quatro grandes classes: encurtamento dos telômeros, mutações somáticas, polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) e desequilíbrio genômico (22,23).

O encurtamento dos telômeros é descrito como um passo crítico no CHC, estando correlacionado com o aumento da instabilidade genômica e associado a iniciação tumoral em fígados cirróticos (19,20). A reativação da telomerase é encontrada em 90% dos CHCs, podendo ocorrer devido a mutações no promotor do *TERT* (aprox.60% dos casos), ampliações do gene ou inserção do vírus da hepatite B (HBV) no promotor (19,24). É proposto que o encurtamento dos telômeros atue nas etapas iniciais da hepatocarcinogênese ao promover uma maior instabilidade cromossômica e influenciar na transformação de lesões cancerígenas. Por sua vez, em etapas mais avançadas do desenvolvimento do CHC, a reativação da telomerase auxilia na progressão tumoral ao restaurar a estabilidade cromossômica (20).

As mutações somáticas ocorrem tanto em tecidos pré-neoplásicos como em tecidos tumorais, contribuindo para a iniciação e progressão do câncer (21,22). As consequências desse tipo de mutação irão depender tanto do gene atingido quanto na região de ocorrência no genoma. Mutações do tipo *missense*, que ocorrem em regiões codificantes, poderão influenciar diretamente no funcionamento do produto proteico. Como é o caso de mutações em genes supressores tumorais, em que ocorre perda de função, e proto-oncogenes, em que ocorre o ganho de função. Já no caso de mutações ocorrendo em regiões não codificantes, as alterações podem ter efeito em funções regulatórias da célula, influenciando processos de transcrição e tradução (18,21). No CHC, a literatura aponta para uma série de mutações em

genes cujas alterações influenciam variadas vias de sinalização celular como é o caso dos genes *p53*, *pRb*, *p21*, *PTEN*, *Ras*, *c-myc*, *c-fos*, *c-erb2* (18,22). As principais vias alteradas no CHC são as de manutenção da telomerase (TERT), controle do ciclo celular (TP53), via WNT/b-catenin, via do estresse oxidativo (NRF2/KEAP1), via RAS/MAPK, via JAK/STAT e via de remodelamento de cromatina (ARID1A/ARID2) (21–24).

Os polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) são a forma mais comum de variação genética no corpo humano, sendo responsáveis por características individuais do organismo, inclusive de suscetibilidade a doenças como o câncer. Os SNPs são caracterizados pela troca de um nucleotídeo em uma posição específica do DNA e cujas consequências podem causar uma alteração, ainda que nem sempre de maneira extrema, na proteína (21,23). Vários estudos como os grandes *Genome-Wide Association Studies* (GWAS) já demonstraram a presença de associação entre SNPs e a suscetibilidade ao CHC. Os genes associados incluem aqueles envolvidos em processos de metabolismo da célula tumoral, resposta imune, resposta ao estresse, estresse oxidativo ou envolvidos nas principais vias de sinalização celular (21).

O desequilíbrio genômico é uma alteração característica de células tumorais, sendo o tipo mais comum de alteração genética no CHC. A instabilidade cromossômica é causa de aneuploidia, podendo ocorrer devido a erros durante o processo de mitose ou nos processos de replicação e reparo do DNA. Essas mudanças genômicas podem ser classificadas tanto como numéricas, como o caso de perda e ganho de todo o cromossomo; quanto estruturais, onde apenas fragmentos do cromossomo podem ser adicionados, perdidos, invertidos, amplificados ou, ainda, podendo acontecer a perda alélica (21,23). Nesse último caso, ocorre o processo de perda de heterozigidade (LOH), causado tanto por dissomia uniparental adquirida quando por conversão gênica, que é caracterizado pela perda de um dos alelos (geralmente o tipo selvagem) de um locus. Isso, por sua vez, promove a ocorrência de uma diferença de genótipo entre o DNA germinativo (heterozigoto) e o DNA tumoral (homozigoto) (23,25). As ampliações mais comumente relatadas no CHC ocorreram nas regiões 1q, 6p, 8q, 17q e

20q(18,23); já as perdas cromossômicas foram reportadas nas regiões 1p, 1q, 2q, 3p, 4q, 5q, 6p, 8p, 8q, 9p, 10q, 11p, 13q, 14q, 16q e 17p (23,26).

1.2. Estresse oxidativo e selenoproteínas

1.2.1. Selenoproteínas

O estresse oxidativo consiste em uma condição de desequilíbrio fisiológico entre compostos oxidantes, como as espécies reativas de oxigênio (ROS), e os compostos antioxidantes (27,28). As ROS, por sua vez, são produtos normais do metabolismo celular, como o ânion superóxido (O_2^-), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxil (OH^\cdot). Em condições fisiológicas, as defesas antioxidantes são suficientes para manter o equilíbrio da concentração dessas substâncias, no entanto, em condições patológicas que levam ao estabelecimento do estresse oxidativo, o acúmulo das ROS pode ser prejudicial (27–29).

Um dos efeitos do acúmulo das ROS no organismo está ligado ao dano do DNA, cujas consequências podem levar ao aumento da mutagênese, instabilidade genômica e aumento da proliferação celular (30). Em razão disso, o estresse oxidativo e a ação das ROS já foram associados com uma variedade de doenças, incluindo o câncer (2,27,31). A indução do estresse oxidativo pode ocorrer devido a diversos agentes externos prejudiciais ao corpo, como a exposição à radiação ionizante, drogas e infecções; ou através de fontes internas como alterações do próprio metabolismo (28,31).

Em contrapartida às ROS, o organismo humano é composto de vários componentes com funções antioxidantes, tendo as selenoproteínas como alguns dos seus representantes. As selenoproteínas exercem suas ações antioxidantes através do composto selênio que está incorporado em seu sítio ativo na forma de selenocisteína (Sec) (3,32). O selênio (Se) é um micronutriente adquirido através da dieta tanto em suas formas inorgânicas (selenito e selenato) quanto orgânicas (selenometionina e selenocisteína). Sua absorção ocorre no intestino via paracelular (inorgânicas) e transcelular (orgânicas), sendo depois transportado até o fígado, onde sofre metabolização e pode ser transformado a seleneto de

hidrogênio (H_2Se). O H_2Se é precursor das selenoproteínas, sendo posteriormente convertido a selenofostato (33).

A síntese de selenoproteínas (Figura 3) é dependente da incorporação do selênio em sua estrutura na forma de selenocisteína que, por sua vez, ocorre devido a dois mecanismos principais: o uso de um RNA transportador específico (Sec tRNA^{[Ser]Sec}) que tem incorporado a forma ativada do selênio, o selenofostato, em sua estrutura; e a presença da sequência de inserção de Sec (SECIS), localizada na região 3'UTR do mRNA de selenoproteínas (3,32). O elemento SECIS é responsável pela ativação de uma maquinaria celular que sinaliza a incorporação da selenocisteína, através do Sec tRNA^{[Ser]Sec}, quando o ribossomo faz a leitura da sequência UGA (normalmente, um códon de parada) no mRNA. Para esse processo também são requeridos pelo menos mais dois fatores: a proteína 2 de ligação a SECIS (SBP2) e fator de elongação transcricional Sec-específico (EFSec) (3).

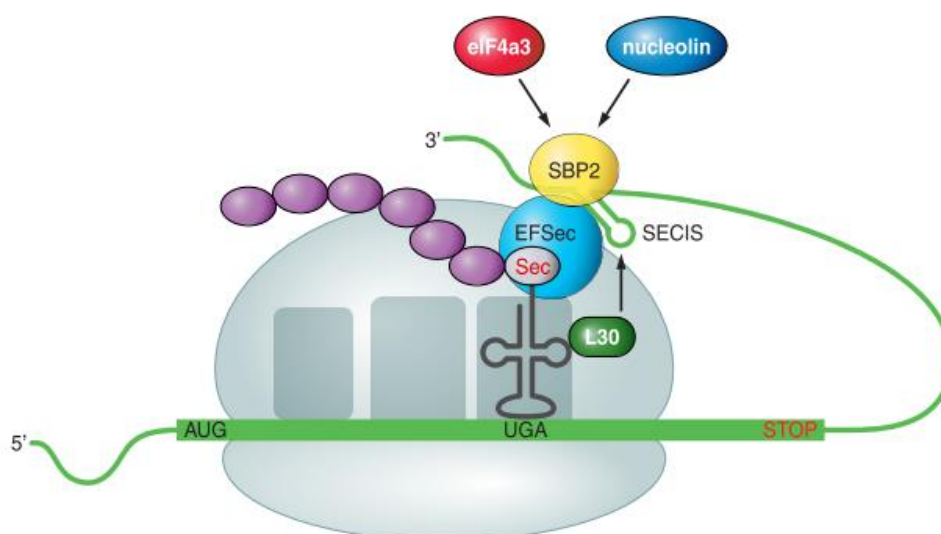


Figura 3. Esquema da síntese de selenoproteínas. Abreviaturas: Sec, selenocisteína; SECIS, sequência de inserção de Sec; SBP2, proteína 2 de ligação a SECIS; EFSec, fator de elongação transcricional Sec-específico; L30, proteína ribossomal L30; eIF4a3, fator eucariótico de iniciação tradução. Figura produzida por Labunsky et al (3).

O selenoproteoma humano consiste em 25 diferentes selenoproteínas que possuem localizações, funções e regulações variadas, mas todas envolvidas nos processos redox (3,32). Em destaque, estão as proteínas que formam a família das glutathionas peroxidases (GPxs). Suas ações estão envolvidas em muitos processos do corpo humano, atuando principalmente no metabolismo do peróxido de hidrogênio, através de sua detoxificação, e desempenhando, dessa forma, papel no equilíbrio redox das células (3,32).

A glutathiona peroxidase 1 é codificada pelo gene *GPX1* que se localiza no braço curto do cromossomo 3 (3p21.31), sendo formada por uma estrutura de homotetrâmero associada com quatro argininas e uma lisina. Essas subunidades têm função de ligação com a glutathiona (34). Ela é considerada a mais abundante selenoproteína em mamíferos, localizando-se no citosol e distribuindo-se em todas as células do corpo, mas com maior expressão em órgãos como o fígado e os rins (3,34,35). Suas ações estão envolvidas no processo de redução de H_2O_2 dependente de glutathiona, servindo como um forte antioxidante intracelular. Além disso, como o H_2O_2 é uma molécula envolvida em diversas ações como proliferação celular, apoptose, resposta ao estresse e funções envolvendo a mitocôndria, a *GPX1* acaba por atuar também como um modulador desses mecanismos (3).

Outra enzima da família das GPxs é a glutathiona peroxidase 4 cuja estrutura é formada por um monômero, sendo codificada pelo gene *GPX4*, localizado no braço curto do cromossomo 19 (19p13.3). O gene *GPX4* é capaz de codificar 3 isoformas da proteína: a citosólica (c*GPX4*), a mitocondrial (m*GPX4*) e a nuclear (sm*GPX4*). Enquanto a primeira tem ampla distribuição nos tecidos, as duas últimas são basicamente expressas nos testículos (34). Diferentemente da *GPX1*, além da redução da glutathiona, a *GPX4* possui a ação na redução de peróxidos lipídicos como os hidroperóxidos de fosfatidilcolina e colesterol, desempenhando papel protetor na prevenção da decomposição lipídica. Outras atuações da enzima parecem estar envolvidas na regulação de proteínas tirosina fosfatases através da modulação do H_2O_2 (3,34,35).

A 15-kDa selenoproteína é um outro tipo de proteína envolvida nos processos antioxidantes do corpo. Ela é codificada pelo gene *SELENOF* ou *SEP15*,

localizado no braço curto do cromossomo 1 (1p22.3). Sua expressão nos tecidos humanos é variável, sendo mais significativa em órgãos como a próstata, o fígado, os rins e testículos. Suas funções ainda não estão bem esclarecidas, mas estudos apontam que, devido a sua localização intracelular no retículo endoplasmático, esta enzima parece estar envolvida nos processos de redução ou isomerização de pontes dissulfeto em proteínas, desempenhando papel de controle de qualidade do dobramento proteico (3,36).

Também podemos citar a proteína denominada selenoproteína P (SelP) que é codificada pelo gene *SELENOP* ou *SEPP1*, localizado no braço curto do cromossomo 5 (5p12). A SelP é primariamente sintetizada pelos hepatócitos, sendo posteriormente secretada para o plasma (37). Sua estrutura é formada por múltiplos resíduos de Sec, o que é atribuída com a função de transportadora de Se para tecidos periféricos do corpo. Dessa forma, essa proteína para se ter um papel central na homeostase do Se no organismo humano, controlando a sua distribuição e, portanto, agindo também no combate ao estresse oxidativo (3,37).

1.2.2. Alterações genéticas de selenoproteínas

Tendo em vista a importância das funções das selenoproteínas como protetoras contra o estresse oxidativo, alterações na estrutura e/ou expressão dessas proteínas podem levar ao desequilíbrio dos processos redox do corpo e, por consequência, a diversos distúrbios como o câncer. De fato, alguns estudos já abordaram esses aspectos envolvendo uma série de selenoproteínas e vários tipos de cânceres (Tabela 1). O aumento da expressão do gene *GPX1* em tecidos tumorais já foi relatado em cânceres colorretal, de bexiga, de laringe e renal (38–42), enquanto que a redução da expressão foi reportada em câncer gástrico e de mama (43,44). Por sua vez, uma superexpressão do gene *GPX1* foi encontrada em linhagem celular de hepatoma HepG2 quando comparada às células de hepatócitos LO2 (45).

Para o gene *GPX4*, estudos *in vitro* demonstraram uma diminuição da expressão do gene da selenoproteína em linhagens celulares de câncer de mama (46) e carcinoma renal (47) quando comparados à linhagem de célula mamária não

cancerosa. Estudo de Lan et al. (43) também observou o decréscimo da expressão gênica da GPX4 em tecido de câncer gástrico em relação aos controles. Contrariamente a isso, uma superexpressão da enzima foi detectada em linhagens celulares de hepatoma (45,48), amostras de carcinoma de cólon (38) e carcinoma hepatocelular (49).

A expressão do gene *SEP15* também se mostrou alterada em alguns casos como o estudo de Guariniello et al. (48) que demonstrou uma superexpressão da enzima em linhagem de hepatoma com relação à linhagem não cancerosa, e o trabalho Lan et al. (43) detectou um aumento de expressão em câncer gástrico. A expressão gênica da Selp, por sua vez, apresentou-se diminuída em câncer colorretal e de pulmão(39,50), enquanto que apresentou-se superexpressa em estudo *in vitro* com HepG2(48).

Além de modificações no padrão de expressão das proteínas, mudanças na estrutura de uma proteína podem, por vezes, afetar o funcionamento da mesma. Alterações estruturais em uma proteína podem ocorrer devido a alterações genéticas. Dentre as variações genéticas estão os polimorfismos de nucleotídeo único (SNP) que correspondem à substituição de apenas um nucleotídeo do DNA, são alterações que ocorrem com uma frequência maior do que 1% da população, podendo se localizar ou não em regiões codificantes do DNA (51).

Diversos SNPs já foram descritos para as diferentes proteínas, com variadas relações e alterações funcionais ou não (Tabela 2). Para o gene *GPX1*, por exemplo, já foram validados vários SNPs na espécie humana, sendo o SNP rs1050450 um dos mais estudados e com maiores frequências³ para o alelo raro (A=0,22). Essa alteração genética consiste na troca de base de uma guanina (G) por uma adenina (A), sendo, essa substituição, suficiente para formar uma variante do tipo *missense*. Isso afeta o tipo de aminoácido na cadeia proteica, ocorrendo a troca de uma prolina por uma leucina na posição 198 (52). A presença do alelo A para o SNP rs1050450 já foi associada com o aumento do risco de desenvolvimento

³Nota: As frequências para o alelo raro (MAF) descritas nessa tese são referentes às frequências globais do projeto 1000Genomes.

Tabela 1. Comparação da expressão gênica de selenoproteínas na literatura.

| Tipo de câncer | GPX1 | GPX4 | SEP15 | SELENOP |
|--|-------------|-------------|--------------|----------------|
| Carcinoma de cólon (38) | ↑ | ↑ | - | - |
| Câncer colorretal (39) | ↑ | NS | - | ↓ |
| Câncer de bexiga (40) | ↑ | - | - | - |
| Carcinoma de células escamosas da laringe (42) | ↑ | - | - | - |
| Câncer gástrico (43) | ↓ | ↓ | ↓ | - |
| Carcinoma de células renais claras (47) | ↓ | ↓ | - | - |
| Carcinoma de células renais claras (41) | ↑ | NS | - | - |
| Câncer de mama (44) | ↓ | - | - | - |
| Células MCF 7 (46) | ↓ | ↓ | - | - |
| Câncer de pulmão de células não pequenas (50) | - | - | NS | ↓ |
| Carcinoma hepatocelular (49) | - | ↑ | - | - |
| Linhagem celular HepG2 (45) | ↑ | ↑ | - | ↑ |
| Linhagens celulares HepG2 and Huh7(48) | - | ↑ | ↑ | - |

Abreviaturas: ↑= maior expressão no tecido tumoral comparado ao tecido normal/peritumoral (ou linhagem celular não tumoral); ↓= menor expressão no tecido tumoral comparado ao tecido normal/peritumoral (ou linhagem celular não tumoral); NS= resultado sem diferença significativa; - = não analisado. Células MCF 7 constituem um tipo de linhagem celular de câncer de mama; Células HepG2 e Huh7 constituem tipos de linhagem celulares de carcinoma hepatocelular e câncer de fígado.

de cânceres, quando eles foram avaliados em conjunto pela meta-análise de Chen et al. (53) e por estudo de Wang et al (54). Foi encontrada associação com o aumento de risco para câncer pulmão, bexiga, próstata e cabeça e pescoço nesses trabalhos.

Outro SNP do gene *GPX1* é o rs3448, que possui uma MAF (*minor allele frequency*) de T=0,16, e que consiste na troca entre uma timina (T) por uma citosina (C). Nesse caso, a substituição causa alterações na região 5' não traduzida (5'-UTR) do mRNA (52). Poucos estudos foram realizados com esse SNP, mas o trabalho de Geybels et al. (55) já demonstrou que a presença do genótipo TT foi associada com o risco geral ao desenvolvimento de câncer de próstata.

O SNP rs713041 do gene *GPX4*, com MAF de T=0,40, é caracterizado por uma troca de base entre uma timina (T) e uma citosina (C), causando uma mutação do tipo sinônima ou alterando a região 3' não traduzida (3'UTR) da proteína, de acordo com a variante de *splicing* do transcrito (mRNA) em questão (52). Nas selenoproteínas, essa região contém a SECIS que é necessária para que o ribossomo faça a inserção do aminoácido Sec na cadeia peptídica durante a tradução (3). Estudo realizado *in vitro* por Bermano et al. (56) demonstrou que essa mudança altera a ligação de proteínas à região 3'UTR, podendo influenciar na sua atividade. Da mesma forma, Gautrey et al. (57) detectou uma alteração no padrão de síntese da selenoproteína de acordo com a variante do SNP (T/C) em condições de baixa concentração de Se. Além disso, também já foi encontrada associação com o aumento de risco ao câncer colorretal em portadores do genótipo CT (58).

Assim como outras selenoproteínas, o gene da SEP15 também apresenta uma série de SNPs, dentre eles os rs5845 e rs5859 (ambos com MAF de 0,28). O SNP rs5845 é caracterizado por um troca de guanina (G) por adenina (A), sendo o A o alelo raro, enquanto que SNP rs5859 é descrito como a troca de uma citosina (C) por uma timina (T), sendo o T o alelo raro. Ambos formam variantes da região

Tabela 2. Evidências da literatura sobre os SNPs das selenoproteínas.

| SNP | Chr | Gene | Localização do gene | Troca de base | Evidências |
|------------------|-----|----------------|---------------------|---------------|---|
| rs1050450 | 3 | <i>GPX1</i> | 3p21.31 | G>A | Alelo A associado a cânceres de pulmão, bexiga, próstata e cabeça e pescoço (53,54). |
| rs3448 | 3 | <i>GPX1</i> | 3p21.31 | T>C | Genótipo TT associado ao risco geral de câncer de próstata (55). |
| rs713041 | 9 | <i>GPX4</i> | 19p13.3 | T>C | Altera a ligação das proteínas na região 3'UTR, influenciando na atividade da proteína (56). Alteração no padrão de síntese das selenoproteínas (57). Genótipo CT associado a câncer colorretal (58). |
| rs5845 | 1 | <i>SEP15</i> | 1p22.3 | G>A | Genótipo AA associado a câncer retal e próstata (59,60). |
| rs5859 | 1 | <i>SEP15</i> | 1p22.3 | C>T | Genótipo TT associado a câncer retal (60). |
| rs7579 | 5 | <i>SELENOP</i> | 5p12 | C>T | Aumento do risco de câncer de próstata (AA) e colorretal (Alelo A) (61). |
| rs3877899 | 5 | <i>SELENOP</i> | 5p12 | C>T | Genótipo TT associado a câncer de mama e próstata (55,63). |

Abreviaturas: SNP, polimorfismo de nucleotídeo único; Chr, cromossomo; C, citosina; T, timina; A, adenina; G, guanina.

3'-UTR do mRNA (52). Esses SNPs já foram estudados por trabalhos abrangendo alguns tipos de cânceres, alterações na memória em adultos e outros processos. Com relação ao câncer, o genótipo AA (rs5845) foi associado com câncer retal e de próstata e o genótipo TT (rs5859) com câncer retal (59,60).

Por sua vez, para a proteína SelP, dois SNPs apresentam maiores frequências e têm sido alvos de estudos: o rs7579 e o rs3877899. O SNP rs7579 apresenta a MAF de 0,24 e consiste na substituição de uma citosina (C) por uma adenina (T) na região 3'-UTR (52). Com relação a estudos envolvendo o câncer, a presença do genótipo AA foi associada com o aumento do risco de câncer de próstata (61), enquanto que o alelo A foi associado com o aumento de risco de câncer colorretal (58). O SNP rs3877899 (MAF de 0,17), por sua vez, consiste na mesma troca de base (C por T), mas causando uma mutação do tipo *missense* que produz a troca de aminoácido entre uma alanina e uma treonina na posição 234 da cadeia peptídica (52). A homozigosidade do alelo T para esse SNP foi associada com cânceres de mama (62) e próstata (55).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Avaliar a influência da variabilidade genética e do padrão de expressão gênica das selenoproteínas no risco ao carcinoma hepatocelular.

2.2. Objetivos específicos

Analisar a expressão de mRNA das selenoproteínas GPX1, GPX4, Sep15 e SelP e outras enzimas antioxidantes em tecido tumoral, peritumoral e não tumoral de pacientes com carcinoma hepatocelular e a partir de dados do banco de dados TCGA.

Avaliar se parâmetros como idade, sexo, fatores etiológicos e clínicos relacionados com a suscetibilidade/gravidade ao CHC influenciam a expressão dos genes em tecido tumoral e peritumoral de pacientes com carcinoma hepatocelular.

Analisar a variabilidade dos SNPs dos genes *GPX1* (rs1050450 e rs3448), *GPX4* (rs713041), *SEP15* (rs5845, rs5859) e *SELENOP* (rs7579 e rs3877899) em amostras de pacientes com e sem carcinoma hepatocelular.

3.ARTIGOS CIENTÍFICOS

3.1. Artigo científico 1




**Gene expression evaluation of antioxidant enzymes in patients
with hepatocellular carcinoma: RT-qPCR and bioinformatic analyses**

Publicado no periódico Genetics and Molecular Biology em 06 de Abril de 2021,
fator de impacto 1.876.



Research Article
Human and Medical Genetics

Gene expression evaluation of antioxidant enzymes in patients with hepatocellular carcinoma: RT-qPCR and bioinformatic analyses

Andressa de Freitas Alves¹, Ana Carolina de Moura¹, Huander Felipe Andreolla², Ana Beatriz Gorini da Veiga¹ , Marilu Fiegenbaum¹ , Márcia Giovenardi¹ and Silvana Almeida¹ 

¹Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Programa de Pós-graduação em Biociências, Porto Alegre, RS, Brazil.

²Universidade Franciscana, Santa Maria, RS, Brazil.

Abstract

Any condition leading to chronic liver disease is a potential oncogenic agent for hepatocellular carcinoma (HCC). Alterations in the expression of antioxidant enzymes could alter the redox balance. Our aim was to evaluate the expression of the genes *GPX1*, *GPX4*, *SEP15*, *SELENOP*, *SOD1*, *SOD2*, *GSR*, *CAT*, and *NFE2L2* in patients with HCC. Differential gene expression analysis was performed using RNA-Seq data from the TCGA and GTEx databases, and RT-qPCR data from HCC patient samples. Bioinformatic analysis revealed significant differential expression in most genes. *GPX4* expression was significantly increased ($p=0.02$), while *SOD2* expression was significantly decreased ($p=0.04$) in experimental data. In TCGA samples, alpha-fetoprotein levels (mg/dL) were negatively correlated with the expression of *SEP15* ($p<0.001$), *SELENOP* ($p<0.001$), *SOD1* ($p<0.001$), *SOD2* ($p<0.001$), *CAT* ($p<0.001$), and *NFE2L2* ($p=0.004$). Alpha-fetoprotein levels were positively correlated with the expression of *GPX4* ($p=0.02$) and *SELENOP* ($p=0.01$) in the experimental data. Low expression of *GPX1* ($p=0.006$), *GPX4* ($p=0.01$), *SELENOP* ($p=0.006$), *SOD1* ($p=0.007$), *CAT* ($p<0.001$), and *NFE2L2* ($p<0.001$), and higher levels of *GSR*, were associated with low overall survival at 12 months. These results suggest a significant role for these antioxidant enzymes in HCC pathogenesis and severity.

Keywords: Hepatocellular carcinoma, selenoproteins, antioxidant enzymes, oxidative stress, gene expression.

Received: November 26, 2019; Accepted: February 10, 2021.

Introduction

Hepatocellular carcinoma (HCC) has a high mortality rate, and ranks as the third leading cause of cancer deaths worldwide (Ozakyol, 2017; Forner *et al.*, 2018). Major risk factors for HCC include infection with hepatitis B and C viruses, alcohol intake, and fatty liver disease (Ozakyol, 2017; Yang *et al.*, 2019). Prognosis and treatment options vary according to tumor stage and liver function. The percentage of patients eligible for curative treatment varies between high and low-resource countries (Ozakyol, 2017; Yang *et al.*, 2019), but generally fluctuates between 20-30% of patients. The median survival of patients with untreated disease is nine months (Klungboonkrong *et al.*, 2017; Forner *et al.*, 2018). New markers or therapeutic targets are required for early diagnosis, and the development of novel treatment strategies for HCC (Klungboonkrong *et al.*, 2017).

Oxidative stress is associated with cancer, and has a dual role in disease development, due to the effects of reactive oxygen species (ROS) on cellular processes. Increased ROS levels are associated with oncogenic effects because of their ability to cause damage to biological macromolecules, such as DNA, lipids, and proteins (Reuter *et al.*, 2010; Moloney and Cotter, 2018). High concentrations of ROS have been

associated with activation of p53, oxidative lipid peroxidation, consumption of antioxidants, and can ultimately lead to cell death (Wang *et al.*, 2016b; Sajadimajd and Khazaei, 2017). Oxidative stress can play different roles: promoting carcinogenesis or cell apoptosis, or by providing sufficient components to promote cancer cell survival. The physiological functions of ROS include regulation of the expression and activity of several signaling regulators that are involved in key processes, such as proliferation and apoptosis (Gill *et al.*, 2016). Cancer cells, in turn, seem to maintain advantageously elevated levels of ROS to guarantee their survival, by adapting the content and regulation of their antioxidant machinery (Sajadimajd and Khazaei, 2017; Moloney and Cotter, 2018).

Cellular antioxidant defense systems include a series of antioxidant enzymes that maintain homeostasis by restricting ROS production or neutralizing ROS (Gill *et al.*, 2016). This group of enzymes includes major components such as superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), and glutathione reductase (GSR), and selenoproteins, including glutathione peroxidase 1 (GPX1), glutathione peroxidase 4 (GPX4), 15-kDa selenoprotein (SEP15), and selenoprotein P (SelP). All of these enzymes act in pathways of chain-breaking ROS molecules, or have other important functions, including detoxification of hydrogen peroxide (H_2O_2), inhibition of lipid peroxidation, quality control of protein folding, and transport of selenium to peripheral tissues (Gupta *et al.*, 2014; Labunskyy *et al.*, 2014; Zoidis *et al.*, 2018). Altered expression of these enzymes could be a useful resource for cancer cells. Hyperactivation of nuclear factor erythroid 2-related

factor 2 (Nrf2), a transcription factor that regulates the expression of several genes, including antioxidant enzymes, has been associated with a variety of cancers as well as with HCC (Cheng *et al.*, 2015; Menegon *et al.*, 2016; Ma-on *et al.*, 2017; Sajadimajd and Khazaei, 2017).

Previous studies have demonstrated an association between aberrant expression of antioxidant enzymes and cancer (Table 1). Abnormal expression of the *GPX1*, *GPX4*, *SEP15*, and *selenoprotein P (SELENOP)* genes has been detected in a variety of cancers, including gastric cancer (Lan *et al.*, 2017), colon carcinoma (Yagublu *et al.*, 2011), colorectal cancer (Hughes *et al.*, 2018), clear cell renal cell carcinomas (Rudenko *et al.*, 2015; Cheng *et al.*, 2019), laryngeal squamous cell carcinoma (Zhang Q *et al.*, 2018), breast cancer (Król *et al.*, 2018), MCF-7 adenocarcinoma cells (Rusolo *et al.*, 2017), lung cancer (Gresner *et al.*, 2009), and HepG2 liver cancer cells (Guariniello *et al.*, 2015; Zhao *et al.*, 2015). The *SOD1*, *SOD2*, *glutathione-disulfide reductase (GSR)*, *catalase (CAT)*, and *nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (NFE2L2)* genes are deregulated in bladder cancer (Wieczorek *et al.*, 2017), oral squamous cell carcinoma (Pedro *et al.*, 2018), breast cancer (Wolf *et al.*, 2016), lung cancer (Zhang Y *et al.*, 2016), MCF-7 cells (Shi *et al.*, 2017), and HCC (Cheng *et al.*, 2015; Guerriero *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2016a).

In the present study, we produced new data on the gene expression levels of the antioxidant enzyme genes *GPX1*, *GPX4*, *SEP15*, *SELENOP*, *SOD1*, *SOD2*, *GSR*, *CAT*, and *NFE2L2* in human HCC tissues. Bioinformatic analyses using databases and RT-qPCR analysis of the original data were performed to investigate whether changes in the expression of these genes might be associated with severity and overall survival in HCC, and to explore possible relationships between the genes.

Material and Methods

Datasets and bioinformatic analyses of differentially expressed genes

Bioinformatic analyses were performed using two different experimental designs: transversal and case-control studies. For the transversal study, publicly available RNA-Seq data from the liver hepatocellular carcinoma (LIHC) project were downloaded directly from The Cancer Genome Atlas (TCGA) portal. These data included HTSeq-Counts of matched samples from 48 tumoral tissues and 48 normal solid tissues. The results published here are in whole or part based upon data generated by the TCGA Research Network: <https://www.cancer.gov/tcga>. For the case-control study, RNA-Seq by Expectation-Maximization expected count data of 292 TCGA-LIHC tumoral samples (case) and 115 Genotype-Tissue Expression (GTEx) normal liver samples (control) were downloaded from “Figshare Data Record 1”, made available by Wang *et al.* (2018). Since TCGA and GTEx are studies from different sources, reprocessing of data and batch effect removal were necessary for adequate comparison. Therefore, in the present study, normalized datasets provided by Wang *et al.* (2018) were used. Publicly available clinical data were also collected from both datasets.

Differential expression analyses for both studies (tumoral × normal and case × control) were performed using the DESeq2 (Love *et al.*, 2014) package in the R language with $\text{padj} < 0.05$. The Edge R (Robinson *et al.*, 2009) package was also used for trimmed mean of M values (TMM) normalization and generation of logarithmic counts per million (logCPM) data for further statistical analyses.

Tissue samples and clinical data collection

Hepatic fresh tissue specimens (tumoral and adjacent peritumoral tissues) were collected from 14 cirrhotic patients with HCC who underwent liver transplantation between 2013 and 2015 at the Division of Gastroenterology of Irmandade Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre (ISCMPA), Brazil. Clinical data, such as age, sex, etiology, and metabolic panel, were collected from medical records. Informed consent was obtained from all patients. The study protocol was approved by the ISCMPA and Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA) Ethics Committees (no. 2.400.119).

RNA extraction and quantitative real-time PCR analysis

Tissue samples from ISCMPA were collected from explanted liver and immediately dipped in RNAlater solution Ambion® (Thermo Fisher Scientific, USA). The stabilized tissue samples were frozen at -80°C until RNA isolation. Total RNA was extracted from the samples shortly after collection, using TRIzol™ reagent (Invitrogen, USA) according to the manufacturer’s specifications. RNA purity and concentration were evaluated by spectrometry using a Biospec-Nano device (Shimadzu, Japan). RNA integrity was evaluated by agarose gel electrophoresis of total RNA (Figure S1). Total RNA was reverse transcribed using the GoScript™ Reverse Transcription System (Promega, USA) according to the manufacturer’s instructions, in a PCR thermal cycler (Applied Biosystems, USA). Total RNA not used for RT-PCR was frozen at -80°C in case any additional experiments were necessary.

Quantitative polymerase chain reaction (qPCR) assays were performed on a StepOnePlus™ system (Applied Biosystems, USA), using SYBR™ Select Master Mix (Applied Biosystems, USA) and specific primers (Invitrogen, USA). The primer sequences are shown in Table S1. *Actin beta (ACTB)*, *glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)*, and *18S* genes were tested for stability using the protocol described by Moura *et al.* (2014). The *ACTB* gene displayed higher stability, and was used as an endogenous control.

Gene expression was normalized to the *ACTB* housekeeping gene. The difference in gene expression between tumoral and peritumoral tissues (used as the calibrator) was calculated using the $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ method (Livak and Schmittgen, 2001; Schmittgen and Livak, 2008), where $\Delta\Delta\text{Ct} = \Delta\text{Ct}(\text{tumoral}) - \Delta\text{Ct}(\text{peritumor})$ for tumoral tissue and $\Delta\Delta\text{Ct} = \Delta\text{Ct}(\text{peritumor}) - \Delta\text{Ct}(\text{peritumor})$ for peritumoral tissue. Fold-change calculations were conducted as previously described (Schmittgen and Livak, 2008).

Table 1 – Comparison of gene expression in the present study and literature.

| Type of cancer | GPXI | GPX4 | SEP15 | SELENOP | SOD1 | SOD2 | GSR | CAT | NFE2L2 |
|---|------|------|-------|---------|------|------|-----|-----|--------|
| Colon carcinoma (Yagublu <i>et al.</i> , 2011) | ↑ | ↑ | - | - | - | - | - | - | - |
| Colorectal cancer (Hughes <i>et al.</i> , 2018) | ↑ | NS | - | ↓ | - | ↑ | - | - | - |
| Bladder cancer (Wieczorek <i>et al.</i> , 2017) | ↑ | - | - | - | - | NS | - | NS | - |
| Laryngeal squamous cell carcinoma (Zhang <i>et al.</i> , 2018) | ↑ | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Gastric Cancer (Lan <i>et al.</i> , 2017) | ↓ | ↓ | ↓ | - | - | - | - | - | - |
| Clear cell renal cell carcinomas (Rudenko <i>et al.</i> , 2015) | ↓ | ↓ | - | - | - | - | - | - | - |
| Clear cell renal cell carcinomas (Cheng <i>et al.</i> , 2019) | ↑ | NS | - | - | - | - | - | - | - |
| Breast Cancer (Król <i>et al.</i> , 2018) | ↓ | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Breast Cancer (Wolf <i>et al.</i> , 2016) | - | - | - | - | - | - | - | - | ↓ |
| MCF 7 cells (Rusolo <i>et al.</i> , 2017) | ↓ | ↓ | - | - | - | - | - | - | - |
| MCF 7 cells (Shi <i>et al.</i> , 2017) | - | - | - | - | - | ↑ | - | - | - |
| Non-small cell lung cancer (Gresner <i>et al.</i> , 2009) | - | - | NS | ↓ | - | - | - | - | - |
| Lung squamous cell carcinoma (Zhang <i>et al.</i> , 2016) | - | - | - | - | - | - | - | - | ↑ |
| Oral squamous cell carcinoma (Pedro <i>et al.</i> , 2018) | - | - | - | - | ↓ | ↑ | ↓ | ↓ | - |
| Hepatocellular carcinoma (Wang <i>et al.</i> , 2016) | - | - | - | - | - | ↓ | - | - | - |
| Hepatocellular carcinoma (Guerrero <i>et al.</i> , 2015) | - | ↑ | - | - | - | - | - | - | - |
| Hepatocellular carcinoma (Cheng <i>et al.</i> , 2015) | - | - | - | - | - | - | - | - | ↑ |
| HepG2 cell line (Zhao <i>et al.</i> , 2015) | ↑ | ↑ | - | ↑ | - | - | - | - | - |
| HepG2 and Huh7 cell lines (Guariniello <i>et al.</i> , 2015) | - | ↑ | ↑ | - | - | - | - | - | - |
| TCGA (Tumor x normal adjacent tissue) | ↑ | NS | NS | ↓ | ↓ | ↓ | NS | ↓ | ↓ |
| TCGA x GTEX (Case x control) | ↑ | ↑ | ↑ | ↑ | NS | ↓ | ↑ | ↓ | ↑ |
| ISCOMPA (Tumor x peritumor) | NS | ↑ | NS | NS | NS | ↑ | NS | NS | NS |

Abbreviations: ↑=higher expression in tumoral compared to normal/peritumoral tissue (or non-tumoral cell line); ↓= lower expression in tumoral compared to normal/peritumoral tissue (or non-tumoral cell line); NS = not significant; - = not analyzed; TCGA= The Cancer Genome Atlas; GTEX = Genotype-Tissue Expression; ISCOMPA = Irmandade Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre. Each line corresponds to one study for better understanding. MCF 7 cells constitute a type of breast cancer cell line, and HepG2 and Huh7 cells constitute types of HCC and liver cancer cell line.

Protein-protein interaction (PPI) network analysis

PPI network visualization and analysis were performed using Cytoscape 3.8 software (Shannon, 2003). PPI network construction was carried out using the Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes (STRING) database v.11 (Szklarczyk *et al.*, 2019), using STRINGapp from Cytoscape 3.8. A confidence score of 0.4 was set as the cut-off criterion.

Gene ontology (GO) and pathway enrichment analyses

To analyze the genes and biological characteristics, bioinformatic enrichment analysis of GO and pathways was performed using the STRINGapp plugin from Cytoscape 3.8. This plugin has a feature that performs enrichment retrieval from databases. GO (Ashburner *et al.*, 2000; Carbon *et al.*, 2019), the Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) Pathway (Kanehisa, 2000; Kanehisa *et al.*, 2019) and REACTOME Pathway (Jassal *et al.*, 2020) were the databases selected for retrieval by the STRINGapp plugin. Two groups of genes were examined separately: upregulated and downregulated. All genes were analyzed with “*Homo sapiens*” as background species. The statistical criterion was a corrected p-value <0.05.

Statistical analyses

Continuous data are shown as mean \pm standard deviation or median (interquartile range). Categorical values are shown as absolute frequency (relative frequency). Shapiro-Wilks or Kolmogorov-Smirnov tests were used to test the normality of variables. Comparison of mRNA levels between tumoral and peritumoral tissues was performed using Wilcoxon signed-rank tests. Correlations were made using Spearman’s tests, and are presented as p-values and r coefficients. Survival analysis was performed using Kaplan–Meier log-rank tests and Cox regression. Evaluate Cutpoints (Ogłuszka *et al.*, 2019) software was used to choose the optimal cut-off point for the dichotomization of continuous variables. SPSS 20.0 (SPSS Inc., USA) and R software version 4.0.0 were used for statistical analysis. The significance level was set at p<0.05.

Results

Differential gene expression of antioxidant enzymes in HCC

Comparison of matched tumoral and adjacent normal tissues from TCGA patients revealed significantly differential expression of six genes (Figure 1A). One gene (*GPX1*) was

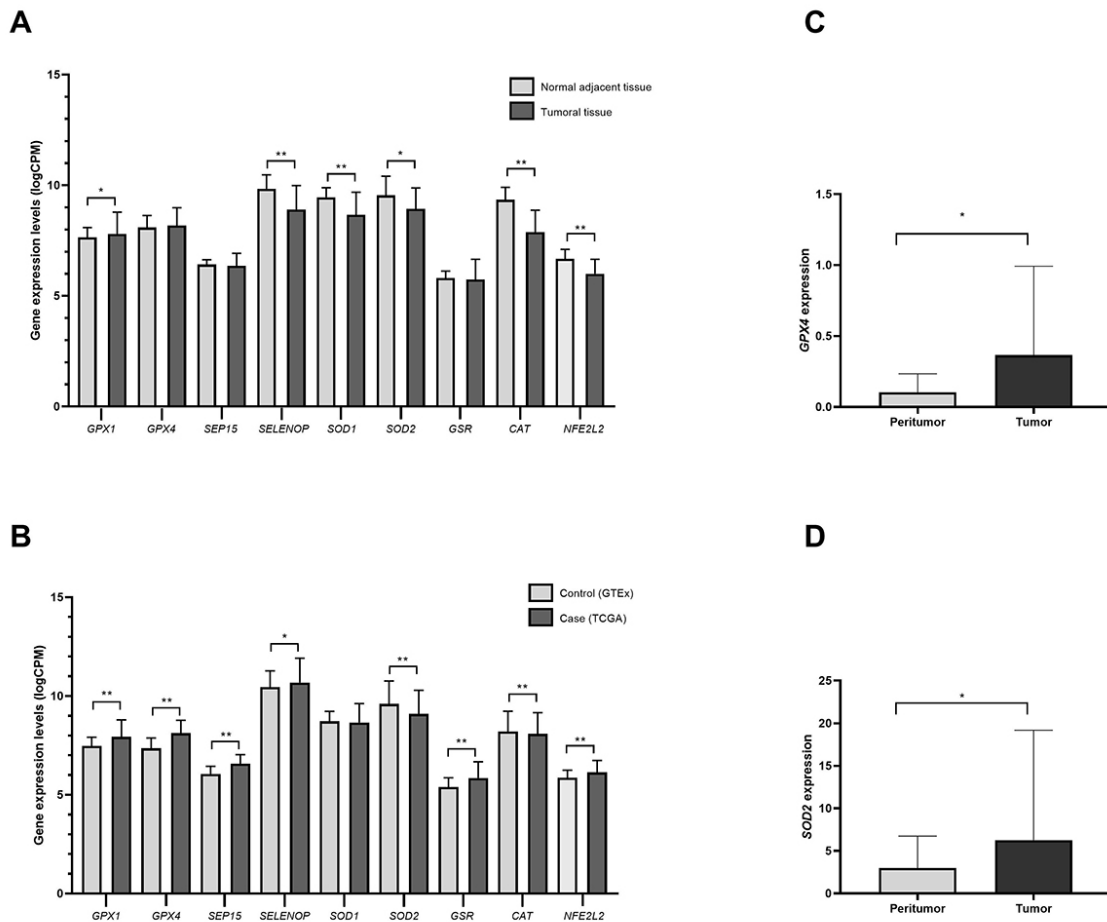


Figure 1 – Gene expression profiles. (A) Gene expression levels in the TCGA-LIHC dataset for tumoral and normal adjacent tissues. (B) Gene expression levels in case (TCGA) versus control (GTEx) analysis. (C) and (D) Significant differentially expressed genes in ISCMPA’s sample (tumoral versus peritumoral tissues). *p<0.05, **p<0.001.

upregulated and five (*SELENOP*, *SOD1*, *SOD2*, *CAT*, and *NFE2L2*) were downregulated. All genes except *SOD1* showed significant differential expression in TCGA (case) and GTEX (control) comparisons (Figure 1B). Six genes (*GPX1*, *GPX4*, *SEP15*, *SELENOP*, *GSR*, and *NFE2L2*) were upregulated, and two genes (*SOD2* and *CAT*) were downregulated. Detailed data from these analyses are provided in Table S2.

In RT-qPCR analysis of 28 fresh frozen matched samples of HCC patients from ISCMPA, two genes displayed significantly higher expression in tumoral tissue than in peritumoral tissue (Figure 1C, D). *GPX4* displayed a 2.70-fold

increase ($p=0.02$), and *SOD2* a 2.59-fold increase ($p=0.04$). In contrast, the *GPX1*, *SEP15*, *SELENOP*, *SOD1*, *GSR*, *CAT*, and *NFE2L2* genes were not significantly differentially expressed when comparing tumoral and peritumoral tissues (data not shown).

Correlation analysis

Correlations between gene expression levels of TCGA data and alpha-fetoprotein levels were also examined (Figure 2A). Alpha-fetoprotein levels (mg/dL) were negatively correlated with the expression of *SEP15* ($p<0.001$), *SELENOP* ($p<0.001$),

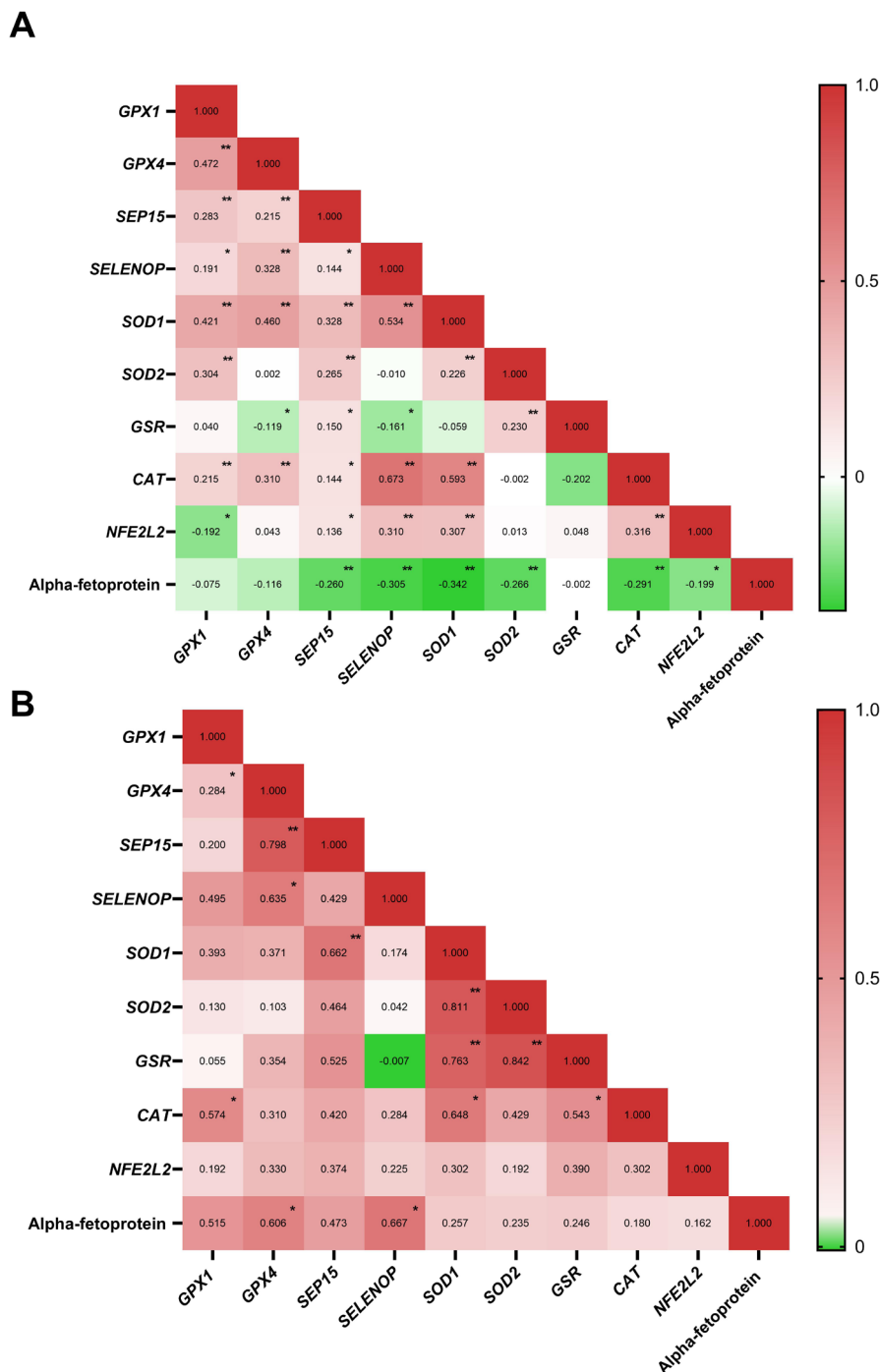


Figure 2 – Spearman correlation analysis. (A) Spearman correlation coefficients (r) for gene expression levels in TCGA tumoral samples and clinical data. (B) Spearman correlation coefficients (r) for gene expression levels in ISCMPA tumoral samples. * $p<0.05$, ** $p<0.001$.

SOD1 ($p < 0.001$), *SOD2* ($p < 0.001$), *CAT* ($p < 0.001$), and *NFE2L2* ($p = 0.004$). In contrast, analysis of relative mRNA expression ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) in tumoral tissue revealed that patients from ISCMPA, alpha-fetoprotein (mg/dL) levels were positively correlated with *GPX4* ($p = 0.02$) and *SELENOP* ($p = 0.01$) expression levels (Figure 2B).

Survival analysis

In TCGA samples, patients were divided into two groups according to gene expression (high or low), using the optimal cut-off point generated by the Evaluate Cutpoints (Ogłuszka et al., 2019) software. Kaplan–Meier and Cox multivariate regression were used to generate overall survival data (Figure 3 and Table 2). The final models used for multivariate analysis are presented in Table S3. Low overall survival at 12 months was correlated with low expression of *GPX1* ($p = 0.006$), *GPX4* ($p = 0.01$), *SELENOP* ($p = 0.006$), *SOD1* ($p = 0.007$), *CAT* ($p < 0.001$), and *NFE2L2* ($p < 0.001$). Higher levels of *GSR* ($p < 0.001$) were associated with low overall survival in the same period. Complete sample data from patients from ISCMPA were not available for survival analysis.

PPI network analysis

Since correlation analyses revealed several significant correlations (Figure 2) between gene expression in both TCGA and ISCMPA samples, a PPI network analysis was performed. The PPI network contained nine nodes and 25 edges (Figure 4A), with an average node degree of 5.55 and PPI enrichment p -value $< 1.0e-16$. *GPX1* and *GPX4* had the highest degree and betweenness centrality values, of 8 and 0.166, respectively. Proteins *SELP* and *SEP15* had the lowest degree value, interacting with only three other proteins in this analysis: *GPX1*, *GPX4*, and each other.

GO and pathway enrichment analyses

Gene enrichment analysis using the enrichment tool STRINGapp returned a series of sets. GO terms are divided into three groups: biological process (BP), molecular function (MF), and cellular component (CC). The most significant results are presented in Table 3.

Upregulated genes were mainly enriched in the biological processes of cellular detoxification, response to oxidative stress, and cellular response to toxic substances. With respect to GO molecular function, antioxidant activity and glutathione peroxidase activity were implicated. According to GO cellular component, genes were mainly enriched in the intracellular organelle lumen. Downregulated genes were mainly enriched in biological processes of response to ROS, protein homotetramerization, and aging. GO molecular functions returned antioxidant activity and oxidoreductase activity as the main enriched terms.

KEGG pathways and REACTOME Pathways analyses revealed that genes were enriched in several pathways. The most significant results are presented in Table 4. Upregulated genes were mainly enriched in pathways involving glutathione metabolism, synthesis of eicosatetraenoic acids, detoxification of ROS, and diseases that included amyotrophic lateral sclerosis and Huntington's disease. Downregulated genes were also enriched in pathways of detoxification of ROS, as well as pathways involving peroxisomes, longevity regulation, FoxO signaling, and the immune system.

Discussion

We performed bioinformatic and experimental analyses to evaluate the expression patterns of eight antioxidant enzymes, including four selenoproteins, and one important transcription factor, to assess their association with HCC pathogenesis.

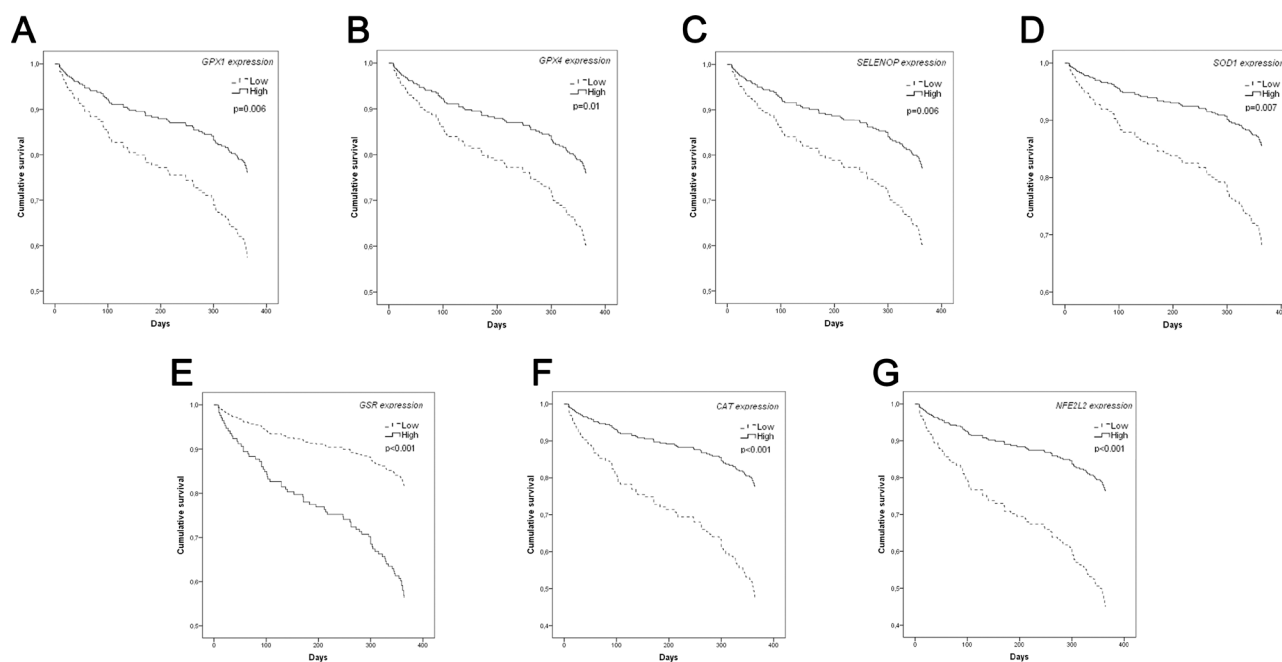


Figure 3 – Survival analysis. Cumulative survival plot of dichotomized gene expression levels of TCGA tumoral tissues.

Table 2 – Multivariate Cox proportional hazards regression analysis to assess the independent effect of gene expression on survival in 12 months

| | Adjusted HR | 95% CI | p |
|----------------|-------------|-------------|--------|
| <i>GPX1</i> | 2.023 | 1.222-3.347 | 0.006 |
| <i>GPX4</i> | 1.859 | 1.147-3.015 | 0.012 |
| <i>SEP15</i> | 0.75 | 0.315-1.783 | 0.514 |
| <i>SELENOP</i> | 1.968 | 1.217-3.183 | 0.006 |
| <i>SOD1</i> | 2.447 | 1.273-4.702 | 0.007 |
| <i>SOD2</i> | 1.461 | 0.824-2.590 | 0.194 |
| <i>GSR</i> | 0.354 | 0.224-0.559 | <0.001 |
| <i>CAT</i> | 2.924 | 1.774-4.820 | <0.001 |
| <i>NFE2L2</i> | 2.955 | 1.779-4.908 | <0.001 |

HR: hazard ratio; CI: confidence interval

A number of differentially expressed genes were identified in tumoral samples from TCGA patients (Figure 1A, B), along with replication of two genes in the experimental data (Figure 1C, D). Previous studies have demonstrated variable expression patterns of antioxidant genes, depending on the type of cancer analyzed (Table 1). The present results add new information about the expression of these genes in HCC.

Some studies evaluated the expression of the genes for these antioxidant enzymes separately in HCC tumoral samples, HepG2 and Huh7 cell lines (Table 1). Results for *GPX1*, *GPX4*, *SEP15*, *SELENOP*, *SOD2*, and *NFE2L2* seem to be corroborated by our analysis (Cheng *et al.*, 2015; Guariniello *et al.*, 2015; Guerriero *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2016a; Zhao *et al.*, 2015). We observed that the pattern of gene expression of these enzymes seemed to vary when analysis was performed in TCGA tumoral versus normal adjacent tissues, and TCGA versus GTEx databases (Figure 1A, B and Table 1). The tumor microenvironment seems to play a role in HCC progression, influencing progression by modulation of liver fibrosis, initiation of the epithelial-to-mesenchymal transition, invasion, alterations of oxidative stress status, and other processes (Novikova *et al.*, 2017). Differences in antioxidant enzyme levels between normal, tumoral, and peritumoral tissues may represent different stages of adaptation of this system against oxidative stress, or the use of ROS as signaling molecules (Moloney and Cotter, 2018).

Differences in the expression of two genes, *GPX4* and *SOD2*, were statistically significant in TCGA and experimental data. Increased expression of *GPX4* was present in TCGA versus GTEx analysis and experimental data (Figure 1B, C). However, this difference was not significant in TCGA tumoral × non-tumoral tissues (Figure 1A). In agreement with our findings, studies with grade III HCC tissues (Guerriero *et al.*, 2015), HepG2 cell lines (Guariniello *et al.*, 2015; Zhao *et al.*, 2015), and Huh7 cells (Guariniello *et al.*, 2015) also revealed higher expression of *GPX4* (Table 1). Lower expression was found in gastric cancer (Lan *et al.*, 2017), clear cell renal cell carcinoma (Rudenko *et al.*, 2015), and human breast cancer cell lines (Rusolo *et al.*, 2017) (Table 1).

GPX4 has the same detoxification function as *GPX1* in the cell, including the ability to reduce lipid peroxides (Figure 4B) (Labunskyy *et al.*, 2014). Even though mRNA expression was analyzed, and gene transcription is not always directly related to protein synthesis, it is possible that overexpression

of *GPX4* could affect the cell environment. Increased *GPX4* expression could enhance the levels of antioxidant components in cells and protect against oxidative stress (Davis *et al.*, 2012; Rohr-Udilova *et al.*, 2018). However, overexpression of *GPX4* could also benefit cancer cells. *GPX4* plays an important role in preventing oxidative stress-induced apoptosis by decreasing lipid peroxidation. In so doing, *GPX4* blocks posterior signaling, leading to cell death (Figure 4B). Therefore, overexpression of this enzyme could be an advantageous mechanism used by tumoral cells to sustain growth and avoid apoptosis (Labunskyy *et al.*, 2014; Rohr-Udilova *et al.*, 2018). A previous study showed that overexpression of *GPX4* in HCC *in vitro* protected the cells from oxidative stress and reduced the intracellular free radical level (Rohr-Udilova *et al.*, 2018).

SOD2 had different expression patterns between TCGA analyses and experimental data (Figure 1A, B, D and Table 1). Reduced expression of *SOD2* has been previously reported (Wang *et al.*, 2016a), in a study into HBV-positive HCC tumors in a cohort. Higher gene expression of *SOD2* has been reported in oral squamous cell carcinoma (Pedro *et al.*, 2018) and colorectal adenoma and cancer (Hughes *et al.*, 2018). Most of the patients from TCGA and Wang *et al.* (2016a) presented with hepatitis B as the main etiology, while patients from our experimental data were mostly HCV-positive. No statistically significant differences were found in gene expression levels between risk factor types (data not shown). A diversity of tumor types can develop in HCC, in terms of staging and its molecular subclasses, which could explain, in part, the variety of findings in gene expression and deregulated pathways (Hoshida *et al.*, 2013).

SOD2 is located in the mitochondrial matrix (Figure 4B) and acts to catalyze dismutation of the superoxide anion ($O_2^{\cdot-}$) to H_2O_2 , playing a crucial role in alleviating oxidative stress (Kim *et al.*, 2017). Loss of this antioxidant component could impair the oxidative balance in cells. However, its overexpression could favor the cancer cell environment (Kim *et al.*, 2017). Intensification of *SOD2* expression in tumoral cells seems to ensure H_2O_2 flow from mitochondria, which is a crucial step for the occurrence of the Warburg effect (Che *et al.*, 2016), a strategy used by cancer cells to increase the generation of additional metabolites. Upregulation of *SOD2* could favor H_2O_2 accumulation (Figure 4B), which is involved in a variety of signaling pathways related to proliferation, migration, and invasion in cancer cells (Glorieux *et al.*, 2015).

Table 3 – Top Most significant enriched gene ontology (GO) terms.

| Category | Id | Term | Count | Genes | P-value ^a |
|----------|------------|--|---------------|---------------------------------------|----------------------|
| | | | Upregulated | | |
| BP | GO.0098754 | Detoxification | 5 | GSR SOD1 GPX4 NFE2L2 GPXI | 5.92E-08 |
| BP | GO.0006979 | Response to oxidative stress | 6 | GSR SOD1 GPX4 NFE2L2 GPXI SELENOP | 1.50E-07 |
| BP | GO.0097237 | Cellular response to toxic substance | 5 | GSR SOD1 GPX4 NFE2L2 GPXI | 6.26E-07 |
| BP | GO.0098869 | Cellular oxidant detoxification | 4 | GSR SOD1 GPX4 GPXI | 3.10E-06 |
| BP | GO.1902175 | Regulation of oxidative stress-induced intrinsic apoptotic signaling pathway | 3 | SOD1 NFE2L2 GPXI | 2.18E-05 |
| BP | GO.0034599 | Cellular response to oxidative stress | 4 | GSR SOD1 NFE2L2 GPXI | 6.32E-05 |
| BP | GO.0006749 | Glutathione metabolic process | 3 | GSR SOD1 GPXI | 6.95E-05 |
| BP | GO.0045454 | Cell redox homeostasis | 3 | GSR NFE2L2 GPXI | 1.20E-04 |
| BP | GO.0042542 | Response to hydrogen peroxide | 3 | SOD1 NFE2L2 GPXI | 4.20E-04 |
| BP | GO.0019372 | Lipoxygenase pathway | 2 | GPX4 GPXI | 7.50E-04 |
| MF | GO.0016209 | Antioxidant activity | 4 | GSR SOD1 GPX4 GPXI | 7.40E-07 |
| MF | GO.0004602 | Glutathione peroxidase activity | 2 | GPX4 GPXI | 8.10E-04 |
| MF | GO.0016491 | Oxidoreductase activity | 4 | GSR SOD1 GPX4 GPXI | 0.0014 |
| CC | GO.0070013 | Intracellular organelle lumen | 7 | GSR SOD1 SEPI5 GPX4 NFE2L2 GPXI SEPP1 | 0.0067 |
| CC | GO.0005759 | Mitochondrial matrix | 3 | GSR SOD1 GPXI | 0.0082 |
| CC | GO.0005739 | Mitochondrion | 4 | GSR SOD1 GPX4 GPXI | 0.0163 |
| | | | Downregulated | | |
| BP | GO.0000302 | Response to reactive oxygen species | 2 | CAT SOD2 | 0.0057 |
| BP | GO.0034599 | Cellular response to oxidative stress | 2 | CAT SOD2 | 0.0057 |
| BP | GO.0051289 | Protein homotetramerization | 2 | CAT SOD2 | 0.0057 |
| BP | GO.0072593 | Reactive oxygen species metabolic process | 2 | CAT SOD2 | 0.0057 |
| BP | GO.0098869 | Cellular oxidant detoxification | 2 | CAT SOD2 | 0.0057 |
| BP | GO.0007568 | Ageing | 2 | CAT SOD2 | 0.006 |
| BP | GO.0010035 | Response to inorganic substance | 2 | CAT SOD2 | 0.0157 |
| BP | GO.0043066 | Negative regulation of apoptotic process | 2 | CAT SOD2 | 0.0419 |
| BP | GO.0055114 | Oxidation-reduction process | 2 | CAT SOD2 | 0.043 |
| MF | GO.0016209 | Antioxidant activity | 2 | CAT SOD2 | 5.8E-4 |
| MF | GO.0016491 | Oxidoreductase activity | 2 | CAT SOD2 | 0.0229 |

GO, gene ontology; BP, biological process; MF, molecular function; CC, cellular component; ^a Corrected p-value

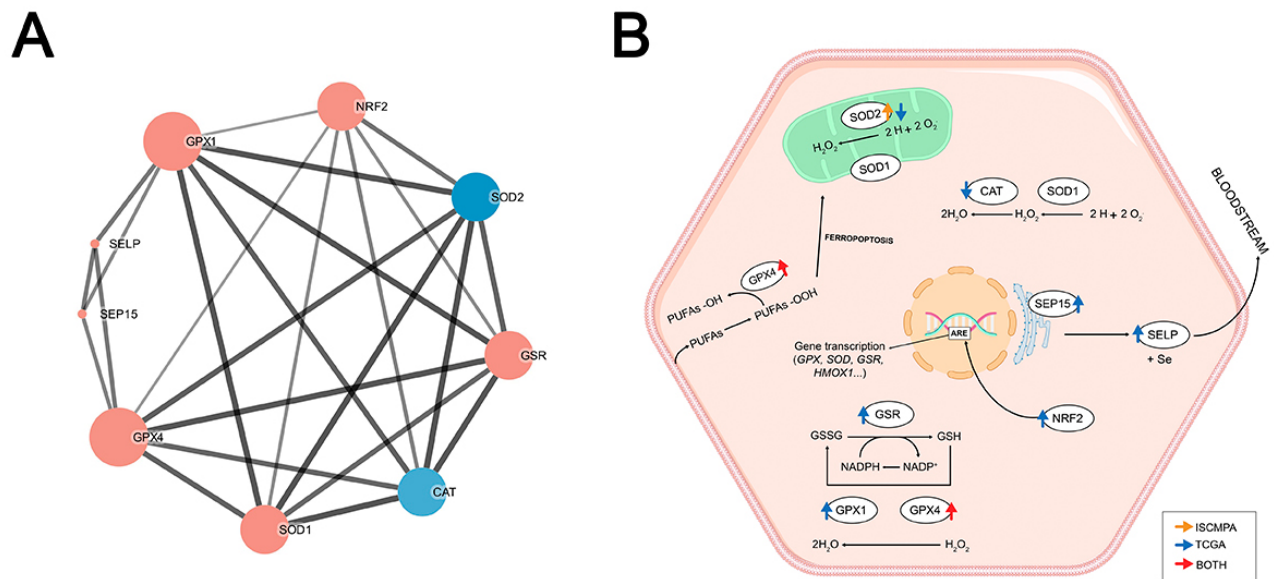


Figure 4 – Enriched annotation pathways and interaction network analysis of antioxidant proteins investigated in the present study. (A) Protein-protein interaction network of the analyzed genes. Lines represent interaction associations between nodes and line thickness indicates the strength of data support (score). Size of nodes indicates the degree of associations. Blue nodes represent downregulated genes and red nodes represent upregulated genes according to data from case (TCGA) vs control (GTEx) analyses. (B) Illustrative representation of antioxidant enzymes functions in hepatocytes. Up- and down-arrows denote significant upregulated or downregulated genes, respectively. Red arrows: both analysis; Blue arrows: only in TCGA analysis; Orange arrows: only in experimental analysis. Abbreviations: GPX1, glutathione peroxidase 1; GPX4, glutathione peroxidase 4; GSR, glutathione reductase; SOD1, superoxide dismutase 1; SOD2, superoxide dismutase 2; CAT, catalase; SEP15, 15 kDa selenoprotein; SelP, selenoprotein P; GSSG, oxidized glutathione; GSH, reduced glutathione; NRF2; nuclear factor erythroid 2-related factor 2; HMOX1; heme oxygenase-1 gene; ARE; antioxidant response element; Se, selenium; and PUFAs; Polyunsaturated fatty acids.

Table 4 – Top Most significant enriched pathways.

| Category | Id | Term | Count | Genes | P-value ^a |
|---------------|-------------|---|-------|---------------|----------------------|
| Upregulated | | | | | |
| K | hsa00480 | Glutathione metabolism | 3 | GSR GPX4 GPX1 | 8.46E-06 |
| R | HSA-2142770 | Synthesis of 15-eicosatetraenoic acid derivatives | 2 | GPX4 GPX1 | 7.05E-05 |
| R | HSA-2142712 | Synthesis of 12-eicosatetraenoic acid derivatives | 2 | GPX4 GPX1 | 7.05E-05 |
| R | HSA-2142688 | Synthesis of 5-eicosatetraenoic acids | 2 | GPX4 GPX1 | 7.05E-05 |
| R | HSA-3299685 | Detoxification of Reactive Oxygen Species | 2 | SOD1 GPX1 | 4.20E-04 |
| K | hsa05014 | Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) | 2 | SOD1 GPX1 | 9.40E-04 |
| K | hsa04918 | Thyroid hormone synthesis | 2 | GSR GPX1 | 0.0013 |
| R | HSA-114608 | Platelet degranulation | 2 | SOD1 SEPP1 | 0.0033 |
| K | hsa05016 | Huntington's disease | 2 | SOD1 GPX1 | 0.0065 |
| Downregulated | | | | | |
| R | HSA-3299685 | Detoxification of Reactive Oxygen Species | 2 | CAT SOD2 | 6.61E-5 |
| K | hsa04146 | Peroxisome | 2 | CAT SOD2 | 9.18E-5 |
| K | hsa04211 | Longevity regulating pathway | 2 | CAT SOD2 | 9.18E-5 |
| K | hsa04068 | FoxO signaling pathway | 2 | CAT SOD2 | 1.0E-4 |
| R | HSA-2262752 | Cellular responses to stress | 2 | CAT SOD2 | 0.003 |
| R | HSA-8953897 | Cellular responses to external stimuli | 2 | CAT SOD2 | 0.003 |
| R | HSA-168256 | Immune System | 2 | CAT SOD2 | 0.046 |

K, KEGG Pathways; R, REACTOME Pathways; a Corrected p-value

Survival analysis of patients from TCGA revealed an interesting aspect of gene expression patterns in HCC. Although higher expression of antioxidant enzymes was present in HCC patients, patients with lower gene expression also displayed lower overall survival, except for *GSR* expression (Figure 3). As previously discussed, ROS act as a two-edged sword in cancer, with beneficial and detrimental roles in cells, and are tightly regulated by cancer cells (Moloney and Cotter, 2018). On the one hand, higher expression of antioxidant enzymes could not only control ROS accumulation, preventing cell death being triggered by them, but could also perpetuate tumoral cells. On the other hand, lower expression could cause apoptosis and kill tumoral cells. However, regarding the level of expression, tumors could also be favored due to the accumulation of ROS used as signaling factors (Sajadimajd and Khazaei, 2017; Moloney and Cotter, 2018). This mechanism and the extent to which the levels of these antioxidant enzymes vary in each stage of hepatocarcinogenesis should be explored in depth in further studies.

Correlation (Figure 2), PPI network (Figure 4A), and GO (Tables 3 and 4) analyses highlighted possible relationships between the antioxidant enzymes investigated and their interactions in different pathways (Table 4). *NFR2*, which is encoded by *NFE2L2*, seems to be important because of its interaction with Antioxidant Responsive Element (ARE) (Figure 4B), an interaction that increases the expression of several genes, including genes that encode glutathione peroxidases and SODs (Raghunath *et al.*, 2018). Further analysis at the protein level should be performed to clarify the knowledge about this protein network, especially in the context of carcinogenesis.

None of the other genes in the experimental data had significantly altered expression, even though there was a tendency towards underexpression or overexpression of some genes. The limitations of our study, such as the difficulty in acquiring fresh liver tissue for mRNA analysis, resulted in a small sample size, which could be one of the explanations for the lack of statistical significance. To improve our analysis, we also investigated data from larger databases, such as TCGA and GTEx, which provided us with a better understanding of the results. In addition, peritumoral tissue, due to its proximity to the tumor, could already contain alterations, and could complicate the examination of gene expression differences. However, the availability of fresh, healthy liver tissue was also limited. Peritumoral tissue was collected with a safety margin and, in this case, allowed us to perform a paired analysis. These data permitted an evaluation of differences in gene expression in the tumoral and adjacent peritumoral tissues of the same patient. To verify the presence of differences between tissue types, we performed bioinformatic analyses between matched samples, as well as between case and control samples.

We present preliminary findings of the gene expression patterns of antioxidant enzymes in HCC. The findings highlight the importance of further evaluation of these components in the pathology of cancer studies with larger sample sizes. We were able to replicate data from TCGA analysis for at least two genes. The present study is one of few investigations to investigate a diversity of antioxidant enzyme genes in the context of cancer. We were also able to examine clinical

parameters and survival data for different gene expression levels in TCGA patients. Our study highlights the need for further studies to better understand the role of these enzymes in HCC.

Acknowledgments

We thank CNPq for financial support and Pâmela Victoria Von Burg, Grasiela Agnes, and Marília Zandoná for exceptional technical assistance. This study was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), 408864/2016-8.

Conflict of interest

The authors have no conflict of interest to disclose.

Authors Contributions

AFA conceived and designed the study, conducted all the analysis and wrote the manuscript; ACM conducted laboratory experiments; HFA and ABGV collected samples and clinical data from patients; MG, MF and SA revised the manuscript, helped in statistical analysis, provided financial support and administered the project. All authors read and approved the final version.

References

- Ashtburner M, Ball CA, Blake JA, Botstein D, Butler H, Cherry JM, Davis AP, Dolinski K, Dwight SS, Eppig JT *et al.* (2000) Gene Ontology: tool for the unification of biology. *Nat Genet* 25:25–29.
- Carbon S, Douglass E, Dunn N, Good B, Harris NL, Lewis SE, Mungall CJ, Basu S, Chisholm RL, Dodson RJ *et al.* (2019) The Gene Ontology resource: 20 years and still GOing strong. *Nucleic Acids Res* 47:D330–D338.
- Che M, Wang R, Li X, Wang H and Zheng XFS (2016) Expanding roles of superoxide dismutases in cell regulation and cancer. *Drug Discov Today* 21:143–149.
- Cheng ML, Lu YF, Chen H, Shen ZY and Liu J (2015) Liver expression of Nrf2-related genes in different liver diseases. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 14:485–491.
- Cheng Y, Xu T, Li S and Ruan H (2019) GPX1, a biomarker for the diagnosis and prognosis of kidney cancer, promotes the progression of kidney cancer. *Aging (Albany NY)* 11:12165–12176.
- Davis CD, Tsuji PA and Milner JA (2012) Selenoproteins and cancer prevention. *Annu Rev Nutr* 32:73–95.
- Forner A, Reig M and Bruix J (2018) Hepatocellular carcinoma. *Lancet* 391:1301–1314.
- Gill JG, Piskounova E and Morrison SJ (2016) Cancer, oxidative stress, and metastasis. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 81:163–175.
- Glorieux C, Zamocky M, Sandoval JM, Verrax J and Calderon PB (2015) Regulation of catalase expression in healthy and cancerous cells. *Free Radic Biol Med* 87:84–97.
- Gresner P, Gromadzinska J, Jablonska E, Kaczmarski J and Wasowicz W (2009) Expression of selenoprotein-coding genes SEPP1, SEP15 and hGPX1 in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 65:34–40.
- Guariniello S, Di Bernardo G, Colonna G, Cammarota M, Castello G and Costantini S (2015) Evaluation of the selenotranscriptome expression in two hepatocellular carcinoma cell lines. *Anal Cell Pathol (Amst)* 2015:419561.
- Guerriero E, Capone F, Accardo M, Sorice A, Costantini M, Colonna G, Castello G and Costantini S (2015) GPX4 and GPX7 over-

- expression in human hepatocellular carcinoma tissues. *Eur J Histochem* 59:5–10.
- Gupta RK, Patel AK, Shah N, Chaudhary AK, Jha UK, Yadav UC, Gupta PK and Pakuwal U (2014) Oxidative stress and antioxidants in disease and cancer: a review. *Asian Pac J Cancer Prev* 15:4405–9.
- Hoshida Y, Nijman SMB, Kobayashi M, Chan JA, Brunet J, Chiang DY, Villanueva A, Newell P, Hashimoto M, Watanabe G *et al.* (2013) Integrative transcriptome analysis reveals common molecular subclasses of human hepatocellular carcinoma. *Cancer Res.* 69:7385–7392.
- Hughes DJ, Kunická T, Schomburg L, Liška V, Swan N and Souček P (2018) Expression of selenoprotein genes and association with selenium status in colorectal adenoma and colorectal cancer. *Nutrients* 10:1812.
- Jassal B, Matthews L, Viteri G, Gong C, Lorente P, Fabregat A, Sidiropoulos K, Cook J, Gillespie M, Haw R *et al.* (2020) The reactome pathway knowledgebase. *Nucleic Acids Res* 48:D498–D503.
- Kanehisa M (2000) KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. *Nucleic Acids Res* 28:27–30.
- Kanehisa M, Sato Y, Furumichi M, Morishima K and Tanabe M (2019) New approach for understanding genome variations in KEGG. *Nucleic Acids Res* 47:D590–D595.
- Kim Y, Gupta Vallur P, Phaëton R, Mythreye K and Hempel N (2017) Insights into the dichotomous regulation of SOD2 in cancer. *Antioxidants* 6:86.
- Klungboonkrong V, Das D and McLennan G (2017) Molecular mechanisms and targets of therapy for hepatocellular carcinoma. *J Vasc Interv Radiol* 28:949–955.
- Król MB, Galicki M, Grešner P, Wiczorek E, Jablonska E, Reszka E, Morawiec Z, Wasowicz W and Gromadzinska J (2018) The ESR1 and GPX1 gene expression level in human malignant and non-malignant breast tissues. *Acta Biochim Pol* 65:51–57.
- Labunskyy VM, Hatfield DL and Gladyshev VN (2014) Selenoproteins: molecular pathways and physiological roles. *Physiol Rev* 94:739–777.
- Lan X, Xing J, Gao H, Li S, Quan L, Jiang Y, Ding S and Xue Y (2017) Decreased expression of selenoproteins as a poor prognosticator of gastric cancer in humans. *Biol Trace Elem Res* 178:22–28.
- Livak KJ and Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods* 25:402–408.
- Love MI, Huber W and Anders S (2014) Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol* 15:1–21.
- Ma-on C, Sanpavat A, Whongsiri P, Suwannasin S, Hirankarn N, Tangkijvanich P and Boonla C (2017) Oxidative stress indicated by elevated expression of Nrf2 and 8-OHdG promotes hepatocellular carcinoma progression. *Med Oncol.* 34:57.
- Menegon S, Columbano A and Giordano S (2016) The dual roles of NRF2 in cancer. *Trends Mol Med* 22:578–593.
- Moloney JN and Cotter TG (2018) ROS signalling in the biology of cancer. *Semin Cell Dev Biol* 80:50–64.
- Moura AC, Lazzari VM, Agnes G, Almeida S, Giovenardi M and Veiga ABG (2014) Transcriptional expression study in the central nervous system of rats: what gene should be used as internal control? *Einstein (São Paulo)* 12:336–341.
- Novikova MV, Khromova NV and Kopnin PB (2017) Components of the hepatocellular carcinoma microenvironment and their role in tumor progression. *Biochemistry* 82:861–873.
- Ogłuszka M, Orzechowska M, Jędrozka D, Witas P and Bednarek AK (2019) Evaluate Cutpoints: Adaptable continuous data distribution system for determining survival in Kaplan-Meier estimator. *Comput Methods Programs Biomed* 177:133–139.
- Ozakoyol A (2017) Global epidemiology of hepatocellular carcinoma (HCC Epidemiology). *J Gastrointest Cancer* 48:238–240.
- Pedro NF, Biselli JM, Maniglia JV, Santi-Neto D, Pavarino EC, Goloni-Bertollo EM and Biselli-Chicote PM (2018) Candidate biomarkers for oral squamous cell carcinoma: differential expression of oxidative stress-related genes. *Asian Pacific J Cancer Prev* 19:1343–1349.
- Raghunath A, Sundarraj K, Arfuso F, Sethi G and Perumal E (2018) Dysregulation of Nrf2 in hepatocellular carcinoma: Role in cancer progression and chemoresistance. *Cancers (Basel)* 10:1–29.
- Reuter S, Gupta SC, Chaturvedi MM and Aggarwal BB (2010) Oxidative stress, inflammation, and cancer: How are they linked? *Free Radic Biol Med* 49:1603–1616.
- Robinson MD, McCarthy DJ and Smyth GK (2009) edgeR: A Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics* 26:139–140.
- Rohr-Udilova N, Bauer E, Timelthaler G, Eferl R, Stolze K, Pinter M, Seif M, Hayden H, Reiberger T, Schulte-Hermann R *et al.* (2018) Impact of glutathione peroxidase 4 on cell proliferation, angiogenesis and cytokine production in hepatocellular carcinoma. *Oncotarget* 9:10054–10068.
- Rudenko E, Kondratov O, Gerashchenko G, Lapska Y, Kravchenko S, Koliada O, Vozianov S, Zgonnyk Y and Kashuba V (2015) Aberrant expression of selenium-containing glutathione peroxidases in clear cell renal cell carcinomas. *Exp Oncol* 37:105–110.
- Rusolo F, Capone F, Pasquale R, Angiolillo A, Colonna G, Castello G, Costantini M and Costantini S (2017) Comparison of the seleno-transcriptome expression between human non-cancerous mammary epithelial cells and two human breast cancer cell lines. *Oncol Lett* 13:2411–2417.
- Sajadimajd S and Khazaei M (2017) Oxidative stress and cancer: The role of Nrf2. *Curr Cancer Drug Targets* 18:538–557.
- Schmittgen TD and Livak KJ (2008) Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat Protoc* 3:1101–8.
- Shannon P (2003) Cytoscape: A software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome Res* 13:2498–2504.
- Shi Y, Ye P and Long X (2017) Differential expression profiles of the transcriptome in breast cancer cell lines revealed by next generation sequencing. *Cell Physiol Biochem* 44:804–816.
- Szklarczyk D, Gable AL, Lyon D, Junge A, Wyder S, Huerta-Cepas J, Simonovic M, Doncheva NT, Morris JH, Bork P *et al.* (2019) STRING v11: Protein-protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets. *Nucleic Acids Res* 47:D607–D613.
- Wang Q, Armenia J, Zhang C, Penson A V, Reznik E, Zhang L, Minet T, Ochoa A, Gross BE, Iacobuzio-Donahue CA *et al.* (2018) Data Descriptor: Unifying cancer and normal RNA sequencing data from different sources. *Sci Data* 5:1–8.
- Wang R, Yin C, Li X-X, Yang X-Z, Yang Y, Zhang M-Y, Wang H-Y and Zheng XF (2016a) Reduced SOD2 expression is associated with mortality of hepatocellular carcinoma patients in a mutant p53-dependent manner. *Aging (Albany NY)* 8:1184–1200.
- Wang Z, Li Z, Ye Y, Xie L and Li W (2016b) Oxidative stress and liver cancer: Etiology and therapeutic targets. *Oxid Med Cell Longev* 2016:7891574.
- Wiczorek E, Jablonowski Z, Tomasik B, Gromadzinska J, Jablonska E, Konecki T, Fendler W, Sosnowski M, Wasowicz W and Reszka E (2017) Different gene expression and activity pattern of antioxidant enzymes in bladder cancer. *Anticancer Res* 37:841–848.

- Wolf B, Goebel G, Hackl H and Fiegl H (2016) Reduced mRNA expression levels of NFE2L2 are associated with poor outcome in breast cancer patients. *BMC Cancer* 16:1–14.
- Yagublu V, Arthur JR, Babayeva SN, Nicol F, Post S and Keese M (2011) Expression of selenium-containing proteins in human colon carcinoma tissue. *Anticancer Res* 31:2693–2698.
- Yang JD, Hainaut P, Gores GJ, Amadou A, Plymoth A and Roberts LR (2019) A global view of hepatocellular carcinoma: trends, risk, prevention and management. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 16:589–604.
- Zhang Q, Xu H, You Y, Zhang J and Chen R (2018) High Gpx 1 expression predicts poor survival in laryngeal squamous cell carcinoma. *Auris Nasus Larynx* 45:170–174.
- Zhang Y, Fan H, Fang S, Wang L, Chen L, Jin Y, Jiang W, Lin Z, Shi Y, Zhan C *et al.* (2016) Mutations and expression of the NFE2L2/KEAP1/CUL3 pathway in Chinese patients with lung squamous cell carcinoma. *J Thorac Dis* 8:1639–1644.
- Zhao H, Tang J, Xu J, Cao L, Jia G, Long D, Liu G, Chen X and Wang K (2015) Selenoprotein genes exhibit differential expression patterns between hepatoma HepG2 and normal hepatocytes LO2 cell lines. *Biol Trace Elem Res* 167:236–241.
- Zoidis E, Seremelis I, Kontopoulos N and Danezis GP (2018) Selenium-dependent antioxidant enzymes: Actions and properties of selenoproteins. *Antioxidants* 7:1–26.
- Wang Q, Gao J and Nikolaus S. Figshare Data Record 1, <https://doi.org/10.6084/m9.figshare.5330539> (accessed 20 June 2020).
- DESeq2, <https://bioconductor.org/packages/release/bioc/html/DESeq2.html> (accessed 25 June 2020).
- Edge R, <https://bioconductor.org/packages/release/bioc/html/edgeR.html> (accessed 04 July 2020).
- Evaluate Cutpoints, <http://wnbikp.umed.lodz.pl/Evaluate-Cutpoints/> (accessed 15 July 2020).
- Cytoscape 3, <https://cytoscape.org/> (accessed 28 July 2020).
- STRINGapp, <http://apps.cytoscape.org/apps/stringapp> (accessed 30 July 2020).

Supplementary material

The following online material is available for this article:

Table S1 – Sequences of primer pairs.

Table S2 – Detailed results of gene expression analysis using RNA-Seq data.

Table S3 – Final models of multivariate Cox regression analysis.

Figure S1 – Sample of agarose gel electrophoresis of total RNA.

Internet Resources

The Cancer Genome Atlas – Liver Hepatocellular Carcinoma (TCGA-LIHC), <https://portal.gdc.cancer.gov/projects/TCGA-LIHC> (accessed 01 June 2020).

Genotype-Tissue Expression database (GTEx), <https://gtexportal.org/home/eqtls/tissue?tissueName=Liver> (accessed 05 June 2020).

Associate Editor: Carlos F. M. Menck.

License information: This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (type CC-BY), which permits unrestricted use, distribution and reproduction in any medium, provided the original article is properly cited.

Supplementary Material to “Gene expression evaluation of antioxidant enzymes in patients with hepatocellular carcinoma: RT-qPCR and bioinformatic analyses”

Table S1 - Sequence of primers pairs.

| Gene | Gene ID | Sequence |
|----------------|---------|--------------------------------------|
| <i>ACTB</i> | 60 | F: 5' TGACGTGGACATCCGCAAAG 3' |
| | | R: 5' CTGGAAGGTGGACAGCGAGG3' |
| <i>GPX1</i> | 2876 | F: 5' AACCAGTTTGGGCATCAGGAGA 3' |
| | | R: 5' TCTCGAAGAGCATGAAGTTGGG 3' |
| <i>GPX4</i> | 2879 | F: 5' TGTAACCAGTTCGGGAAGCA 3' |
| | | R: 5' TCCAATTGATGGCATTTC3' |
| <i>SEP15</i> | 9403 | F: 5' GTCCAAGCTTTTGTAGGAGTG 3' |
| | | R: 5' CAGCAATGTCCCATTGTCGT 3' |
| <i>SELENOP</i> | 6414 | F: 5' AAAGTCTCTCTCACGACTCT 3' |
| | | R: 5' GATGGTAATGAGGCGATGGAGT 3' |
| <i>SOD1</i> | 6647 | F: 5' GAGTTTGGAGATAATACAGCAGGCTGT 3' |
| | | R: 5' TTTCATGGACCACCAGTGTGC 3' |
| <i>SOD2</i> | 6648 | F: 5' GTGGAGAACCCAAAGGGGAGTT 3' |
| | | R: 5' TTTCATGGACCACCAGTGTGC 3' |
| <i>GSR</i> | 2936 | F: 5' TCACGCAGTTACCAAAAGGAAA 3' |
| | | R: 5' CACACCCAAGTCCCCTGCATAT 3' |
| <i>CAT</i> | 847 | F: 5' GTTACTCAGGTGCGGGCATTCTAT 3' |
| | | R: 5' GAAGTTCTTGACCGCTTTCTTCTG 3' |
| <i>NFE2L2</i> | 4780 | F: 5'-CAGCGACGGAAAGAGTATGA-3 |
| | | R: 5'-TGGGCAACCTGGGAGTAG-3' |

Abbreviations: F, forward sequence; R, reverse sequence

**Supplementary Material to “Gene expression evaluation of antioxidant enzymes in patients with hepatocellular carcinoma:
RT-qPCR and bioinformatic analyses”**

Table S2 - Detailed results of gene expression analysis from RNAseq data.

| Genes | Log2FC | FC | Wald statistic | BH adjusted p-values |
|--|---------|--------|----------------|----------------------|
| TCGA: tumoral x normal adjacent tissues | | | | |
| <i>GPX1</i> | 0.3616 | 1.2849 | 2.3186 | 0.0417 |
| <i>GPX4</i> | 0.2418 | 1.1825 | 1.6216 | 0.1691 |
| <i>SEP15</i> | 0.0291 | 1.0203 | 0.3219 | 0.8125 |
| <i>SELENOP</i> | -0.7322 | 0.6020 | -4.3953 | <0.001 |
| <i>SOD1</i> | -0.5405 | 0.6875 | -3.4356 | 0.0018 |
| <i>SOD2</i> | -0.4753 | 0.7193 | -2.6170 | 0.0201 |
| <i>GSR</i> | 0.1840 | 1.1360 | 1.2959 | 0.2818 |
| <i>CAT</i> | -1.2491 | 0.4207 | -7.7742 | <0.001 |
| <i>NFE2L2</i> | -0.6041 | 0.6579 | -5.5939 | <0.001 |
| TCGA (case) x GTEx (control) | | | | |
| <i>GPX1</i> | 0.5181 | 1.432 | 6.3326 | 5.60E-10 |
| <i>GPX4</i> | 0.6792 | 1.601 | 10.4244 | 8.39E-25 |
| <i>SEP15</i> | 0.4108 | 1.329 | 8.9075 | 1.77E-18 |
| <i>SELENOP</i> | 0.2953 | 1.227 | 2.8004 | 0.0074 |
| <i>SOD1</i> | 0.0079 | 1.005 | 0.0917 | 0.9362 |
| <i>SOD2</i> | -0.6257 | 0.648 | -5.0087 | 1.06E-06 |
| <i>GSR</i> | 0.5010 | 1.415 | 6.1414 | 1.85E-09 |
| <i>CAT</i> | -0.2278 | 0.854 | -2.2139 | 0.0366 |
| <i>NFE2L2</i> | 0.2046 | 1.152 | 3.5121 | 0.0007 |

Log2FC, log2 Fold-change; FC, fold-change; BH, bonferroni hochberg correction. Significant p-value <0.05

Supplementary Material to “Gene expression evaluation of antioxidant enzymes in patients with hepatocellular carcinoma: RT-qPCR and bioinformatic analyses”

Table S3 - Final models of Multivariate Cox proportional hazards regression analysis (Backward – stepwise method) for each gene.

| | Adjusted HR | 95% CI | p |
|---------------------------|-------------|-------------|--------|
| <i>GPX1</i> | | | |
| Sex | 1.685 | 0.986-2.881 | 0.056 |
| Age | 1.017 | 0.999-1.035 | 0.069 |
| <i>GPX1</i> expression | 2.023 | 1.222-3.347 | 0.006 |
| <i>GPX4</i> | | | |
| Histologic grade | 0.595 | 0.355-0.997 | 0.49 |
| Pathologic tumor | 1.498 | 0.936-2.396 | 0.92 |
| <i>GPX4</i> expression | 1.859 | 1.147-3.015 | 0.012 |
| <i>SELENOP</i> | | | |
| Histologic grade | 0.531 | 0.312-0.905 | 0.2 |
| Pathologic tumor | 1.539 | 0.964-2.456 | 0.071 |
| <i>SELENOP</i> expression | 1.968 | 1.217-3.183 | 0.006 |
| <i>SOD1</i> | | | |
| Sex | 1.54 | 0.913-2.597 | 0.105 |
| Age | 1.015 | 0.998-1.033 | 0.089 |
| Histologic grade | 0.652 | 0.387-1.097 | 0.107 |
| Pathologic tumor | 1.691 | 1.059-2.699 | 0.028 |
| <i>SOD1</i> expression | 2.447 | 1.273-4.702 | 0.007 |
| <i>GSR</i> | | | |
| Histologic grade | 0.584 | 0.350-0.975 | 0.04 |
| Pathologic tumor | 1.576 | 0.989-2.512 | 0.056 |
| <i>GSR</i> expression | 0.354 | 0.224-0.559 | <0.001 |
| <i>CAT</i> | | | |
| Histologic grade | 0.502 | 0.295-0.855 | 0.011 |
| Pathologic tumor | 1.516 | 0.950-2.421 | 0.081 |
| <i>CAT</i> expression | 2.924 | 1.774-4.820 | <0.001 |
| <i>NFE2L2</i> | | | |
| Age | 1.016 | 0.998-1.033 | 0.078 |
| Pathologic tumor | 1.649 | 1.031-2.637 | 0.037 |
| <i>NFE2L2</i> expression | 2.955 | 1.779-4.908 | <0.001 |

HR: hazard ratio; CI: confidence interval

Supplementary Material to “Gene expression evaluation of antioxidant enzymes in patients with hepatocellular carcinoma: RT-qPCR and bioinformatic analyses”

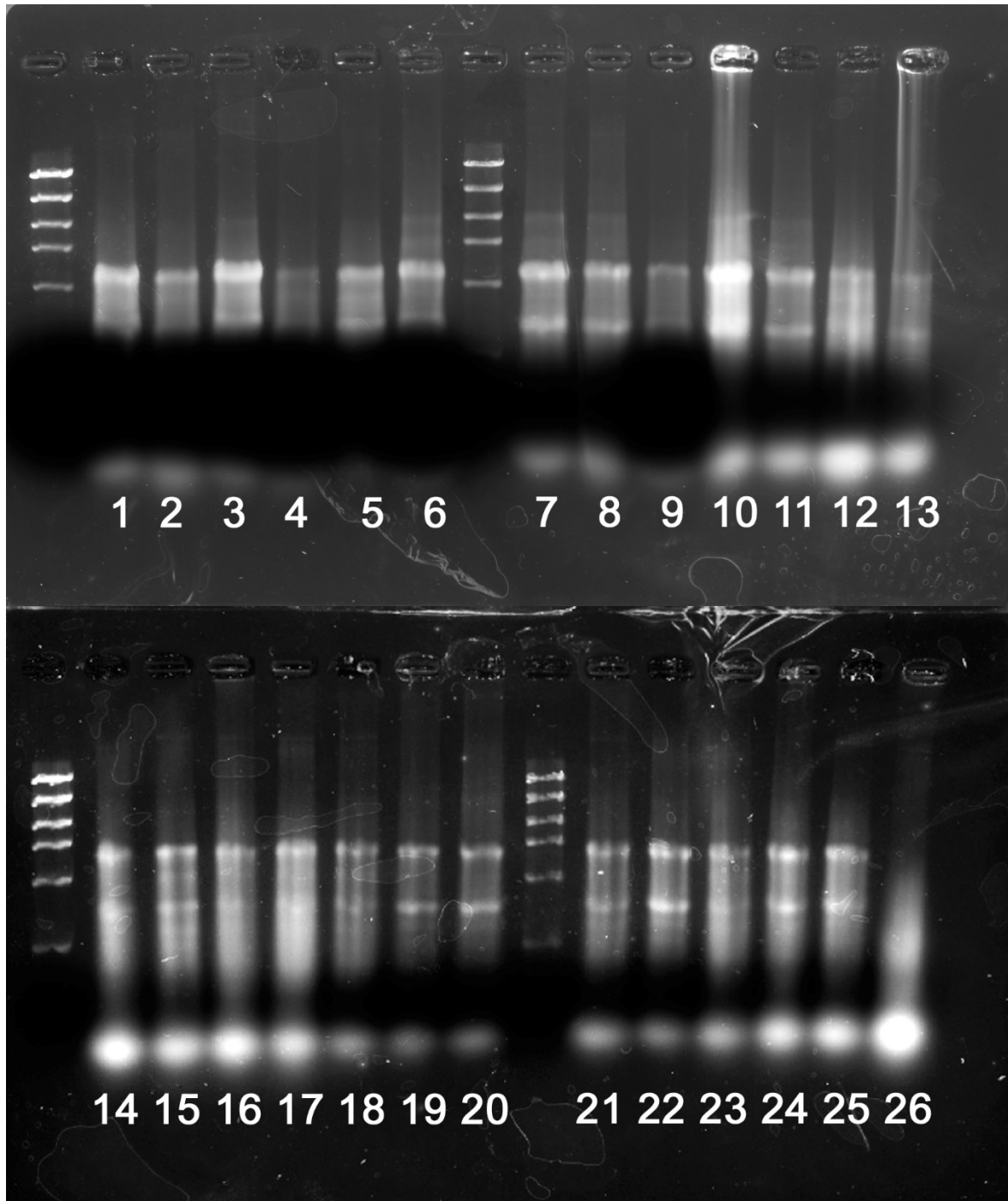


Figure S1 - Sample of agarose gel electrophoresis of total RNA from tumor and peritumoral samples of patients from ISCMPA. Integrity was assessed by the presence of bands corresponding to the 28S and 18S rRNA subunits. Odd numbers represent peritumoral samples and whole numbers represent tumoral samples.

3.1. Artigo científico 2

Evaluation of the variability of selenoprotein SNPs in hepatocellular carcinoma

Artigo a ser submetido a revista Molecular Genetics and Genomics, com fator de impacto 2.797.

Normas da revista: <https://www.springer.com/journal/438/submission-guidelines>

Evaluation of the variability of selenoprotein SNPs in hepatocellular carcinoma

Andressa de Freitas Alves¹, Vanessa Dido Baldissera², Tatiane Jacobsen da Rocha³, Carlos Thadeu Schmidt Cerski⁴, Paulo Ott Fontes^{3,5}, Márcia Giovenardi¹, Marilu Fiegenbaum¹, Silvana Almeida¹.

¹Biosciences Graduate program, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA), Porto Alegre, Brazil.

²Health Sciences Graduate program, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA), Porto Alegre, Brazil.

³Irmandade Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre (ISCMPA), Porto Alegre, Brazil.

⁴Department of Pathology, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Brazil.

⁵Hepatology Graduate Program, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA), Porto Alegre, Brazil.

Corresponding author: Silvana Almeida. Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Programa de Pós-graduação em Biociências, Rua Sarmiento Leite, 245, Prédio 1, sala 309, 90050-170 Porto Alegre, RS, Brazil. E-mail: salmeida@ufcspa.edu.br.

Abstract

Hepatocellular carcinoma is a significant cause of cancer-related death in the world. Hepatocarcinogenesis is not fully elucidated and is associated with a variety of factors, including oxidative stress. Selenoproteins act as antioxidants, neutralizing effects from oxidative stress, therefore alterations in their genes could impair redox balance and influence cancer development. Our aim was to evaluate the variability of SNPs from selenoproteins in patients with hepatocellular carcinoma. Experimental data from case and control patients was genotyped by qPCR and bioinformatic analyses were conducted in whole exome sequencing data from TCGA (tumoral and non-tumoral tissues). SNPs analyzed *GPX1* rs1050450, *GPX1* rs3448, *GPX4* rs713041, *SEP15* rs5845, *SEP15* rs5859, *SELENOP* rs7579 and *SELENOP* rs3877899. Loss of heterozygosity (LOH) was estimated by HWE-LOH package of R project. A significant difference in genotype frequencies of all studied SNPs, but rs3448, was found between case and control groups of experimental data ($p < 0.05$). Both experimental and TCGA data presented a tendency of decrease in heterozygous genotype in tumoral samples of HCC patients, and estimated LOH analysis demonstrated variable rates (8-41%) of LOH in tumoral samples. In patients LOH positive in rs713041, a significant difference was found in patients that had alcohol intake as the only risk factor for HCC ($p = 0.04$) and between histological grade tumors ($p = 0.02$). These SNPs from selenoproteins seem to have significant association with HCC as well as LOH may be an influencing factor in tumoral development.

Keywords: Hepatocellular carcinoma, selenoproteins, antioxidant enzymes, oxidative stress, SNPs, loss of heterozygosity.

Introduction

Hepatocellular carcinoma (HCC) configures as the second leading cause of cancer-related deaths worldwide with a variable incidence rate attributed to differences in exposition to risk factors (Forner et al. 2018; Frager and Schwartz 2020). Overall survival of patients varies from 2.5 to 18 months, depending of global location, highlighting the importance of understanding HCC pathology with the aim of development of strategies for better prognosis and creation of new treatment approaches (Ozakyol 2017; Yang et al. 2019).

Hepatocarcinogenesis is a multi-step process associated with a variety of factors, including oxidative stress (OS) that have influence in all steps of cancer development (Liu et al. 2014; Klungboonkrong et al. 2017; Moloney and Cotter 2018). Antioxidant system includes antioxidant enzymes such as selenoproteins that act to neutralize the effects of OS in cell environment. Glutathione peroxidases (GPXs), 15KDa selenoprotein (SEP15) and selenoprotein P (SeIP) are some of the selenoprotein representants that perform important functions such as hydrogen peroxide (H₂O₂) detoxification, blocking of lipid peroxidation, quality control of protein folding, and selenium transportation (Moloney and Cotter 2018; Zoidis et al. 2018). The study of genetic alterations in selenoproteins is the target of several works regarding multiple diseases as well as cancer (Zhuo and Diamond 2009; Zoidis et al. 2018).

HCC molecular mechanisms have not been fully elucidated. Genomic instability is reported as an important driven force to cancer development, contributing in structural and numerical chromosome alterations (Liu et al. 2014; Zhao and Huang 2015; Niu et al. 2016). A variety of genetic alterations have been described in HCC context, including single nucleotide polymorphisms (SNPs) and loss of heterozygosity (LOH) (Zhao and Huang 2015; Niu et al. 2016). In the present study, we bring new data regarding genotype frequencies of SNPs in selenoprotein genes, such as *GPX1* rs1050450 and rs3448, *GPX4* rs713041, *SEP15* rs5845 and rs5859 and *SELENOP* rs7579 and rs387899, in the context of HCC. Bioinformatic analyses were also performed to study the possibility of LOH events in tumoral

sample and explore the likelihood of association with some clinicopathological feature.

Material and Methods

Samples

Paraffin embedded liver tissue samples from 199 cases of HCC were collected between 2008 and 2016, from KCM Laboratory (Porto Alegre, Brazil) and Complexo Hospitalar Irmandade Santa Casa de Porto Alegre (ISCMPA), Brazil. All samples were processed, prior to DNA extraction, by microtomy and were stocked in microtubes in freezer at -20°C. Samples that presented excessive necrosis were excluded from study. Genomic DNA samples, extracted from EDTA-treated whole blood, of 180 healthy elderly volunteers were used as control group. Control patients were excluded if they presented history of cancer or other history of diseases such as chronic renal disease, head injury or stroke, family history of dementia, other psychiatric conditions or other conditions such as substance abuse. Clinical data was obtained from medical records, alongside with written informed consent from all participants involved in our study. The study protocol was approved by UFCSPA'S Ethics Committee.

For additional bioinformatic analysis, clinical data and whole exome sequencing data from the liver hepatocellular carcinoma (LIHC) project were downloaded directly from The Cancer Genome Atlas (TCGA) portal. These data included aligned sequences (BAM files) from 370 patients with HCC. Access of controlled data from project phs000178.v11.p8 was obtained via NIH database of Genotypes and Phenotypes (dbGaP) with project ID 25204 and request number #91072-1. The results published here are in whole or part based upon data generated by The Cancer Genome Atlas managed by the NCI and NHGRI. Information about TCGA can be found at <http://cancergenome.nih.gov>.

DNA extraction and qPCR analysis

Sample deparaffinization was performed using xylol and ethanol, and DNA was extracted with AccuPrep® Genomic DNA Extraction Kit (Bioneer Corporation,

USA), following manufacturer instructions. The integrity and amount of DNA from each sample was evaluated by spectrometry using Biospec Nano (Shimadzu Scientific Instruments®). Genotyping of samples were performed by qPCR analysis using TaqMan® Genotyping Master Mix kit (Applied Biosystems™, USA) and TaqMan® MGB probes (Applied Biosystems™, USA), according to the manufacturer's commercial protocol.

Bioinformatic analysis

Determination of genotypes and somatic mutation calling from TCGA samples were performed using VarScan2 (v.2.4.2) (Koboldt et al. 2012) and by visual inspection of aligned sequences in Integrative Genomics Viewer (IGV) v.2.8.2 (Robinson et al. 2011), following protocol developed by Barnell et al. (2019). For VarScan2 analysis, BAM files were previously converted to mpileup files using SAM Tools (v.1.9) (Li et al. 2009), an application available in public server of Galaxy web platform (v.21.01) (Afgan et al. 2018) at usegalaxy.org.

Estimation analysis of LOH for experimental samples and TCGA samples were performed in R project (v.4.0.0), using HWE-LOH package developed by Wilkins & Laframboise (2011).

Statistical analysis

Genotype frequencies were determined by direct counting and allele frequencies were calculated from genotype frequencies. All groups were tested for Hardy-Weinberg equilibrium. Comparison between groups were performed by Chi-Square test and Fisher's Exact test (qualitative) with Bonferoni correction or Student's T-Test and Mann-Whitney U-test (quantitative). Kolmogorov-Smirnov test was used for normality test of quantitative variables and they were presented as mean and standard deviation. Qualitative variables were described as absolute and relative frequencies. IBM SPSS Statistics version 20 was used for statistical analysis. Significant level was set as $p < 0.05$.

Results

Genotype frequencies of SNPs in HCC patients versus healthy individuals

Several SNPs in selenoprotein genes have been described and associated with a variety of diseases. In order to investigate if this association also occur in HCC, we evaluated the genotype frequencies in tumoral samples of patients with HCC and in whole blood samples of healthy patients. When we compared genotype frequencies of SNPs between groups (cases versus controls), we found significant difference in all SNPs analyzed, except for *GPX1* rs3448 (Table 1). However, when Hardy-Weinberg equilibrium (HWE) was calculated for tumoral samples of HCC patients (cases), only SNPs *GPX1* rs1050450 and *GPX1* rs3448 met equilibrium ($p > 0.05$, Table 1).

After re-evaluation of all analyses and confirmation of these results, we seek to analyze the same SNPs in whole exome sequencing data from HCC patients of TCGA-LIHC project. Data were available only for *GPX1* rs1050450, *GPX4* rs713041, *SELENOP* rs7579 and *SELENOP* rs3877899 SNPs in tumoral and non-tumoral (blood or adjacent normal tissue) samples of 370 patients. When we compared genotype frequencies from tumoral and non-tumoral tissues of the same patient, we found no significant difference between groups (Table 2, $p > 0.05$). However, just like ISCMPA sample, SNP *GPX4* rs713041 didn't meet Hardy-Weinberg equilibrium in tumoral samples (Table 2).

Loss of heterozygosity analysis

Since most of SNPs didn't meet HWE and we detected a tendency of decrease in heterozygous genotype in tumoral samples of HCC patients (both ISCMPA and TCGA sample, Table 1 and 2), we performed an estimation analysis of loss of heterozygosity using HWE-LOH R package developed by Wilkins & Laframboise (2011). SNPs *SEP15* rs5859, *SEP15* rs5845 and *GPX4* rs713041 presented highest estimated LOH rates in ISCMPA sample (Table 3). Evaluation of LOH in SNPs *SEP15* rs5859, *SEP15* rs5845 and *GPX1* rs3448 were not possible

in TCGA sample since data were not available. However, *GPX4* rs713041 and *SELENOP* rs7579 presented highest estimated LOH rate (Table 3) in this dataset.

Relationship between characteristics of sample and LOH

Description of samples' characteristics from ISCMPA and TCGA datasets are presented in Table 4. HCC patients from ISCMPA sample presented mean age of 59 years and prevalence of male sex (66.3%), as well as TCGA sample that presented same mean age and similar male percentage (68.4%). Control patients from ISCMPA showed slightly higher mean age (63 years) and prevalence of female sex (81.6%). ISCMPA cases and TCGA patients differed in main etiology (associated or not with others risk factors): hepatitis C virus infection (78.4%) and hepatitis B virus infection (63.9%), respectively.

In order to detected association with any characteristic present in patients that underwent LOH, we performed statistical analysis for relevant clinical features in TCGA sample. When we analyzed those patients that had alcohol intake as the only risk factor for HCC, we found a significant difference between groups (LOH positive versus LOH negative for *GPX4* rs713041, Table 5, $p=0.04$). No other association was found for viral hepatitis or associated risk factors (Table 5, $p>0.05$).

When we compared histological tumoral grade score and presence of LOH in *GPX4* rs713041 SNP, we also found significant difference between groups (Table 5, $p=0.02$). Poorly differentiated tumors (G3 and G4 scores) were more common in patients positive for LOH in rs713041 (63.2%), whereas patients that were LOH negative presented higher frequency (64.6%) of well differentiated tumors (G1 and G2 scores).

No significant association was found when we analyzed LOH in any other SNPs and others parameters such as age, risk factors, sex, TNM classification, Ishak score, presence of vascular invasion, ECOG score and metabolic panel exams (data not shown).

Discussion

HCC is characterized by accumulation of genetic and genomic alterations that are extensively studied for understanding their impact in the development and progression of this disease (Liu et al. 2014; Zhao and Huang 2015; Niu et al. 2016). Among these changes, there are single nucleotides polymorphisms (SNPs) and loss of heterozygosity (LOH) that configure common genetic alterations attributed to susceptibility of several diseases, including cancers such as HCC (Zhao and Huang 2015; Niu et al. 2016).

In the literature, several works reported associations between polymorphisms in selenoproteins genes and a variety of cancers. Increased risk for lung, bladder, head and neck, and prostate cancers (Chen et al. 2011; Wang et al. 2017) were already associated with AA genotype of *GPX1* rs1050450. The same was reported for CT genotype of *GPX4* rs73041 and colorectal cancer (Méplán et al. 2010); genotypes AA and TT of *SEP15* rs5845 and rs5859, respectively, for rectal and prostate cancers (Sutherland et al. 2010; Karunasinghe et al. 2013); and TT genotype of *SELENOP* rs3877899 for prostate (Geybels et al. 2013) and breast cancers (Méplán et al. 2013). Likewise, in our study, we detected an increase of the same genotypes in tumoral samples (Figure 1a, c, d, e and g), possibly due to LOH mechanism (Table 1). No significant association was found for *GPX1* rs3448 (Figure 1b, $p > 0.05$).

In its turn, regarding *SELENOP* rs7579, studies from Meplán et al (2010) and Steinbrecher et al (2010) demonstrated an increased risk of prostate and colorectal cancer for genotype TT, while our results demonstrated an increase of CC genotype in HCC tumoral samples (Figure 1f). Study from Donadio and Hesketh (2017) showed that CC carriers of *SELENOP* rs7579 presented lower mRNA levels of SelP compared to allele T carriers, before and after supplementation of selenium. Likewise, results from Meplán et al (2009) demonstrated that lower expression of 60-kDa isoform of SelP was present in CC carriers when compared to allele T carriers, before selenium supplementation. Moreover, in vitro experiment in HepG2 cells reported that higher expression of SelP may inhibit proliferation of HCC cells and reduce oxidative stress status (Wang et al. 2020). Although we were unable to

confirm this hypothesis in our sample, tumoral HCC cells with CC genotype of *SELENOP* rs7579 could have an advantage in their survival by maintaining a lower expression of this selenoprotein.

Since we observed the association of these genotypes with HCC tumoral samples as well as detected a decrease of heterozygotes (Figure 1 and 2b) along with genotype frequency deviation from Hardy-Weinberg equilibrium, we raised the possibility that LOH could be happening and influencing in genotype difference between tumor/normal cells in HCC. In fact, our LOH analyses (Table 1) demonstrated that a variety of LOH events could be occurring in tumoral cells of HCC patients. LOH was already reported in HCC tumors in several chromosomal regions (1p, 1q, 2q, 3p, 4q, 5q, 6p, 8p, 8q, 9p, 10q, 11p, 13q, 14q, 16q and 17p) (Zhang 2005; Zhuo and Diamond 2009; Kasai et al. 2018), including in some of the SNPs reported in this article (Table 1). LOH was already stated in *GPX1* locus in breast cancer (Hu and Diamond 2003; Hu et al. 2005) and head and neck cancer (Hu et al. 2004), as well as its presence was associated with reduced glutathione peroxidase 1 (GPx1) activity in lung tumor (Hardie et al. 2000). Also, LOH in *SEP15* locus was already detected in head and neck cancer (Hu et al. 2001).

LOH is a typical event in a variety of cancers, frequently involved in wild-type allele loss in tumor suppressor genes, but also affecting non-driver genes, influencing haplo-insufficiency occurrence and possibly creating distinct characteristics between tumoral and normal cells (Berger and Pandolfi 2011; Zhang and Sjöblom 2021). Because of that, LOH occurrence are extensively studied for associations with specific DNA locus or some clinicopathological feature (Zhang and Sjöblom 2021). Our studied demonstrated a significant difference between patients that are positive for LOH *GPX4* rs713041 and clinical parameters such as histological tumoral grade (poorly differentiated tumors) and alcohol intake as risk factor (Table 3). In fact, aggressive tumoral features such as high histological grade (poorly differentiated tumors) (Zhang 2005), high TNM stages and bigger tumor size (Wong et al. 2002), poor patient outcome (Jang et al. 2008), higher cancer recurrence (Okuno et al. 2009), higher incidence of metastasis and infection by HBV (Li et al. 2001) have already been associated with LOH in specific loci in HCC.

Even though LOH and other genetic alterations can occur randomly, consequences of these changes could lead to acquirement of characteristics that are advantageous for tumor cells growth as well as could create unique vulnerabilities for their survival (Berger and Pandolfi 2011; Zhang and Sjöblom 2021). These possibilities reinforce the importance of studying LOH events both for a better understanding of HCC pathology and for the selection of new therapeutic targets. Regarding this article, inherited limitations of our study include small sample size and impossibility to collect matched normal tissues for experimental analysis of LOH. Even so, investigation of TCGA data allowed further examinations in a new dataset of patients alongside with detection of associations with clinicopathological parameters. Our study provides inherited data about SNPs from selenoproteins genes in HCC context as well as raises hypotheses concerning genetic alterations, such as LOH, influencing the genotype of specific genes in tumoral genome. These genetic alterations seem to have significant association with HCC and should be further investigated for elucidation of their impact in hepatocarcinogenesis.

Declarations

Acknowledgments

We thank CNPq for financial support and Victória Rocha Foigt, Luísa Comarú, Grasiela Agnes, and Marília Zandoná for exceptional technical assistance.

Funding

This study was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), 408864/2016-8.

Conflicts of interest

The authors have no conflict of interest to disclose.

Availability of data and material

Not applicable.

Code availability

Not applicable.

Ethics approval

The study protocol was approved by UFCSPA'S Ethics Committee, nº 2.315.844.

Consent to participate

All patients have given written informed consent to participate of our study.

Consent for publication

Not applicable.

References

Afgan E, Baker D, Batut B, et al (2018) The Galaxy platform for accessible, reproducible and collaborative biomedical analyses: 2018 update. *Nucleic Acids Res* 46:W537–W544. <https://doi.org/10.1093/nar/gky379>

Barnell EK, Ronning P, Campbell KM, et al (2019) Standard operating procedure for somatic variant refinement of sequencing data with paired tumor and normal samples. *Genet Med* 21:972–981. <https://doi.org/10.1038/s41436-018-0278-z>

Berger AH, Pandolfi PP (2011) Haplo-insufficiency: A driving force in cancer. *J Pathol* 223:138–147. <https://doi.org/10.1002/path.2800>

Chen J, Cao Q, Qin C, et al (2011) GPx-1 polymorphism (rs1050450) contributes to tumor susceptibility: Evidence from meta-analysis. *J Cancer Res Clin Oncol* 137:1553–1561. <https://doi.org/10.1007/s00432-011-1033-x>

Donadio JLS, Hesketh J (2017) Influence of Genetic Variations in Selenoprotein Genes on the Pattern of Gene Expression after. <https://doi.org/10.3390/nu9070739>

Forner A, Reig M, Bruix J (2018) Hepatocellular carcinoma. *Lancet* 391:1301–1314. <https://doi.org/10.1109/FCS.2017.8088863>

Frager SZ, Schwartz JM (2020) Hepatocellular carcinoma: Epidemiology, screening, and assessment of hepatic reserve. *Curr Oncol* 27:138–143. <https://doi.org/10.3747/co.27.7181>

Geybels MS, Hutter CM, Kwon EM, et al (2013) Variation in selenoenzyme genes and prostate cancer risk and survival. *Prostate* 73:734–742. <https://doi.org/10.1002/pros.22617>

Hardie LJ, Briggs JA, Davidson LA, et al (2000) The effect of hOGG1 and glutathione peroxidase I genotypes and 3p chromosomal loss on 8-hydroxydeoxyguanosine levels in lung cancer. *Carcinogenesis* 21:167–172. <https://doi.org/10.1093/carcin/21.2.167>

Hu Y, Benya R V., Carroll RE, Diamond AM (2005) Allelic loss of the gene for the GPX1 selenium-containing protein is a common event in cancer. *J Nutr* 135:3021–3025. <https://doi.org/10.1093/jn/135.12.3021s>

Hu YJ, Diamond AM (2003) Role of glutathione peroxidase 1 in breast cancer: Loss of heterozygosity and allelic differences in the response to selenium. *Cancer Res* 63:3347–3351

Hu YJ, Dolan ME, Bae R, et al (2004) Allelic loss at the GPx-1 locus in cancer of the head and neck. *Biol Trace Elem Res* 101:97–106. <https://doi.org/10.1385/bter:101:2:097>

Hu YJ, Korotkov K V., Mehta R, et al (2001) Distribution and functional consequences of nucleotide polymorphisms in the 3'-untranslated region of the human Sep15 gene. *Cancer Res* 61:2307–2310

Jang HS, Kang KM, Choi BO, et al (2008) Clinical significance of loss of heterozygosity for M6P/IGF2R in patients with primary hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 14:1394–1398. <https://doi.org/10.3748/wjg.14.1394>

Karunasinghe N, Han DY, Goudie M, et al (2013) Prostate disease risk factors among a New Zealand cohort. *J Nutrigenet Nutrigenomics* 5:339–351. <https://doi.org/10.1159/000346279>

Kasai F, Hirayama N, Ozawa M, et al (2018) HuH-7 reference genome profile: complex karyotype composed of massive loss of heterozygosity. *Hum Cell* 31:261–267. <https://doi.org/10.1007/s13577-018-0212-3>

Klungboonkrong V, Das D, McLennan G (2017) Molecular Mechanisms and Targets of Therapy for Hepatocellular Carcinoma. *J Vasc Interv Radiol* 28:949–955. <https://doi.org/10.1016/j.jvir.2017.03.002>

Koboldt DC, Zhang Q, Larson DE, et al (2012) VarScan 2: Somatic mutation and copy number alteration discovery in cancer by exome sequencing. *Genome Res* 22:568–576. <https://doi.org/10.1101/gr.129684.111>

Li H, Handsaker B, Wysoker A, et al (2009) The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics* 25:2078–2079. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp352>

Li SP, Wang HY, Li JQ, et al (2001) Genome-wide analyses on loss of heterozygosity in hepatocellular carcinoma in Southern China. *J Hepatol* 34:840–849. [https://doi.org/10.1016/S0168-8278\(01\)00047-2](https://doi.org/10.1016/S0168-8278(01)00047-2)

Liu M, Jiang L, Guan XY (2014) The genetic and epigenetic alterations in human hepatocellular carcinoma: A recent update. *Protein Cell* 5:673–691. <https://doi.org/10.1007/s13238-014-0065-9>

Méplan C, Dragsted LO, Ravn-Haren G, et al (2013) Association between Polymorphisms in Glutathione Peroxidase and Selenoprotein P Genes, Glutathione Peroxidase Activity, HRT Use and Breast Cancer Risk. *PLoS One* 8:. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0073316>

Méplan C, Hughes DJ, Pardini B, et al (2010) Genetic variants in selenoprotein genes increase risk of colorectal cancer. *Carcinogenesis* 31:1074–1079. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgq076>

Méplan C, Nicol F, Burtle BT, et al (2009) Relative abundance of selenoprotein P isoforms in human plasma depends on genotype, se intake, and cancer status. *Antioxidants Redox Signal* 11:2631–2640. <https://doi.org/10.1089/ars.2009.2533>

Moloney JN, Cotter TG (2018) ROS signalling in the biology of cancer. *Semin Cell Dev Biol* 80:50–64. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2017.05.023>

Niu ZS, Niu XJ, Wang WH (2016) Genetic alterations in hepatocellular carcinoma: An update. *World J Gastroenterol* 22:9069–9095. <https://doi.org/10.3748/wjg.v22.i41.9069>

Okuno T, Ueda M, Tsuruyama T, et al (2009) Loss of heterozygosity on 10q23 is involved in metastatic recurrence of hepatocellular carcinoma. *Cancer Sci* 100:520–528. <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2008.01056.x>

Ozakyol A (2017) Global epidemiology of hepatocellular carcinoma (HCC Epidemiology). *J Gastrointest Cancer* 19:. <https://doi.org/10.1007/s12029-017-9959-0>

Robinson JT, Thorvaldsdóttir H, Winckler W, et al (2011) Integrative genomics viewer. *Nat Biotechnol* 29:24–26. <https://doi.org/10.1038/nbt.1754>

Steinbrecher A, Méplan C, Hesketh J, et al (2010) Effects of selenium status and polymorphisms in selenoprotein genes on prostate cancer risk in a prospective study of European men. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 19:2958–2968. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-10-0364>

Sutherland A, Kim DH, Relton C, et al (2010) Polymorphisms in the selenoprotein S and 15-kDa selenoprotein genes are associated with altered susceptibility to colorectal cancer. *Genes Nutr* 5:215–223. <https://doi.org/10.1007/s12263-010-0176-8>

Wang C, Zhang R, Chen N, et al (2017) Association between glutathione peroxidase-1 (GPX1) Rs1050450 polymorphisms and cancer risk. *Int J Clin Exp Pathol* 10:9527–9540

Wang J, Shen P, Liao S, et al (2020) Selenoprotein P inhibits cell proliferation and ROX production in HCC cells. *PLoS One* 15:1–11. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0236491>

Wilkins K, Laframboise T (2011) Losing balance: Hardy-Weinberg disequilibrium as a marker for recurrent loss-of-heterozygosity in cancer. *Hum Mol Genet* 20:4831–4839. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddr422>

Wong CM, Lee JMF, Lau TCM, et al (2002) Clinicopathological significance of loss of heterozygosity on chromosome 13q in hepatocellular carcinoma. *Clin Cancer Res* 8:2266–2272

Yang JD, Hainaut P, Gores GJ, et al (2019) A global view of hepatocellular carcinoma: trends, risk, prevention and management. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 16:589–604. <https://doi.org/10.1038/s41575-019-0186-y>

Zhang S-H (2005) Clinicopathological significance of loss of heterozygosity and microsatellite instability in hepatocellular carcinoma in China. *World J Gastroenterol* 11:3034. <https://doi.org/10.3748/wjg.v11.i20.3034>

Zhang X, Sjöblom T (2021) Targeting loss of heterozygosity: A novel paradigm for cancer therapy. *Pharmaceuticals* 14:1–17. <https://doi.org/10.3390/ph14010057>

Zhao Z, Huang J (2015) Recent updates of genetic and genomic alterations in hepatocellular carcinoma. *Hepatoma Res* 0:0. <https://doi.org/10.4103/2394-5079.168446>

Zhuo P, Diamond AM (2009) Molecular mechanisms by which selenoproteins affect cancer risk and progression. *Biochim Biophys Acta - Gen Subj* 1790:1546–1554. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2009.03.004>

Zoidis E, Seremelis I, Kontopoulos N, Danezis GP (2018) Selenium-dependent antioxidant enzymes: Actions and properties of selenoproteins. *Antioxidants* 7:1–26. <https://doi.org/10.3390/antiox7050066>

Table 1. Genotype and allele frequencies of selenoproteins SNPs from case and control patients from ISCMPA

| SNPs | Healthy controls – n(%) | HCC – n(%) | χ^2 p-value | Adjusted residuals |
|--------------------------|-------------------------|------------------|-------------------|--------------------------|
| rs1050450 GPX1 | | | | |
| GG | 85 (47.2) | 95 (62.1) | 0.02* | ±2.71, p=0.007 |
| AG | 73 (40.6) | 46 (30) | | ±1.99, p=0.04 |
| AA | 22 (12.2) | 12 (7.9) | | ±1.32, p>0.05 |
| A allele (%) | 32.5 | 22.9 | | |
| HWE p-value | >0.05 | >0.05 | | |
| rs3448 GPX1 | | | | |
| CC | 85 (54.5) | 73 (50.3) | 0.66 | ±0.72, p>0.05 |
| CT | 56 (35.9) | 54 (37.2) | | ±0.24, p>0.05 |
| TT | 15 (9.6) | 18 (12.5) | | ±0.78, p>0.05 |
| T allele (%) | 27.5 | 31 | | |
| HWE p-value | >0.05 | >0.05 | | |
| rs713041 GPX4 | | | | |
| CC | 50 (27.8) | 55 (35.7) | 0.03* | ±1.56, p>0.05 |
| CT | 89 (49.4) | 54 (35.1) | | ±2.65, p=0.008 |
| TT | 41 (22.8) | 45 (29.2) | | ±1.34, p>0.05 |
| T allele (%) | 47.5 | 46.7 | | |
| HWE p-value | >0.05 | <0.001 | | |
| rs5845 SEP15 | | | | |
| GG | 111 (61.7) | 96 (63.2) | <0.001* | ±0.28, p>0.05 |
| AG | 65 (36.1) | 35 (23) | | ±2.59, p=0.01 |
| AA | 4 (2.2) | 21 (13.8) | | ±3.99, p<0.001 |
| A allele (%) | 20.3 | 25.3 | | |
| HWE p-value | >0.05 | <0.001 | | |
| rs5859 SEP15 | | | | |
| CC | 111 (61.7) | 111 (65.7) | <0.001* | ±0.78, p>0.05 |
| CT | 65 (36.1) | 36 (21.3) | | ±3.05, p=0.002 |
| TT | 4 (2.2) | 22 (13) | | ±3.84, p<0.001 |
| T allele (%) | 20.3 | 23.7 | | |
| HWE p-value | >0.05 | <0.001 | | |
| rs7579 SELENOP | | | | |
| CC | 80 (44.4) | 86 (62.3) | 0.005* | ±3.16, p=0.002 |
| CT | 80 (44.4) | 39 (28.3) | | ±2.96, p=0.003 |
| TT | 20 (11.2) | 13 (9.4) | | ±0.49, p>0.05 |
| T allele (%) | 33.3 | 23.5 | | |
| HWE p-value | >0.05 | 0.01 | | |
| rs3877899 SELENOP | | | | |
| CC | 113 (62.8) | 89 (62.2) | 0.02* | ±0.10, p>0.05 |
| CT | 60 (33.3) | 38 (26.6) | | ±1.31, p>0.05 |
| TT | 7 (4.5) | 16 (11.2) | | ±2.53, p=0.01 |
| T allele (%) | 20.5 | 24.5 | | |
| HWE p-value | >0.05 | <0.001 | | |

Abbreviation: SNPs, single nucleotide polymorphisms; HWE, Hardy-Weinberg Equilibrium. The Chi-Square test was used to compare groups, at

significance level of $p < 0.05$, followed by Bonferroni correction. *Indicates a significant difference between the groups.

Table 2. Genotype and allele frequencies of selenoproteins SNPs from TCGA patients with HCC.

| SNPs | Non-tumoral tissue – n(%) | Tumoral tissue – n(%) | χ^2 p-value |
|--------------------------|---------------------------|-----------------------|------------------|
| rs1050450 GPX1 | | | |
| GG | 240 (64.9) | 244 (65.9) | 0.837 |
| AG | 119 (32.2) | 113 (31) | |
| AA | 11 (2.9) | 13 (3.1) | |
| A allele (%) | 19 | 18.7 | |
| HWE p-value | p>0.05 | p>0.05 | |
| rs713041 GPX4 | | | |
| CC | 124 (34.8) | 136 (38.2) | 0.380 |
| CT | 172 (48.3) | 153 (42.9) | |
| TT | 60 (16.9) | 67 (18.9) | |
| T allele (%) | 41 | 40.3 | |
| HWE p-value | p>0.05 | 0.04 | |
| rs7579 SELENOP | | | |
| CC | 188 (56.6) | 187 (56.3) | 0.923 |
| CT | 113 (34) | 111 (33.4) | |
| TT | 31 (9.4) | 34 (10.2) | |
| T allele (%) | 52.7 | 53.9 | |
| HWE p-value | 0.02 | p>0.05 | |
| rs3877899 SELENOP | | | |
| CC | 274 (74.1) | 274 (74.1) | 0.975 |
| CT | 85 (22.9) | 86 (23.2) | |
| TT | 12 (3) | 11 (2.7) | |
| T allele (%) | 14.7 | 14.5 | |
| HWE p-value | p>0.05 | p>0.05 | |

Abbreviation: SNPs, single nucleotide polymorphisms; HWE, Hardy-Weinberg Equilibrium. The Chi-Square test was used to compare groups, at

significance level of $p < 0.05$. *Indicates a significant difference between the groups.

Table 3. Estimated loss of heterozygosity rate of HCC patients from ISCMPA and TCGA.

| SNP | Chr | Gene | Gene Location | SNP Location in Gene | Base change | Estimated LOH rate – ISCMPA (%) | Estimated LOH rate – TCGA (%) |
|-----------|-----|----------------|---------------|----------------------|-------------|---------------------------------|-------------------------------|
| rs1050450 | 3 | <i>GPX1</i> | 3p21.31 | 3:49357401 (Exon) | G>A | 16 | 0 |
| rs3448 | 3 | <i>GPX1</i> | 3p21.31 | 3:49359318 (5'UTR) | T>C | 14 | - |
| rs713041 | 19 | <i>GPX4</i> | 19p13.3 | 6:31356889 (3'UTR) | T>C | 30 | 10 |
| rs5845 | 1 | <i>SELENOF</i> | 1p22.3 | 1:86863156 (3'UTR) | G>A | 39 | - |
| rs5859 | 1 | <i>SELENOF</i> | 1p22.3 | 1:86862842 (3'UTR) | C>T | 41 | - |
| rs7579 | 5 | <i>SELENOP</i> | 5p12 | 5:42800706 (3'UTR) | C>T | 20 | 14 |
| rs3877899 | 5 | <i>SELENOP</i> | 5p12 | 5:42801166 (Exon) | C>T | 28 | 8 |

Abbreviation: SNP, single nucleotide polymorphism; LOH, loss of heterozygosity; ISCMPA, Irmandade Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre; TCGA, The Cancer Genome Atlas.

Table 4. Characteristics of ISCMPA and TCGA samples.

| | ISCMPA | | TCGA |
|--|------------------------|---------------------------|------------------------|
| | HCC patients n= 199 | Healthy patients n=180 | HCC patients n= 370 |
| Age (years) - $\mu \pm$ SD | 59.3 \pm 5.8 | 63.3 \pm 6.3 | 59.2 \pm 13.54 |
| Sex – n (%) | | | |
| Male | 132 (66.3) | 37 (18.4) | 253 (68.4) |
| Female | 67 (33.7) | 143 (81.6) | 117 (31.6) |
| HCC risk Factors – n (%) | | | |
| HBV | 11 (5.5) | - | 231 (63.9) |
| HCV | 156 (78.4) | - | 133 (35.9) |
| Alcohol intake | 38 (19.1) | - | 116 (31.4) |
| Tumor Grade – n (%) | | | |
| G1-G2 | - | - | 231 (63.1) |
| G3-G4 | - | - | 135 (36.9) |

Abbreviations: ISCMPA, Irmandade Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre; TCGA, The Cancer Genome Atlas; HCC, Hepatocellular carcinoma; HBC, Hepatitis B virus infection; HCV, Hepatitis C virus infection.

Table 5. Relationship between clinical parameters and LOH events in *GPX4* rs713041 in TCGA patients.

| | LOH+ | LOH- | p-value |
|---|-------------------|-------------------|--------------|
| Age (years) - $\mu \pm$ SD | 60.16 \pm 14.11 | 59.20 \pm 13.52 | 0.89 |
| Sex – n (%) | | | |
| <i>Male</i> | 14 (73.7) | 239 (68.1) | 0.79 |
| <i>Female</i> | 5 (26.3) | 112 (31.9) | |
| HBV infection – n (%) | | | |
| + | 8 (42.1) | 87 (24.8) | 0.10 |
| - | 11 (57.9) | 264 (75.2) | |
| HCV infection – n (%) | | | |
| + | 0 (0) | 27 (7.7) | 0.38 |
| - | 19 (100) | 324 (92.3) | |
| Alcohol intake – n (%) | | | |
| + | 4 (21.1) | 23 (6.6) | 0.04* |
| - | 15 (78.9) | 328 (93.4) | |
| HBV + HCV + Alcohol – n (%) | | | |
| + | 2 (5.4) | 35 (94.6) | 1 |
| - | 17 (5.1) | 316 (94.9) | |
| Tumor Stage (TNM) – n (%) | | | |
| <i>Stages I-II</i> | 13 (76.5) | 244 (73.9) | 1 |
| <i>Stages III-IV</i> | 4 (23.5) | 86 (26.1) | |
| Histological Tumor Grade – n (%) | | | |
| <i>G1-G2</i> | 7 (36.8) | 224 (64.6) | 0.02* |
| <i>G3-G4</i> | 11 (63.2) | 124 (35.4) | |
| Vascular invasion – n (%) | | | |
| <i>None</i> | 8 (61.5) | 199 (66.1) | 0.89 |
| <i>Micro</i> | 4 (30.8) | 87 (28.9) | |
| <i>Macro</i> | 1 (7.7) | 15 (5) | |
| Child-Pugh classification – n (%) | | | |
| <i>A</i> | 9 (90%) | 211 (90.9) | |
| <i>B</i> | 1 (10) | 20 (8.6) | 0.96 |
| <i>C</i> | 0 (0) | 1 (0.4) | |
| Ishak score – n (%) | | | |
| <i>No fibrosis</i> | 3 (42.9) | 71 (34.1) | 0.59 |
| <i>Fibrosis</i> | 1 (14.3) | 68 (32.7) | |
| <i>Cirrhosis</i> | 3 (42.9) | 69 (33.2) | |
| Inflammation in adjacent tissue – n (%) | | | |
| <i>No</i> | 7 (63.6) | 110 (48.9) | 0.37 |
| <i>Yes</i> | 4 (36.4) | 115 (51.1) | |

Abbreviations: LOH, loss of heterozygosity; HBV, hepatitis B virus; HCV, hepatitis C virus; TNM, classification of malignant tumors. *Significant p-value ($p < 0.05$)

4. DISCUSSÃO

Os dados epidemiológicos do carcinoma hepatocelular evidenciam a gravidade desse tipo de câncer, considerando-se sua alta taxa de mortalidade, de 830.000 mortes/906.000 casos em 2020, e seu prognóstico desfavorável onde a sobrevida média dos pacientes é de 11 meses (5,6). Além disso, os processos que formam a hepatocarcinogênese ainda não são completamente entendidos, sugerindo-se influência tanto de fatos externos quanto internos ao organismo humano (2,18).

Assim como em outros tumores, o CHC é caracterizado pelo acúmulo de uma série de alterações genéticas que, por sua vez, auxiliam na aquisição de capacidades pelas células malignas as quais possibilitam sua proliferação e sobrevida (21). De fato, alterações genéticas não somente são um exemplo, mas também são capazes de influenciar no aparecimento das características tumorais denominadas pontos-chave ou “*hallmarks*” do câncer: manutenção da sinalização proliferativa, inibição de supressores de crescimento, evasão do sistema imune, ativação da imortalidade replicativa, inflamação mediada pelo tumor, desregulação da energética celular, invasão e metástase, indução de angiogênese, instabilidade genômica e mutações e resistência à morte celular (21,63).

O estresse oxidativo, por sua vez, possui papel significativo tanto no desenvolvimento quanto na progressão tumoral, podendo influenciar direta ou indiretamente na aquisição de cada uma das características tumorais citadas. O acúmulo de ROS pela célula tem influência em todas as etapas da carcinogênese (iniciação, promoção e progressão), seja através de danos ao DNA, possibilitando a aquisição de mutações ou interferindo na expressão de genes, seja atuando diretamente em outras macromoléculas como as proteínas (28,31). Desse modo, a conexão entre alterações genéticas e o estresse oxidativo, no contexto do câncer, parece ter um efeito paradoxal: variações genéticas podem influenciar no aparecimento do estresse oxidativo (ex.: através de mudanças em proteínas antioxidantes) e, por outro lado, o próprio estresse oxidativo pode causar o aparecimento de variações genéticas cujas consequências estimulam a aquisição de características vantajosas às células malignas (28,30,31).

Considerando esse efeito paradoxal, alterações tanto na expressão quanto na estrutura de selenoproteínas, enzimas antioxidantes que combatem o estresse oxidativo, podem causar impacto no desenvolvimento de cânceres, incluindo o CHC. No primeiro artigo desta tese foi apresentado um estudo sobre o perfil da expressão gênica de selenoproteínas e outras enzimas antioxidantes no contexto do CHC, tanto em amostras tumorais e peritumorais quanto em tecidos de indivíduos saudáveis. Essa análise nos permitiu verificar que o padrão de expressão dos genes dessas enzimas apresenta-se de forma diversa dependendo do estado celular, considerando que, mesmo comumente usado como amostra controle, o tecido peritumoral já parece sofrer influência do microambiente tumoral (64). De fato, como já citado anteriormente, a célula tumoral parece ter um controle de ajuste fino na quantidade de estresse oxidativo dependendo do status celular. As quantidades de ROS parecem ser adaptadas de modo a beneficiar o tumor, sendo que um dos métodos para isso pode ser através do controle da expressão gênica de componentes antioxidantes (29,65).

Apesar de não termos verificado a expressão proteica em si, podemos detectar uma alteração da expressão gênica tanto da GPX4 quanto da superóxido dismutase 2 (SOD2) nos dados experimentais e análises dos bancos de dados. O controle tanto de uma como da outra poderia trazer vantagens à célula maligna uma vez que a GPX4 possui ação na inibição da peroxidação lipídica e, conseqüentemente, prevenindo a morte celular induzida por estresse oxidativo; e a SOD2 atua na formação de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), a partir do ânion superóxido, que se configura como um importante sinalizador celular, atuando, inclusive, em um dos “hallmarks” do câncer através do processo chamado efeito Warburg.

Tendo em vista que nossos resultados apresentaram a alteração de expressão dos genes de enzimas antioxidantes, incluindo selenoproteínas, no contexto do CHC, no segundo artigo desta tese foi apresentado um estudo sobre o estado de variabilidade genética em amostras tumorais e não tumorais de pacientes com CHC e amostras de pacientes saudáveis. Como discutido anteriormente, variações genéticas nos genes das selenoproteínas poderiam causar mudanças no

funcionamento da proteína ou, então, alterar sítios de ligação de proteínas ao DNA ou mRNA. Por sua vez, essas modificações poderiam ter um papel importante no risco e progressão do CHC, uma vez que causariam alterações no estado redox da célula (21,23).

Mesmo que no estudo em questão não tenha sido proposta a análise direta das consequências desses SNPs no CHC, foi possível detectar a presença de diferenças entre as frequências genótípicas das amostras tumorais de pacientes com CHC e amostras não hepáticas de indivíduos saudáveis. Não só, isso a tendência de decréscimo do genótipo heterozigoto nas amostras tumorais, principalmente do SNP rs713041 do gene *GPX4*, permitiu o questionamento da ocorrência outros eventos genômicos, como a perda heterozigosidade (LOH). Por sua vez, esses eventos poderiam ser capazes de originar diferenças entre o DNA de células tumorais e não tumorais (DNA germinativo). Desse modo, justamente essas diferenças poderiam ser capazes de gerar características únicas às células malignas que poderiam produzir efeitos nos processos e vias de sinalização celulares. Logo, suas consequências poderiam criar um ambiente mais propício à progressão do tumor, mas também poderiam estabelecer vulnerabilidades nas células as quais poderiam ser exploradas como alvos terapêuticos em potencial (25,66).

5.CONCLUSÕES

-O padrão de expressão gênica de enzimas antioxidantes, incluindo selenoproteínas, difere entre tecido tumoral e peritumoral de pacientes com carcinoma hepatocelular, assim como, de tecidos hepáticos de indivíduos saudáveis. Isso evidencia que o microambiente tumoral tem influência nos tecidos adjacentes, assim como, o padrão de expressão desses genes parece ser ajustado de acordo com o estado da célula.

-A redução da expressão dos genes das enzimas antioxidantes estudadas, no tumor, foi associada com a menor sobrevida em 12 meses nos pacientes com carcinoma hepatocelular, assim como, foi positivamente correlacionado com os níveis de alfa-fetoproteína, um marcador tumoral para o CHC. Além disso, foram detectadas diversas correlações entre os níveis de expressão dos diferentes genes estudados, sendo apoiados por análises de rede proteínas e ontologia gênica. Isso sugere a importância dessas enzimas no contexto de progressão clínica do CHC e reforça a necessidade de mais estudos com o objetivo de melhor compreender a relação entre esses componentes antioxidantes.

-As frequências genotípicas de SNPs das selenoproteínas estudadas diferem entre amostras tumorais de pacientes com CHC e amostras não tumorais de indivíduos saudáveis. Além disso, a perda de heterozigosidade parece também influenciar no genótipo entre amostras tumorais e não tumorais do mesmo paciente com CHC.

-As taxas estimadas de perda de heterozigosidade variam de acordo com o SNP e parecem ser uma possível explicação para as diferenças entre células tumorais e não tumorais no CHC.

-A perda de heterozigosidade para o SNP rs713041 do gene *GPX4* foi associada com características clínico-patológicas como a etiologia (consumo de álcool) e o grau histológico (tumores pouco diferenciados), evidenciando que esse evento genômico possa influenciar na aquisição de características únicas pela célula maligna.

-O presente estudo trouxe dados inéditos tanto em relação a alterações na expressão gênica quanto a alterações genéticas dos genes de selenoproteínas em pacientes com carcinoma hepatocelular. Ambos os processos parecem ter papel importante no desenvolvimento e progressão do carcinoma hepatocelular.

6.REFERÊNCIAS

1. Forner A, Reig M, Bruix J. Hepatocellular carcinoma. *Lancet*. 2018;391(10127):1301–14.
2. Klungboonkrong V, Das D, McLennan G. Molecular Mechanisms and Targets of Therapy for Hepatocellular Carcinoma. *J Vasc Interv Radiol*. 2017;28(7):949–55.
3. Labunskyy VM, Hatfield DL, Gladyshev VN. Selenoproteins: molecular pathways and physiological roles. *Physiol Rev* [Internet]. 2014;94(3):739–77. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24987004>
4. Frager SZ, Schwartz JM. Hepatocellular carcinoma: Epidemiology, screening, and assessment of hepatic reserve. *Curr Oncol*. 2020;27(S3):138–43.
5. Ozakyol A. Global epidemiology of hepatocellular carcinoma (HCC Epidemiology). *J Gastrointest Cancer* [Internet]. 2017;19. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28626852>
6. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin*. 2021;71(3):209–49.
7. Paranaguá-Vezozzo DC, Ono SK, Alvarado-Mora M V., Farias AQ, Cunha-Silva M, França JID, et al. Epidemiology of HCC in Brazil: Incidence and risk factors in a ten-year cohort. *Ann Hepatol*. 2014;13(4):386–93.
8. Appel-Da-Silva MC, Da Silva Miozzo SA, De Azevedo Dossin I, Valle Tovo C, Branco F, De Mattos AA. Incidence of hepatocellular carcinoma in outpatients with cirrhosis in Brazil: A 10-year retrospective cohort study. *World J Gastroenterol*. 2016;22(46):10219–25.
9. Tang A, Hallouch O, Chernyak V, Kamaya A, Sirlin CB. Epidemiology of hepatocellular carcinoma: target population for surveillance and diagnosis. *Abdom Radiol*. 2017;1–13.
10. INCA IN do C. Atlas de Mortalidade por Câncer [Internet]. 2020. Available from: <https://www.inca.gov.br/aplicativos/atlas-de-mortalidade-por-cancer>

11. Kikuchi L, Chagas AL, Alencar RSSM, Paranaguá-Vezozzo DC, Carrilho FJ. Clinical and epidemiological aspects of hepatocellular carcinoma in Brazil. *Antivir Ther.* 2013;18(3 PARTB):445–9.
12. Debes JD, Chan AJ, Balderramo D, Kikuchi L, Gonzalez Ballerga E, Prieto JE, et al. Hepatocellular carcinoma in South America: Evaluation of risk factors, demographics and therapy. *Liver Int.* 2018;38(1):136–43.
13. Pimenta JR, Massabki PS. Carcinoma hepatocelular : um panorama clínico. *Rev Bras Clin Med.* 2010;8:59–67.
14. Kew MC. The role of cirrhosis in the etiology of hepatocellular carcinoma. *J Gastrointest Cancer.* 2014;45(1):12–21.
15. Morgan TR, Mandayam S, Jamal MM. Alcohol and hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology.* 2004;127(5 SUPPL.):87–96.
16. Chedid MF, Krueel CRP, Pinto MA, Grezzana-Filho TJM, Leipnitz I, Krueel CDP, et al. Carcinoma hepatocelular: diagnóstico e manejo cirúrgico. *ABCD Arq Bras Cir Dig (São Paulo)* [Internet]. 2017;30(4):272–8. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-67202017000400272&lng=en&tlng=en
17. Gomes MA, Priolli DG, Tralhão JG, Botelho MF. Carcinoma hepatocelular: epidemiologia, biologia, diagnóstico e terapias. *Rev Assoc Med Bras.* 2013;59(5):514–24.
18. Alqahtani A, Khan Z, Alloghbi A, Ahmed TSS, Ashraf M, Hammouda DM. Hepatocellular carcinoma: Molecular mechanisms and targeted therapies. *Med.* 2019;55(9):1–22.
19. Craig AJ, von Felden J, Garcia-Lezana T, Sarcognato S, Villanueva A. Tumour evolution in hepatocellular carcinoma. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* [Internet]. 2020;17(3):139–52. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41575-019-0229-4>
20. Farazi PA, DePinho RA. Hepatocellular carcinoma pathogenesis: From genes to environment. *Nat Rev Cancer.* 2006;6(9):674–87.
21. Liu M, Jiang L, Guan XY. The genetic and epigenetic alterations in human hepatocellular carcinoma: A recent update. *Protein Cell.* 2014;5(9):673–91.

22. Zhao Z, Huang J. Recent updates of genetic and genomic alterations in hepatocellular carcinoma. *Hepatoma Res.* 2015;0(0):0.
23. Niu ZS, Niu XJ, Wang WH. Genetic alterations in hepatocellular carcinoma: An update. *World J Gastroenterol.* 2016;22(41):9069–95.
24. Zucman-Rossi J, Villanueva A, Nault JC, Llovet JM. Genetic Landscape and Biomarkers of Hepatocellular Carcinoma. *Gastroenterology* [Internet]. 2015;149(5):1226-1239.e4. Available from: <http://dx.doi.org/10.1053/j.gastro.2015.05.061>
25. Zhang X, Sjöblom T. Targeting loss of heterozygosity: A novel paradigm for cancer therapy. *Pharmaceuticals.* 2021;14(1):1–17.
26. Kasai F, Hirayama N, Ozawa M, Satoh M, Kohara A. HuH-7 reference genome profile: complex karyotype composed of massive loss of heterozygosity. *Hum Cell* [Internet]. 2018;31(3):261–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s13577-018-0212-3>
27. Gupta RK, Patel AK, Shah N, Chaudhary AK, Jha UK, Yadav UC, et al. Oxidative stress and antioxidants in disease and cancer: a review. *Asian Pac J Cancer Prev* [Internet]. 2014;15(11):4405–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24969860>
28. Sajadimajd S, Khazaei M. Oxidative Stress and Cancer: The Role of Nrf2. *Curr Cancer Drug Targets.* 2017;18(6):538–57.
29. Moloney JN, Cotter TG. ROS signalling in the biology of cancer. *Semin Cell Dev Biol* [Internet]. 2018;80:50–64. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.semcdb.2017.05.023>
30. Reuter S, Gupta SC, Chaturvedi MM, Aggarwal BB. Oxidative stress, inflammation, and cancer: How are they linked? *Free Radic Biol Med* [Internet]. 2010 Dec;49(11):1603–16. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3624763/pdf/nihms412728.pdf>
31. Wang Z, Li Z, Ye Y, Xie L, Li W. Oxidative stress and liver cancer: Etiology and therapeutic targets. *Oxid Med Cell Longev.* 2016;2016.
32. Zoidis E, Seremelis I, Kontopoulos N, Danezis GP. Selenium-dependent

- antioxidant enzymes: Actions and properties of selenoproteins. *Antioxidants*. 2018;7(5):1–26.
33. Wrobel JK, Power R, Toborek M. Biological activity of selenium: Revisited. *IUBMB Life*. 2016;68(2):97–105.
 34. Brigelius-flohé R, Maiorino M. Biochimica et Biophysica Acta Glutathione peroxidases ☆. *BBA - Gen Subj [Internet]*. 2013;1830(5):3289–303. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbagen.2012.11.020>
 35. Short SP, Williams CS. Selenoproteins in Tumorigenesis and Cancer Progression. *Adv Cancer Res*. 2017;136:49–83.
 36. Zhuo P, Diamond AM. Molecular mechanisms by which selenoproteins affect cancer risk and progression. *Biochim Biophys Acta - Gen Subj [Internet]*. 2009 Nov;1790(11):1546–54. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304416509000579>
 37. Turanov AA, Everley RA, Hybsier S, Renko K, Schomburg L, Gygi SP, et al. Regulation of selenocysteine content of human selenoprotein p by dietary selenium and insertion of cysteine in place of selenocysteine. *PLoS One*. 2015;10(10).
 38. Yagublu V, Arthur JR, Babayeva SN, Nicol F, Post S, Keese M. Expression of selenium-containing proteins in human colon carcinoma tissue. *Anticancer Res*. 2011;31(9):2693–8.
 39. Hughes DJ, Kunická T, Schomburg L, Liška V, Swan N, Souček P. Expression of selenoprotein genes and association with selenium status in colorectal adenoma and colorectal cancer. *Nutrients*. 2018;10(11).
 40. Wieczorek E, Jablonowski Z, Tomasik B, Gromadzinska J, Jablonska E, Konecki T, et al. Different Gene Expression and Activity Pattern of Antioxidant Enzymes in Bladder Cancer. *Anticancer Res*. 2017;37(2):841–8.
 41. Cheng Y, Xu T, Li S, Ruan H. GPX1, a biomarker for the diagnosis and prognosis of kidney cancer, promotes the progression of kidney cancer. *Aging (Albany NY)*. 2019;11(24):12165–76.
 42. Zhang Q, Xu H, You Y, Zhang J, Chen R. High Gpx1 expression predicts poor

- survival in laryngeal squamous cell carcinoma. *Auris Nasus Larynx* [Internet]. 2018;45(1):170–4. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.anl.2017.05.012>
43. Lan X, Xing J, Gao H, Li S, Quan L, Jiang Y, et al. Decreased Expression of Selenoproteins as a Poor Prognosticator of Gastric Cancer in Humans. *Biol Trace Elem Res* [Internet]. 2017;178(1):22–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s12011-016-0908-8>
 44. Król MB, Galicki M, Grešner P, Wieczorek E, Jablonska E, Reszka E, et al. The ESR1 and GPX1 gene expression level in human malignant and non-malignant breast tissues. *Acta Biochim Pol*. 2018;65(1):51–7.
 45. Zhao H, Tang J, Xu J, Cao L, Jia G, Long D, et al. Selenoprotein Genes Exhibit Differential Expression Patterns Between Hepatoma HepG2 and Normal Hepatocytes LO2 Cell Lines. *Biol Trace Elem Res*. 2015;167(2):236–41.
 46. Rusolo F, Capone F, Pasquale R, Angiolillo A, Colonna G, Castello G, et al. Comparison of the seleno-transcriptome expression between human non-cancerous mammary epithelial cells and two human breast cancer cell lines. *Oncol Lett*. 2017;13(4):2411–7.
 47. Rudenko E, Kondratov O, Gerashchenko G, Lapska Y, Kravchenko S, Koliada O, et al. Aberrant expression of selenium-containing glutathione peroxidases in clear cell renal cell carcinomas. *Exp Oncol*. 2015;37(2):105–10.
 48. Guariniello S, Di Bernardo G, Colonna G, Cammarota M, Castello G, Costantini S. Evaluation of the selenotranscriptome expression in two hepatocellular carcinoma cell lines. *Anal Cell Pathol (Amst)* [Internet]. 2015;2015:419561. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26199857>
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC4493270>
 49. Guerriero E, Capone F, Accardo M, Sorice A, Costantini M, Colonna G, et al. GPX4 and GPX7 over-expression in human hepatocellular carcinoma tissues. *Eur J Histochem*. 2015;59(4):5–10.
 50. Gresner P, Gromadzinska J, Jablonska E, Kaczmarek J, Wasowicz W. Expression of selenoprotein-coding genes SEPP1, SEP15 and hGPX1 in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer*. 2009;65(1):34–40.

51. Strachan T, Read A. Human Molecular Genetics. 5th ed. Garland Science; 2018. 784 p.
52. Smigielski EM, Sirotkin K, Ward M, Sherry ST. dbSNP: A database of single nucleotide polymorphisms. Vol. 28, Nucleic Acids Research. 2000. p. 352–5.
53. Chen J, Cao Q, Qin C, Shao P, Wu Y, Wang M, et al. GPx-1 polymorphism (rs1050450) contributes to tumor susceptibility: Evidence from meta-analysis. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2011;137(10):1553–61.
54. Wang C, Zhang R, Chen N, Yang L, Wang Y, Sun Y, et al. Association between glutathione peroxidase-1 (GPX1) Rs1050450 polymorphisms and cancer risk. *Int J Clin Exp Pathol*. 2017;10(9):9527–40.
55. Geybels MS, Hutter CM, Kwon EM, Ostrander EA, Fu R, Feng Z, et al. Variation in selenoenzyme genes and prostate cancer risk and survival. *Prostate* [Internet]. 2013 May;73(7):734–42. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/pros.22617>
56. Bermanno G, Pagmantidis V, Holloway N, Kadri S, Mowat NAG, Shiel RS, et al. Evidence that a polymorphism within the 3'UTR of glutathione peroxidase 4 is functional and is associated with susceptibility to colorectal cancer. *Genes Nutr*. 2007;2(2):225–32.
57. Gautrey H, Nicol F, Sneddon AA, Hall J, Hesketh J. A T/C polymorphism in the GPX4 3'UTR affects the selenoprotein expression pattern and cell viability in transfected Caco-2 cells. *Biochim Biophys Acta - Gen Subj*. 2011;1810(6):284–91.
58. Méplan C, Hughes DJ, Pardini B, Naccarati A, Soucek P, Vodickova L, et al. Genetic variants in selenoprotein genes increase risk of colorectal cancer. *Carcinogenesis*. 2010;31(6):1074–9.
59. Karunasinghe N, Han DY, Goudie M, Zhu S, Bishop K, Wang A, et al. Prostate disease risk factors among a New Zealand cohort. *J Nutrigenet Nutrigenomics*. 2013;5(6):339–51.
60. Sutherland A, Kim DH, Relton C, Ahn YO, Hesketh J. Polymorphisms in the selenoprotein S and 15-kDa selenoprotein genes are associated with altered susceptibility to colorectal cancer. *Genes Nutr*. 2010;5(3):215–23.

61. Steinbrecher A, Méplan C, Hesketh J, Schomburg L, Endermann T, Jansen E, et al. Effects of selenium status and polymorphisms in selenoprotein genes on prostate cancer risk in a prospective study of European men. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2010;19(11):2958–68.
62. Méplan C, Dragsted LO, Ravn-Haren G, Tjønneland A, Vogel U, Hesketh J. Association between Polymorphisms in Glutathione Peroxidase and Selenoprotein P Genes, Glutathione Peroxidase Activity, HRT Use and Breast Cancer Risk. *PLoS One.* 2013;8(9).
63. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell* [Internet]. 2011;144(5):646–74. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
64. Novikova M V., Khromova N V., Kopnin PB. Components of the hepatocellular carcinoma microenvironment and their role in tumor progression. *Biochem.* 2017;82(8):861–73.
65. Bansal A, Celeste Simon M. Glutathione metabolism in cancer progression and treatment resistance. *J Cell Biol.* 2018;217(7):2291–8.
66. Berger AH, Pandolfi PP. Haplo-insufficiency: A driving force in cancer. *J Pathol.* 2011;223(2):138–47.

ANEXOS

ANEXO A – Parecer consubstanciado do CEP 1

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
CIÊNCIAS DA SAÚDE DE
PORTO ALEGRE



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE SELENOPROTEÍNAS EM PACIENTES COM CARCINOMA HEPATOCELULAR

Pesquisador: Silvana de Almeida

Área Temática: Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP.);

Versão: 2

CAAE: 75355317.0.0000.5345

Instituição Proponente: Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.400.119

Apresentação do Projeto:

Trata-se de uma continuação de um estudo realizado em 2013-2015 com as amostras biológicas coletadas nessa data. As amostras estão sob guarda do Laboratório Molecular da UFCSPA. As amostras estudadas são as que foram autorizadas para armazenamento e utilização para outras pesquisas.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Avaliar o perfil de expressão de selenoproteínas no tecido hepático tumoral e peritumoral de pacientes com diagnóstico de carcinoma hepatocelular.

Objetivo Secundário:

-Analisar a expressão de mRNA das selenoproteínas GPX1, GPX4, Sep15 e SelP em amostras de tumor e peritumor de pacientes com carcinomahepatocelular.

- Avaliar se parâmetros como idade, sexo e fatores etiológicos relacionados com a susceptibilidade ao CHC influenciam a expressão dos genes em tecido tumoral e peritumoral de pacientes com carcinoma hepatocelular.

Endereço: Rua Sarmiento Leite, 245

Bairro: Sarmiento

CEP: 90.050-170

UF: RS

Município: PORTO ALEGRE

Telefone: (51)3303-8804

E-mail: cep@ufcsa.edu.br

Continuação do Parecer: 2.400.119

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

O presente projeto apresenta riscos mínimos, pois as amostras já foram coletadas e o RNA já está disponível para análise.

Benefícios:

O presente projeto pode auxiliar na elucidação da influência do selênio e das selenoproteínas na suscetibilidade ao carcinoma hepatocelular.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O material biológico havia sido coletado em pesquisa anterior (2013). O TCLE previa a autorização para o armazenamento e autorização do material para outras pesquisas.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Não apresenta o TCLE porém justifica:

As amostras dos espécimes hepáticos dos 19 pacientes já foram coletadas e encontram-se no Laboratório de Biologia Molecular da UFCSPA. Os pacientes consentiram em participar de um projeto anterior intitulado: "O papel dos RNAs codificadores e não-codificadores no hepatocarcinoma", com aprovação do CEP da ISCMPA nº 690.585. Este projeto tinha como objetivo principal: "Investigar o papel da variabilidade nos genes dos receptores de estrógenos, assim como na sua expressão, no desenvolvimento de hepatocarcinomas." e o TCLE assinado pelos 19 pacientes previa a autorização para o armazenamento e a utilização do

material biológico em outras pesquisas, sem necessidade de novo consentimento.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Recomenda-se aprovar.

Considerações Finais a critério do CEP:

De acordo com o parecer do relator.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

| Tipo Documento | Arquivo | Postagem | Autor | Situação |
|--------------------------------|--|------------------------|--------------------|----------|
| Informações Básicas do Projeto | PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_981249.pdf | 26/10/2017 14:22:50 | | Aceito |
| Recurso Anexado | CartaEncaminhamento.pdf | 26/10/2017 | Silvana de Almeida | Aceito |

Endereço: Rua Sarmento Leite, 245
Bairro: Sarmento CEP: 90.050-170
UF: RS Município: PORTO ALEGRE
Telefone: (51)3303-8804 E-mail: cep@ufcspa.edu.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
CIÊNCIAS DA SAÚDE DE
PORTO ALEGRE



Continuação de Parecer: 2.400.119

| | | | | |
|---|---|------------------------|--------------------|--------|
| pele Pesquisador | CartaEncaminhamento.pdf | 14:21:51 | Silvana de Almeida | Aceito |
| Orçamento | Orcamento.pdf | 26/10/2017 14:21:29 | Silvana de Almeida | Aceito |
| Cronograma | Cronograma.pdf | 26/10/2017 14:19:40 | Silvana de Almeida | Aceito |
| TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência | TCLE_HCC.pdf | 21/08/2017 16:53:35 | Silvana de Almeida | Aceito |
| Outros | PB_PARECER_CONSUBSTANCIADO_CEP_350534.pdf | 21/08/2017 16:53:19 | Silvana de Almeida | Aceito |
| Outros | TermoCompromissoEntregaRelatorios.PDF | 21/08/2017 16:52:29 | Silvana de Almeida | Aceito |
| Declaração de Instituição e Infraestrutura | AnuenciaChefiadoLaboratorio.pdf | 21/08/2017 16:51:35 | Silvana de Almeida | Aceito |
| Projeto Detalhado / Brochura Investigador | Projeto_expressao_Revisado.pdf | 21/08/2017 16:50:31 | Silvana de Almeida | Aceito |
| Folha de Rosto | FolhadeRostoAssinada.pdf | 21/08/2017 16:49:15 | Silvana de Almeida | Aceito |

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

PORTO ALEGRE, 27 de Novembro de 2017

Assinado por:

Julia Fernanda Semmelmann Pereira Lima
(Coordenador)

Endereço: Rua Sarmiento Leite ,245
Bairro: Sarmiento CEP: 90.050-170
UF: RS Município: PORTO ALEGRE
Telefone: (51)3303-8804 E-mail: cep@ufcspa.edu.br

ANEXO B – Termo de consentimento livre e esclarecido 1

Sujeito de pesquisa Nº: _____

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Pesquisa: “O papel dos RNAs codificadores e não-codificadores no hepatocarcinoma”.

Investigador Responsável: Huander Felipe Andreolla

Prezado(a) Sr.(a):

O câncer primário de fígado (hepatocarcinoma), como outros tipos de tumores, é uma doença que pode estar relacionada a diversos fatores. São causas relacionadas ao hepatocarcinoma as hepatites virais ou crônicas, a ingestão de bebidas alcoólicas, a cirrose hepática, a obesidade, o diabetes, entre outros.

Com a evolução das pesquisas científicas, ficou evidente que este tipo de câncer parece também estar relacionado com alterações dos receptores de estrógenos (receptores de hormônios sexuais que influenciam muitos processos no corpo humano, como por exemplo aqueles relacionados à reprodução, à integridade óssea, à saúde cardiovascular, aos comportamentos, entre outros). Esses receptores podem estar envolvidos na origem e progressão do hepatocarcinoma. Da mesma forma, os trabalhos mais recentes também apontam que pequenas moléculas chamadas micro-RNAs também parecem ter importância no que diz respeito ao risco do tumor recidivar ou de originar metástases, estando relacionados a um melhor ou pior prognóstico da doença.

A melhoria da assistência bem como o aumento da sobrevida de indivíduos diagnosticados com hepatocarcinoma apenas têm sido possível em razão do melhor entendimento da mesma e do uso de ferramentas para um diagnóstico cada vez mais precoce e de intervenções terapêuticas mais eficazes.

O(a) Sr(a) possui o diagnóstico de hepatocarcinoma e será submetido(a) a um procedimento cirúrgico curativo. Sendo assim, está sendo convidado(a) a participar de uma pesquisa intitulada: “O papel dos RNAs codificadores e não-codificadores no hepatocarcinoma”.

Esta pesquisa tem como objetivo avaliar marcadores relacionados aos receptores de estrógenos e aos RNAs presentes no tecido tumoral, no tecido que circunda o tumor e em amostras de pacientes sem diagnóstico de hepatocarcinoma, a fim de se conhecer melhor a biologia do câncer hepático e as suas características genéticas.

Para o desenvolvimento desta pesquisa será necessário obter uma parte do seu tumor e do tecido que circunda o mesmo, a fim de realizar os exames necessários para a caracterização laboratorial dos receptores de estrógeno e dos RNAs presentes. Além disso, serão coletadas informações de seu prontuário relacionadas ao seu estado de saúde.

A sua participação neste estudo é voluntária e não lhe acarreta qualquer tipo de risco ou mudança na forma de como o(a) Sr.(a) será assistido(a) em todos os procedimentos assistenciais na Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre. Vale ressaltar que o(a) Sr(a) poderá retirar sua

Sujeito de pesquisa Nº: _____

participação desta pesquisa a qualquer momento, comunicando ao investigador responsável, sem sofrer qualquer dano ou mudança na forma do seu acompanhamento em nossa Instituição. Além disso, a sua participação contribuirá para que possamos entender melhor a biologia do tumor de fígado, para tal, o(a) Sr(a) ainda poderá concordar em disponibilizar o seu material biológico (peça de tumor) para realização de exames adicionais futuros sem necessidade de re-consentimento conforme consta na Resolução Nº 196/96 versão 2012 e na Resolução CNS Nº 441. A não-aceitação em ceder seu material para pesquisas futuras não compromete a sua participação neste estudo.

O(a) Sr(a) não terá nenhum custo para participar desta pesquisa e em momento algum seu nome será revelado pois as informações utilizadas para a publicação dos resultados desta pesquisa não permitirão que o(a) Sr(a) seja identificado. Apenas terão acesso aos seus dados a equipe envolvida neste estudo e as autoridades regulatórias da área da saúde.

Em caso de dúvidas ou esclarecimentos poderão ser contatados o pesquisador responsável através do telefone (51) 9966 7118 ou, ainda, o Comitê de Ética em Pesquisa da Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre – sob coordenação do Dr. Cláudio Telöken – através do telefone (51) 3214 8571.

Ao assinar abaixo, o(a) Sr(a) confirma que leu as afirmações contidas neste termo de consentimento, que foram explicados os procedimentos do estudo, que teve oportunidade de fazer perguntas, que está satisfeito(a) com as explicações fornecidas e que decidiu participar voluntariamente deste estudo. Uma via deste documento será entregue ao Sr(a) e outra via idêntica deste documento será arquivada pelo pesquisador responsável.

Com relação ao armazenamento e utilização do seu material biológico para estudos futuros, marcar com um "X" a uma das alternativas abaixo:

() **Autorizo** o armazenamento e a utilização do meu material biológico em outras pesquisas, sem necessidade de novo consentimento.

() **Não autorizo** o armazenamento e a utilização do meu material biológico em outras pesquisas.

Nome do sujeito de pesquisa (letra de forma)
Data: ____ / ____ / 201 ____.

Assinatura do sujeito de pesquisa

Nome do representante legal (letra de forma)
Data: ____ / ____ / 201 ____.

Assinatura do representante legal

Nome do pesquisador (letra de forma)
Data: ____ / ____ / 201 ____.

Assinatura e carimbo do pesquisador

ANEXO C – Parecer consubstanciado do CEP 2

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
CIÊNCIAS DA SAÚDE DE
PORTO ALEGRE



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DA VARIABILIDADE GENÉTICA DE SELENOPROTEÍNAS NA SUSCEPTIBILIDADE AO CARCINOMA HEPATOCELULAR

Pesquisador: Silvana de Almeida

Área Temática: Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP;);

Versão: 1

CAAE: 75361317.4.0000.5345

Instituição Proponente: Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.315.844

Apresentação do Projeto:

O projeto tem por objetivo avaliar a influência da variabilidade genética das selenoproteínas no risco de desenvolvimento de carcinoma hepatocelular. O estudo é uma ampliação de um projeto anterior, e a coleta e o preparo do material hepático já foi feita e armazenada em tubos identificados apenas por números.

Objetivo da Pesquisa:

A pesquisa tem por finalidade avaliar a influência da variabilidade genética das selenoproteínas no risco de desenvolvimento de carcinoma hepatocelular. O estudo se baseará em amostras de material hepático já coletadas e preparadas em estudo anterior e cedidas para este, cujo objetivo era investigar o papel da variabilidade nos genes dos receptores de estrógenos com CHC.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Embora sempre existam riscos em pesquisas envolvendo seres humanos, no TCLE está escrito que "Não há nenhum desconforto ou riscos decorrentes da participação nesta pesquisa." Contudo, trata-se de uma ampliação de pesquisa já realizada e, portanto, aprovada anteriormente pelo CEP, não havendo motivos para objeções quanto a esse quesito.

Quanto aos benefícios, o TCLE traz que a possibilidade de predizer os doentes com maior risco de

Endereço: Rua Sarmiento Leite, 245

Bairro: Sarmiento

CEP: 90.050-170

UF: RS

Município: PORTO ALEGRE

Telefone: (51)3303-8804

E-mail: cep@ufcspa.edu.br

Continuação do Parecer: 2.815.844

recidiva e com pior prognóstico ajudará a orientar o tratamento cirúrgico e quimioterápico de acordo com o risco individual. O participante teria garantias de garantia de resposta a qualquer pergunta; liberdade de abandonar a pesquisa a qualquer momento e garantia de privacidade.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

As amostras foram obtidas através de procedimentos como biópsia, ressecção cirúrgica e transplante hepático e são derivadas de projeto aprovado pelo CEP da UFCSPA. O TCLE foi aplicado aos pacientes. Os dados serão derivados de coleta anterior, e são cedidos por um dos membros da pesquisa. Fica subentendido, ainda que de forma não tão clara e objetiva, que as amostras poderiam ser reutilizadas a partir da seguinte frase: "Caso aceite, sua participação no estudo consistirá em permitir que após a coleta da peça cirúrgica pelo médico responsável, um fragmento da mesma seja encaminhado para ser devidamente armazenado para estudo molecular."

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

O TCLE, apesar de conter inadequações (como a linguagem de difícil compreensão pelo paciente; não descrição de riscos; e não ser dito que o paciente receberia uma VIA do documento), é parte de um projeto anterior, já aprovado pelo CEP.

O TERMO DE ANUÊNCIA foi apresentado.

Termo de compromisso foi submetido e assinado.

Recomendações:

Recomenda-se refazer o cálculo do orçamento.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não há pendências.

Considerações Finais a critério do CEP:

De acordo com o parecer do Relator.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

| Tipo Documento | Arquivo | Postagem | Autor | Situação |
|---------------------------------|--|------------------------|--------------------|----------|
| Informações Básicas do Projeto | PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_981300.pdf | 21/08/2017 17:21:25 | | Aceito |
| Outros | CompromissoEntregaRelatoriosAssinado.PDF | 21/08/2017 17:20:57 | Silvana de Almeida | Aceito |
| TCLE / Termos de Assentimento / | TCLEProjetoAprovado.pdf | 21/08/2017 17:20:15 | Silvana de Almeida | Aceito |

Endereço: Rua Sarmento Leite, 245
Bairro: Sarmento CEP: 90.050-170
UF: RS Município: PORTO ALEGRE
Telefone: (51)3303-8804 E-mail: cep@ufcsa.edu.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
CIÊNCIAS DA SAÚDE DE
PORTO ALEGRE



Continuação do Parecer: 2.815.844

| | | | | |
|--|---|------------------------|--------------------|--------|
| Justificativa de Ausência | TCLEProjetoAprovado.pdf | 21/08/2017 17:20:15 | Silvana de Almeida | Aceito |
| Outros | ParecerConsubstanciadodeProjetodePesquisa.pdf | 21/08/2017 17:18:55 | Silvana de Almeida | Aceito |
| Declaração de Instituição e Infraestrutura | AnuenciaChefiadoLaboratorio.PDF | 21/08/2017 17:17:49 | Silvana de Almeida | Aceito |
| Projeto Detalhado / Brochura Investigador | Projeto_polimorfismos_revisado.pdf | 21/08/2017 17:17:31 | Silvana de Almeida | Aceito |
| Folha de Rosto | FolhadeRostoAssinada.pdf | 21/08/2017 17:17:14 | Silvana de Almeida | Aceito |

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

PORTO ALEGRE, 05 de Outubro de 2017

Assinado por:

Julia Fernanda Semmelmann Pereira Lima
(Coordenador)

Endereço: Rua Sarmento Leite ,245
Bairro: Sarmento CEP: 90.050-170
UF: RS Município: PORTO ALEGRE
Telefone: (51)3303-8804 E-mail: cep@ufcsa.edu.br

ANEXO D – Termo de consentimento livre e esclarecido 2

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para Pacientes que irão se submeter à Cirurgia para a retirada da peça cirúrgica.

Título da pesquisa: Avaliação de polimorfismos e isoformas dos genes ESR1 e ESR2 em pacientes com carcinoma hepatocelular.

I. Justificativa e objetivos da pesquisa:

Tendo em vista a elevada prevalência dos tumores de fígado e o impacto que promove na sobrevida dos pacientes, torna-se fundamental que se consiga um maior entendimento do comportamento biológico dos mesmos. Assim fazendo, poderemos modificar a história natural da doença trazendo benefícios imensuráveis aos pacientes.

Dessa forma, se a avaliação dos marcadores dos genes ESR1 e ESR2 e das isoformas resultarem em dados relevantes, entende-se permitir uma melhor seleção dos pacientes com CHC a serem submetidos a procedimentos que apresentam uma morbi-mortalidade não desprezível. Atualmente a seleção dos pacientes para a realização cirúrgica de ressecção ou transplante é um desafio à comunidade hepatológica.

Este estudo é de extrema importância, pois as alterações na expressão dos genes ESR1 e ESR2 e nas isoformas têm sido descritos em tumores hepáticos. Assim, a pesquisa de marcadores que atuem como novos fatores prognósticos antes das intervenções citadas tomam-se, de fundamental importância uma vez que contribuirá para a melhor seleção dos candidatos aos tratamentos curativos com níveis de sobrevida livre de doença tumoral superiores aos de hoje apreciados. Esta pesquisa torna-se relevante, pois permite determinar fatores de prognóstico baseados em evidências moleculares.

O objetivo deste trabalho é investigar o papel da variabilidade nos genes dos receptores de estrógenos com CHC.

II. Os procedimentos a serem utilizados:

Caso aceite, sua participação no estudo consistirá em permitir que após a coleta da peça cirúrgica pelo médico responsável, um fragmento da mesma seja encaminhado para ser devidamente armazenado para estudo molecular. O restante da peça cirúrgica será destinado ao exame histopatológico normal. Portanto, não haverá modificação da técnica cirúrgica. O material será coletado após o término da cirurgia.

III. Os desconfortos ou riscos esperados:

Não há nenhum desconforto ou riscos decorrentes da participação nesta pesquisa.

IV. Os benefícios que se pode obter:

A possibilidade de prever os doentes com maior risco de recidiva e com pior prognóstico ajudará a orientar o tratamento cirúrgico e quimioterápico de acordo com o risco individual. Uma combinação de marcadores moleculares com características específicas podem permitir uma previsão mais precisa das pessoas com alto risco de progressão da doença e uma direção mais adequada para o tratamento.

V. Garantia de resposta a qualquer pergunta:

O participante da pesquisa poderá, a qualquer momento, solicitar às informações sobre os procedimentos relacionados à pesquisa, inclusive para tirar quaisquer dúvidas que tenham permanecido.

VI. Liberdade de abandonar a pesquisa sem prejuízo para si:

A qualquer momento você poderá retirar seu consentimento e deixar de participar do estudo, sem que isto traga prejuízo.

VII. Garantia de privacidade:

As informações desse estudo são sigilosas e o participante não será identificado.

VIII. Consentimento Pós-Esclarecido:

Ressaltamos que a concordância em participar não implica necessariamente em qualquer modificação na vida do(a) senhor(a), nem tampouco os resultados dessa pesquisa terão efeito sobre o(a) senhor(a). Da mesma forma, a não concordância em participar deste estudo não irá alterar de nenhuma maneira os procedimentos já estabelecidos.

Eu,..... (paciente ou responsável) fui informado dos objetivos da pesquisa acima de maneira clara e detalhada e esclareci minhas dúvidas. Sei que em qualquer momento poderei solicitar novas informações e modificar minha decisão se assim eu o desejar. O Dr. Paulo Roberto Ott Fontes certificou-me de que todos os dados desta pesquisa serão confidenciais e terei liberdade de retirar meu consentimento de participação na pesquisa, face a estas informações.

Caso tiverem novas perguntas sobre este estudo, posso chamar Dr. Paulo Roberto Ott Fontes no telefone (051) 32148040 ou a pesquisadora responsável Márcia Giovenardi no telefone (51) 33038751. Para qualquer pergunta sobre os meus direitos como participante deste estudo ou se penso que fui prejudicado pela minha participação, posso chamar o Comitê de Ética em Pesquisa da UFCSPA, pelo telefone (051) 32039000 e o Comitê de Ética em Pesquisa da Irmandade Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre (CEP/ISCMPA), pelo telefone (051) 32148571.

Declaro que recebi cópia do presente Termo de Consentimento.

Assinatura do Paciente

Nome do Paciente

__/__/__

Dr. Paulo Roberto Ott Fontes

__/__/__

Márcia Giovenardi

CURRÍCULO LATTES



Impressão
curtindo



Andressa de Freitas Alves

Endereço para acessar esta CV: <https://lattes.cnpq.br/5564423437261811>

Última atualização do currículo em 04/05/2021

Resumo informado pelo autor

Profissional biomédica com habilitação em Análises Clínicas e Biologia Molecular/UFCSPA, Mestre em Ciências da Saúde - Biologia celular e molecular/UFCSPA. Trabalhou em pesquisa na área de receptores de estrogênio, inflamação, estresse oxidativo e selenoproteínas, e carcinoma hepatocelular. Possui vivência laboratorial dentro de suas habilitações e atuou como professora EAD e Presencial para cursos da área da saúde. Atualmente é doutoranda em Biociências pela UFCSPA na área de Genética Humana e Pós-graduanda em Biomedicina Estética pela ISEEC.

(Texto informado pelo autor)

Nome civil

Nome: Andressa de Freitas Alves

Dados pessoais

Filiação: Gilmar Severo Alves e Seltonara de Freitas Alves
Nascimento: 25/03/1991 - Porto Alegre/RS - Brasil
Carteira de Identidade: 3086192346 SSP-IGP - RS - 10/08/2007
CPF: 017.061.030-68

Formação acadêmica/titulação

- 2017** Doutorado em BIOCÊNCIAS.
Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, UFCSPA, Porto Alegre, Brasil
Orientador: Silvana de Almeida
Co-orientador: Mircia Góvernerá, Merli Fliegenbaum
Bolsista do(x): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
- 2015 - 2017** Mestrado em Ciências da Saúde.
Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, UFCSPA, Porto Alegre, Brasil
Título: Avaliação de marcadores inflamatórios e do receptor de estrogênio em pacientes com carcinoma hepatocelular. Ano de obtenção: 2017
Orientador: Mircia Góvernerá
Bolsista do(x): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
- 2020** Especialização em Biomedicina Estética.
Instituto de Saúde Esportiva, Estética e Clínica, ISEEC, Brasil
- 2010 - 2014** Graduação em Biomedicina.
Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, UFCSPA, Porto Alegre, Brasil
com período acadêmico em Universidade de Coimbra (Orientador: António José Ribeiro)
Título: AVALIAÇÃO DOS POLIMORFISMOS rs2234850 E rs1543821 DO GENE ESR1 EM PACIENTES COM CARCINOMA HEPATOCELULAR
Orientador: Mircia Góvernerá
Bolsista do(x): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

Formação complementar

- 2021 - 2021** Curso de curta duração em Curso teórico e prático de Mesoterapia e Skinbooster. (Carga horária: 12h).
Clínica Sagitta, SAGITTA, Brasil
- 2020 - 2020** Curso de curta duração em RNA-Seq with Bioconductor in R. (Carga horária: 4h).
DataCamp, DATACAMP, Estados Unidos
- 2020 - 2020** Curso de curta duração em Mini-curso How to write a review paper. (Carga horária: 2h).
Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, UFCSPA, Porto Alegre, Brasil
- 2020 - 2020** Curso de curta duração em Mini-curso R para não programadores. (Carga horária: 2h).
Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, UFCSPA, Porto Alegre, Brasil
- 2020 - 2020** Curso de curta duração em Mini-curso Transforme suas pesquisas com Illumina NGS. (Carga horária: 3h).
Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, UFCSPA, Porto Alegre, Brasil
- 2019 - 2019** Curso de curta duração em Curso Teórico-Prático de Western Blot. (Carga horária: 8h).
Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, UFCSPA, Porto Alegre, Brasil
- 2019 - 2019** Curso de curta duração em Introdução à Bioinformática. (Carga horária: 3h).
Universidade Luterana do Brasil, ULBRA, Canoas, Brasil
- 2019 - 2019** Curso de curta duração em CUIDADOS, MANEJO E EXPERIMENTAÇÃO DE MURINOS E ZEBRAFISH (Técnicos). (Carga horária: 18h).
Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, PUCRS, Porto Alegre, Brasil
- 2019 - 2019** Curso de curta duração em CUIDADOS, MANEJO E EXPERIMENTAÇÃO DE MURINOS E ZEBRAFISH (Prático em zebra). (Carga horária: 3h).
Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, PUCRS, Porto Alegre, Brasil
- 2019 - 2019** Estágio universitário em UFCSPA Aozinhas. (Carga horária: 8h).
Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, UFCSPA, Porto Alegre, Brasil
- 2018 - 2018** Curso de curta duração em Mini curso de Sequenciamento de Nova Geração (NGS). (Carga horária: 3h).

- Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, UFCSPA, Porto Alegre, Brasil
- 2017 - 2017** Curso de curta duração em Quantificação de Imagens. (Carga horária: 3h).
Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, UFCSPA, Porto Alegre, Brasil
- 2016 - 2016** Curso de curta duração em Coleta de Materiais Biológicos. (Carga horária: 4h).
Associação Sul Brasileira de Biomedicina, ASSBM, Brasil
- 2016 - 2016** Curso de curta duração em Interpretação de Exames Laboratoriais. (Carga horária: 10h).
Instituto Biomédico de Aprimoramento Profissional, IBAP, Jacaré, Brasil
- 2015 - 2015** Curso de curta duração em Diagnóstico de Neoplasias Hematológicas. (Carga horária: 7h).
Universidade Feevale, FEEVALL, Novo Hamburgo, Brasil
- 2011 - 2011** Oficina de Primeiros Socorros. (Carga horária: 3h).
Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, UFCSPA, Porto Alegre, Brasil
- 2011 - 2011** Curso de curta duração em Curso de Urinalítes. (Carga horária: 8h).
Sociedade Brasileira de Análises Clínicas-RS, SBAC-RS, Brasil
- 2011 - 2011** Curso de curta duração em IV Mini curso de Capacitação de Jovens Cientistas. (Carga horária: 3h).
Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, UFCSPA, Porto Alegre, Brasil
- 2011 - 2011** Curso de curta duração em Imagiologia básica para a área de saúde. (Carga horária: 8h).
Universidade Feevale, FEEVALL, Novo Hamburgo, Brasil
- 2010 - 2010** Curso de curta duração em II Ciclo de Atividades sobre Saúde e Meio Ambiente. (Carga horária: 3h).
Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, UFCSPA, Porto Alegre, Brasil
- 2010 - 2010** Estágio universitário em Feira de Saúde - Biomedicina - UFCSPA. (Carga horária: 8h).
Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, UFCSPA, Porto Alegre, Brasil
- 2010 - 2010** Curso de curta duração em Perícia Criminal. (Carga horária: 20h).
Semavit Cursos, SAMAVIT, Brasil

Atuação profissional

1. Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre - UFCSPA

Vínculo Institucional

- 2017 - Atual** Vínculo: Bolsista , Enquadramento funcional: Bolsista de Doutorado - CNPQ, Regime: Parcial
Outras informações:
Bolsista de doutorado em Biodinâmica em projeto intitulado "Avaliação da influência das selenoproteínas na susceptibilidade ao carcinoma hepatocelular". Participação ativa nas reuniões e seminários do grupo de pesquisa; Desenvolvimento de atividades laboratoriais como extração, quantificação e PCR Real time de DNA assim como técnicas envolvendo RNA; Minicurrículo de aulas de Biologia Molecular para o curso de Biomedicina; Co-orientação de graduandos de Biomedicina para trabalho de conclusão de curso.
- 2015 - 2017** Vínculo: Bolsista , Enquadramento funcional: Bolsista de Mestrado -CNPQ, Regime: Dedicção exclusiva
Outras informações:
Bolsista de Mestrado em Ciências da Saúde no projeto intitulado "Avaliação de marcadores inflamatórios e do receptor de estrogênio em pacientes com carcinoma hepatocelular". Atuação: Participação ativa em reuniões e seminários do grupo de pesquisa; Desenvolvimento de atividades laboratoriais de imunohistoquímica e quantificação de imagens microscópicas; Atuação em docência para cursos de Biomedicina, Farmacobiologia e Psicologia na disciplina de Fisiologia com aulas teóricas, laboró-práticas e práticas; Desenvolvimento de dissertação e artigo científico.
- 2014 - 2014** Vínculo: Bolsista , Enquadramento funcional: Bolsista Iniciação Científica ProbioFAPERGS , Carga horária: 20, Regime: Parcial
Outras informações:
em projeto intitulado "Determinação de polimorfismos dos genes ERS1 e ERS2 em pacientes com carcinoma hepatocelular". Participou de reuniões de pesquisa, congressos e análises laboratoriais em Biologia Molecular.
- 2014 - 2014** Vínculo: Bolsista , Enquadramento funcional: Bolsista Iniciação Científica Probio/CNPQ , Carga horária: 20, Regime: Parcial
Outras informações:
em projeto intitulado "Determinação de polimorfismos dos genes ERS1 e ERS2 em pacientes com carcinoma hepatocelular". Participou de reuniões de pesquisa, congressos e análises laboratoriais em Biologia Molecular.
- 2011 - 2011** Vínculo: Monitor , Enquadramento funcional: Monitor Voluntário , Carga horária: 10, Regime: Parcial
Outras informações:
Monitor voluntária de disciplina de Biofísica Celular do Curso de Biomedicina, auxiliando na produção e correção de pré-letas assim como ajudando nas aulas práticas de disciplina.
- 2011 - 2012** Vínculo: Iniciação Científica , Enquadramento funcional: Iniciação Científica Voluntária , Carga horária: 20, Regime: Parcial
Outras informações:
em projeto intitulado "Estudo do papel de Ocitocina no comportamento sexual e reprodutivo de camundongos". Participou de reuniões de pesquisa, congressos e experimentos comportamentais e laboratoriais.

2. Projeta Cursos Profissionalizantes - PROJETA

Vínculo Institucional

- 2018 - 2018** Vínculo: Professor prestação de serviço , Enquadramento funcional: Professor , Carga horária: 2, Regime: Parcial
Outras informações:
Professor sob prestação de serviço, atuação: desenvolvimento e ministração de aulas teóricas e práticas para o curso profissionalizante de auxiliar de laboratório e análises clínicas, compreendendo disciplinas de segurança do trabalho, biossegurança, anatomia e citologia básicas, hematologia, imunologia, microbiologia (bacteriologia, parasitologia e micologia), bioquímica, urinales e coleta de sangue venoso.

3. Me Salvo LTDA - Cursos e Consultorias - MS

Vínculo Institucional

- 2016 - 2018** Vínculo: Prestação de serviço , Enquadramento funcional: Professor Sênior EAD, Regime: Parcial
Outras informações:
Professora sob regime de prestação de serviço, atuação: Desenvolvimento de conteúdo didático para disciplinas de Biofísica, Parasitologia, Fisiologia e Citologia; Desenvolvimento e gravação de vídeo-aulas voltadas para os cursos de ensino superior da área de saúde; Elaboração de material didático para feição de conteúdo das disciplinas, como exercícios e apostilas; Participação ativa no curso e palestra profissional de empresa para aprimoramento das atividades educadas.

4. Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre - ISCMPA

Vínculo Institucional

2014 - 2014 Vínculo: Estágário, Enquadramento funcional: Estágio Curricular, Carga horária: 30, Regime: Parcial
Outras informações:
Estágio Curricular de 300h em Análises Clínicas no Laboratório Central de Análises Clínicas da ISCMPA. Acompanhar as atividades, preparo de amostras, execução de técnicas, seleção e interpretação de laudos e controle de qualidade de todos os setores do laboratório: Bioquímica, Bacteriologia, Parasitologia, Uroanálise, Imunologia, Hematologia e Coagulação.

5. Quatro G Pesquisa e Desenvolvimento - QUATRO G PSD

Vínculo Institucional

2014 - 2014 Vínculo: Estágário, Enquadramento funcional: Estágário, Carga horária: 30, Regime: Parcial
Outras informações:
Estágio curricular de 300h em Biologia Molecular no laboratório de empresa. Trabalhar em projetos de pesquisa de empresa na área de Biologia Molecular, acompanhando técnicas de Expressão de Proteínas Recombinantes, Eletroforese de Proteínas e DNA, Western Blotting, Purificação de Proteínas e ELISA.

6. Instituto de Saúde Esportiva, Estética e Clínica - ISEEC

Vínculo Institucional

2021 - 2021 Vínculo: Estágio, Enquadramento funcional: Estágário, Carga horária: 25, Regime: Parcial
Outras informações:
Estágio curricular com carga horária de 100h. Acompanhamento e atuação na Clínica ISEEC no atendimento e avaliação de pacientes além de execução de procedimentos como: Mastectomia (parotídeo, facial e capilar), carboniloxipia, ultrassom, Luz Intensa Pulsada, Peeling químico e físicos, Hidroterapia, aplicação de toxina botulínica e preenchimento com ácido hialurônico.

Projetos

Projetos de pesquisa

2019 - Atual ESTUDO DO PAPEL DO SELÊNIO E DAS SELENOPROTEÍNAS EM ZEBRAFISH (Danio rerio)

Descrição: Introdução: A esteatose hepática não alcoólica (NAFLD) é definida como o acúmulo de gordura no fígado sem a associação do consumo excessivo de álcool. A prevalência geral para essa doença é cerca de 25%, com o Brasil apresentando uma taxa de 30%. Apesar do avanço nas pesquisas, ainda não foi desenvolvido um método ou marcador não invasivo eficiente para o diagnóstico e estadiamento do NAFLD. O selênio (Se) é um micronutriente essencial para o funcionamento de todos os organismos, exercendo seu efeito através de selenoproteínas. As selenoproteínas são enzimas antioxidantes capazes de combater os malefícios do estresse oxidativo. Objetivo: Avaliar o efeito da suplementação de selênio no desenvolvimento de esteatose hepática gordurosa não alcoólica, no padrão de expressão das selenoproteínas e no comportamento de zebrafish (Danio rerio). Materiais e métodos: Serão utilizados zebrafish adultos wild-type que serão divididos em grupos de acordo com a suplementação de dieta com selênio e inclusão de esteatose (controle - CT, suplementação de selênio - SE1 e SE2, dano hepático - DN, dano hepático com suplementação de selênio - DN-SE1 e 2). Serão analisados alguns comportamentos dos animais, a quantificação dos depósitos lipídicos no fígado, a expressão gênica de selenoproteínas e a concentração corporal de selênio. O presente estudo será submetido ao CEUA-UFCSFA. Resultados esperados: O presente trabalho terá dados inéditos sobre o efeito da suplementação de selênio na prevenção e progressão de esteatose hepática não alcoólica, assim como, na expressão gênica de selenoproteínas em zebrafish.

Situação: Em andamento Natúrea: Projetos de pesquisa

Alunos envolvidos: Graduação (2), Doutorado (1).

Integrantes: Anderson de Freitas Alves; MARLENE PORAWSKI; SILVANA ALMEIDA (Responsável); MARCIA GIOVENARDI; Marlu Fiegenbaum; Luiza Motter Comari; Thania Raverbal de Oliveira; Ana Cláudia Reis Schneider; Thiago Alves

2017 - Atual Variabilidade Genética no Carcinoma Hepatocelular

Descrição: Introdução: O carcinoma hepatocelular é uma neoplasia primária do fígado, classificada como segunda causa de morte por câncer no mundo. A infecção pelo vírus de hepatite B e C, além do consumo de álcool, são as etiologias mais associadas a esse câncer, no entanto, qualquer condição que leve a uma doença hepática crônica, configura-se como um agente oncogênico em potencial. O estresse oxidativo é uma das condições estudadas devido à ligação entre o acúmulo de espécies reativas de oxigênio e danos ao DNA. Assim como, as condições hormonais. Objetivo: Avaliar a influência da variabilidade genética e da expressão das selenoproteínas e genes relacionados aos hormônios sexuais na susceptibilidade ao carcinoma hepatocelular. Materiais e métodos: Os experimentos serão divididos em dois subprojetos. O primeiro irá investigar a associação de polimorfismos em genes candidatos.

Análise de técnicas de PCR Real time, pelo método de discriminação alélica com sondas de hidrólise. A amostra é composta por pacientes com carcinoma hepatocelular (case) e sem a doença (controle), em um número de 102 indivíduos por grupo, todos provenientes da ISCMPA. As amostras derivam de projeto aprovado pelo CEP de UFCSFA (parecer 1785/12). O segundo subprojeto irá analisar a expressão de mRNA dos mesmos genes, através do uso de PCR quantitativa, em 10 amostras de tumor e perfumtor de pacientes com carcinoma hepatocelular da ISCMPA. As amostras derivam de projeto aprovado pelo CEP de ISCMPA (parecer nº 650/08). Também serão analisadas características de amostra como sexo, fatores etiológicos e idade. O termo de consentimento livre e esclarecido foi aplicado aos pacientes de ambas as projetos e presente estudo será submetido ao CEP de UFCSFA.

Situação: Em andamento Natúrea: Projetos de pesquisa

Alunos envolvidos: Graduação (1), Doutorado (1).

Integrantes: Anderson de Freitas Alves; SILVANA ALMEIDA (Responsável); MARCIA GIOVENARDI; BALDISSERA, V.D.; Huander F. Andreoli; Ana Beatriz G. Veiga; Marlu Fiegenbaum; Luiza Motter Comari

Áreas de atuação

1. Biomedicina
2. Biologia Molecular
3. Genética Humana e Médica
4. Fisiologia
5. ANÁLISES CLÍNICAS




Idiomas

Inglês Compreende Bem, Fala Bem, Escreve Bem, Lê Bem
Português Compreende Bem, Fala Bem, Escreve Bem, Lê Bem

Produção

Produção bibliográfica

Artigos completos publicados em periódicos

1.  **ALVES, ANDRESSA DE FREITAS; MOURA, ANA CAROLINA DE; ANDREOLLA, HJANDER FELIPE; VEIGA, ANA BEATRIZ GORMI DA; FIEGENBAUM, MARILU; GIOVENARDI, MÁRCIA; ALMEIDA, SILVANA**
Gene expression evaluation of antioxidant enzymes in patients with hepatocellular carcinoma: RT-qPCR and bioinformatic analysis. *GENETICS AND MOLECULAR BIOLOGY (ONLINE VERSION)*, **6(3)**, v.44, p.400160373 -, 2021.
2.  **DE-FREITAS-ALVES, ANDRESSA; DICO-BALDISSERA, VANESSA; CREMONESE-FILIPPI-CHELIA, EDUARDO; SCHMIDT-CZERSKI, CARLOS THADEU; OTT-FONTES, PAULO ROBERTO; DA-CRUZ-FERNANDES, MARILDA; PORAWSKI, MARILENE; GIOVENARDI, MÁRCIA**
Altered expression of COX-2 and TNF- α in patients with hepatocellular carcinoma. *REVISTA ESPANOLA DE ENFERMEDADES DIGESTIVAS*, **6(7)**, v.111, p.364111(2) - 370, 2019.
3.  **BALDISSERA, V.D.; ALVES, A.F.; ALMEIDA, S.; PORAWSKI, M.; GIOVENARDI, M.**
Hepatocellular carcinoma and estrogen receptors: Polymorphisms and isoforms relations and implications. *MEDICAL HYPOTHESES*, **6(3)**, v.95, p.67 - 70, 2016.

Apresentação de trabalho e palestra

1. **ALVES, A. F.; MOURA, A. C.; ANDREOLLA, H. F.; VEIGA, A. B. G.; FIEGENBAUM, M.; GIOVENARDI, MÁRCIA; ALMEIDA, S.**
GP74 and SOD2 are upregulated in patients with hepatocellular carcinoma, 2019. (Outra, Apresentação de Trabalho)
2. **ALVES, A.F.; MOURA, A. C.; ANDREOLLA, H. F.; VEIGA, A. B. G.; FIEGENBAUM, M.; GIOVENARDI, M.; ALMEIDA, S.**
GP74 e SOD2 estão superexpressos em pacientes com carcinoma hepatocelular, 2019. (Congresso, Apresentação de Trabalho)
3. **ALVES, A.F.; BURD, P. V.; ANDREOLLA, H. F.; VEIGA, A. B. G.; FIEGENBAUM, M.; GIOVENARDI, M.; ALMEIDA, S.**
Avaliação da influência das selenoproteínas em carcinoma hepatocelular, 2019. (Outra, Apresentação de Trabalho)
4. **ALVES, A. F.; BALDISSERA, V.D.; ANDREOLLA, H. F.; VEIGA, A. B. G.; FIEGENBAUM, M.; GIOVENARDI, M.; ALMEIDA, S.**
AVALIÇÃO DA INFLUÊNCIA DAS SELENOPROTEÍNAS NA SUSCEPTIBILIDADE AO CARCINOMA HEPATOCELULAR, 2017. (Seminário, Apresentação de Trabalho)
5. **ALVES, A. F.; BALDISSERA, V.D.; CZERSKI, C. S.; FONTES, P.; PORAWSKI, M.; FERNANDES, M. C.; GIOVENARDI, M.**
AVALIÇÃO DE MARCADORES INFLAMATÓRIOS EM PACIENTES COM CARCINOMA HEPATOCELULAR, 2016. (Congresso, Apresentação de Trabalho)
6. **BALDISSERA, V.D.; ALVES, A. F.; CZERSKI, C. S.; FONTES, P.; PORAWSKI, M.; ALMEIDA, S.**
ASSOCIATION OF RS2234693 AND RS1943821 POLYMORPHISMS OF ESR1 GENE WITH RISK TO HEPATOCELLULAR CARCINOMA, 2015. (Congresso, Apresentação de Trabalho)
7. **BALDISSERA, Vanessa; ALVES, A. F.; FORNECK, S.; CZERSKI, C. S.; FONTES, P.; PORAWSKI, M.; ALMEIDA, S.; GIOVENARDI, M.**
ESTROGEN RECEPTOR EXPRESSION IN HEPATOCELLULAR CARCINOMA, 2014. (Congresso, Apresentação de Trabalho)
8. **ALVES, A. F.; BALDISSERA, Vanessa; FORNECK, S.; CZERSKI, C. S.; FONTES, P.; PORAWSKI, M.; ALMEIDA, S.; GIOVENARDI, M.**
Expressão do Receptor de Estrogênio em Carcinoma Hepatocelular, 2014. (Outra, Apresentação de Trabalho)

Educação e Popularização de C&T

Redes sociais, websites e blogs

1. **ALMEIDA, S.; FIEGENBAUM, M.; ALVES, A. F.; RODRIGUES, M. M. O.; MOUSQUER, G. T.**
DNA Esplica, 2019 (Rede Social, Mídias sociais, websites, blogs)

Bancas

Bancas

Participação em banca de trabalhos de conclusão

Graduação

1. **ALVES, A.F.**
Participação em banca de Mônica Silva Alves. Influência dos polimorfismos rs5174, rs2287960 e rs373785 no gene LRP6 (ApoE/R2) nos níveis de selênio e no desempenho de memória em adultos maiores e idosos, 2019 (Biomédica) Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre
2. **ALVES, A.F.; RODRIGUES, M. M. O.; ALMEIDA, S.**
Participação em banca de Carolina Kufmann. Análise da expressão gênica do receptor de dopamina D2 em áreas cerebrais de camundongos fêmeas lactantes submetidos a três diferentes dietas, 2018 (Biomédica) Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre

Participação em banca de comissões julgadoras

Outra

1. Congresso UFGSPA: conectando saúde e sociedade, 2019
Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre
2. IV Mostra de Trabalhos de Ensino, Pesquisa e Extensão da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, 2019
Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre

3. III Mostra de Trabalhos de Ensino, Pesquisa e Extensão da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, 2017
Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre

Outras informações relevantes

1 Co-orientação de trabalho de conclusão de curso de graduação:

Viviane Rocha Folz. AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DO POLIMORFISMO n713041 NO GENE GPX4 NA SUSCEPTIBILIDADE AO CARCINOMA HEPATOCELULAR, 2018. Trabalho de Conclusão de Curso. (Graduação em Biomedicina) - Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre. Orientador: Silvana de Almeida, Co-orientador: Andreza de Freitas Alves.

Pâmela Victoria Von Burg. AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DO GENE GLUTATIONA PEROXIDASE 1 EM CARCINOMA HEPATOCELULAR, 2018. Trabalho de Conclusão de Curso. (Graduação em Biomedicina) - Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre. Orientador: Silvana de Almeida, Co-orientador: Andreza de Freitas Alves.

Página gerada pelo sistema Currículo Lattes em 08/08/2021 às 18:38:12.