



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA**

Jovita Ramos Ariede

MicroRNoma dos carcinomas de fígado

Tese apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Doutora em Bases Gerais da Cirurgia.

Orientadora: Profa. Dra. Patricia Pintor dos Reis
Coorientador: Prof. Adj. Giovanni Faria Silva

**Botucatu
2017**

Jovita Ramos Ariede

MicroRNoma dos carcinomas de fígado

Tese apresentada à Faculdade de
Medicina, Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de
Botucatu, para obtenção do título de
Doutora em Bases Gerais da Cirurgia.

Orientadora: Profa. Dra. Patricia Pintor dos Reis
Coorientador: Prof. Adj. Giovanni Faria Silva

Botucatu
2017

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL ROSEMEIRE APARECIDAVICENTE-CRB 8/5651

Ariede, Jovita Ramos Ariede.

MicroRNoma dos carcinomas de fígado / Jovita Ramos
Ariede Ariede. - Botucatu, 2017

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista
"Júlio de Mesquita", Faculdade de Medicina de
Botucatu

Orientador: Patricia Pintor dos Reis

Coorientador: Giovanni Faria Silva

Capes: 20200005

1. Fígado - Câncer. 2. MicroRNAs. 3. Marcadores
bioquímicos.

Palavras-chave: Alvos moleculares terapêuticos;
Biomarcadores; Carcinoma hepatocelular; microRNA.

DEDICO ESTE TRABALHO...

*Aos meus pais, Valentin e Zeti, ao meu noivo Adriano, ao meu irmão Italo e cunhada Débora,
pelo incentivo e apoio em todas as minhas escolhas e decisões.*

*A Vitória desta conquista dedico com todo meu amor, unicamente, a vocês!
Vocês são eternos em meu coração.*

AGRADECIMENTO

A conclusão desta tese só se fez possível mediante a participação de muitos colaboradores, os quais contribuíram direta ou indiretamente não somente para o desenvolvimento deste trabalho, mas também para meu crescimento acadêmico.

Ficam aqui expresso os meus sinceros agradecimentos:

Ao meu pai **VALENTIN**, a minha mãe **ZETI**, ao meu irmão **ITALO**, a minha cunhada **DÉBORA** e todos da minha preciosa família, pela paciência, auxílio e incentivo em todos os momentos. Sem o apoio da família não somos nada!

Ao meu querido noivo, **ADRIANO**, que sempre me apoiou e que esteve presente em cada momento desta caminhada, torcendo pelo meu êxito e me dando muita força desde o início desta trajetória. Obrigada por fazer parte da minha vida.

A minha orientadora, Dra. **PATRICIA PINTOR DOS REIS**. Obrigada por sempre estar disposta a ajudar e auxiliar. Também agradeço pela confiança depositada no meu potencial, pelo estímulo ao crescimento profissional, pelos conselhos e por todos os ensinamentos.

Ao meu coorientador, Dr. **GIOVANNI FARIA SILVA**, meu eterno agradecimento pelos importantes ensinamentos na área clínica e por estar sempre disposto a me ensinar e apoiar.

A Dra. **SILVIA REGINA ROGATTO**, por nos oferecer a estrutura do laboratório Neogene.

A Dra. **SANDRA DRIGO LINDE**, por toda ajuda e apoio, pela disponibilidade em ajudar.

Ao Dr. **FÁBIO EDUARDO SEVERINO**, por toda ajuda na realização das análises de bioinformática desse estudo.

A Dra. **MARIA APARECIDA MARCHESAN RODRIGUES**, por toda ajuda nas análises anatomopatológicas das amostras utilizadas.

A Dra. **CLAUDIA NISHIDA HASIMOTO** e Dr. **JUAN CARLOS LLANOS**, por toda a ajuda na coleta dos dados para realização desse estudo.

Aos amigos de laboratório, **NAIARA, NATÁLIA, TAINARA, MAÍSA, TATIANE, MÁRCIO, MARCO** e ao **FÁBIO**, muito obrigada pela força, pela amizade, pelos momentos de descontração e também pelas produtivas discussões. Agradeço pelo auxílio de todos.

A **MÁRCIA FONSECA PIAGENTINI CRUZ**, secretária da Pós-Graduação em Bases Gerais da Cirurgia, muito obrigada pelo auxílio, pelas informações e por toda ajuda cedida.

Ao Programa de Pós-Graduação em Bases Gerais da Cirurgia da Faculdade de Medicina de Botucatu - UNESP.

Aos docentes do Programa de Pós-Graduação em Bases Gerais da Cirurgia.

Deixo, ainda, expresso meus agradecimentos a todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para que este trabalho se realizasse.

EPÍGRAFE

*“Ninguém caminha sem aprender a caminhar,
sem aprender a fazer o caminho caminhado,
sem aprender a refazer, a retocar o sonho,
por causa do qual a gente se pôs a caminhar”*

Paulo Freire

RESUMO

Introdução: O carcinoma hepatocelular (CHC) está entre as neoplasias de alta complexidade no diagnóstico, determinação do prognóstico e tratamento, sendo o sexto tipo de câncer mais comum no mundo e a segunda causa mais comum de morte por câncer. Uma variedade de genes alterados foram relatados, revelando heterogeneidade genética entre tumores de diferentes pacientes. Portanto, o insucesso terapêutico da terapia convencional pode ser parcialmente atribuído a essa heterogeneidade associada ao comportamento biológico tumoral. Sendo assim, justifica-se a necessidade de identificação de vias moleculares as quais podem conter biomarcadores clinicamente aplicáveis para a melhoria do diagnóstico e tratamento dos pacientes com CHC. Os resultados podem ter futuras aplicações clínicas utilizando miRNAs e os genes-alvo regulados por miRNAs como biomarcadores com valor diagnóstico, prognóstico e terapêutico.

Objetivos: Identificar o perfil global de expressão de miRNAs (microRNoma) e os mRNAs-alvo potencialmente regulados por miRNAs em CHC.

Pacientes e Métodos: Foram incluídas 18 amostras de tecido, fixadas em formalina e emblocadas em parafina (FFPE) de carcinoma hepatocelular, sendo 18 amostras tumorais e 18 amostras de tecido hepático histologicamente normal, adjacente ao tumor, dos mesmos pacientes. O perfil de expressão de miRNAs das amostras tumorais foi determinado utilizando o ensaio TaqMan Array Human MicroRNA Cards (TLDA) (card A) (Life Technologies). A análise dos dados utilizou o programa ExpressionSuite v1.0.3. Análises computacionais utilizando algoritmo de bioinformática foram realizadas com o objetivo de identificar genes-alvo regulados por miRNAs, bem como redes de interação proteica e vias moleculares envolvendo genes e miRNAs.

Resultados: Foram identificados 8 miRNAs com expressão diferencial estatisticamente significativa ($FC \geq 1,5$ e $p < 0,05$) em carcinoma hepatocelular, sendo que 5 miRNAs estavam com expressão aumentada e 3 miRNAs estavam com expressão diminuída comparado com os tecidos histologicamente normais. Nossos resultados mostram uma complexidade de alterações associadas à tumorigênese do CHC, devido ao número de genes-alvo identificados regulados pelos miRNAs alterados nesse tumor. **Conclusão:** Redes de interação entre miRNAs e mRNAs-alvo estão associadas ao desenvolvimento e progressão do CHC.

Palavras-chave: Carcinoma Hepatocelular; microRNA; Biomarcadores; Alvos moleculares terapêuticos.

ABSTRACT

Introduction: Hepatocellular carcinoma (HCC) is among the most complex neoplasms in diagnosis, prognosis, and treatment, being the sixth most common cancer and the second most common cause of cancer death worldwide. Several genes have been reported as deregulated in HCC, revealing the genetic heterogeneity among tumors from different patients. Therefore, treatment failure by conventional therapy may be partially attributed to such heterogeneity associated with tumor biological behavior. Thus, the need for identification of molecular pathways which may contain clinically applicable biomarkers for better diagnosis and treatment of HCC patients is warranted. The results may have future clinical applications using miRNAs and target genes regulated by miRNAs as biomarkers with diagnostic, prognostic and therapeutic value.

Objectives: To identify the global expression profile of miRNAs (microRNome) and target mRNAs potentially regulated by miRNAs in HCC.

Patients and Methods: Thirty-six formalin-fixed and paraffin-embedded tissue samples (FFPE) from hepatocellular carcinoma were included, with 18 tumor samples and 18 histologically normal hepatic tissue samples adjacent to the tumor from the same patients. miRNA expression profiles were determined using the TaqMan Array Human MicroRNA Cards (TLDA) assay (card A) (Life Technologies). Data analysis used ExpressionSuite v1.0.3 program. Computational bioinformatic analyzes were performed to identify target genes regulated by miRNAs, as well as miRNA-mRNA interaction networks and gateways involving genes and miRNAs.

Results: 8 statistically significantly deregulated miRNAs ($FC \geq 1.5$ and $p < 0.05$) were identified in hepatocellular carcinoma, being 5 over-expressed and 3 under-expressed compared to histologically normal liver tissues. Our results showed a complexity of alterations associated with HCC tumorigenesis due to the number of target genes identified by deregulated miRNAs. **Conclusion:** miRNA-mRNA networks are involved in molecular pathways associated with HCC development and progression.

Keywords: Hepatocellular Carcinoma; MicroRNA; Biomarkers; Therapeutic molecular targets.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Algoritmo de diagnóstico e protocolos de convocatória. *Uma técnica imagiológica é recomendada apenas nos centros de excelência com equipamento radiológico de topo. **Marca radiológica do CHC: hipervascularização arterial e “washout” nas fases venosa/tardia. TC: tomografia computadorizada, RM: ressonância magnética.....	09
Figura 2. Cortes histológicos representativos de carcinoma hepatocelular bem diferenciado (hematoxilina e eosina - HE, x 200).....	12
Figura 3. Padrões de crescimento do carcinoma hepatocelular. A: CHC com padrão de crescimento trabecular (HE, x 300); B: CHC com padrão de crescimento pseudoglandular (HE, x 100); C: CHC com padrão de crescimento sólido (HE, x 200); D: CHC com formação de células gigantes (HE, x 200).....	13
Figura 4. Sistema de Barcelona para estadiamento clínico e estratégia terapêutica em câncer hepático (Barcelona Clinic Liver Cancer Staging System-BCLC).....	19
Figura 5. Delineamento e seleção das amostras.....	34
Figura 6. Volcano plot, ilustrando os miRNAs com expressão significativamente desregulada ($FC \geq 1.5$ e $p < 0,05$) em CHC comparado com tecido hepático histologicamente normal. FC: fold change.....	40
Figura 7. Análise de interação entre microRNAs e genes-alvo em carcinoma hepatocelular.....	42
Figura 8. Análise de interação entre microRNAs e genes-alvo em carcinoma hepatocelular.....	43

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Estadiamento clínico do carcinoma hepatocelular (CHC) - TNM, American Joint Committee on Cancer (AJCC).....	16
Tabela 2. Terapias dirigidas em carcinoma hepatocelular.....	22
Tabela 3. miRNAs com expressão significativamente ($FC \geq 1,5$ e $p < 0,05$) alterada em carcinoma hepatocelular.....	41
Tabela 4. Lista dos 30 “top” miRNAs selecionados, com expressão significativamente alterada em CHC vs. tecido hepático normal.....	44

LISTA DE SIGLAS E ABREVIACÕES

<i>Ago 1</i>	<i>Argonauta 1</i>
<i>Ago 2</i>	<i>Argonauta 2</i>
<i>AASLD</i>	<i>Associação Americana para o Estudo das Doenças do Fígado</i>
<i>AFP</i>	<i>Alfa-fetoproteína</i>
<i>AJCC</i>	<i>American Joint Committee on Cancer</i>
<i>AKT</i>	<i>Proteína quinase B</i>
<i>APC</i>	<i>Adenomatous polyposis coli</i>
<i>ARID1A</i>	<i>ARID1A AT-rich interaction domain 1A</i>
<i>ATF2</i>	<i>Fator ativador de transcrição 2</i>
<i>AXIN1</i>	<i>Protein is encoded by the AXIN1 gene</i>
<i>BAG3</i>	<i>BCL2 Associated Athanogene 3</i>
<i>BCL2</i>	<i>B-cell CLL/Lymphoma 2</i>
<i>BCLC</i>	<i>Barcelona Clinic Liver Cancer</i>
<i>BRAF</i>	<i>Proto-oncogene B-Raf</i>
<i>BRG1</i>	<i>Transcription activator BRG1</i>
<i>CCND3</i>	<i>G1/S-specific cyclin-D3</i>
<i>CDKN2A</i>	<i>Inibidor da quinase dependente de ciclina 2a</i>
<i>CEP</i>	<i>Comitê de Ética em Pesquisa</i>
<i>c-Fos</i>	<i>Proto-oncogene</i>
<i>CHC</i>	<i>Carcinoma Hepatocelular</i>
<i>CLIP</i>	<i>Cancer of the Liver Italian Program Score</i>
<i>c-myc</i>	<i>Regulator gene</i>
<i>CT</i>	<i>Cycle threshold</i>
<i>CTNNB1</i>	<i>CTNNB1 catenin beta 1</i>
<i>CUPI</i>	<i>Chinese University Prognostic Index</i>
<i>DCP</i>	<i>Desgamacarboxiprotrombina</i>
<i>ddH₂O</i>	<i>MilliQ water vs bi-distilled water</i>
<i>DDLT</i>	<i>Transplante hepático de doador falecido</i>
<i>DNA</i>	<i>Ácido desoxirribonucleico</i>
<i>dNTP</i>	<i>Desoxirribonucleotídeos Fosfatados</i>
<i>dsRNA</i>	<i>RNA de fita dupla</i>
<i>dTTP</i>	<i>2'-deoxythymidine 5'-triphosphate</i>
<i>EASL</i>	<i>Associação Europeia para o Estudo do Fígado</i>
<i>ECOG</i>	<i>Eastern Cooperative Oncology Group</i>
<i>EGFR</i>	<i>Sinalização celular do Receptor do Fator de Crescimento Epidérmico</i>
<i>EIA</i>	<i>Imunoensaio enzimático</i>
<i>EMA</i>	<i>Agência Europeia de Medicamentos</i>
<i>EORTC</i>	<i>Associação Europeia para o estudo e tratamento do câncer</i>
<i>FC</i>	<i>Fold change</i>
<i>FDA</i>	<i>Food and Drugs Administration</i>
<i>FDG</i>	<i>Fluorodesoxiglicose</i>

<i>FDR</i>	<i>False discovery rate</i>
FFPE	Fixado em formalina e embebido em parafina
<i>FGF19</i>	<i>Fibroblast growth factor 19</i>
<i>FGF3</i>	<i>Fibroblast growth factor 3</i>
<i>FGF4</i>	<i>Fibroblast growth factor 4</i>
FMB	Faculdade de Medicina de Botucatu
FMUSP	Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
H&E, HE	Hematoxilina e eosina
<i>H3K9</i>	<i>Histona-lisina SETDB1 N-metiltransferase</i>
HCB	Hospital das Clínicas de Botucatu
<i>HRAS</i>	<i>HRas proto-oncogene</i>
<i>IGF-II</i>	<i>Insulin like growth factor 2</i>
<i>IGFs</i>	<i>Insulin like growth factor</i>
JIS	Japan Integrated Staging Score
<i>K-RAS</i>	<i>Kirsten rat sarcoma viral oncogenes homolog p53</i>
<i>LDLT</i>	<i>Transplante hepático de doador vivo</i>
<i>LncRNA</i>	<i>Long non-coding RNA</i>
M1	Metástase 1
MAMRK	Maria Aparecida Marchesan Rodrigues
<i>MAPK</i>	<i>Proteino-quinases ativadas por mitógenos</i>
<i>MAT1A</i>	<i>Methionine adenosyltransferase 1A</i>
<i>MAT2A</i>	<i>Methionine adenosyltransferase 2A</i>
<i>MELD</i>	<i>Model for End-Stage Liver Disease</i>
<i>MET</i>	<i>MET proto-oncogene, receptor tyrosine kinase</i>
<i>miR(s) /miRNA(s)</i>	<i>Micro ácido ribonucléico</i>
<i>miRNoma</i>	<i>Conjunto de miRNAs do genoma</i>
<i>miRtrons</i>	<i>microRNAs located in the introns of the mRNA</i>
<i>mRNA</i>	<i>Ácido ribonucléico mensageiro</i>
<i>mTOR</i>	<i>Proteína-alvo da rapamicinaem em mamíferos</i>
N	Normal
N1	Normal 1
<i>ncRNA</i>	<i>RNA não-codantes</i>
<i>N-ras</i>	<i>Neuroblastoma RAS viral oncogene homolog</i>
<i>P21Waf1 / Cip1</i>	<i>Cyclin-dependent kinase inhibitor p21</i>
<i>PCR</i>	<i>Reação em cadeia da polimerase</i>
<i>PDGFR</i>	<i>Fator de crescimento derivado de plaquetas</i>
<i>PDGFR</i>	<i>Receptor de fator de crescimento derivado de plaquetas</i>
<i>PI3K</i>	<i>Fosfatidilinositol 3-quinases</i>
<i>PPAR-γ</i>	<i>Peroxisome proliferator-activated receptor gamma</i>
<i>Pré-miRNA</i>	<i>miRNA precursor</i>
<i>pri-miRNA</i>	<i>miRNA iniciado com transcrito primário longo</i>
<i>PTEN</i>	<i>Fosfatase homóloga à tensina</i>
<i>RAF</i>	<i>Raf-1 proto-oncogene, serine/threonine kinase</i>
<i>RB1</i>	<i>Retinoblastoma 1</i>

<i>RISC</i>	<i>RNA-Induced Silencing Complex</i>
<i>RM</i>	Ressonância magnética
<i>RNA</i>	Ácido ribonucleico
<i>RNM</i>	Ressonância nuclear magnética
<i>RPS6KA3</i>	<i>Proteína ribossomal S6 quinase polipeptídeo 3</i>
<i>RSK2</i>	<i>Ribosomal Protein S2 Kinase</i>
<i>RT</i>	<i>Real time</i>
<i>RT-qPCR</i>	<i>PCR quantitativa em tempo real</i>
<i>SETDB1</i>	<i>SET Domain Bifurcated 1</i>
<i>SNPs</i>	<i>Polimorfismo de nucleotídeo único</i>
<i>ST</i>	<i>Serina/Treonina</i>
<i>TA</i>	Temperatura ambiente
<i>TC</i>	<i>Tirosina quinase</i>
<i>TCGA</i>	<i>The Cancer Genome Atlas</i>
<i>TCLE</i>	<i>Termo de Consentimento Livre e Esclarecido</i>
<i>TERT</i>	<i>Telomerase reverse transcriptase</i>
<i>TGF</i>	<i>Transforming Growth Factor Beta</i>
<i>TKI</i>	<i>Domínio tirosina-quinase</i>
<i>TLDA</i>	<i>TaqMan Array Human MicroRNA Cards</i>
<i>TNM</i>	<i>Tumor Nódulo Metástase</i>
<i>TP53</i>	<i>Gene supressor tumoral TP53</i>
<i>TRBP</i>	<i>Transactivating response RNA-binding protein</i>
<i>TSC1</i>	<i>Tuberous Sclerosis 1</i>
<i>TSC2</i>	<i>Tuberous Sclerosis 2</i>
<i>UICC</i>	<i>Union for International Cancer Control</i>
<i>UNESP</i>	<i>Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"</i>
<i>USG</i>	Ultrassonografia
<i>UTR</i>	<i>Região não traduzida</i>
<i>VEGFR</i>	<i>Receptor de fator de crescimento endotelial vascular</i>
<i>VHB</i>	Vírus da hepatite B
<i>VHC</i>	Vírus da hepatite C
<i>WNT</i>	<i>Wnt signaling pathway</i>
<i>WNT-β-catenina</i>	<i>Wnt / β-Catenin Signaling Pathway</i>
<i>Xrn1</i>	<i>5'-3' Exoribonuclease 1</i>
<i>Xrn2</i>	<i>5'-3' Exoribonuclease 2</i>

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
~	Aproximadamente
<	Menor que
>	Maior que
≤	Menor ou igual a
≥	Maior ou igual a
°C	Graus Celsius
h	Hora
KDa	Kilodalton
min	Minuto
mL	Mililitro
mm	Milímetro
ng	Nanograma
RPM	Rotação por minuto
s	Segundo
μL	Microlitro

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Câncer.....	1
1.2. Carcinoma Hepatocelular.....	1
1.2.1. Etiologia e Epidemiologia.....	1
1.2.2. Fatores de risco para o desenvolvimento de CHC.....	3
1.2.3. Tumorigênese hepática.....	4
1.2.4. Manifestações clínicas e patologia do diagnóstico do CHC.....	6
1.2.5. Diagnóstico e detecção precoce.....	7
1.2.6. Histopatologia.....	11
1.2.7. Estadiamento e fatores prognósticos no CHC.....	14
1.2.8. Tratamento.....	20
1.3. Moléculas reguladoras da expressão gênica: microRNAs.....	24
1.4. MicroRNAs como biomarcadores no câncer.....	26
1.5. MicroRNAs e alvos moleculares terapêuticos.....	27
1.6. MicroRNAs em CHC.....	29
2. JUSTIFICATIVA.....	31
3. OBJETIVOS.....	32
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	33
4.1. Considerações sobre os aspectos éticos.....	33
4.2. Critérios de inclusão e exclusão dos pacientes.....	33
4.3. Identificação das amostras.....	33
4.4. Delineamento e seleção das amostras.....	34
4.5. Análise molecular.....	35
4.5.1. Microdissecção com agulha.....	35
4.5.2. Extração de RNA.....	35
4.5.3. Avaliação da quantidade e qualidade do RNA.....	36
4.5.4. Reação de Transcrição Reversa de miRNAs.....	36
4.5.5. Análise da expressão de microRNAs.....	37
4.6. Análise dos dados.....	38
4.6.1. Processamento dos dados de expressão.....	38
4.6.2. Predição de alvos e vias dos miRNAs.....	38
4.6.3. Validação externa dos resultados de expressão de miRNAs.....	38

5. RESULTADOS.....	40
5.1. Perfil da expressão de miRNAs em carcinoma hepatocelular.....	40
5.2. Correlação dos miRNAs expressos em carcinoma hepatocelular com dados de meta-análise em CHC.....	41
5.3. Resultados de predição de genes-alvo regulados por miRNAs.....	41
5.4. Validação externa dos dados de expressão global dos miRNAs: repositório do TCGA.....	44
6. DISCUSSÃO.....	46
7. CONCLUSÕES.....	52
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	53
ANEXO 1 - Certificado de Aprovação do estudo junto ao CEP.....	76
ANEXO 2 - Artigo intitulado: “Deregulated miRNA-mRNA-lncRNA networks associated with hepatitis virus infection in hepatocellular carcinoma”.....	77

1. INTRODUÇÃO

1.1. Câncer

O câncer retrata uma doença caracterizada pelo crescimento rápido, descontrolado e invasivo de células, causado por alterações genéticas e epigenéticas (1).

Os cânceres são considerados um problema de saúde pública mundial, pois estão associados a um alto índice de mortalidade e morbidade. A estimativa para o Brasil, biênio 2016-2017, aponta a ocorrência de cerca de 600 mil casos novos de câncer segundo dados do INCA (Instituto Nacional de Câncer) (2).

1.2. Carcinoma Hepatocelular

1.2.1. Etiologia e Epidemiologia

O fígado é a maior víscera interna do corpo humano o qual situa-se no quadrante superior direito do abdômen, aderido à superfície inferior do diafragma. É, essencialmente, uma massa de células permeada por um complexo, organizado em sistema de canais que transportam o suprimento sanguíneo e a bile (3).

Quanto à anatomia, o fígado apresenta dois lobos, direito e esquerdo, separados pelo ligamento falciforme. Funcionalmente, o fígado é composto por oito segmentos (I-VIII) cada um suprido por uma única tríade portal (veia porta, artéria hepática e ducto biliar) (4).

A veia porta é responsável pelo suprimento sanguíneo (70-80%), sendo que pela veia porta chega ao fígado todo o material absorvido nos intestinos, com exceção de parte dos lipídios que é transportada por via linfática. Graças a essa característica, o fígado é capaz de metabolizar e acumular nutrientes e neutralizar e eliminar substâncias tóxicas absorvidas. A veia porta é formada pela junção da veia mesentérica superior e veia esplênica que se ramifica num tronco curto do lobo superior direito e em um tronco esquerdo o qual é mais longo. A artéria hepática e seus ramos são bem menos constantes. Em 55% das pessoas ela se origina diretamente do tronco celíaco, mas, no restante, pode se originar da mesentérica superior, gastroduodenal, gástrica direita ou esquerda ou até mesmo da aorta. A maior parte do fluxo vai para o estroma, ductos biliares e vesícula biliar (5, 6).

O hepatocarcinoma ou carcinoma hepatocelular (CHC), é um câncer primário de fígado, ou seja, o câncer derivado das principais células do fígado, os hepatócitos. O desenvolvimento de tumores hepáticos malignos deve-se ao surgimento e acúmulo de alterações genéticas e epigenéticas, resultando na divisão celular descontrolada. Entre as

alterações genéticas mais frequentemente observadas estão as mutações, as quais podem ser causadas por algum agente externo (como os vírus da hepatite C e/ou B) ou pelo excesso de multiplicações das células (como a regeneração crônica de hepatócitos associada à hepatite), o que aumenta o risco de surgimento de erros na duplicação do DNA (7, 8).

Os tumores malignos do fígado podem ser divididos em dois tipos: carcinoma primário (que tem sua origem no próprio órgão) e secundário ou metastático (originado em outro órgão e que atinge também o fígado). Dentre os carcinomas originados no fígado, o mais frequente é o CHC. Outros tipos de carcinomas primários de fígado incluem o colangiocarcinoma (carcinoma que se origina nas vias biliares hepáticas), angiossarcoma (tumor maligno que se origina nos vasos sanguíneos hepáticos), hepatoblastoma (tumor raro que acomete recém-nascidos ou crianças nos primeiros anos de vida), carcinoma hepatocelular esclerosante e carcinoma fibrolamelar (que apresenta maior facilidade para extração cirúrgica, portanto melhor prognóstico) (1, 2).

Mundialmente, o câncer de fígado é o sexto câncer mais comum (~850.000 novos casos por ano) sendo o quinto câncer mais comum em homens (554.000 casos, 7,5% do total) e o nono em mulheres (228.000 casos, 3,4%) (1). Também é considerado a segunda maior causa de mortalidade comparado a outros tipos de câncer no mundo com ~800.000 mortes ao ano (1, 7, 9-11). Aproximadamente 60% dos casos de carcinoma hepatocelular ocorrem nos países em desenvolvimento e essa estimativa está aumentando com o tempo (12). O CHC é responsável por até 90% de todos os cânceres primários de fígado em todo o mundo, e representa um importante problema mundial de saúde pública, pois a incidência está aumentando cada vez mais em todos os países (8, 10, 13).

No Brasil, as estimativas de incidência de CHC são baixas. Um estudo realizado em 2014 no Hospital das Clínicas da FMUSP relatou uma incidência anual de 2,9% em pacientes cirróticos (14). Em 2009, uma pesquisa nacional incluiu dados de 29 centros para um total de 1.405 pacientes com diagnóstico de CHC. A idade média foi de 59 anos e 78% dos casos eram do sexo masculino. A cirrose hepática estava presente em 98% dos casos e a infecção crônica pelo VHC foi a etiologia mais comum (54%), seguido pelo VHB (16%) e álcool (14%) (15).

As regiões dos continentes Asiático e Africano ocupam o primeiro lugar em incidência no desenvolvimento de neoplasias malignas, culminando no elevado número de óbitos, principalmente devido ao precário processo de diagnóstico, podendo levar a um maior risco de desenvolvimento da doença (por exemplo, indivíduos com infecção pelos vírus da hepatite

C ou B), da alta prevalência dos fatores de risco na população e, ainda, pela ausência de diagnóstico precoce e estratégias de tratamento adequadas (16, 17).

No continente Americano, grande parte da Europa e Austrália são considerados de baixa incidência para o CHC, com menos de 5 casos por 100.000 habitantes/ano (16). Nos Estados Unidos, entretanto, a incidência aumentou nos últimos 20 anos, provavelmente em decorrência da prevalência de infecções causadas pelo vírus da hepatite C (VHC) (13).

A incidência mundial de CHC é paralela ao da hepatite viral crônica. O vírus da hepatite B (VHB) é um vírus de DNA que pode provocar mutagênese. No contexto da infecção crônica pelo VHB, o CHC pode ou não ocorrer na presença de cirrose, por outro lado em pacientes com infecção crônica pelo VHC, que é causada por um vírus de RNA, o CHC raramente ocorre na ausência de fibrose hepática avançada ou cirrose (18, 19).

O desenvolvimento e a progressão do CHC ocorrem em um processo de várias etapas, com transformação maligna geralmente associada com hepatite e/ou cirrose crônica (20). A associação do CHC à cirrose faz presente em até 80% dos casos. Porém, o fator etiológico envolvido é de grande importância, visto que o desenvolvimento tumoral é muito mais comum nas cirroses de origem viral (21).

1.2.2. Fatores de risco para o desenvolvimento de CHC

O CHC é um dos poucos cânceres com fatores de risco bem definidos geralmente são decorrentes da cirrose (lesão hepática crônica causada por inflamação e fibrose), do consumo excessivo de álcool, hepatite crônica devido à infecção pelos vírus da hepatite B ou C e síndrome metabólica os quais estão associados com ~50% dos carcinomas primários de fígado (22-24). Outros fatores etiológicos estão associados ao desenvolvimento do CHC como a inalação da fumaça do tabaco, cirrose biliar primária, hepatite autoimune, esteatohepatite não alcoólica, exposição à aflatoxina B1 (uma toxina produzida por fungos do gênero *Aspergillus* e com potencial carcinogênico, sendo capaz de induzir mutações no gene supressor tumoral *TP53*) e doenças hereditárias (25), como por exemplo, a hemocromatose (11, 26-28).

A compreensão dos mecanismos de patogênese do CHC é de extrema importância para o desenvolvimento de estratégias eficazes de prevenção e tratamento desse tipo de câncer. Apesar dos contínuos avanços no tratamento cirúrgico, a recorrência do tumor primário, bem como metástase regional e/ou distantes são comumente observados na prática clínica e associados com as altas taxas de mortalidade dos pacientes com CHC (22, 24, 29).

Portanto, a identificação de biomarcadores prognósticos e preditivos robustos é necessária, a fim de melhorar o diagnóstico e tratamento dos pacientes, levando a melhoria da sobrevida dos pacientes (28, 30-32).

Análises genômicas têm proporcionado um entendimento dos principais genes condutores da iniciação e progressão tumoral. O CHC apresenta uma média de 40 aberrações genéticas, sendo algumas consideradas condutoras da tumorigênese. Mutações comuns afetam a manutenção dos telômeros, tais como mutações na transcriptase reversa telomérica (*TERT*), ativação da via do *WNT*, devido a mutações em *CTNNB1*, que codifica a proteína β -catenina e inativação de *TP53*. Adicionalmente, foram relatadas alterações em genes que atuam na remodelação da cromatina (*ARID1A*), genes da via de sinalização do *RAS* e *mTOR* (alvo da rapamicina em mamíferos) e ativação de vias de estresse oxidativo (31-33).

1.2.3. Tumorigênese hepática

Os eventos moleculares que desencadeiam a tumorigênese do CHC se relacionam com doenças que interferem na síntese de DNA e RNA, como a cirrose, e a infecção pelo VHB e VHC (23, 24, 34). A infecção pelo VHB causa integração do DNA viral no DNA humano, levando a perda do controle do ciclo celular devido à inativação de genes supressores de tumor e ativação de proto-oncogene (35-37). Outros eventos relacionados à infecção pelo VHB são: superexpressão dos fatores de crescimento TGF α IGF-II e das proteínas *N-RAS*, *c-MYC*, *c-FOS*, além de alterações genéticas nas regiões cromossômicas 4q, 8p e 17p, relacionadas a hepatocarcinogênese (38). Alterações moleculares estão associadas ao desenvolvimento do CHC. A hepatocarcinogênese é um processo de múltiplas etapas complexas que geralmente ocorrem no contexto da cirrose do fígado (39).

A história natural do CHC na cirrose segue uma sequência de eventos iniciando com o desenvolvimento de nódulos cirróticos pré-cancerígenos com displasia de baixo grau, chamado de nódulos displásicos de baixo grau. Esses nódulos, posteriormente evoluem para nódulos displásicos de alto grau que podem se transformar em CHC em estágio inicial (estágios 0 e A) e avançados (estágios B e C). Transformações malignas em CHC podem ser provenientes de vários tipos celulares, incluindo hepatócitos maduros e células progenitoras (40).

Semelhante a outros tumores sólidos epiteliais, o CHC é o resultado do acúmulo de alterações genômicas somáticas (41). Tais alterações estão associadas com a evolução do tumor incluindo a iniciação, progressão, metástase e resistência a terapia por promoção de

várias funções, incluindo a proliferação, sobrevivência, invasão ou evasão do sistema imune (42, 43). A tumorigênese do CHC consiste em um processo complexo e com heterogeneidade genética entre tumores de diferentes pacientes (43-46).

Marcadores moleculares que foram identificados a fim de discriminar nódulos pré-malignos de CHC forneceram informações sobre o início da tumorigênese hepática (47-49). Com base nesses marcadores, os mecanismos de transformação maligna de hepatócitos foram demonstrados, os quais incluem a ativação da via *WNT- β -catenina*, a re-expressão de genes fetais e a resposta ao estresse oxidativo. Além disso, várias linhas de evidência demonstraram que a manutenção dos telômeros e o complexo da telomerase que controla os nucleotídeos TTAGGG, uma sequência repetida na extremidade dos cromossomos, desempenham uma importante função na iniciação e promoção da cirrose no CHC (50, 51).

A manutenção dos telômeros foi demonstrada na evasão da senescência celular. A telomerase apresenta expressão aumentada em 90% dos CHC, relacionada a mutações no promotor do *TERT* em 60% dos casos e a amplificações gênicas em 5% dos casos (43, 52). Outras vias como a de sinalização da *WNT- β -catenina* são frequentemente ativadas no CHC por meio de mutações em *CTNNB1* que ativam a *β -catenina* (11-37% dos casos de CHC). Isso ocorre predominantemente em pacientes sem infecção pelo VHB e com tumores bem diferenciados (53, 54). Mutações inativadoras também são frequentemente identificadas em axina 1 (*AXIN1*; 10% dos casos de CHC) ou, mais raramente, no gene da polipose adenomatosa do cólon (*APC*; 1-2% dos casos de CHC). Todas estas mutações resultam em ativação da via da *WNT- β -catenina* (43, 46). A inativação da *p53* e as alterações no ciclo celular também ocorrem especialmente em casos relacionados a infecção pelo VHB ou à aflatoxina. Neste contexto, os pacientes que foram expostos a aflatoxina B1 apresentam uma mutação específica no gene *TP53* (43, 46, 55). A inativação da via do retinoblastoma também é observada com frequência por meio de mutações no gene retinoblastoma 1 (*RB1*) (3-8% dos casos de CHC) ou no inibidor da quinase dependente de ciclina 2A (*CDKN2A*) o qual pode conter deleções em 2-12% dos casos. A maioria desses defeitos moleculares estão associados com um mau prognóstico e podem contribuir para um fenótipo mais agressivo da doença (43, 44, 56).

Adicionalmente, complexos de remodelação da cromatina e reguladores epigenéticos estão frequentemente alterados em CHC. Essas alterações incluem mutações no gene *BRG1* (43, 46, 57). Recentemente, o modificador *HRAS histona-lisina* e *SETDB1 N-metiltransferase* foram identificados com expressão aumentada em CHC (58, 59). A expressão aumentada de

SETDB1 promove o crescimento de células tumorais e está associado com a maior agressividade da doença e pior prognóstico. Curiosamente, a metilação do DNA está alterada globalmente no CHC e modificações nos padrões de metilação estão associados ao prognóstico (60) e à infecção pelo VHB (61).

As vias de sinalização molecular do *RAS-RAF-MAPK* (MAP quinase) e o fosfatidilinositol 3-quinase (*PI3K*) - *Akt-mTOR* estão frequentemente ativadas em CHC. Essas alterações são causadas por amplificações genômicas de uma região do DNA que inclui os genes *FGF3*, *FGF4* e *FGF19* em aproximadamente 5% dos tumores, e também podem estar relacionadas com mutações de inativação em esclerose tuberosa 1 (*TSC1*) ou *TSC2* (3-8% dos casos), ou em fosfatase homóloga à tensina (*PTEN*) (1-3% dos casos). Mutações que causam a inativação da proteína ribossomal S6 quinase $\alpha 3$ (*RPS6KA3* ou *RSK2*) ocorrem em 5-9% dos casos e levam à ativação da sinalização da *RAS-MAPK* (42, 43), enquanto as mutações que ativam os genes da família *RAS* ou *BRAF* são raramente identificados (< 2 % dos casos) (39, 62).

Estudos genômicos demonstraram a existência de subclasses moleculares do CHC (63-66). Duas das principais classes moleculares, cada uma representando cerca de 50% dos pacientes, têm sido identificadas como: CHC proliferativo e não-proliferativo (63, 66, 67). A classe proliferativa é demonstrada pela ativação de *RAS*, sinalização do *mTOR* e fator de crescimento semelhante a insulina (*IGFs*) e amplificação do *FGF19*, associados a tumores VHB+ e ao mau prognóstico (65, 67, 68). Alguns autores têm demonstrado que existem dois subtipos da classe proliferativa: o grupo *WNT* fator de crescimento transformador- β e o grupo de células progenitoras. O grupo de células progenitoras é enriquecido em marcadores por células progenitoras, tais como moléculas de adesão celular epitelial e a expressão aumentada de α -fetoproteína (65, 67-69). Por outro lado, a classe não-proliferativa é mais heterogênea e possui um subtipo caracterizado por mutações em *CTNNB1* relacionados ao etilismo e a infecção pelo VHC (69).

1.2.4. Manifestações clínicas e patologia do CHC

O CHC pode apresentar quatro graus de diferenciação (classificação de Edmonson e Steiner, 1954) e cinco tipos histológicos diferentes; dentre eles: CHC esclerosante (70); carcinoma fibrolamelar (que apresenta maior facilidade para extração cirúrgica, portanto melhor prognóstico) (70, 71); carcinoma colangiocelular (72); hepatocolangiocarcinoma (73); hepatoblastoma (mais comum em crianças) (74).

O conhecimento da história natural da evolução do CHC tem importância na avaliação da eficiência das diferentes estratégias terapêuticas, uma vez que o prognóstico destes pacientes se encontra, em grande parte, influenciado pelo momento da realização do diagnóstico (21).

Em princípio, geralmente são tumores assintomáticos, descobertos durante exames de rotina em pacientes cirróticos. Naqueles sintomáticos, existe um amplo espectro de manifestações clínicas que dependerá principalmente da extensão da neoplasia e do grau de comprometimento da função hepática subjacente (75).

A maioria dos pacientes apresentam dor abdominal superior mal definida, podendo irradiar para o ombro direito, quando o tumor se situa no lobo superior direito; tumoração palpável no abdome à direita; distensão abdominal, emagrecimento progressivo; anorexia, perda do apetite; ascite; hepatomegalia; icterícia, mal-estar geral, sinais de encefalopatia hepática e hemorragia digestiva (75-78).

O prognóstico para os pacientes com CHC é, de maneira geral, difícil de ser determinado. A sobrevida depende da extensão do envolvimento tumoral e de outros fatores prognósticos (21, 79).

Nos pacientes que são portadores do tipo fibrolamelar do CHC, comumente não é observado a presença de hepatopatia crônica e normalmente o diagnóstico é feito a partir do achado de uma massa hepática assintomática (71).

A evolução natural do CHC é o aumento progressivo da massa primária até ela comprometer a função hepática ou evoluir com metástase, preferencialmente para os pulmões em primeiro lugar e a seguir, para outros locais como gânglios linfáticos intra-abdominais, ossos, linfonodos, cérebro, suprarrenal e outros órgãos provocando os sintomas e sinais correspondentes (80-84).

1.2.5. Diagnóstico e detecção precoce

Na avaliação inicial do paciente com suspeita de CHC faz-se necessário avaliar a presença de neoplasia, hepatopatias crônicas associadas e ressecabilidade. O diagnóstico do CHC pode ser feito por meio de exames de imagem, marcadores tumorais e anatomopatológicos (76, 85, 86).

Os testes de função hepática embora indispensáveis na avaliação inicial não têm valor diagnóstico no CHC, visto que a maioria dos pacientes se apresenta com alterações

decorrentes da hepatopatia de base. Sua importância se revela em estratificar os pacientes quanto ao risco e benefício do tratamento proposto e ao prognóstico (87).

Os protocolos de convocatória são cruciais para o sucesso dos procedimentos de vigilância. Consistem de um algoritmo definido a ser seguido quando os testes de vigilância mostram um resultado anormal. Esta definição deve ter em conta o alvo ideal da vigilância - isto é, a identificação do CHC numa fase muito precoce (2 cm ou menos) - quando os tratamentos radicais podem ser aplicados com maior probabilidade de cura a longo prazo (88).

Os estudos histológicos mostram que a maioria dos nódulos < 1 cm, detectados no fígado cirrótico, não são CHCs (90). Portanto, recomenda-se um seguimento frequente nestes casos (Figura 1). Uma regra aceita é considerar qualquer nódulo > 1 cm como um resultado de rastreio anormal (85). Estes novos nódulos devem acionar a estratégia de seguimento para o diagnóstico com critérios invasivos (biópsia) ou não-invasivos. Se um diagnóstico não for possível com critérios não-invasivos devido à aparência radiológica atípica, então é recomendada a biópsia (91).

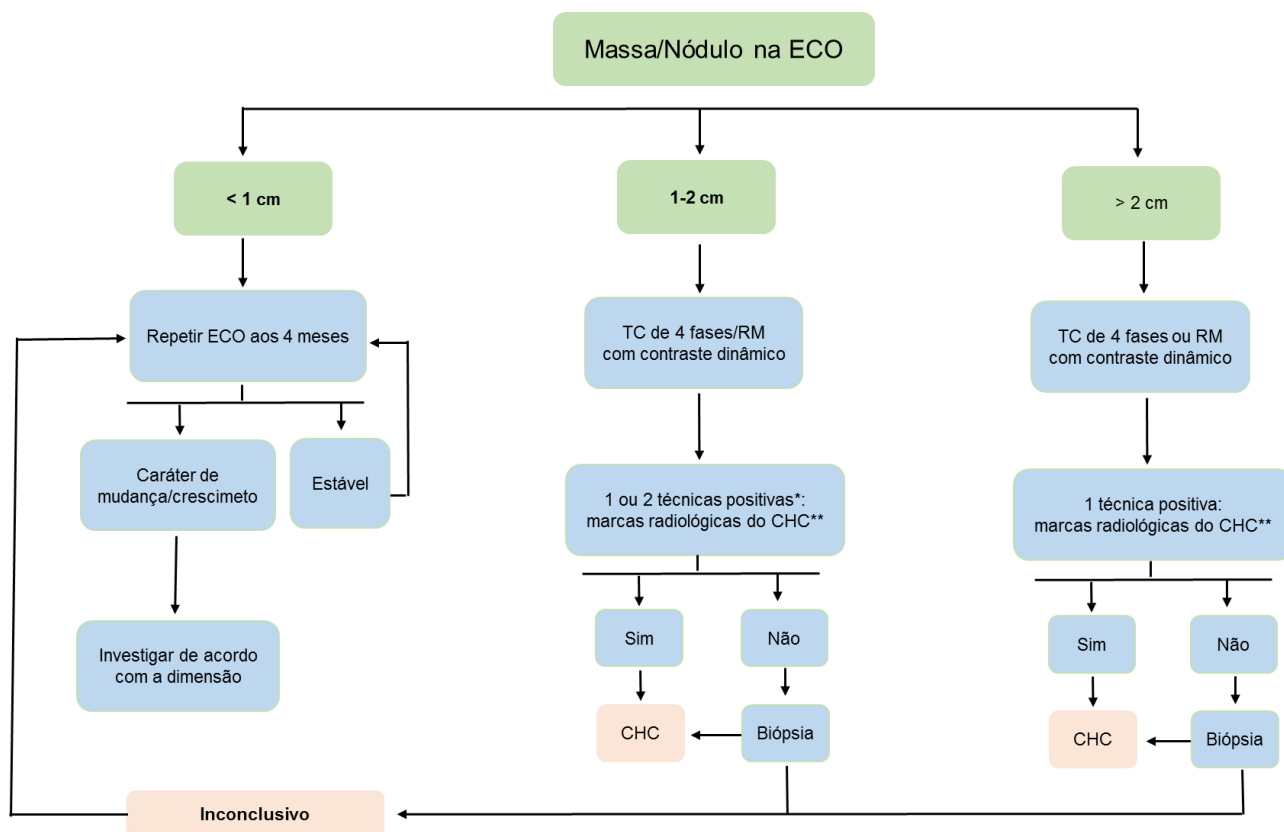


Figura 1 - Algoritmo de diagnóstico e protocolos. *Uma técnica imagiológica é recomendada apenas nos centros de excelência com equipamento radiológico de topo. **Marca radiológica do CHC: hipervascularização arterial e “washout” nas fases venosa/tardia. TC: tomografia computadorizada, RM: ressonância magnética. Adaptado de: EASL-EORTC, Eur J Cancer. 2012; 48(5):599-641. (91).

Exames de imagem

Ultrassonografia (USG): É o primeiro exame a ser realizado, pois não é invasivo e somente é útil para o rastreio e triagem do paciente. As principais limitações da USG devem-se a avaliação dificultada em pacientes obesos, quando o tumor se localiza subdiafragmamente e em fígado esteatótico e fibrose macronodular (92-94).

Nódulos encontrados na USG que são < 1 cm devem ser seguidos com USG em intervalos de 3-6 meses (nível III). Se não houver nenhum crescimento ao longo de um período de até 2 anos, pode-se reverter para a rotina (85).

Nódulos > 1 cm encontrados na triagem de USG de um fígado cirrótico devem ser investigados com ressonância magnética. Se as aparências são típicas de CHC (isto é, hipervascular na fase arterial com lavagem na fase venosa portal), a lesão deve ser tratada como um CHC. Se os resultados não são característicos ou o perfil vascular não é típico, um

segundo estudo com contraste com outra modalidade de imagem deve ser realizado, ou deve-se realizar biópsia (85).

Tomografia Computadorizada (TC): Apresenta melhor acurácia que a ultrassonografia, podendo visualizar lesões despercebidas pelo exame ecográfico.

Para lesões > 2cm com hipervascularização, lavagem tardia em um método de imagem. Lesões entre 1 e 2 cm com hipervascularização, lavagem tardia em um e ou dois métodos de imagem (89).

Esse método é muito útil para o diagnóstico, classificação e estadiamento, na caracterização dos grupos prognósticos e na elaboração do planejamento terapêutico (17, 94).

O CHC pode ser diagnosticado radiologicamente, sem a necessidade de biópsia, caso as características típicas de imagem estiverem demonstradas, sendo necessário a utilização de contraste. Na fase arterial, o CHC aumenta mais do que o fígado. Isto é porque, o sangue arterial no fígado é diluído pelo sangue venoso, que não contém contraste, enquanto que o CHC contém apenas sangue arterial. Na fase venosa, o CHC aumenta menos do que o fígado circundante pois o CHC não tem um fornecimento sanguíneo portal e o fluxo de sangue arterial através da lesão não contém mais contraste, enquanto que o sangue da porta hepática no fígado agora contém contraste. Isto é conhecido como "washout", embora o termo não descreve a sequência de eventos. Na fase tardia, a presença de "washout" persiste, e às vezes "washout" está presente apenas na fase tardia (85).

Ressonância nuclear magnética (RNM): A utilização desta técnica permite a melhor detecção do CHC, podendo demonstrar degeneração gordurosa do tumor e invasão vascular. Fornece melhor resolução imagiológica do fígado sem utilizar contrastes nefrotóxicos ou radiação ionizante e em pacientes com cirrose hepática, a RMN tem melhor sensibilidade e especificidade (95, 96).

Angiografia: As técnicas menos invasivas descritas anteriormente substituíram a angiografia convencional no diagnóstico do CHC, porém a angiografia continua a ser utilizada durante a quimioembolização de tumores e no controle do sangramento por ruptura de um CHC (85, 93).

PET scan: o papel do PET no diagnóstico e estadiamento do CHC permanece incerto. Os CHCs acumulam fluorodesoxiglicose (FDG) em graus variáveis, o que limita a sensibilidade do PET para tumores primários do fígado (97). Esta variabilidade limita a utilidade do PET no diagnóstico. A capacidade de distinção entre lesões hepáticas benignas e malignas é limitada pelos prováveis resultados falsos negativos e positivos (98).

Marcadores tumorais

Alfa-fetoproteína (AFP): A AFP é uma α 1-gamaglobulina produzida nos hepatócitos fetais e saco vitelino, e é o único marcador tumoral de significado clínico comprovado. A elevação deste marcador é encontrada na maior parte dos casos em tumores com mais de 5 cm de diâmetro bem como outras características do CHC como tamanho, estágio ou prognóstico. A AFP pode estar elevada na gravidez, nos tumores de origem gonadal e pode ocorrer em pacientes com doença hepática crônica sem CHC como hepatites virais crônica e aguda (99, 100).

A AFP é empregada para o seguimento dos pacientes tratados por ressecção ou ablação, pois como a regeneração do fígado normal não produz este marcador, a detecção de níveis elevados de AFP sugere uma doença residual e, no caso de uma elevação súbita após um período de normalização dos níveis séricos, pode indicar recidiva da doença (92).

Desgamacarboxiprotrombina (DCP): A DCP é medida pelo kit revisado de imunoenensaio enzimático (EIA) e tem correlação mais forte do que a AFP com tamanho e diferenciação histológica do CHC; esse marcador deve ser usado em combinação com a AFP porém, não é utilizado rotineiramente na prática clínica (101).

Biópsia percutânea

A biópsia percutânea de lesão hepática pode ser útil em pacientes com lesão hepática focal nos quais o diagnóstico é incerto e os resultados influenciariam a abordagem. A realização dessa técnica não é necessária em pacientes com imagem típica e elevação da AFP (102, 103).

1.2.6. Histopatologia

O fígado é constituído principalmente por células hepáticas ou hepatócitos. Os hepatócitos têm formato poliédrico e medem 20-30 μ m. Estes se agrupam em placas que se

anastomosam entre si formando unidades morfológicas chamadas lóbulos hepáticos. Os hepatócitos se dispõem em placas orientadas radialmente e cada placa é constituída por células dispostas em uma só camada (104). Cada lóbulo é uma massa poliédrica de tecido hepático. Os lóbulos se encostam uns nos outros em quase toda sua extensão. No entanto, em algumas regiões, os lóbulos ficam separados por tecido conjuntivo e vasos. Estas regiões ocupam os cantos do poliedro e recebem o nome de espaços-porta (79).

O CHC é um tumor epitelial derivado dos hepatócitos e seu parênquima é formado por células neoplásicas arranjadas em um padrão trabecular ou acinar em meio a pouca quantidade de estroma (Figura 2) (105).

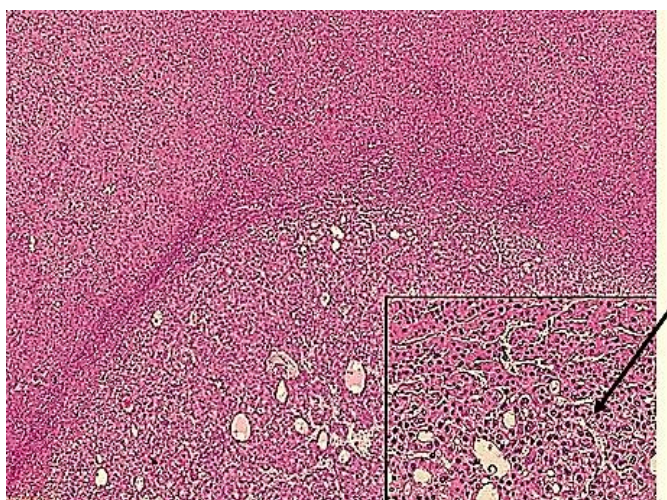


Figura 2 - Cortes histológicos representativos de carcinoma hepatocelular bem diferenciado (hematoxilina e eosina - HE, x 200); Retirado de: Schlageter M et al, World J Gastroenterol. 2014; 20(43):15955-64. (106).

O CHC pode ser classificado quanto a sua forma de apresentação, tamanho ou quanto ao padrão de crescimento: lesão focal; múltiplos nódulos; doença infiltrativa difusa (107).

Os padrões de crescimento histológicos mais comuns são: trabecular, pseudoglandular ou acinar, padrão sólido, formação de células gigantes e tecido hepático histologicamente normal (Figura 3) (106).

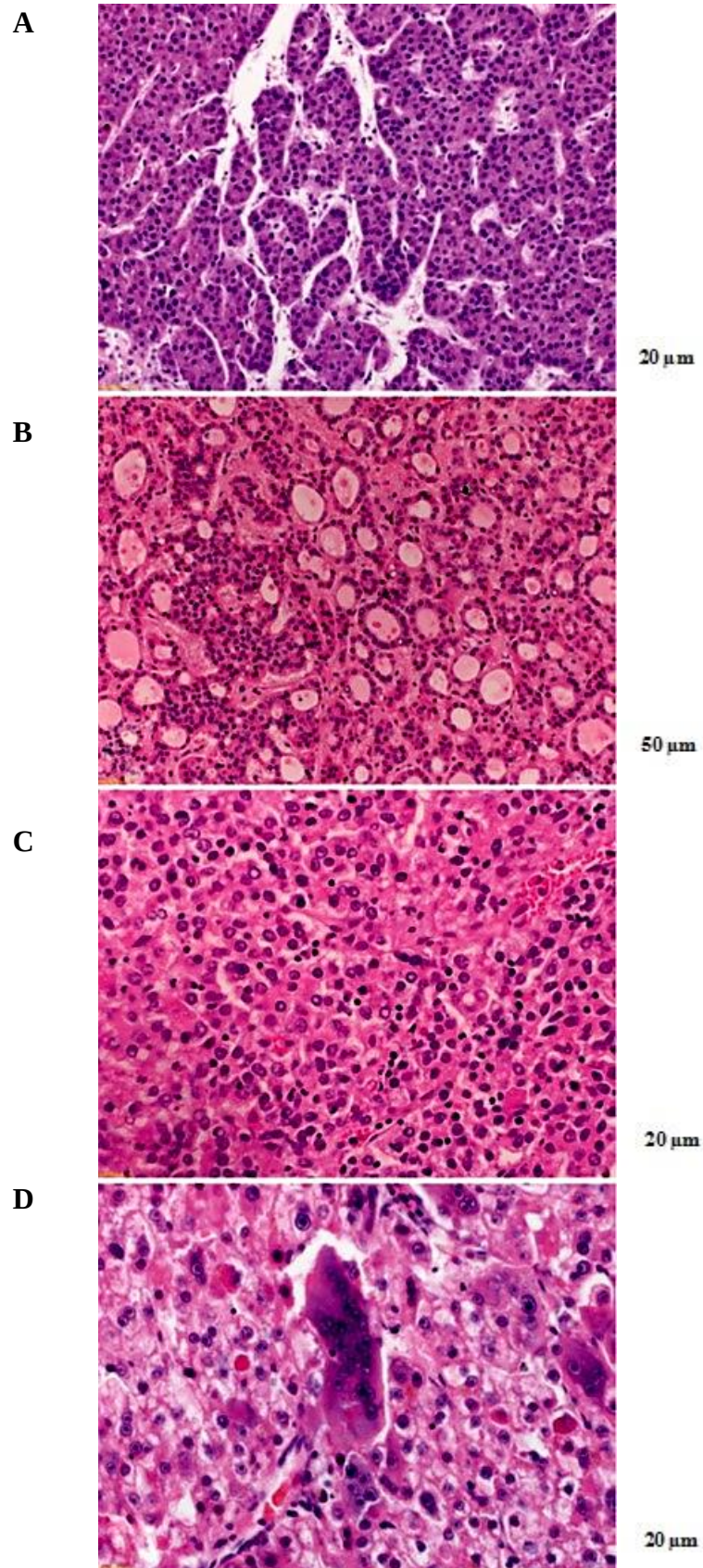


Figura 3 - Padrões de crescimento do carcinoma hepatocelular. A: CHC com padrão de crescimento trabecular (HE, x 300); B: CHC com padrão de crescimento pseudoglandular (HE, x 100); C: CHC

com padrão de crescimento sólido (HE, x 200); D: CHC com formação de células gigantes (HE, x 200). Retirado de: Schlageter M et al, World J Gastroenterol. 2014; 20(43):15955-64. (106).

Os CHC variam de bem diferenciados a lesões indiferenciadas altamente anaplásicas. Nos tumores bem diferenciados e moderadamente diferenciados, células reconhecíveis como de origem hepatocítica estão dispostas em um padrão trabecular ou em um padrão acinoso pseudoglandular. As formas pouco diferenciadas representam a forma mais maligna do CHC primário. As células dessa forma tumoral podem assumir um aspecto pleomórfico com numerosas células gigantes anaplásicas, podendo tornar-se células pequenas e completamente indiferenciadas, ou assemelhar-se a um sarcoma de células fusiformes (108).

Uma variedade típica do CHC é o carcinoma fibrolamelar ocorrendo geralmente em adultos jovens, homens e mulheres, não tendo associação com o VHB e VHC ou fatores de risco de desenvolvimento de cirrose e, na maioria das vezes, tem melhor prognóstico. Ao exame microscópico, observa-se um composto de células poligonais bem diferenciadas crescendo em ninhos ou cordões e separadas por lamelas paralelas de feixes colágenos densos (109).

Após a lesão hepática causada por qualquer um dos vários fatores de risco, ocorre o desenvolvimento de necrose seguida pela proliferação dos hepatócitos. Ciclos contínuos deste processo destrutivo-regenerativo promove uma condição de doença hepática crônica terminando com o desenvolvimento da cirrose hepática. A cirrose é caracterizada pela formação de nódulos hepáticos anormais rodeados por deposição de colágeno e formação de cicatrizes no fígado (110).

1.2.7. Estadiamento e fatores prognósticos no CHC

Na determinação do prognóstico de pacientes com cirrose, os parâmetros da avaliação da doença hepática crônica, como os usados na classificação de Child-Pugh, são incorporados na maioria dos critérios de classificação do CHC, incluindo *CLIP (Cancer of the Liver Italian Program Score)*, *JIS (Japan Integrated Staging Score)*, *CUPI (Chinese University Prognostic Index)* e *French Prognostic Classification* (111-114).

O CHC tem um diferencial em relação à grande parte dos outros cânceres, pois o prognóstico e tratamento não dependem apenas das características inerentes ao tumor, mas também do grau da doença hepática de base (1, 115).

O índice de Child-Pugh, tem maior utilidade como avaliação do prognóstico na cirrose. Embora tenha sido usado originalmente para prever a mortalidade durante a

cirurgia, a escala é usada atualmente para determinar o prognóstico e tratamento. Essa classificação é uma tentativa de agrupar em uma única classificação alguns dos fatores mais significativos no paciente com cirrose, para prever o risco de submeter os mesmos ao tratamento cirúrgico (116, 117). O índice de Child-Pugh leva em consideração os níveis de bilirrubina, o tempo de protrombina, níveis de albumina, o grau de ascite e encefalopatia dos pacientes, e os divide em três grupos: A, B e C, conforme a gravidade da insuficiência hepática. Assim, baseando-se na função hepática global, essa classificação discrimina os pacientes quanto ao seu risco em um procedimento. Pacientes classificados como Child-Pugh A, e alguns poucos selecionados da classe B ficam livres de contraindicação para cirurgia, enquanto que os pacientes da classe C, com número de plaquetas abaixo de 50.000/mm³ e hipertensão portal não são candidatos à cirurgia (118, 119).

Nos anos 2000, uma nova metodologia de estadiamento, o sistema *Model for End-Stage Liver Disease (MELD)*, se tornou uma opção à classificação Child-Pugh, e cada vez mais vem sendo aceita como sua substituta, uma vez que conta apenas com variáveis objetivas, comparado com a Child-Pugh (120).

A seleção do melhor tratamento para os pacientes com CHC é resultado da avaliação de diversos fatores, dos quais os mais relevantes são o estadio tumoral e a função hepática. São descritas várias ferramentas para estadiamento clínico do CHC (121).

Um sistema utilizado para o estadiamento é o TNM que leva em consideração: tamanho, multifocalidade, envolvimento vascular, metástases à distância e a fibrose no fígado subjacente (Tabela 1) (39, 122, 123).

Têm sido propostos inúmeros sistemas de determinação do prognóstico do CHC, porém, nenhum é adaptado universalmente (112, 124-127). Foram reconhecidas quatro características como determinantes da sobrevida dos pacientes: a gravidade da doença hepática subjacente, o tamanho do tumor, a extensão do tumor para estruturas adjacentes e a presença de metástases (112, 128).

A importância da cirrose subjacente foi demonstrada em um estudo de Hong Kong, que descreveu a expectativa de sobrevida dos pacientes com CHC de acordo com o sistema TNM e o tamanho tumoral em pacientes com e sem cirrose relacionada com a hepatite B (85, 129).

Tabela 1 - Estadiamento clínico do carcinoma hepatocelular (CHC) - TNM, American Joint Committee on Cancer (AJCC).

Estadio do Carcinoma Hepatocelular

Tumor

T: tumor primário

Tx: tumor primário não avaliado

T0: não há evidência de tumor primário

T1: tumor único sem invasão vascular

T2: tumor único com invasão vascular ou tumores múltiplos, nenhum deles com mais de 5 cm em sua maior dimensão

T3: tumores múltiplos, com mais de 5 cm em sua maior dimensão ou tumor envolvendo ramo principal da veia porta ou veia hepática

T4: tumor com invasão direta de órgãos adjacentes, que não a vesícula biliar ou com perfuração do peritônio visceral

Nódulo

N: linfonodos regionais

Nx: linfonodos regionais não podem ser avaliados

N0: ausência de metástase em linfonodos regionais

N1: metástase em linfonodos regionais

Metástase

M: a presença de metástase a distância não pode ser avaliada

Mx: metástase a distância não pode ser avaliada

M0: ausência de metástase a distância

M1: metástase a distância

Classificação

Estágio I: T1N0M0

Estágio II: T2N0M0

Estágio IIIA: T3aN0M0

Estágio IIIB: T3bN0M0

Estágio IIIC: qualquer T, N1M0

Estágio IV: qualquer T, qualquer N, M1

Grau histológico

G1: bem diferenciado

G2: moderadamente diferenciado

G3: pouco diferenciado

Retirado de: Del Pozo AC, López P, Clin Liver Dis. 2007; 11(2):305-21. (130). *American Joint Committee on Cancer (AJCC) / Union for International Cancer Control (UICC)* (2010).

A classificação de Okuda tem como objetivo prever a média de sobrevida de pacientes com CHC não submetidos a qualquer tipo de tratamento clínico ou hepatectomia. Em 1985, Okuda e cols. propuseram uma classificação que leva em consideração as características do CHC e projeta uma expectativa de sobrevida dos pacientes conforme essas características. Estas incluem além do tamanho do tumor, a presença de ascite, níveis de albumina e bilirrubina. Atualmente questiona-se a eficácia deste sistema de estadiamento, pois na época em que foi proposto os pacientes eram diagnosticados tardiamente, já com doença avançada (125).

Com base em quatro parâmetros, o estadiamento do tumor e o prognóstico dos pacientes é estimado em semanas. A ressalva em relação a essa classificação é que os tratamentos clínicos evoluíram muito desde 1985, em especial com o surgimento de novos agentes quimioterápicos, o aprimoramento das técnicas de quimioembolização e de tratamentos percutâneos (125, 128).

A classificação de *CLIP (Cancer of the Liver Italian Program)* possibilita uma melhor avaliação da sobrevida dos pacientes com CHC. É um índice que soma de 0 a 6 e integra a classificação de Okuda e cols. e o índice de Child-Pugh (131).

Um novo critério prognóstico foi validado, o *CUPI (Chinese University Prognostic Index)*. Este sistema é composto por alguns fatores os quais são: TNM, bilirrubina total, fosfatase alcalina, alfafetoproteína e doença assintomática. Com base na soma dos valores atribuídos a cada fator, os pacientes são divididos em três grupos de risco: baixo, intermediário e alto, estabelecendo estimativa de sobrevida. Estudos afirmam que o CUPI tem um alto valor preditivo de sobrevida (114).

Ainda não há consenso sobre qual o melhor sistema de estadiamento na determinação do prognóstico dos pacientes com CHC (101, 132). De modo geral, os sistemas de estadiamento patológico como o TNM preveem melhor o prognóstico do que os sistemas clínicos, particularmente ao avaliar os resultados da ressecção cirúrgica. Apenas o sistema de estadiamento da AJCC é validado em coortes independentes, de pacientes submetidos à ressecção hepática ou transplante (133).

O sistema de estadiamento mais amplamente utilizado é o Sistema de Barcelona (*Barcelona Clinic Liver Cancer - BCLC*) (121) o qual é padronizado internacionalmente e recomendado pela Associação Americana para o Estudo das Doenças do Fígado (AASLD) e da Associação Europeia para o Estudo do Fígado (EASL), e baseia-se apenas em parâmetros clínicos para definição de tratamento e previsão prognóstica, estadiamento tumoral, função hepática e o estado do paciente, podendo ser aplicado à maioria dos pacientes com CHC (76, 127). Em 2012, a EASL em conjunto com a Associação Europeia para o estudo e tratamento do câncer (EORTC), publicaram as diretrizes clínicas para a vigilância, o diagnóstico e as estratégias terapêuticas do CHC, atualizando o painel de recomendações proposto em 2001 (85) e até agora usado (39, 91).

O BCLC classifica o CHC em muito precoce, precoce, intermediário, avançado e terminal, baseado nos critérios de Child-Pugh, estado funcional, tamanho tumoral, multifocalidade e a presença de invasão da veia porta. Os pacientes com doença em estágios muito precoce e precoce são passíveis de modalidades de tratamento curativas, incluindo a ressecção, o transplante hepático, a injeção percutânea de etanol ou a ablação por radiofrequência (76, 91, 134).

Outros sistemas de estadiamento aplicados isoladamente ou em combinação com BCLC não são recomendados na prática clínica (91, 134).

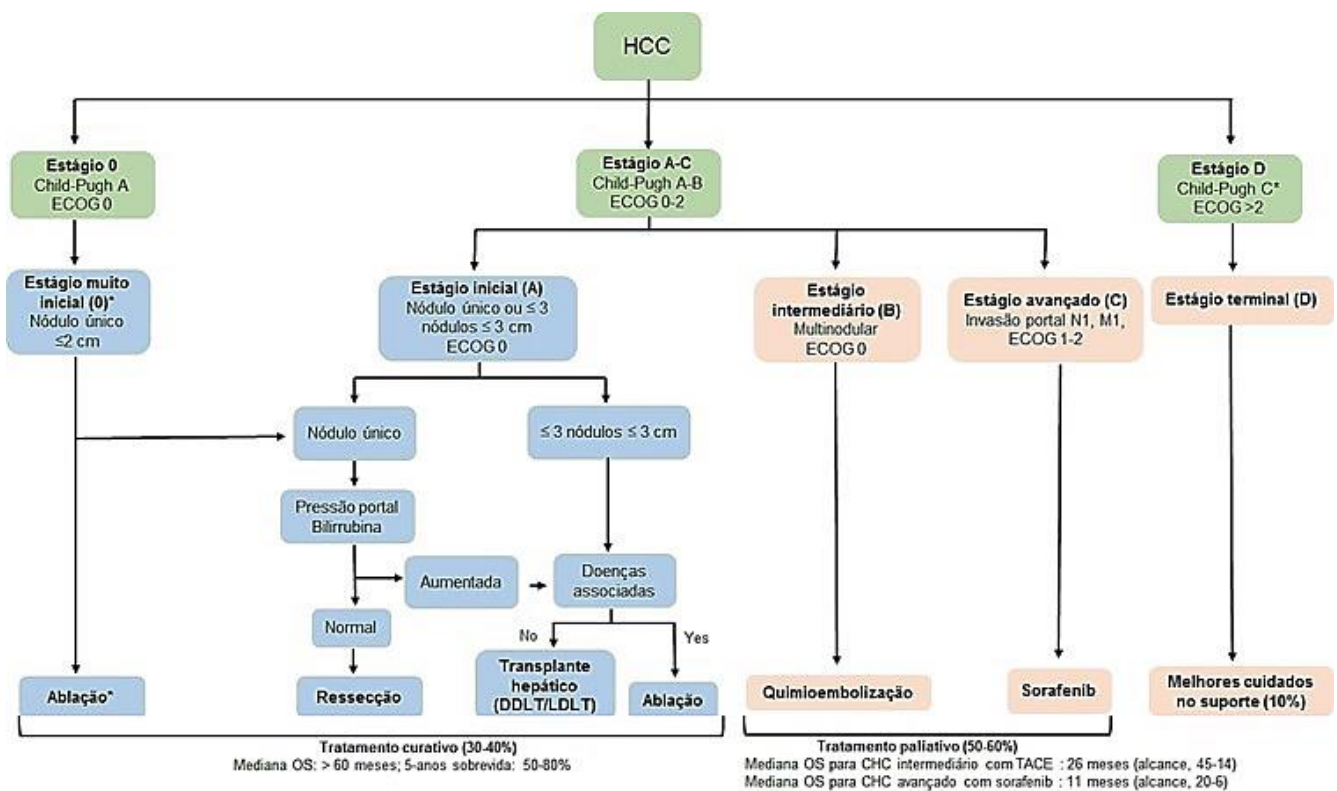


Figura 4 - Sistema de Barcelona para estadiamento clínico e estratégia terapêutica em câncer hepático (*Barcelona Clinic Liver Cancer Staging System*- BCLC). A classificação do BCLC consiste em cinco etapas para selecionar os melhores candidatos para as melhores terapias disponíveis atualmente. Pacientes com tumores iniciais assintomáticos (estádio 0-A) são candidatos para terapias radicais (ressecção, transplante ou ablação local). Pacientes assintomáticos com CHC multinodular (CHC; fase B) são enquadrados para o procedimento de quimioembolização, enquanto os pacientes com tumores sintomáticos avançado e/ou um padrão tumoral invasivo (etapa C) são candidatos a receber Sorafenib. A doença em estágio final (etapa D) inclui pacientes com prognósticos pobres. DDLT (transplante hepático de doador falecido); ECOG, (*Eastern Cooperative Oncology Group*); LDLT (transplante hepático de doador vivo); M1 (metástase M1); N1 (linfonodo N1); OS (sobrevida global). * Para os pacientes em fases muito inicial (estágio 0) pode ser realizado inicialmente a ablação, caso o paciente tenha contraindicação para o transplante de fígado. # O paciente classe C de Child-Pugh deve ser considerado em primeiro lugar para o transplante de fígado. Adaptado de: Bruix J et al, *J Hepatol*, 2015; 62 (1 Suppl): S144-56. (17). Liver EAfSo, Cancer EOFRaTo, *Eur J Cancer*, 2012; 48(5):599-41. (91). Liver EAFTSOT, Cancer EOFRATO, *J Hepatol*, 2012; 56(4):908-43. (134).

Uma questão crítica no desenvolvimento de um plano terapêutico para os pacientes com CHC, é o reconhecimento de que grupos de pacientes com fatores de mau prognóstico, podem ser submetidos a um tratamento agressivo e obterem excelentes resultados clínicos (135).

1.2.8. Tratamento

Em estadios iniciais da doença é possível aplicar tratamentos com intenção curativa como a hepatectomia, o transplante hepático e a ablação (136, 137). Por ordem de eficácia, os diferentes tratamentos com intenção curativa são o transplante hepático, a ressecção hepática, a terapia ablativa ou de destruição local (como radiofrequência, crioterapia e alcoolização) (91, 134). Nos pacientes sem condições de cura, a quimioembolização arterial hepática demonstrou eficácia paliativa na estabilização da doença de alguns pacientes e em tratamentos com quimioterapia sistêmica ainda não foi demonstrado um benefício real (76, 87).

O transplante hepático é considerado como opção de tratamento de primeira linha para CHC em pacientes cirróticos, por tratar tanto o tumor quanto sua causa de base, no entanto, só pode ser realizado na ausência de doença extra-hepática (87). No intuito de otimizar o tratamento do CHC pelo transplante hepático, critérios estabelecidos por Bismuth em 1993 (138), e modificados por Mazzaferro em 1996 (139) (critérios de Milão), foram utilizados para determinar quais pacientes seriam mais beneficiados por esta modalidade terapêutica (20, 21, 91, 134, 140, 141).

A ressecção cirúrgica, procedimento conhecido como hepatectomia, é considerado um tratamento potencialmente curativo e como primeira linha de tratamento para pacientes Child Pugh A, sem hipertensão portal e com tumores ressecáveis. Na cirrose hepática descompensada, a ressecção cirúrgica está formalmente contraindicada, sendo necessária inicialmente avaliação para transplante (95, 137, 142-145).

As terapias de destruição local são menos eficazes no controle tumoral em relação às ressecções cirúrgicas. A alcoolização com etanol a 95% provoca danos tumorais por gerarem necrose (75, 91, 134)

O método de radiofrequência que utiliza agulhas com eletrodos específicos é uma técnica utilizada com auxílio de exames de imagem como ultrassonografia ou tomografia computadorizada, destruindo localmente as lesões pelo calor. É um método indicado com intenção curativa para nódulos menores de 3 cm (21, 75, 146).

A destruição tumoral por meio de congelação (crioterapia) utiliza temperaturas muito baixas para causar dano celular nos tumores. Da mesma forma que a radiofrequência, a crioterapia possui baixas taxas de complicações (21, 91, 134).

As recomendações para uso de ablação local por radiofrequência ou injeção percutânea de etanol, são para aqueles pacientes estadiados como BCLC precoces, não

candidatos à cirurgia sendo recomendada como principal terapia ablativa devido a um controle significativamente melhor da doença (91, 134).

A quimioembolização é recomendada para pacientes estadiados como BCLC intermediários, multinodulares, assintomáticos, sem invasão vascular ou disseminação extra-hepática não podendo ser utilizada em pacientes com doença hepática descompensada ou doença extra-hepática (147, 148).

O tratamento sistêmico com drogas citotóxicas, Tamoxifeno, Acetato de Megestrol, Antiandrógenos, Interferon-alfa e Análogos da Somatostatina não apresentaram bons resultados até o momento, tanto pela limitação clínica dos pacientes quanto pela resposta a quimioterapia (21, 76, 77).

A droga Sorafenib é usada como terapia sistêmica padrão para o CHC, sendo indicada para pacientes com função hepática preservada, pacientes não operáveis e com neoplasias avançadas sendo para esses, uma terapia de primeira linha caso não possam utilizar terapias que são potencialmente mais eficazes (85, 149, 150).

Como tratamento de segunda linha, para os pacientes com intolerância ou falha ao Sorafenib, atualmente está sendo utilizado o Regorafenib que é um inibidor da multikinase oral atuando no bloqueio da atividade das proteínas cinases envolvidas na angiogênese, oncogênese e no microambiente do tumor (151, 152).

O Regorafenib mostrou atividade antitumoral e um perfil de segurança gerenciável na fase II do estudo de pacientes com CHC que progrediram durante o tratamento com Sorafenib (<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01774344>). (151)

Tabela 2 - Terapias dirigidas em carcinoma hepatocelular.

Fármaco	Tipo de fármaco	Alvo molecular	Via de sinalização afetada
Sorafenibe	Inibidor TC	VEGFR, PDGFR, RAF	VEGFR,PDGFR
Sunitinibe	Inibidor TC	VEGFR, PDGFR, c-kit	VEGFR, PDGFR, c-kit
Bevacizumabe	Anticorpo monoclonal ao ligando	VEGFR	VEGFR
Cetuximabe	Anticorpo monoclonal ao ligando	EGFR	EGFR
Trastuzumabe	Anticorpo monoclonal ao receptor	Her-2/neu	Her-2/neu
Erlotinibe	Inibidor TC	EGFR	EGFR
Gefitinibe	Inibidor TC	EGFR	EGFR
Lapatinibe	Inibidor TC	Her-2/neu	Her-2/neu
Rapamicina	Inibidor quinase ST	mTOR	PI3K/Akt/mTOR
Everolimus	Inibidor quinase ST	mTOR	PI3K/Akt/mTOR
XL-765	Inibidor quinase ST	PI3K	PI3K/Akt/mTOR
Selumetinibe	Inibidor MEK	RAS-RAF-MEK-ERK	RAS-RAF-MEK-ERK
Refametinibe	Inibidor MEK	RAS-RAF-MEK-ERK	RAS-RAF-MEK-ERK
Cabozantinibe	Inibidor MET	MET	MET
Tivantinib	Inibidor MET	MET	MET
Brivanib	Inibidor VEGF e FGF	VEGF e FGF	VEGF e FGF

EMA (Agência Europeia de Medicamentos); FDA (*Food and Drugs Administration*); TC (tirosina quinase); ST (serina/treonina); VEGFR (fator de crescimento endotelial vascular); PDGFR (fator de crescimento derivado de plaquetas); MAPK (proteína-quinases ativado por mitógenos) mTOR (proteína-alvo da rapamicina em mamíferos); PI3K (fosfatidilinositol 3-quinase); Akt (proteína quinase B). Retirado de: Schlageter M et al, *World J Gastroenterol*, 2014; 20(43):15955-64. (106). Zender L, Kubicka S, *Onkologie*, 2008; 31(10):550-55 (153). Thomas MB et al, *Cancer* 2007; 110(5):1059-67. (154). Zhu AX et al. *Cancer*, 2007; 110(3):581-89. (155). Liu L et al, *Cancer Res*, 2006; 66(24):11851-58. (156). Faivre S et al, *Lancet Oncol*, 2009; 10(8):794-800. (157). Papaetis GS, Syrigos KN, *BioDrugs*, 2009; 23(6):377-89. (158). Selumetinibe (159-162). Tivantinib (163-166). Brivanib (167, 168).

Aproximadamente 40% dos pacientes (fases iniciais 0 e A) são elegíveis para terapias potencialmente curativas como a ressecção cirúrgica, transplante ou ablação local. Esses tratamentos podem oferecer taxas de sobrevida média de 60 meses, comparado a uma sobrevida de história natural de 36 meses. Para pacientes com doença mais avançada, apenas dois tratamentos têm demonstrado vantagens com relação a ensaios clínicos randomizados.

Os pacientes em estágio intermediário (fase B), com função hepática preservada são beneficiados pela quimioembolização (169, 170) e têm uma sobrevida média estimada de 26 meses. Os pacientes em estágio avançado (estágio C) necessitam de Sorafenib sistêmico, o que prolonga a sobrevida em aproximadamente 3 meses (149).

Na oncologia clínica atual, testes moleculares para genotipagem do tumor são recomendados para a tomada de decisões terapêuticas mais eficazes com a utilização de terapias com alvos moleculares (171, 172). Em CHC, estudos recentes têm demonstrado uma ampla visão do perfil mutacional e identificaram de 30-40 alterações moleculares por tumor, entre os quais 6-8 são condutores da tumorigênese no entanto, ainda não foram identificados painéis de biomarcadores clinicamente úteis para pacientes com CHC (172).

Novas terapias moleculares

Sinalização do RAS: A sinalização da via *RAS-RAF-MEK-ERK* desempenha um papel fundamental na proliferação celular e tem sido implicada no câncer de pâncreas e melanoma (159, 160). Apesar das mutações em *RAF/MAPK* serem incomuns em CHC, a ativação da sinalização de *Ras/MAPK* tem sido descrita em CHC avançado (161). Considerando esses achados, inibidores de *MEK* tais como o Selumetinibe (*AZD6244*, *ARRY-142886*) e Refametinibe foram testados em pacientes com CHC avançado (162).

Um estudo de fase II realizado em pacientes asiáticos com CHC avançado mostrou uma progressão mediana de 122 dias e sobrevida global de 290 dias. Usando a tecnologia de irradiação, 4 dos 69 pacientes tinham mutações em *RAS* e 3 destes atingiram uma resposta parcial à terapia alvo (163).

Sinalização de *MET*: Terapias enfocadas em *MET* também estão sendo estudadas em CHC. A ativação da sinalização de *MET* em CHC avançado, por meio de diferentes mecanismos, ocorre em aproximadamente 50% dos casos (164, 165). O Cabozantinibe um inibidor de *MET*, foi aprovado para uso em estudos clínicos com o objetivo de suprimir o crescimento de tumores primários e metástases (166).

Novas estratégias que incorporem biomarcadores preditivos e o desenvolvimento de terapêuticas mais precisas são necessários para pacientes com CHC (172). Apesar dos avanços nas estratégias de diagnóstico e tratamento, a maioria dos pacientes ainda são diagnosticados em estádios avançados da doença o que diminui significativamente a sobrevida, dessa forma, o CHC ainda é um problema clínico importante. O tratamento do CHC sofreu muitas mudanças na última década e tornou-se uma grande área para pesquisa.

Os pacientes podem se beneficiar de opções efetivas que poderão melhorar a sua sobrevivência, independente do estágio evolutivo ao diagnóstico (173).

Avanços recentes na área da biologia molecular têm levado à identificação de uma gama de alterações genéticas e epigenéticas e vias moleculares implicadas no desenvolvimento e progressão do CHC. A identificação de alterações genômicas e epigenômicas adicionais, tais como alterações em moléculas reguladoras da expressão gênica, têm o papel de levar ao desenvolvimento de melhores estratégias de diagnóstico e tratamento para os pacientes com CHC (13).

1.3. Moléculas reguladoras da expressão gênica: microRNAs

Estudos envolvendo biomarcadores e alvos terapêuticos têm evidenciado o papel biológico dos RNAs não codificadores (ncRNA), no desenvolvimento e progressão de neoplasias humanas (174).

De acordo com o seu tamanho, os ncRNAs são divididos em duas classes principais: os ncRNAs pequenos (< 200 nucleotídeos) e os ncRNAs longos (lncRNAs >200 nucleotídeos). Os ncRNAs pequenos, especialmente os microRNAs (miRNAs), têm sido o foco da maioria dos estudos (2002-2016), sendo associados ao desenvolvimento de diversas doenças, incluindo o câncer (175, 176).

Os microRNAs são pequenos RNAs de aproximadamente 18-25 nucleotídeos de comprimento, não codificadores de proteínas, transcritos a partir do DNA e com papel na regulação pós-transcricional da expressão gênica (24, 177).

A biogênese dos miRNAs tem início com um transcrito primário longo (pri-miRNA) em forma de grampo (hairpin), o qual é sintetizado pela enzima RNA polimerase II, a partir do DNA genômico. No núcleo celular, a enzima Drosha (uma RNase III) cliva este pri-miRNA, formando um complexo de ~650KDa acoplado ao co-fator *DGCR8* (Di George syndrome critical region 8) (178, 179).

O *DGCR8* contém dois domínios de ligação de RNA dupla fita (dsRNA). A atividade desse complexo em uma molécula de pri-miRNA resulta em um miRNA precursor (pré-miRNA) em forma de hairpin e de ~70 a 100 nucleotídeos de comprimento (179, 180). Posteriormente a proteína Exportina-5 exporta o pré-miRNA do núcleo para o citoplasma, onde a enzima Dicer (RNase III) em conjunto com o complexo *TRBP* (*transactivating response RNA-binding protein*), cliva a região do loop originando um RNA de fita dupla (dsRNA) de ~22 nucleotídeos; essa molécula é denominada miRNA. O miRNA maduro de

fita simples é então incorporado ao complexo de silenciamento induzido por RNA (RISC, do inglês *RNA-Induced Silencing Complex*) (179, 181). O complexo *RISC* contém uma família de proteínas denominada Argonauta (*Ago 1 e Ago 2*) e a proteína *TRBP* (179, 182).

Como resultado desse processo, a fita funcional do miRNA maduro é capaz de regular a expressão gênica em nível pós-transcricional; essa atividade ocorre pela ligação, por pareamento complementar de bases, da extremidade 5' do miRNA (denominado de sequência *seed*) à extremidade 3' não traduzida (3' UTR) do mRNA, levando à inibição da tradução do mRNA por homologia incompleta ou à degradação do mRNA por homologia completa (26).

Interessantemente, miRNAs podem se ligar a ribonucleoproteínas na sequência *seed* de modo independente ao RISC, e consequentemente, interferir na ligação miRNA-mRNA resultando na ativação da tradução. Foi demonstrado que os miRNAs também podem regular a expressão gênica em nível transcricional, pela ligação direta com o DNA (179).

Os miRNAs constituem moléculas com papel relevante na regulação da expressão gênica (182-186). No câncer, os miRNAs atuam como moléculas reguladoras agindo de forma similar a oncogenes ou a genes supressores tumorais, sendo denominados oncomiRs (177, 180).

Atualmente, foram identificados 2.588 miRNAs maduros no genoma humano (Banco de dados miRBase, <http://www.mirbase.org/cgi-bin/browse.pl?org=hsa>), sendo que miRNAs são encontrados em localizações genômicas tais como regiões intrônicas de transcritos não codificadores ou codificadores (tais miRNAs compartilham o promotor gênico), regiões exônicas de transcritos não codificadores ou codificadores, além de miRNAs que constituem íntrons (miRtrons) (187, 188).

Diferentes mecanismos podem levar à desregulação dos miRNAs como deleções genômicas, amplificações, mutações e polimorfismos, alterações na transcrição ou na maquinaria da biogênese e modificações epigenéticas (189).

A descoberta dos miRNAs como reguladores da expressão gênica e do seu papel na tumorigênese têm evidenciado os miRNAs como biomarcadores úteis no diagnóstico, prognóstico e como potenciais alvos terapêuticos no câncer humano (190-193). Por serem moléculas pequenas e estarem associados ao complexo *RISC*, os miRNAs são moléculas estáveis e podem ser detectadas em amostras quimicamente degradadas, tais como tecidos fixados em formalina e emblocados em parafina (FFPE) e também são detectáveis em fluidos corporais, como no plasma e soro. Adicionalmente, os miRNAs têm expressão tecido-específica e podem ser detectados utilizando pequenas quantidades de RNA (194).

Estas características tornam os miRNAs moléculas interessantes para o estudo de biomarcadores. Além disso, o seu envolvimento na tumorigênese sugere sua utilidade para o melhor entendimento de vias moleculares envolvidas na patogênese do câncer.

1.4. *MicroRNAs como biomarcadores no câncer*

Os miRNAs atuam em importantes processos biológicos, tais como o desenvolvimento embrionário, a diferenciação celular, proliferação e apoptose e têm sido implicados na iniciação, progressão e metástase (7, 186, 195, 196). É importante ressaltar que os miRNAs têm sido sugeridos como potenciais biomarcadores de diagnóstico e prognóstico, clinicamente aplicáveis em câncer incluindo o CHC (190, 197-200).

Vários estudos realizados na última década têm sido dedicados à avaliação quantitativa e qualitativa da expressão dos miRNAs e têm mostrado alterações consideráveis nos seus perfis de expressão em várias doenças (201).

A expressão dos miRNAs pode ser regulada em múltiplos níveis. Ao nível transcricional, a expressão dos genes de miRNAs podem mudar em conjunto com (miRNAs intragênicos), ou independentemente dos seus genes hospedeiros (miRNAs intergênicos) (201).

Os miRNAs intergênicos têm os seus próprios promotores. São expressos independentemente e podem ser regulados por fatores de transcrição separados. Em ambos os casos, a expressão do miRNA pode mudar devido a mutações diferentes ou pode ser regulada pela metilação do promotor (202). No nível pós-transcricional, a expressão do miRNA pode ser sobre-expressa devido a alterações na atividade das enzimas chave da biogênese dos miRNAs, tais como a Dicer e Drosha (203). A atividade destas enzimas pode também ser afetada por mutações ou modificações epigenéticas. Além disso, compostos químicos de origem endógena (hormônios, citocinas) e de origem exógena (xenobióticos), podem alterar a expressão dos miRNAs. A ativação de receptores nucleares por xenobióticos como seus ligantes pode induzir a expressão tanto de miRNAs intergênicos como intragênicos (201, 204).

Vários estudos demonstraram a expressão desregulada dos miRNAs associada à patogênese do câncer. Alterações na expressão de miRNAs podem ocorrer devido a diferentes mecanismos em nível genômico, tais como anormalidades cromossômicas (amplificações, deleções ou translocação), mutações e polimorfismos (SNPs), desregulação transcricional,

defeitos na maquinaria da biogênese ou modificações epigenéticas (alterações na metilação e remodelação da cromatina) (196).

Estudos em larga escala mostraram que os miRNAs são úteis como biomarcadores moleculares, pois apresentam assinaturas de expressão diferencial entre células normais e neoplásicas, contribuindo com a classificação de doenças (175). Um dos primeiros estudos que associou o papel dos miRNAs na tumorigênese humana foi em leucemia linfocítica crônica, onde constatou-se que os miRNAs miR-15a e miR-16 estão mapeados na região 13q 14, uma região de deleção característica na leucemia linfocítica crônica. Esse achado associou essa deleção com a perda da expressão desses miRNAs e, consequentemente, a perda do controle da expressão do gene *BCL2* (*B-cell CLL/Lymphoma 2*), o qual apresenta papel biológico anti-apoptótico em algumas células, tais como os linfócitos (180). Esse e outros estudos evidenciaram que os miRNAs estão frequentemente localizados em regiões de ganhos e perdas genômicas relacionadas ao câncer (179). Interessantemente, um estudo de genoma total identificou alterações no número de cópias do DNA associadas à desregulação da expressão de 41 miRNAs em diferentes tipos de câncer incluindo carcinomas de ovário, mama e melanoma (200).

Embora a expressão desregulada de miRNAs tenha sido identificada em diversos tipos de tumores, o envolvimento dos miRNAs no processo de tumorigênese ainda precisa ser elucidado. Portanto, estudos para a identificação de perfis de expressão global de miRNAs, bem como caracterização funcional de miRNAs e genes-alvo e seu papel na iniciação e progressão de neoplasias, são necessários para o melhor entendimento da biologia tumoral. Tais estudos devem contribuir para a identificação de novos alvos terapêuticos no câncer.

1.5. MicroRNAs e alvos moleculares terapêuticos

Os miRNAs têm sido indicados como candidatos interessantes para o direcionamento terapêutico. O interesse nas atividades biológicas dos miRNAs e seus papéis no processamento pós-transcricional tem impulsionado a pesquisa neste campo. Medicamentos que bloqueiam a ação dos miRNAs tem o potencial de modificar simultaneamente múltiplas vias genéticas (7, 205). Um exemplo é a associação entre o mecanismo de sinalização celular do Receptor do Fator de Crescimento Epidérmico (*EGFR*) e a expressão alterada de miRNAs in vivo, in vitro em amostras clínicas (206); neste estudo, a perda do miR-128b foi correlacionada com resposta ao tratamento com Genfitinibe, um inibidor do domínio tirosina-quinase (*TKI*) do *EGFR* (207). O miRNA-7 também foi implicado como regulador negativo

da via do *EGFR* (208). Finalmente, a expressão aumentada do miR-21 foi correlacionada com ativação do mecanismo de sinalização do *EGFR* na presença de mutações neste gene (209, 210).

Linhas de evidência experimental mais recentes mostraram que a desregulação de miRNAs promove diretamente a iniciação e progressão tumoral, revelando, portanto, o potencial dos miRNAs como alvos terapêuticos no câncer. Estudos de expressão global de miRNAs fornecerão a base para o entendimento dos mecanismos oncogênicos e a aplicação translacional dos miRNAs no desenvolvimento de novas terapias para pacientes com carcinomas de fígado.

Estudos adicionais precisam ser realizados para compreender a função biológica complexa dos miRNAs, seus papéis na patogênese, e os compostos que alteram os seus níveis em CHC.

Uma variedade de abordagens experimentais tem sido utilizada para caracterizar a expressão de miRNAs em CHC. Um estudo de clonagem e sequenciamento de pequenos RNAs derivados de diferentes tecidos de ratos levou à identificação do miR-122 como um miRNA abundante e específico do fígado. O miR-122 é um dos miRNAs mais específicos e abundantes no fígado de adultos humanos constituindo cerca de 70% do conjunto total de miRNAs expressos em células hepáticas, conduzindo a caracterização do miR-122 um importante papel em doenças do fígado, incluindo o CHC (211, 212).

Notavelmente, tem sido evidenciado que o miR-122 é necessário para a replicação do VHC nos hepatócitos o qual liga-se a regiões conservadas na região 5'-UTR do VHC, no entanto, o mecanismo pelo qual o miR-122 promove a replicação do VHC não é totalmente compreendido (209, 212). Como a redução ou a eliminação do VHC é uma estratégia eficaz para impedir que os pacientes desenvolvam o CHC, o sequestro do miR-122 tem sido sugerido como uma potencial estratégia terapêutica contra a infecção pelo VHC (212-214).

Foi demonstrado o potencial de aplicação de antagomirs ao miR-122 como um tratamento anti-VHC em chimpanzés com infecção crônica pelo VHC (215). Estes estudos conduziram o desenvolvimento de uma nova terapia de segmentação de miR-122 com o valor clínico para pacientes com infecção pelo VHC (216).

Estudos também demonstraram que embora este requisito tenha sido explorado para o desenvolvimento de um antagomir anti-miR-122 como um antiviral para o hospedeiro, os mecanismos moleculares subjacentes à atividade do fator de miR-122 permanecem

indefinidos. Alguns estudos sugerem que o miR-122 protege o RNA viral contra as exoribonucleases 5', *Xrn1* e *Xrn2* (217).

Considerando a importância dos miRNAs nos processos associados à tumorigênese humana, a caracterização do perfil global de alterações na expressão dos miRNAs em CHC, pode contribuir para o desenvolvimento de biomarcadores com potencial aplicação clínica. Biomarcadores moleculares podem ser úteis no desenvolvimento de estratégias para detecção precoce de doença, diagnóstico, prognóstico e terapêuticas mais precisas para pacientes com CHC.

1.6. MicroRNAs em CHC

Embora vários estudos têm relatado a desregulação da expressão de miRNAs em CHC, existem poucos dados sobre análises integrativas, as quais são essenciais para a melhor compreensão e identificação de vias moleculares envolvidas na tumorigênese e progressão do CHC (213).

Os mecanismos pelos quais miRNAs regulam a tumorigênese, progressão e metástase dos carcinomas de fígado ainda não estão bem elucidados. Os papéis dos miRNAs na tumorigênese hepática são complexos, sendo que diferentes estudos têm relatado perfis únicos, com apenas alguns miRNAs em comum, indicando a heterogeneidade do CHC (24).

Combinações de análises genômicas e estudos funcionais identificaram miRNAs com papel de supressores tumorais.

Dois estudos sugeriram um papel importante para os microRNAs miR-122, miR-26, miR-101 e miR-21 na regulação da formação de metástases hepáticas, indicando que tais miRNAs podem servir como biomarcadores ou potenciais moléculas terapêuticas (7, 205). Em outro estudo, o miR-138 foi demonstrado regulando a ciclina CCND3, atuando como supressor tumoral em CHC (218).

Apesar destes e outros estudos (revisados em Samuel & Knudson) (205), ainda à necessidade de integração de dados de expressão de miRNAs e genes-alvo regulados por miRNAs, fundamental para a elucidação de vias moleculares desreguladas nestas neoplasias. Além disso, a correlação entre alterações em miRNAs e parâmetros clínicos relevantes, incluindo prognóstico e resposta ao tratamento podem elucidar biomarcadores com poder de predição do comportamento clínico tumoral em pacientes individuais. Estes resultados poderão ser aplicados para melhorar o manejo dos pacientes.

Relatos na literatura têm demonstrado que o miR-10b tem expressão aumentada em muitos tumores, provavelmente atuando como promotor da tumorigênese pulmonar de células não pequenas e atuando no aumento da proliferação, capacidade de migração e invasão celular (219). No CHC, a expressão aumentada do miR-10b estimula a proliferação celular aumentando a capacidade metastática (220-222).

Esses dados indicam que a desregulação dos miRNAs pode promover diretamente a iniciação e a progressão do CHC. Entretanto, ainda há necessidade de novos estudos que levem à elucidação do papel dos miRNAs na regulação da função tumoral. Apesar de vários estudos terem sido previamente publicados sobre as alterações genéticas e epigenéticas do CHC, existe uma falta de estudos que buscam identificação de vias moleculares que dirigem o desenvolvimento e a progressão dessa doença.

2. JUSTIFICATIVA

Apesar dos avanços nas estratégias cirúrgicas e terapêuticas dos pacientes com carcinomas de fígado, o prognóstico dos pacientes ainda é muito pobre. Estratégias terapêuticas vigentes para carcinomas de fígado têm falhado em atenuar a agressividade da doença ou melhorar a sobrevida dos pacientes. Estudos anteriores relataram uma variedade de genes alterados, revelando heterogeneidade genética entre tumores de diferentes pacientes. Portanto, o insucesso terapêutico da terapia convencional pode ser parcialmente atribuído a heterogeneidade, além do comportamento biológico tumoral.

Justifica-se, portanto a necessidade de identificação de vias moleculares as quais podem conter biomarcadores clinicamente aplicáveis na melhoria do diagnóstico e tratamento dos pacientes com CHC.

As estratégias de identificação de alterações na expressão de miRNAs podem contribuir para elucidar mecanismos moleculares modulados por miRNAs em CHC. Os resultados podem ter futura aplicação clínica utilizando miRNAs e os genes-alvo regulados por miRNAs como biomarcadores com valor diagnóstico, prognóstico e terapêutico para pacientes com CHC.

3. OBJETIVOS

1. Identificar o perfil global de expressão de miRNAs em carcinoma hepatocelular;
2. Utilizar ferramentas de análise de bioinformática para identificar:
 - a) mRNAs-alvo regulados por miRNAs
 - b) Redes de interação entre miRNAs e mRNAs-alvo
3. Realizar a validação externa dos dados de expressão dos miRNAs com os dados do repositório The Cancer Genome Atlas (TCGA);

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Considerações sobre os aspectos éticos

Este projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Faculdade de Medicina de Botucatu (FMB) (4382/2012-A), Anexo 1. O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) foi dispensado uma vez que foram utilizadas amostras de arquivo, coletadas retrospectivamente (blocos de parafina), e as amostras utilizadas eram provenientes de pacientes com perda de seguimento clínico ou que já foram a óbito devido ao caráter agressivo da doença.

4.2. Critérios de inclusão e exclusão dos pacientes

Este estudo incluiu um grupo amostral de conveniência, onde foram utilizadas amostras de carcinoma hepatocelular de pacientes portadores do vírus da hepatite C que foram atendidos no Hospital das Clínicas de Botucatu (HCB) da FMB, UNESP.

Os critérios de inclusão foram os seguintes: pacientes com diagnóstico de carcinoma de fígado, do subtipo histológico hepatocelular, de qualquer estadiamento e grau histológico, portadores do vírus da hepatite C, sendo as amostras provenientes de pacientes submetidos à cirurgia para tratamento.

Os critérios de exclusão foram: pacientes com doença secundária ou metastática no fígado que não carcinoma hepatocelular primário.

4.3. Identificação das amostras

Foram realizadas buscas no banco de dados no Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu - UNESP, para a identificação dos casos de carcinoma hepatocelular que atendessem aos critérios propostos neste estudo. Após a identificação dos casos, todas as lâminas histológicas de cada caso foram requisitadas e analisadas em colaboração com a patologista responsável pelo serviço de Gastroenterologia (MAMRK). Nessa etapa inicial foi analisada uma média de 20 lâminas histológicas para cada caso (n=72), totalizando uma média de 1.440 lâminas. Essa análise histológica rigorosa foi importante para identificar os blocos de melhor qualidade para a análise molecular subsequente. Este procedimento garantiu uma melhor homogeneidade das amostras, evitando pequenos fragmentos e amostras com grande heterogeneidade celular. Além disso, as lâminas histológicas coradas em hematoxilina e eosina (H&E) foram marcadas a fim de identificar as

áreas de tecido tumoral e normal em cada corte histológico. Essas áreas foram utilizadas como guia na etapa de microdissecção dos cortes de parafina contendo áreas dos tecidos de interesse.

Após a rigorosa identificação das amostras, foi realizada a seleção dos casos positivos para o VHC totalizando 18 amostras pareadas de pacientes portadores de CHC e VHC+ (18 amostras de tecido hepático histologicamente normal e 18 amostras de tecido tumoral).

4.4. Delineamento e seleção das amostras

O delineamento e a seleção das amostras estão apresentados na Figura 5.

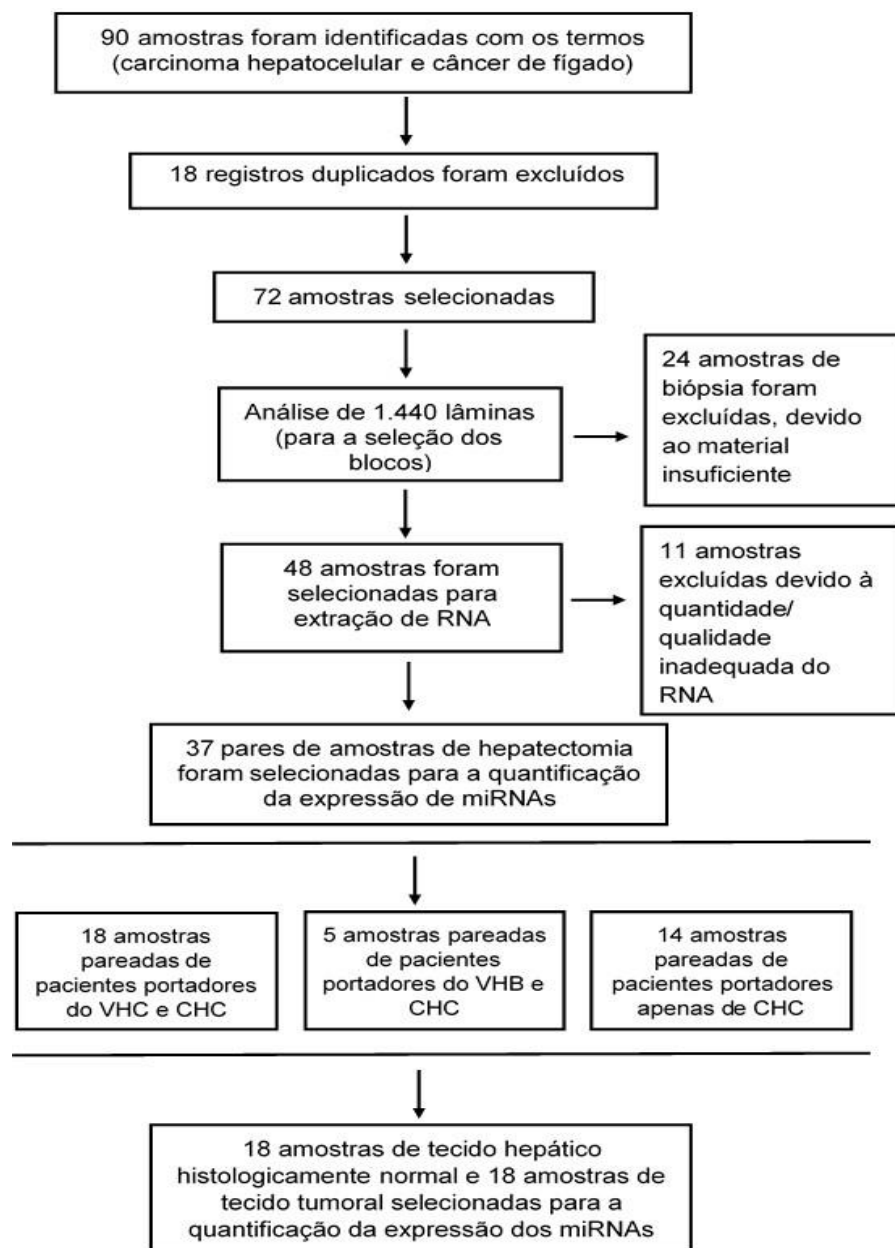


Figura 5 - Delineamento e seleção das amostras.

4.5. Análise molecular

4.5.1. Microdissecção com agulha

Após a identificação dos blocos, cada bloco foi cortado, sendo confeccionadas 5 lâminas de 10µm cada. Para a microdissecção dos tecidos, as lâminas foram incubadas em Xilol 100% (Merk KGaA, Darmstadt, Germany) por 10 min e em seguida transferidas para cubas para desidratação e re-hidratação em uma série de etanol, 100% - 5 min, 95% - 5 min, 80% - 5 min, 70% - 5 min. Os tecidos foram posteriormente corados em uma solução de hematoxilina diluída 5:1 por 15 s, para identificação das áreas a serem microdissecadas. As lâminas foram armazenadas em água MilliQ ddH₂O até o momento da raspagem com agulha hipodérmica estéril 1,60x40mm (Becton Dickinson, Curitiba, PR). As áreas correspondentes ao tumor e ao tecido hepático histologicamente normal foram removidas, separadamente, utilizando o estereomicroscópio Leica EZ4 (Leica Microsystems, China) para a visualização e raspagem dos tecidos. Os tecidos foram colocados em tubos eppendorf de 1,5 mL, livres de RNase e estéreis e acrescidos de tampão de digestão do kit RecoverAll Total Nucleic Acid Isolation (Ambion by Life Technologies, Austin, TX, USA), para o início da extração do RNA total, conforme descrito abaixo.

4.5.2. Extração de RNA

Para isolamento do RNA total de amostras de FFPE utilizamos o *kit Recover AllTotal Nucleic Acid Isolation kit* (Ambion, Life Technologies, Austin, TX, USA), segundo o protocolo do fabricante. A partir das amostras microdissecadas e acrescidas de 200 µL de tampão de digestão, foram adicionados 4µL de enzima protease a cada amostra, e incubadas por 2 h a 50°C, permitindo a lise do tecido e liberação do RNA, seguido de 15 min de incubação a 80°C para a inativação da protease. Após esta primeira incubação, foram adicionados 550µL de etanol absoluto e 240µL do reagente *isolation additive* (fornecido pelo kit) totalizando um volume de 790µL por amostra; essa etapa tem o objetivo de ajudar na separação dos ácidos nucléicos do restante dos componentes celulares. As próximas etapas consistiram na purificação do RNA através de colunas com filtros de sílica, onde o RNA total adere à sílica e os contaminantes são descartados no material filtrado. A purificação foi realizada em duas etapas, na primeira etapa adicionou-se 700µL da solução de lavagem Wash1 (fornecida pelo kit), seguida por centrifugação a 10.000 rpm e temperatura ambiente (TA) por 30 s. Desprezou-se o filtrado e na mesma coluna de purificação adicionou-se 500µL da solução de lavagem Wash2/3 (também incluída no kit). As amostras foram então

novamente submetidas à centrifugação por 30 s a 10.000 rpm em TA. Para evitar a contaminação do RNA com DNA, foi realizado tratamento com DNase. Um mix contendo 4µL da enzima DNase, 6µL do tampão 10X DNA buffer e 50µL de água livre de nuclease (nuclease-free) foi preparado. Todos estes reagentes fazem parte do kit de extração. Foram então adicionados a cada amostra, 60µL deste mix no centro da coluna, seguida de incubação por 30 min em TA. Após este tratamento foi realizada a segunda etapa de lavagem, onde inicialmente adicionou-se 700µL da solução Wash1 seguida por centrifugação por 30 s a 10.000 rpm em TA. Desprezou-se o filtrado e em seguida na mesma coluna de purificação, adicionou-se 500µL da solução Wash2/3. As amostras foram então novamente centrifugadas por 30 s a 10.000 rpm em TA. Com o intuito de eliminar soluções de lavagem residuais nos filtros das colunas de purificação, nova centrifugação por 30 s a 10.000 rpm em TA foi realizada. O filtro foi então transferido para um novo tubo coletor fornecido pelo kit para a eluição do RNA que foi realizada em duas etapas. Primeiro foram adicionados 10µL de água RNase-free no centro do filtro, incubado por 1 min em TA, seguido de centrifugação por 1 min a 14000 rpm em TA. Na segunda etapa foram adicionados 5µL de água estéril e livre de RNase (Sigma) no centro do filtro, incubado por 1 min em TA, seguida por centrifugação por 1 min a 14000 rpm em TA. O RNA total obtido foi então quantificado e armazenado a -80°C.

4.5.3. Avaliação da quantidade e qualidade do RNA

A análise de quantificação e avaliação da qualidade/pureza das amostras de RNA total foi realizada no equipamento NanoDrop 8000 (ThermoScientific, EUA), o qual permite quantificar o RNA total contido em cada amostra, verificando também a presença de contaminação por proteínas e/ou resíduos de solventes orgânicos.

4.5.4. Reação de Transcrição Reversa de miRNAs

A transcrição reversa dos miRNAs foi realizada utilizando o kit TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription Kit (Life Technologies, EUA) combinado com o Megaplex™ RT Primers Pool A v2.1 (Life Technologies, EUA), seguindo as orientações do fabricante. Esse sistema permite a transcrição reversa dos miRNAs maduros inclusos no cartão Taqman Low Array Density Card A (Life Technologies, EUA). Na reação foram adicionados ao RNA total (600ng) os seguintes componentes do kit: Megaplex™ RT Primers (10X), dNTPs com dTTP (100mM), MultiScribe™ Reverse Transcriptase (50U/µL), 10X RT Buffer, inibidor de RNase (RNase Inhibitor) (20U/µL). A mistura foi incubada nas seguintes condições: 40 ciclos de

16°C por 2 min., 42°C por 1 min. e 50°C por 1 s; seguido da inativação da transcriptase reversa a 85°C por 5 min. O produto da transcrição reversa foi armazenado no -20°C até o momento da utilização.

4.5.5. Análise da expressão de microRNAs

A análise de expressão global de miRNAs foi realizada utilizando a plataforma TaqMan Array Human MicroRNA Cards (TLDA) (card A, v3.0) (Life Technologies), um cartão de microfluídos contendo 384 miRNAs e otimizado para o uso com amostras de arquivo (FFPE). A plataforma inclui controles (miRNAs endógenos) para normalização dos dados, e um ensaio não humano como controle negativo. Em resumo, o protocolo inclui a transcrição reversa para converter moléculas de miRNAs em dupla fita, seguida da amplificação e quantificação da expressão.

Para o preparo da PCR quantitativa em tempo real (RT-qPCR) foram utilizados: 450 µL de master mix Taqman® Universal Master Mix II, no UNG (Life Technologies); 6 µL de cDNA (produzido em etapa anterior) e 444 µL de água livre de nuclease (Sigma ddH₂O). Foram adicionados 100 µL desse mix em cada poço da placa; seguido por centrifugação da placa a 1.200 rpm por 1 min, duas vezes. A RT-qPCR foi realizada no equipamento QuantStudio 12K (Life Technologies). Os perfis de expressão de miRNAs foram determinados utilizando o programa RQ Manager v1.2 (Life Technologies), disponível no equipamento acima citado.

Os dados de expressão de miRNAs foram analisados no programa Expression Suite (Life Technologies); que é componente do equipamento QuantStudio 12K (Life Technologies).

Utilizamos o método de normalização global dos dados, conforme descrito por Mestdagh e cols (223). Esse método consiste na identificação dos miRNAs contendo expressão estável em todos experimentos analisados, seguido do uso da mediana do número de ciclos (CT) dos miRNAs mais estáveis como fator de normalização dos dados. Esse tipo de normalização é válido quando um grande número de alvos são testados, sendo assim adequado às nossas análises (223).

4.6. Análise dos dados

4.6.1. Processamento dos dados de expressão

Os dados de expressão foram extraídos do equipamento QuantStudio™ 12K Flex, utilizando o programa Expression Suite Software v1.0.3 for Microsoft® Windows®, uma ferramenta de análise de dados que utiliza o método comparativo CT ($\Delta\Delta CT$) (224). Esta plataforma permite quantificar a expressão relativa de em um grande número de miRNAs e amostras. Os dados de expressão de miRNAs nos tumores foram determinados relativos às amostras de tecido histologicamente normal adjacente ao tumor. Todas as amostras de tumor e normal eram pareadas (dos mesmos pacientes).

4.6.2. Predição de alvos e vias dos miRNAs

Os miRNAs significativamente desregulados ($p < 0,05$) em tumor vs. normal foram utilizados em análise bioinformática de predição dos mRNAs-alvo regulados por estes miRNAs. Esta análise foi realizada utilizando a ferramenta de bioinformática microRNA Data Integration Portal (<http://ophid.utoronto.ca/mirDIP/>) que integra os conjuntos de dados a partir de diferentes bases de dados de predição de miRNAs (225). Apenas alvos preditos em top 1% foram considerados para as análises posteriores. Esses genes que são alvos de miRNAs, foram pesquisados no Expression Atlas (<https://www.ebi.ac.uk/gxa/home>) (226) para expressão alterada (aumentada ou diminuída) no carcinoma hepatocelular. Análises de enriquecimento das vias foram realizadas no portal ToppGene Suite (<https://toppgene.cchmc.org/>) (227). A visualização dos dados foi realizada utilizando Cytoscape v3.1.1 (228). As redes são ilustradas como gráficos com os nós que representam o miRNAs/mRNA alvo e as arestas representam suas interações.

4.6.3. Validação externa dos resultados de expressão de miRNAs

Dados do repositório público The Cancer Genome Atlas (TCGA) (<http://cancergenome.nih.gov/>) foram utilizados para validação dos nossos resultados de expressão de miRNAs em CHC. O repositório TCGA contém dados de expressão de miRNAs gerados em 372 amostras de tecido tumoral e 50 de tecido hepático normal de pacientes com CHC. Os dados brutos foram obtidos e utilizados para análise de expressão diferencial de miRNAs em tumor vs. tecido hepático normal no pacote edgeR do programa R (229).

*TCGA é um consórcio genômico internacional estabelecido para determinar as mutações, alterações genômicas, transcritômicas e epigenômicas mais frequentes em diferentes tipos de tumores humanos, incluindo carcinoma hepatocelular.

As análises foram realizadas com o objetivo de validar nossos dados de expressão de miRNAs com os dados externos do TCGA. Um total de 5 miRNAs foram validados, sendo 1 miRNA com expressão significativamente diminuída (miR-451a) (FC 0,538 e $p < 0,05$) e 4 miRNAs com expressão significativamente aumentada: miR-let-7d-5p (FC 2,402 e $p < 0,05$), miR-27a-3p (FC 4,121 e $p < 0,05$), miR-744-5p (FC 5,169 e $p < 0,05$), miR-485-3p (FC 9,840 e $p < 0,05$). Os valores de FC (*fold change*) indicam o número de vezes no qual o miRNA está com expressão aumentada ou diminuída no tumor comparado com o tecido normal.

5. RESULTADOS

5.1. Perfil da expressão de miRNAs em carcinoma hepatocelular

As análises foram realizadas para identificar diferentes níveis de expressão dos miRNAs nas amostras tumorais em relação aos tecidos histologicamente normais adjacentes ao tumor. Essas análises identificaram 8 miRNAs com expressão diferencial estatisticamente significativa ($FC \geq 1.5$ e $p < 0,05$) (Figura 6), sendo que 5 miRNAs estavam com expressão aumentada e 3 miRNAs estavam com expressão diminuída nos tumores comparado com os tecidos histologicamente normais (Tabela 3).

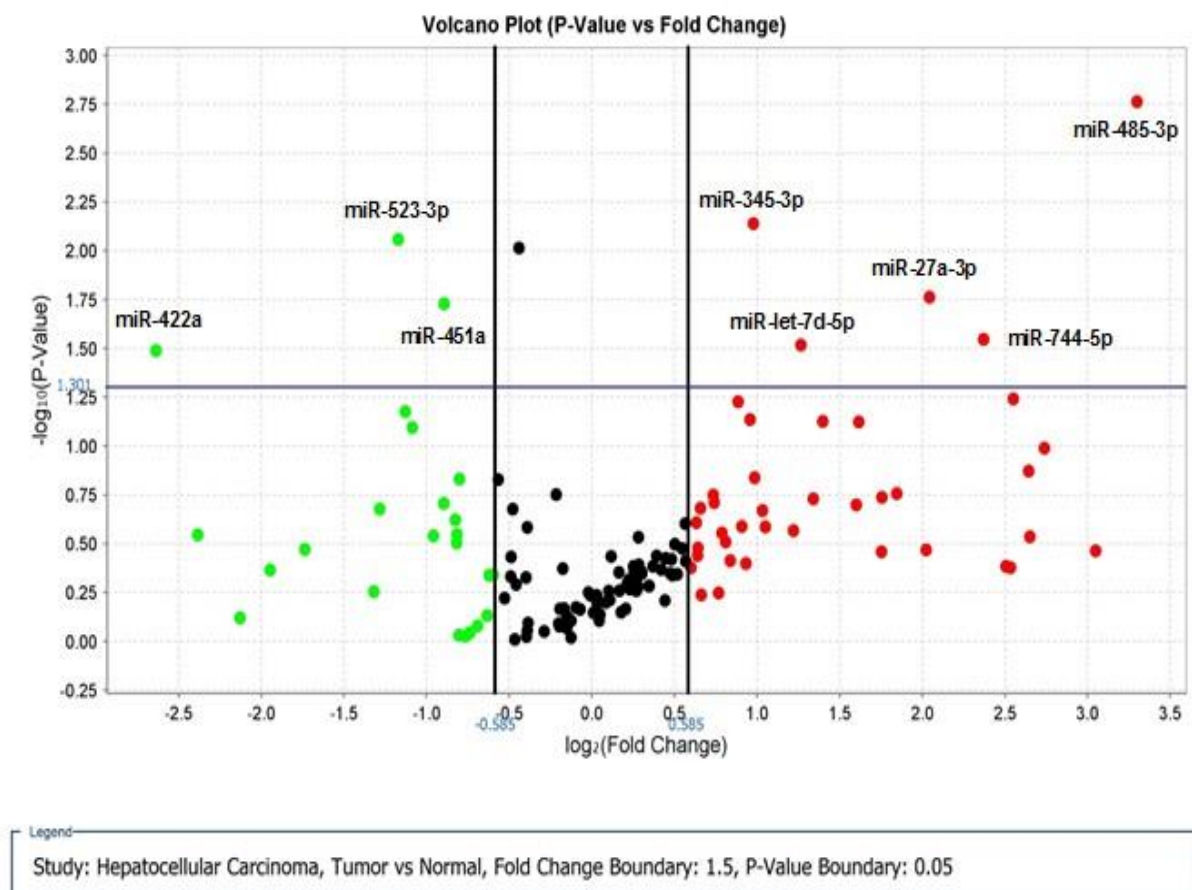


Figura 6 - Volcano plot, ilustrando os miRNAs com expressão significativamente desregulada ($FC \geq 1.5$ e $p < 0,05$) em CHC comparado com tecido hepático histologicamente normal.

Tabela 3 - miRNAs com expressão significativamente ($FC \geq 1,5$ e $p < 0,05$) alterada em carcinoma hepatocelular.

Expressão diminuída			Expressão aumentada		
miRNA	FC	P-value	miRNA	FC	P-value
miR-422a	0,161	0,033	miR-345-3p	1,970	0,007
miR-523-3p	0,444	0,009	miR-let-7d-5p	2,402	0,030
miR-451a	0,538	0,019	miR-27a-3p	4,121	0,017
			miR-744-5p	5,169	0,028
			miR-485-3p	9,840	0,002

FC: *fold change*. Na análise dos dados, apenas os miRNAs com $FC \geq 1.5$ e $p < 0,05$ foram incluídos.

5.2. Correlação dos miRNAs expressos em carcinoma hepatocelular com dados de meta-análise em CHC

Corroborando nossos achados, 3 miRNAs (miR-422a, miR-523-3p e miR-451a) foram relatados com expressão diminuída em uma meta-análise da literatura (Ariede e cols., manuscrito em anexo). Outros miRNAs foram relatados como alterados, porém com resultado inverso ao observado no nosso estudo. Por exemplo, o miR-27a-3p foi identificado com expressão aumentada nos nossos resultados e com expressão diminuída nos dados utilizados na meta-análise.

5.3. Resultados de predição de genes-alvo regulados por miRNAs

Os dados da análise de predição demonstraram vários genes-alvo potencialmente regulados pelos miRNAs identificados, os quais codificam proteínas com funções biológicas importantes na tumorigênese, tais como controle da transcrição, tradução, morte celular, entre outras, no CHC (Figuras 7 e 8).

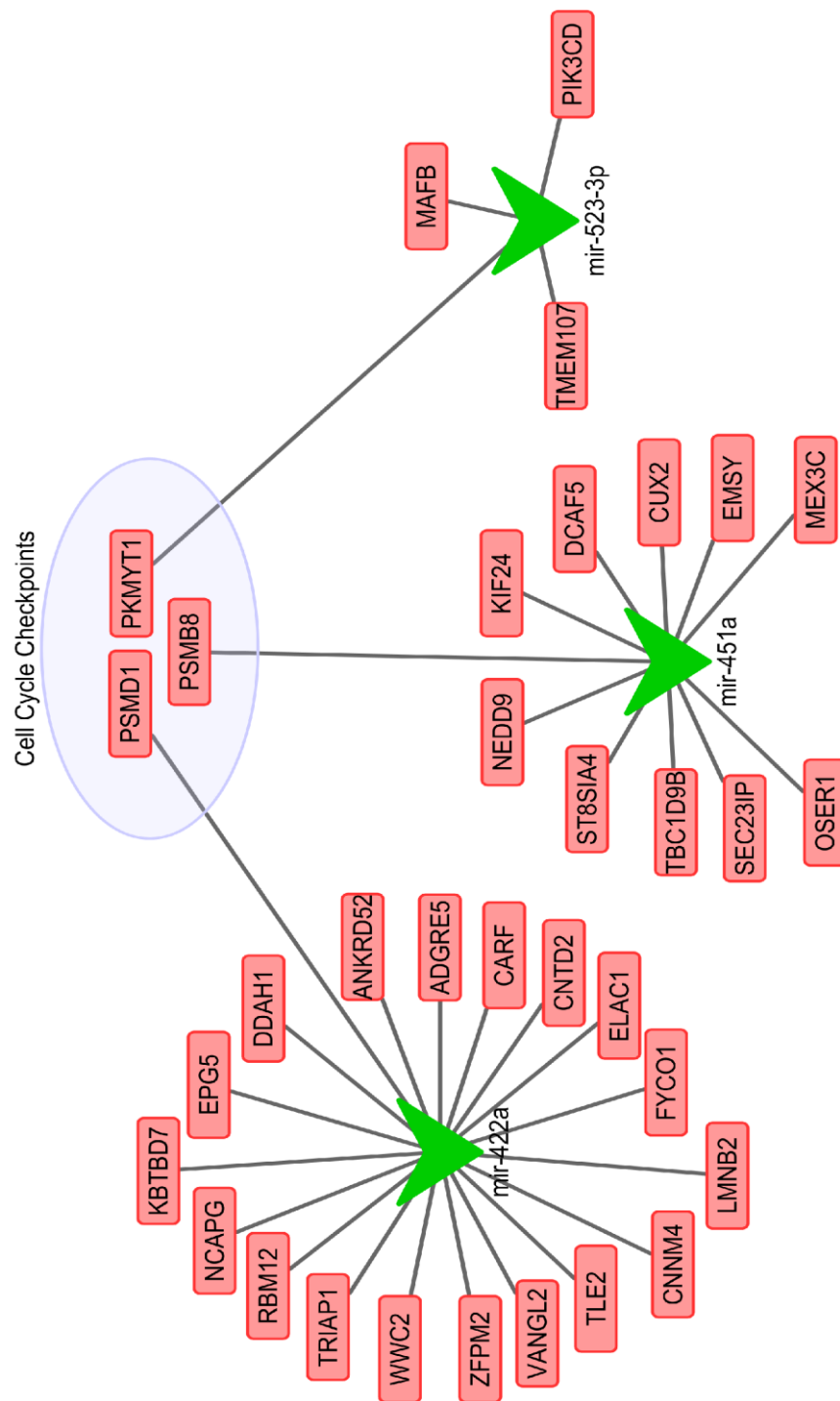


Figura 7 - Análise de interação entre microRNAs e genes-alvo em carcinoma hepatocelular. Rede de interação proteica e os 3 miRNAs desregulados com expressão diminuída em carcinoma hepatocelular comparado com tecido hepático histologicamente normal. A rede de interação foi construída utilizando o programa Expression Atlas (<https://www.ebi.ac.uk/gxa/home>). Os triângulos invertidos em verde representam os miRNAs com expressão diminuída e os retângulos os genes com expressão aumentada.

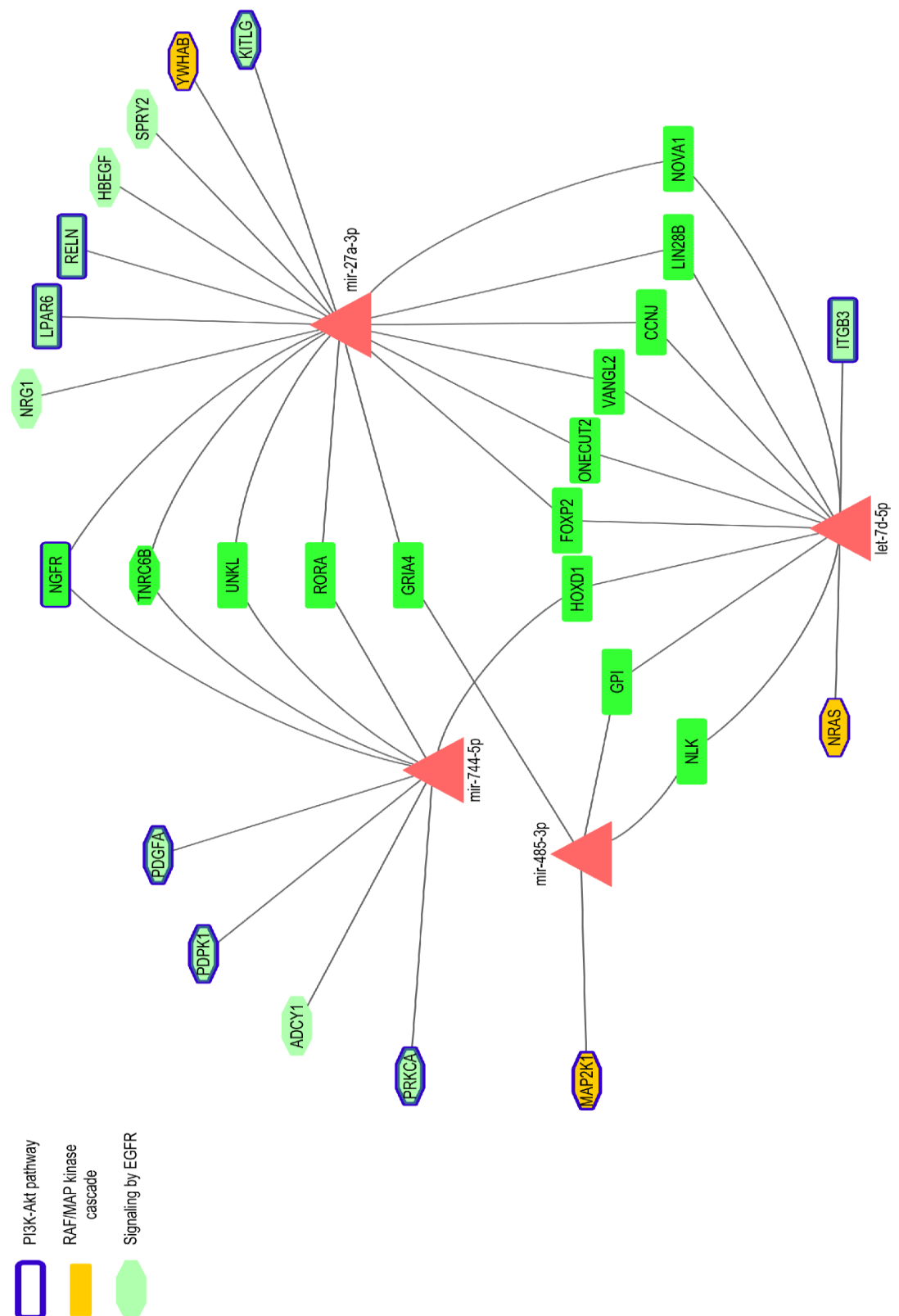


Figura 8 - Análise de interação entre microRNAs e genes-alvo em carcinoma hepatocelular. Rede de interação proteica e os 4 miRNAs com expressão aumentada em carcinoma hepatocelular comparado com tecido hepático histologicamente normal. Os miRNAs miR-27a-3p, let-7d-5p, miR-744-5p e miR-485-3p compartilham a regulação de um grande número de genes os quais apresentam expressão

diminuída em carcinoma hepatocelular. Esses achados sugerem que os miRNAs identificados cooperam na modulação de genes importantes associados ao CHC. Estão sendo demonstrados apenas os genes que representam uma correlação inversa. A rede de interação foi construída utilizando o programa Expression Atlas (<https://www.ebi.ac.uk/gxa/home>). As anotações funcionais estão destacadas na figura da seguinte forma: triângulos (miRNAs com expressão aumentada), retângulos - genes (com expressão diminuída).

5.4. Validação externa dos dados de expressão global de miRNAs: repositório TCGA

Do número total de amostras, 6 normais e 16 tumorais foram excluídas por não serem amostras primárias de câncer de fígado ou por apresentarem classificação incorreta do tipo tumoral. Após checagem desses dados, foram utilizados os dados brutos de 356 amostras tumorais e 44 amostras de tecido hepático normal.

Dos miRNAs encontrados desregulados, 103 estavam com expressão diminuída e 292 com expressão aumentada, com $FDR \leq 0.05$. Os 30 miRNAs mais significativos de acordo com o valor de FDR estão listados na Tabela 4, abaixo.

A lista completa dos miRNAs está descrita no link: <https://drive.google.com/file/d/0B9MqsUMO6CYfSXNMR3BFNXNsRDA/view?usp=sharing>

Tabela 4 - Lista dos 30 “top” miRNAs selecionados, com expressão significativamente alterada em CHC vs. tecido hepático normal.

microRNA	logFC	logCPM	PValue	FDR
hsa-miR-424-5p	-2.2745966	7.3253530	1.545895e-86	8.857980e-84
hsa-miR-21-5p	1.9506109	17.8694328	6.483336e-37	1.857476e-34
hsa-miR-93-5p	1.8472510	12.6155891	3.075695e-34	5.874577e-32
hsa-miR-139-3p	-1.7944366	4.9745645	1.781254e-33	2.551647e-31
hsa-miR-589-5p	1.6827761	6.6959634	6.136574e-33	7.032514e-31
hsa-miR-1258	-3.2938055	1.4749792	2.584395e-32	2.468098e-30
hsa-miR-10b-5p	3.7101493	14.3349361	4.313183e-30	3.530649e-28
hsa-miR-500a-3p	1.7135981	8.6600633	7.065442e-27	5.060622e-25
hsa-miR-4746-5p	2.6139098	1.9847566	1.184839e-26	7.543473e-25
hsa-miR-424-3p	1.3071100	1.9707962	1.055668e-25	6.048977e-24
hsa-miR-10b-3p	3.6007499	3.2033185	2.777994e-25	1.447082e-23
hsa-miR-7706	2.0853447	1.4916208	8.684890e-25	4.147035e-23
hsa-miR-532-5p	1.5329273	10.6056556	1.505918e-24	6.637624e-23
hsa-miR-490-3p	3.2718637	0.8909275	1.737513e-24	7.111392e-23
hsa-miR-224-5p	3.3935542	7.5251508	2.943411e-24	1.124383e-22
hsa-miR-183-5p	3.9649113	11.8922352	1.510055e-22	5.407886e-21
hsa-miR-103a-3p	1.2184821	14.8275515	6.471831e-22	2.181388e-20

hsa-miR-501-3p	1.5222736	6.0330089	1.451918e-21	4.558037e-20
hsa-miR-660-5p	1.4522478	6.5088456	1.511391e-21	4.558037e-20
hsa-miR-106b-5p	1.1209340	8.0929775	3.720211e-21	1.065840e-19
hsa-miR-140-3p	0.9532886	10.7195934	4.251441e-21	1.152783e-19
hsa-miR-96-5p	3.8556591	3.7807761	4.426041e-21	1.152783e-19
hsa-miR-25-3p	1.0540056	13.3035574	8.644991e-21	2.153730e-19
hsa-miR-452-5p	2.5402409	8.1054598	1.064649e-20	2.541850e-19
hsa-miR-221-3p	1.6342649	7.0431486	1.112750e-20	2.550423e-19
hsa-miR-182-5p	3.4558404	13.2811484	2.368182e-20	5.219109e-19
hsa-miR-1307-3p	1.2448026	10.6846973	4.446801e-20	9.437100e-19
hsa-miR-222-3p	1.5405244	4.9507493	2.559637e-19	5.238114e-18
hsa-miR-450a-5p	-1.1184997	3.2963096	2.856689e-19	5.644424e-18
hsa-miR-423-5p	1.0500016	6.0724732	5.082859e-19	9.708260e-18

Log FC: *fold change*; Log CPM: *Counts per milions*; FDR: *False discovery rate*.

6. DISCUSSÃO

A prevalência e gravidade do CHC estão aumentando insatisfatoriamente no mundo devido à melhoria do diagnóstico e a alta taxa de recorrência e metástase, por isso, a melhoria das estratégias terapêuticas para pacientes com CHC é extremamente importante para o manejo de pacientes com essa doença.

Os miRNAs são pequenos RNAs não-codificadores que possuem papel importante em vários processos biológicos e de doença, incluindo a proliferação celular, diferenciação, apoptose e metástase (230-232).

A identificação de perfis desregulados de expressão de miRNAs no câncer pode contribuir para o entendimento da biologia tumoral pela identificação de vias moleculares moduladas pelos miRNAs. Devido ao seu importante papel na regulação gênica, os miRNAs têm sido indicados como moléculas promissoras no desenvolvimento de novos tratamentos para o câncer (189).

Durante a última década, o acúmulo de evidências tem demonstrado um papel proeminente dos miRNAs no desenvolvimento e progressão de vários cânceres atuando como oncogenes ou supressores tumorais (233-235).

O papel emergente dos miRNAs desregulados em CHC tem sido demonstrado em vários estudos. Por conseguinte, uma melhor compreensão dos papéis desses miRNAs na patogênese da doença pode contribuir para o desenvolvimento de terapias mais eficazes para o CHC (236).

Alterações na expressão de miRNAs levam à desregulação da expressão de genes-alvo, sendo que as vias moleculares alteradas podem ter papéis importantes no desenvolvimento e progressão tumoral. Nesse estudo, identificamos 5 miRNAs com expressão significativamente ($FC \geq 1,5$ e $p < 0,05$) aumentada (miR-let-7d-5p, miR-27a-3p, miR-744-5p, miR-485-3p, miR-345-3p) e 3 miRNAs com expressão significativamente ($FC \geq 1,5$ e $p < 0,05$) diminuída (miR-422a, miR-523-3p, miR-451a) em CHC comparado com tecido hepático histologicamente normal e adjacente ao tumor. Esses miRNAs regulam, simultaneamente, um grande número de genes com funções celulares importantes.

Nossos resultados de expressão de miRNAs em CHC foram comparados com os dados obtidos em uma meta-análise incluindo 8 estudos (217, 237-243) os quais identificaram 199 miRNAs desregulados (113 com expressão aumentada e 86 com expressão diminuída) em 273 tumores comparados com 253 amostras controle. Nos estudos incluídos na meta-análise,

as amostras controle eram constituídas por tecido cirrótico ou tecido hepático histologicamente normal adjacente ao tumor (similar ao nosso estudo) ou tecido hepático histologicamente normal de indivíduos sem a doença (obtidos por necropsia). Níveis de expressão de 3 miRNAs com expressão diminuída (miR-422a, miR-523-3p e miR-451a), foram concordantes entre os nossos resultados e os dados da meta-análise. Níveis discordantes de expressão foram detectados apenas para 1 miRNA (miR-27a-3p). Os demais miRNAs identificados em nosso estudo são achados novos, pois não foram relatados nos estudos incluídos na meta-análise.

Os miRNAs da família let-7 têm sido amplamente implicados na tumorigênese como reguladores da expressão de *K-RAS* (177, 244). Estes microRNAs desempenham papéis importantes no desenvolvimento tumoral. Portanto, o controle preciso do nível desses miRNAs é fundamental para as funções celulares. Foi demonstrado que o miRNA let-7d age como supressor tumoral inibindo a proliferação celular (245).

O miR-27a-3p pode promover a proliferação de células do CHC pela regulação da expressão *PPAR-γ* (receptor de lipídeos) proporcionando uma potencial estratégia terapêutica para o tratamento do CHC (246, 247). A expressão aumentada do miR-27a-3p, assim como detectada em nosso estudo, pode exercer a função de oncogene em diferentes tipos tumorais como nos cânceres de pâncreas, gástrico, ovário, mama, pulmão e carcinoma hepatocelular (248). Outro estudo demonstrou que o miR-27a-3p modula a expressão dos receptores de entrada do VHC e inibir a replicação desse vírus em linhagem celular de hepatoma por regulação da acumulação de lipídeos (249).

Os miRNAs também têm sido explorados como marcadores circulantes devido à estabilidade e a fácil detecção dessas moléculas na circulação sanguínea (250). Nesse estudo, identificamos a expressão aumentada do miR-27a-3p em tecido tumoral, o qual também foi demonstrado desregulado no estudo de Zhou e cols. em plasma de pacientes com CHC comparado com indivíduos saudáveis. Os achados de Zhou e cols. sugerem uma utilização clínica potencial do miR-27a-3p para o diagnóstico do CHC. A expressão aumentada do miR-27a-3p também foi identificada em vários tipos tumorais, incluindo o câncer de pâncreas, mama, ovário, esôfago, células renais, glioma e o CHC, promovendo a regulação de processos biológicos como crescimento celular, invasão e metástase (251).

A expressão aumentada do miR-345 foi detectada em carcinoma de células escamosas da cavidade oral e mesotelioma maligno (251, 252). Entre todos os miRNAs com expressão aumentada identificados em nosso estudo, o miR-345-3p foi o único não validado com os

dados do TCGA. Entretanto, a expressão aumentada do miR-345 foi associada a processos de oncogênese, sendo esse miRNA considerado um oncomiR. Em carcinoma colorretal, o miR-345 foi demonstrado regular negativamente a expressão de *BAG3*, um gene com papel anti-apoptótico (253, 254). O miR-345 também controla a via molecular do *p21Waf1/Cip1* atuando como oncomiR em células de hepatoma. Em outros tipos celulares e de acordo com o microambiente, o miR-345 pode atuar tanto como oncogene como quanto supressor tumoral. Adicionalmente, o miR-345 foi associado à hepatocarcinogênese devido infecção crônica pelo VHC (255).

Curiosamente, a alta expressão do miR-485-3p foi relacionada ao RNA longo não codificador (*Long non-coding RNA*; lncRNA) LINC00052, o qual tem a capacidade de inibir a invasão e migração de células de hepatocarcinoma. Os resultados desse estudo sugerem que LINC00052 pode ter potencial no diagnóstico e terapia para o tratamento de pacientes com CHC (256).

Em nossos resultados, os miRNAs com expressão significativamente diminuída ($p < 0,05$) no tumor relativo às amostras de tecido hepático histologicamente normal, foram: miR-422a, miR-451a e miR-523-3p. A expressão diminuída do miR-451 foi confirmada com os dados da meta-análise e validada com os dados do TCGA. Esse foi o único miRNA desregulado nos três conjuntos de dados (nossos dados de expressão, meta-análise e TCGA).

O papel dos miRNAs tem sido evidenciado como biomarcadores prognósticos em CHC. Huang e cols. identificaram que a expressão diminuída do miR-451 está associada com recidiva precoce, menor sobrevida e metástase em pacientes portadores de CHC. Os autores sugeriram que o miR-451 é um potencial biomarcador prognóstico no CHC metastático (262).

Liu e cols. demonstraram que a transfecção do miR-451 inibiu o crescimento e invasão de células tumorais, mas também diminuiu a capacidade angiogênica. Isso revelou o potencial do miR-451 no desenvolvimento e progressão do CHC e a eficácia desse miRNA como agente terapêutico promissor para o desenvolvimento de uma terapia anti-CHC (263). Nesse estudo, foi confirmado que a expressão do miR-451 é regulada negativamente em CHC humano. O miR-451 é um regulador negativo do fator ativador da transcrição (ATF2), modulando a transcrição de ATF2 no núcleo dos tecidos tumorais neoplásicos. Adicionalmente, a análise funcional mostrou que o miR-451 suprime a capacidade migratória de linhagens celulares de hepatoma. Assim, o miR-451 age como um supressor tumoral tendo um papel importante na progressão do CHC (264).

Também foi demonstrado em um estudo que o miR-451 estava com expressão diminuída em CHC comparado com tecido histologicamente normal do fígado o que também sugere que a baixa expressão do miR-451 desempenha um papel importante na promoção da proliferação de células de CHC, atuando como supressor tumoral (265).

Concordante com nossos dados, a expressão diminuída do miR-422 foi identificada em um estudo, o qual demonstrou que o miR-422a é regulado negativamente em amostras de tumores e linhagens celulares de CHC e o seu nível de expressão está negativamente correlacionado com a classificação patológica, recorrência e metástase. A expressão do miR-422a em células tumorais de CHC inibiu significativamente a proliferação e migração celular *in vitro*. Ao mesmo tempo, a alta expressão do miR-422a em células tumorais de CHC inibiu o crescimento de tumores e metástases no fígado em modelos de tumor de xenoenxerto. O miR-422a desempenha um papel importante na regulação da patogênese do CHC e pode ter utilidade na prevenção e tratamento do CHC (257-259).

O miR-523-3p foi sugerido como um miRNA com atividade de supressor tumoral nas etapas iniciais da tumorigênese colorretal (260). Foi demonstrado uma assinatura de expressão de 5 miRNAs (miR- 523-3p, miR-888, miR-18b, miR-302a e miR-423-5p) com potencial impacto no prognóstico na fase inicial de desenvolvimento do câncer colorretal (261).

Um estudo recente (2016) utilizou análise de bioinformática para determinar interações entre miRNAs e genes regulados por miRNAs associados à tumorigênese hepática relacionada ao VHC. Nesse estudo, 4 miRNAs (miR-34a, miR-155, miR-24, miR-744 e miR-92a) foram correlacionados positivamente com CHC e infecção pelo VHC. Entre esses, identificamos e validamos a expressão aumentada do miR-744 em CHC. Adicionalmente, a anotação funcional de miRNAs e genes mostrou que há sobreposição significativa entre perfis de expressão de miRNAs e genes em CHC de pacientes VHC positivos (266). Há evidências da interação entre a infecção pelo VHC com o CHC, o qual geralmente se desenvolve décadas após a infecção pelo VHC e cirrose hepática (267).

Embora os mecanismos moleculares do desenvolvimento do CHC induzido pela infecção pelo VHC ainda não estejam bem elucidados, a inflamação crônica associada a infecção pelo VHC é um fator importante para proporcionar um microambiente adequado para o desenvolvimento do câncer (266-268).

O VHC é classificado como um vírus de RNA de cadeia positiva que se replica no citoplasma e não se integra no DNA do hospedeiro; no entanto, suas características indutoras

da tumorigênese são notáveis. A infecção pelo VHC atua por mecanismos indiretos na promoção da tumorigênese, principalmente devido à inflamação crônica no fígado, a indução de danos oxidativos e danos no DNA, os quais levam ao desenvolvimento de cirrose e consequente CHC (268, 269).

A cirrose, como resultado da fibrose associada à infecção pelo VHC, é a indicação da fase de pré-neoplásica do desenvolvimento do CHC, devido ao seu potencial de causar a proliferação rápida de células displásicas (13). Estudos têm demonstrado que as proteínas do VHC, em particular a proteína do núcleo, são inerentemente oncogênicas; a expressão dessas proteínas nos hepatócitos pode estar envolvida no desenvolvimento de CHC e na ausência de resposta do sistema imune (266).

Várias proteínas do VHC podem interagir com as proteínas da célula hospedeira e induzir a proliferação celular. Evidências mostram que a replicação do RNA do VHC é dependente sobre a proliferação celular (270), enquanto que a síntese de RNA do VHC é estimulada na fase S do ciclo celular (271). Os hepatócitos têm geralmente baixa taxa de proliferação e algumas proteínas virais expressas durante a divisão celular estão envolvidos em efeitos carcinogênicos da infecção pelo VHC (128, 269, 272).

A alta expressão do miR-27a-3p no CHC é abundante e sua expressão pode ter efeito no desenvolvimento do fígado e na infecção pelo VHC e VHB.

Um estudo de Shirasaki e cols. mostrou que a replicação e a infectividade do VHC são reguladas pelo estado lípido celular. Entre os miRs diferencialmente expressos, o miR-27a-3p estava preferencialmente expresso no fígado infectado pelo VHC e VHB. Nesse estudo também foi demonstrado a relevância funcional desse miRNA na replicação do VHC usando a linhagem celular de hepatoma humano Huh-7. Os resultados podem ser aplicáveis na melhoria terapêutica anti-VHC, especialmente em pacientes que demonstram resistência ao tratamento e esteatose hepática grave (246).

A expressão do miR-744 foi avaliada em 96 amostras de CHC e tecidos hepáticos histologicamente normais dos mesmos pacientes. Nesse estudo, os pacientes com invasão microvascular ou múltiplos nódulos tumorais apresentaram expressão significativamente diminuída do miR-744. Adicionalmente, o nível de expressão do miR-744 era ainda menor em pacientes que apresentaram recorrência tumoral após transplante hepático comparado com pacientes sem recorrência. A expressão diminuída do miR-744 foi associada com pior sobrevida global e pior sobrevida livre de recorrência, sendo que esse miRNA foi um preditor independente do prognóstico. Os resultados desse estudo sugerem a utilização potencial do

miR-744 como um biomarcador prognóstico em CHC (273). Ao contrário desse estudo, nossos resultados, os resultados descritos por Poortahmasebi e cols. e os dados do TCGA identificaram a expressão aumentada do miR-744 em CHC de pacientes infectados pelo VHC (266). Apesar do número muito superior de casos analisados nos estudos que identificaram expressão aumentada do miR-744, acreditamos que pode existir heterogeneidade tumoral e clínica associada a esses achados em amostras de pacientes com CHC associado ao VHC.

7. CONCLUSÕES

Podemos concluir que em nosso grupo amostral, cinco miRNAs (miR-451a, let-7d-5p, miR-27a-3p, miR-744-5p e miR-485-3p) foram validados nos dados do TCGA. Três miRNAs (miR-422a, miR-523-3p e miR-451a) foram validados nos dados da meta-análise sendo o miR-451a o único miRNA comum nos três conjuntos de dados.

Os miRNAs miR-345-3p, miR-422a e miR-523-3p foram identificados exclusivamente em nosso estudo, sendo que não encontramos outros estudos que tenham identificado o miR-345-3p em CHC. Esses dados sugerem que alguns miRNAs podem ser específicos de tumores de pacientes brasileiros, entretanto estudos adicionais com um grande número de casos são necessários para testar essa hipótese.

Considerando que o miR-27a-3p já foi associado com a infecção pelo VHC em pacientes com CHC, a identificação da expressão aumentada desse miRNA no nosso grupo de pacientes com CHC/VHC+ corrobora os dados da literatura.

Entre os miRNAs validados, identificamos genes-alvo que atuam em processos celulares importantes na tumorigênese, incluindo genes com papel na checagem do ciclo celular e regulação das vias de sinalização molecular PI3K-AKT, RAF-MAPK e EGFR.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer*. 2015;136(5):E359-86.
2. Instituto Nacional de Câncer 2012
[<http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/inca/portal/home>]
3. Dou JP, Yu J, Cheng ZG, Han ZY, Liu FY, Yu XL, et al. Ultrasound-Guided Percutaneous Microwave Ablation for Hepatocellular Carcinoma in the Caudate Lobe. *Ultrasound Med Biol*. 2016.
4. Ibukuro K, Fukuda H, Tobe K, Akita K, Takeguchi T. The vascular anatomy of the ligaments of the liver: Gross anatomy, Imaging, and Clinical applications. *Br J Radiol*. 2016;20150925.
5. Orcutt ST, Kobayashi K, Sultenfuss M, Hailey BS, Sparks A, Satpathy B, et al. Portal Vein Embolization as an Oncosurgical Strategy Prior to Major Hepatic Resection: Anatomic, Surgical, and Technical Considerations. *Front Surg*. 2016;3:14.
6. Han K, Kim JH, Ko GY, Gwon DI, Sung KB. Treatment of hepatocellular carcinoma with portal venous tumor thrombosis: A comprehensive review. *World J Gastroenterol*. 2016;22(1):407-16.
7. Lin L, Lin Y, Jin Y, Zheng C. Microarray analysis of microRNA expression in liver cancer tissues and normal control. *Gene*. 2013;523(2):158-60.
8. Sartorius K, Sartorius B, Aldous C, Govender PS, Madiba TE. Global and country underestimation of hepatocellular carcinoma (HCC) in 2012 and its implications. *Cancer Epidemiol*. 2015;39(3):284-90.
9. Khare S, Zhang Q, Ibdah JA. Epigenetics of hepatocellular carcinoma: role of microRNA. *World J Gastroenterol*. 2013;19(33):5439-45.
10. Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet-Tieulent J, Jemal A. Global cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin*. 2015;65(2):87-108.
11. Perz JF, Armstrong GL, Farrington LA, Hutin YJ, Bell BP. The contributions of hepatitis B virus and hepatitis C virus infections to cirrhosis and primary liver cancer worldwide. *J Hepatol*. 2006;45(4):529-38.

12. Parkin DM. The global health burden of infection-associated cancers in the year 2002. *Int J Cancer*. 2006;118(12):3030-44.
13. Llovet JM, Villanueva A, Lachenmayer A, Finn RS. Advances in targeted therapies for hepatocellular carcinoma in the genomic era. *Nat Rev Clin Oncol*. 2015;12(8):436.
14. Paranaguá-Vezozzo DC, Ono SK, Alvarado-Mora MV, Farias AQ, Cunha-Silva M, França JI, et al. Epidemiology of HCC in Brazil: incidence and risk factors in a ten-year cohort. *Ann Hepatol*. 2014;13(4):386-93.
15. Carrilho FJ, Kikuchi L, Branco F, Goncalves CS, Mattos AA, Group BHS. Clinical and epidemiological aspects of hepatocellular carcinoma in Brazil. *Clinics (Sao Paulo)*. 2010;65(12):1285-90.
16. Ferenci P, Fried M, Labrecque D, Bruix J, Sherman M, Omata M, et al. Hepatocellular carcinoma (HCC): a global perspective. *J Clin Gastroenterol*. 2010;44(4):239-45.
17. Bruix J, Han KH, Gores G, Llovet JM, Mazzaferro V. Liver cancer: Approaching a personalized care. *J Hepatol*. 2015;62(1 Suppl):S144-56.
18. Lok AS, Seeff LB, Morgan TR, di Bisceglie AM, Sterling RK, Curto TM, et al. Incidence of hepatocellular carcinoma and associated risk factors in hepatitis C-related advanced liver disease. *Gastroenterology*. 2009;136(1):138-48.
19. Yan J, Xie W, Wang Q, Li Y, Feng X, Cheng J. The optimal threshold: Baseline serum hepatitis B virus DNA and alanine transaminase levels can predict the 2-Year on-treatment virological response to lamivudine. *Hepat Mon*. 2011;11(5):358-63.
20. Borel F, Konstantinova P, Jansen PL. Diagnostic and therapeutic potential of miRNA signatures in patients with hepatocellular carcinoma. *J Hepatol*. 2012;56(6):1371-83.
21. Llovet JM, Sala M, Bruix J. Nonsurgical treatment of hepatocellular carcinoma. *Liver Transpl*. 2000;6(6 Suppl 2):S11-5.
22. Mohd Hanafiah K, Groeger J, Flaxman AD, Wiersma ST. Global epidemiology of hepatitis C virus infection: new estimates of age-specific antibody to HCV seroprevalence. *Hepatology*. 2013;57(4):1333-42.
23. Hanto DW, Curry MP, Sun M, Nasser I. Hepatocellular carcinoma (HCC) in a patient with hepatitis B virus (HBV) infection. *Am J Transplant*. 2012;12(3):786-7; quiz 8.
24. Di Leva G, Calin GA, Croce CM. MicroRNAs: fundamental facts and involvement in human diseases. *Birth Defects Res C Embryo Today*. 2006;78(2):180-9.

25. Sanyal AJ, Yoon SK, Lencioni R. The etiology of hepatocellular carcinoma and consequences for treatment. *Oncologist*. 2010;15 Suppl 4:14-22.
26. Kirstein MM, Vogel A. The pathogenesis of hepatocellular carcinoma. *Dig Dis*. 2014;32(5):545-53.
27. McGlynn KA, London WT. Epidemiology and natural history of hepatocellular carcinoma. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 2005;19(1):3-23.
28. Thorgeirsson SS, Grisham JW. Molecular pathogenesis of human hepatocellular carcinoma. *Nat Genet*. 2002;31(4):339-46.
29. McCormack VA, Boffetta P. Today's lifestyles, tomorrow's cancers: trends in lifestyle risk factors for cancer in low- and middle-income countries. *Ann Oncol*. 2011;22(11):2349-57.
30. El-Serag HB. Hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med*. 2011;365(12):1118-27.
31. Nault JC, Datta S, Imbeaud S, Franconi A, Mallet M, Couchy G, et al. Recurrent AAV2-related insertional mutagenesis in human hepatocellular carcinomas. *Nat Genet*. 2015;47(10):1187-93.
32. Liu J, Fan D. Hepatitis B in China. *Lancet*. 2007;369(9573):1582-3.
33. Zucman-Rossi J, Villanueva A, Nault JC, Llovet JM. Genetic Landscape and Biomarkers of Hepatocellular Carcinoma. *Gastroenterology*. 2015;149(5):1226-39.e4.
34. Hackl C, Schlitt HJ, Renner P, Lang SA. Liver surgery in cirrhosis and portal hypertension. *World J Gastroenterol*. 2016;22(9):2725-35.
35. Brechot C. Molecular mechanisms of hepatitis B and C viruses related to liver carcinogenesis. *Hepatogastroenterology*. 1998;45 Suppl 3:1189-96.
36. Kondoh N, Wakatsuki T, Hada A, Shuda M, Tanaka K, Arai M, et al. Genetic and epigenetic events in human hepatocarcinogenesis. *Int J Oncol*. 2001;18(6):1271-8.
37. Liu Y, Wu F. Global burden of aflatoxin-induced hepatocellular carcinoma: a risk assessment. *Environ Health Perspect*. 2010;118(6):818-24.
38. Moghaddam SJ, Haghighi EN, Samiee S, Shahid N, Keramati AR, Dadgar S, et al. Immunohistochemical analysis of p53, cyclinD1, RB1, c-fos and N-ras gene expression in hepatocellular carcinoma in Iran. *World J Gastroenterol*. 2007;13(4):588-93.

39. Llovet JM, Zucman-Rossi J, Pikarsky E, Sangro B, Schwartz M, Sherman M, et al. Hepatocellular carcinoma. *Nat Rev Dis Primers*. 2016;2:16018.
40. Marquardt JU, Andersen JB, Thorgeirsson SS. Functional and genetic deconstruction of the cellular origin in liver cancer. *Nat Rev Cancer*. 2015;15(11):653-67.
41. Alizadeh AA, Aranda V, Bardelli A, Blanpain C, Bock C, Borowski C, et al. Toward understanding and exploiting tumor heterogeneity. *Nat Med*. 2015;21(8):846-53.
42. Guichard C, Amaddeo G, Imbeaud S, Ladeiro Y, Pelletier L, Maad IB, et al. Integrated analysis of somatic mutations and focal copy-number changes identifies key genes and pathways in hepatocellular carcinoma. *Nat Genet*. 2012;44(6):694-8.
43. Schulze K, Imbeaud S, Letouzé E, Alexandrov LB, Calderaro J, Rebouissou S, et al. Exome sequencing of hepatocellular carcinomas identifies new mutational signatures and potential therapeutic targets. *Nat Genet*. 2015;47(5):505-11.
44. Ahn SM, Jang SJ, Shim JH, Kim D, Hong SM, Sung CO, et al. Genomic portrait of resectable hepatocellular carcinomas: implications of RB1 and FGF19 aberrations for patient stratification. *Hepatology*. 2014;60(6):1972-82.
45. Pilati C, Letouzé E, Nault JC, Imbeaud S, Boulai A, Calderaro J, et al. Genomic profiling of hepatocellular adenomas reveals recurrent FRK-activating mutations and the mechanisms of malignant transformation. *Cancer Cell*. 2014;25(4):428-41.
46. Totoki Y, Tatsuno K, Covington KR, Ueda H, Creighton CJ, Kato M, et al. Trans-ancestry mutational landscape of hepatocellular carcinoma genomes. *Nat Genet*. 2014;46(12):1267-73.
47. Di Tommaso L, Franchi G, Park YN, Fiamengo B, Destro A, Morenghi E, et al. Diagnostic value of HSP70, glypican 3, and glutamine synthetase in hepatocellular nodules in cirrhosis. *Hepatology*. 2007;45(3):725-34.
48. Llovet JM, Chen Y, Wurnbach E, Roayaie S, Fiel MI, Schwartz M, et al. A molecular signature to discriminate dysplastic nodules from early hepatocellular carcinoma in HCV cirrhosis. *Gastroenterology*. 2006;131(6):1758-67.
49. Paradis V, Bièche I, Dargère D, Laurendeau I, Laurent C, Bioulac Sage P, et al. Molecular profiling of hepatocellular carcinomas (HCC) using a large-scale real-time RT-PCR approach: determination of a molecular diagnostic index. *Am J Pathol*. 2003;163(2):733-41.

50. Günes C, Rudolph KL. The role of telomeres in stem cells and cancer. *Cell*. 2013;152(3):390-3.
51. Satyanarayana A, Greenberg RA, Schaetzlein S, Buer J, Masutomi K, Hahn WC, et al. Mitogen stimulation cooperates with telomere shortening to activate DNA damage responses and senescence signaling. *Mol Cell Biol*. 2004;24(12):5459-74.
52. Nault JC, Mallet M, Pilati C, Calderaro J, Bioulac-Sage P, Laurent C, et al. High frequency of telomerase reverse-transcriptase promoter somatic mutations in hepatocellular carcinoma and preneoplastic lesions. *Nat Commun*. 2013;4:2218.
53. de La Coste A, Romagnolo B, Billuart P, Renard CA, Buendia MA, Soubrane O, et al. Somatic mutations of the beta-catenin gene are frequent in mouse and human hepatocellular carcinomas. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95(15):8847-51.
54. Audard V, Grimber G, Elie C, Radenen B, Audebourg A, Letourneur F, et al. Cholestasis is a marker for hepatocellular carcinomas displaying beta-catenin mutations. *J Pathol*. 2007;212(3):345-52.
55. Hsu IC, Metcalf RA, Sun T, Welsh JA, Wang NJ, Harris CC. Mutational hotspot in the p53 gene in human hepatocellular carcinomas. *Nature*. 1991;350(6317):427-8.
56. Amaddeo G, Cao Q, Ladeiro Y, Imbeaud S, Nault JC, Jaoui D, et al. Integration of tumour and viral genomic characterizations in HBV-related hepatocellular carcinomas. *Gut*. 2015;64(5):820-9.
57. Sung WK, Zheng H, Li S, Chen R, Liu X, Li Y, et al. Genome-wide survey of recurrent HBV integration in hepatocellular carcinoma. *Nat Genet*. 2012;44(7):765-9.
58. Fei Q, Shang K, Zhang J, Chuai S, Kong D, Zhou T, et al. Histone methyltransferase SETDB1 regulates liver cancer cell growth through methylation of p53. *Nat Commun*. 2015;6:8651.
59. Wong CM, Wei L, Law CT, Ho DW, Tsang FH, Au SL, et al. Up-regulation of histone methyltransferase SETDB1 by multiple mechanisms in hepatocellular carcinoma promotes cancer metastasis. *Hepatology*. 2016;63(2):474-87.
60. Villanueva A, Portela A, Sayols S, Battiston C, Hoshida Y, Méndez-González J, et al. DNA methylation-based prognosis and epidrivers in hepatocellular carcinoma. *Hepatology*. 2015;61(6):1945-56.
61. Herceg Z, Paliwal A. Epigenetic mechanisms in hepatocellular carcinoma: how environmental factors influence the epigenome. *Mutat Res*. 2011;727(3):55-61.

62. Sporn MB, Liby KT. NRF2 and cancer: the good, the bad and the importance of context. *Nat Rev Cancer*. 2012;12(8):564-71.
63. Chiang DY, Villanueva A, Hoshida Y, Peix J, Newell P, Minguez B, et al. Focal gains of VEGFA and molecular classification of hepatocellular carcinoma. *Cancer Res*. 2008;68(16):6779-88.
64. Hoshida Y, Toffanin S, Lachenmayer A, Villanueva A, Minguez B, Llovet JM. Molecular classification and novel targets in hepatocellular carcinoma: recent advancements. *Semin Liver Dis*. 2010;30(1):35-51.
65. Lee JS, Chu IS, Heo J, Calvisi DF, Sun Z, Roskams T, et al. Classification and prediction of survival in hepatocellular carcinoma by gene expression profiling. *Hepatology*. 2004;40(3):667-76.
66. Lee JS, Heo J, Libbrecht L, Chu IS, Kaposi-Novak P, Calvisi DF, et al. A novel prognostic subtype of human hepatocellular carcinoma derived from hepatic progenitor cells. *Nat Med*. 2006;12(4):410-6.
67. Boyault S, Rickman DS, de Reyniès A, Balabaud C, Rebouissou S, Jeannot E, et al. Transcriptome classification of HCC is related to gene alterations and to new therapeutic targets. *Hepatology*. 2007;45(1):42-52.
68. Hoshida Y, Nijman SM, Kobayashi M, Chan JA, Brunet JP, Chiang DY, et al. Integrative transcriptome analysis reveals common molecular subclasses of human hepatocellular carcinoma. *Cancer Res*. 2009;69(18):7385-92.
69. Lachenmayer A, Alsinet C, Savic R, Cabellos L, Toffanin S, Hoshida Y, et al. Wnt-pathway activation in two molecular classes of hepatocellular carcinoma and experimental modulation by sorafenib. *Clin Cancer Res*. 2012;18(18):4997-5007.
70. Gomes MA, Priolli DG, Tralhão JG, Botelho MF. Hepatocellular carcinoma: epidemiology, biology, diagnosis, and therapies. *Rev Assoc Med Bras*. 2013;59(5):514-24.
71. Sergi CM. Hepatocellular Carcinoma, Fibrolamellar Variant: Diagnostic Pathologic Criteria and Molecular Pathology Update. A Primer. *Diagnostics (Basel)*. 2015;6(1).
72. Strasser M, Stadlmayr A, Haufe H, Stickel F, Ferenci P, Patsch W, et al. Natural course of subjects with elevated liver tests and normal liver histology. *Liver Int*. 2016;36(1):119-25.

73. Tejera-Hernández AA, Cabrera-García ME, Martínez-Martin MS, García-Plaza G, Larrea-Olea FJ, Hernández-Hernández JR. [Hepatocholangiocarcinoma in young patient with a giant liver tumour]. *Cir Cir*. 2016.
74. Kelly D, Sharif K, Brown RM, Morland B. Hepatocellular carcinoma in children. *Clin Liver Dis*. 2015;19(2):433-47.
75. Hussain SA, Ferry DR, El-Gazzaz G, Mirza DF, James ND, McMaster P, et al. Hepatocellular carcinoma. *Ann Oncol*. 2001;12(2):161-72.
76. Bruix J, Sherman M, Llovet JM, Beaugrand M, Lencioni R, Burroughs AK, et al. Clinical management of hepatocellular carcinoma. Conclusions of the Barcelona-2000 EASL conference. European Association for the Study of the Liver. *J Hepatol*. 2001;35(3):421-30.
77. Bruix J, Sherman M, Practice Guidelines Committee AeAftSoLD. Management of hepatocellular carcinoma. *Hepatology*. 2005;42(5):1208-36.
78. Llovet JM, Bruix J. Molecular targeted therapies in hepatocellular carcinoma. *Hepatology*. 2008;48(4):1312-27.
79. Pascual S, Herrera I, Irurzun J. New advances in hepatocellular carcinoma. *World J Hepatol*. 2016;8(9):421-38.
80. Sharma P, Saini SD, Kuhn LB, Rubenstein JH, Pardi DS, Marrero JA, et al. Knowledge of hepatocellular carcinoma screening guidelines and clinical practices among gastroenterologists. *Dig Dis Sci*. 2011;56(2):569-77.
81. Katyal S, Oliver JH, Peterson MS, Ferris JV, Carr BS, Baron RL. Extrahepatic metastases of hepatocellular carcinoma. *Radiology*. 2000;216(3):698-703.
82. Kummar S, Shafi NQ. Metastatic hepatocellular carcinoma. *Clin Oncol (R Coll Radiol)*. 2003;15(5):288-94.
83. Uchino K, Tateishi R, Shiina S, Kanda M, Masuzaki R, Kondo Y, et al. Hepatocellular carcinoma with extrahepatic metastasis: clinical features and prognostic factors. *Cancer*. 2011;117(19):4475-83.
84. Attili VS, Babu KG, Lokanatha D, Bapsy PP, Ramachandra C, Rajshekar H. Bone metastasis in hepatocellular carcinoma: need for reappraisal of treatment. *J Cancer Res Ther*. 2008;4(2):93-4.
85. Bruix J, Sherman M, Diseases AAftSoL. Management of hepatocellular carcinoma: an update. *Hepatology*. 2011;53(3):1020-2.

86. El-Serag HB, Marrero JA, Rudolph L, Reddy KR. Diagnosis and treatment of hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology*. 2008;134(6):1752-63.
87. Varela M, Sala M, Llovet JM, Bruix J. Treatment of hepatocellular carcinoma: is there an optimal strategy? *Cancer Treat Rev*. 2003;29(2):99-104.
88. Llovet JM, Burroughs A, Bruix J. Hepatocellular carcinoma. *Lancet*. 2003;362(9399):1907-17.
89. Carrillo FJ et al. Brazilian society of hepatology recommendations for the diagnosis and treatment of hepatocellular carcinoma. *Arq Gastroenterol*. 2015; 52(1):2-14.
90. Roskams T. Anatomic pathology of hepatocellular carcinoma: impact on prognosis and response to therapy. *Clin Liver Dis*. 2011;15(2):245-59, vii-x.
91. Liver EAfSo, Cancer EOfRaTo. EASL-EORTC clinical practice guidelines: management of hepatocellular carcinoma. *Eur J Cancer*. 2012;48(5):599-641.
92. Conte VP. [Hepatocellular carcinoma. Part 1. General considerations and diagnosis]. *Arq Gastroenterol*. 2000;37(1):58-68.
93. Befeler AS, Di Bisceglie AM. Hepatocellular carcinoma: diagnosis and treatment. *Gastroenterology*. 2002;122(6):1609-19.
94. Blum HE. Hepatocellular carcinoma: therapy and prevention. *World J Gastroenterol*. 2005;11(47):7391-400.
95. Szklaruk J, Silverman PM, Charnsangavej C. Imaging in the diagnosis, staging, treatment, and surveillance of hepatocellular carcinoma. *AJR Am J Roentgenol*. 2003;180(2):441-54.
96. Libbrecht L, Bielen D, Verslype C, Vanbeckevoort D, Pirenne J, Nevens F, et al. Focal lesions in cirrhotic explant livers: pathological evaluation and accuracy of pretransplantation imaging examinations. *Liver Transpl*. 2002;8(9):749-61.
97. Khan MA, Combs CS, Brunt EM, Lowe VJ, Wolverson MK, Solomon H, et al. Positron emission tomography scanning in the evaluation of hepatocellular carcinoma. *J Hepatol*. 2000;32(5):792-7.
98. Jeng LB, Changlai SP, Shen YY, Lin CC, Tsai CH, Kao CH. Limited value of 18F-2-deoxyglucose positron emission tomography to detect hepatocellular carcinoma in hepatitis B virus carriers. *Hepatogastroenterology*. 2003;50(54):2154-6.

99. Kansagara D, Papak J, Pasha AS, O'Neil M, Freeman M, Relevo R, et al. Screening for hepatocellular carcinoma in chronic liver disease: a systematic review. *Ann Intern Med.* 2014;161(4):261-9.
100. Collier J, Sherman M. Screening for hepatocellular carcinoma. *Hepatology.* 1998;27(1):273-8.
101. Marrero JA, Fontana RJ, Barrat A, Askari F, Conjeevaram HS, Su GL, et al. Prognosis of hepatocellular carcinoma: comparison of 7 staging systems in an American cohort. *Hepatology.* 2005;41(4):707-16.
102. Bialecki ES, Ezenekwe AM, Brunt EM, Collins BT, Ponder TB, Bieneman BK, et al. Comparison of liver biopsy and noninvasive methods for diagnosis of hepatocellular carcinoma. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2006;4(3):361-8.
103. Crippin JS. Biopsy of suspicious liver nodules: does it change management? *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2006;4(3):296-8.
104. Singh P, Kaur H, Lerner RG, Patel R, Rafiyath SM, Singh Lamba G. Hepatocellular carcinoma in non-cirrhotic liver without evidence of iron overload in a patient with primary hemochromatosis. Review. *J Gastrointest Cancer.* 2012;43(1):36-9.
105. Paradis V. Histopathology of hepatocellular carcinoma. *Recent Results Cancer Res.* 2013;190:21-32.
106. Schlageter M, Terracciano LM, D'Angelo S, Sorrentino P. Histopathology of hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol.* 2014;20(43):15955-64.
107. Shafizadeh N, Kakar S. Diagnosis of well-differentiated hepatocellular lesions: role of immunohistochemistry and other ancillary techniques. *Adv Anat Pathol.* 2011;18(6):438-45.
108. Pittman ME, Brunt EM. Anatomic pathology of hepatocellular carcinoma: histopathology using classic and new diagnostic tools. *Clin Liver Dis.* 2015;19(2):239-59.
109. Ross HM, Daniel HD, Vivekanandan P, Kannangai R, Yeh MM, Wu TT, et al. Fibrolamellar carcinomas are positive for CD68. *Mod Pathol.* 2011;24(3):390-5.
110. Farazi PA, Glickman J, Horner J, Depinho RA. Cooperative interactions of p53 mutation, telomere dysfunction, and chronic liver damage in hepatocellular carcinoma progression. *Cancer Res.* 2006;66(9):4766-73.

111. Daniele B, Annunziata M, Barletta E, Tinessa V, Di Maio M. Cancer of the Liver Italian Program (CLIP) score for staging hepatocellular carcinoma. *Hepatol Res.* 2007;37 Suppl 2:S206-9.
112. Prospective validation of the CLIP score: a new prognostic system for patients with cirrhosis and hepatocellular carcinoma. The Cancer of the Liver Italian Program (CLIP) Investigators. *Hepatology.* 2000;31(4):840-5.
113. Kudo M, Chung H, Osaki Y. Prognostic staging system for hepatocellular carcinoma (CLIP score): its value and limitations, and a proposal for a new staging system, the Japan Integrated Staging Score (JIS score). *J Gastroenterol.* 2003;38(3):207-15.
114. Leung TW, Tang AM, Zee B, Lau WY, Lai PB, Leung KL, et al. Construction of the Chinese University Prognostic Index for hepatocellular carcinoma and comparison with the TNM staging system, the Okuda staging system, and the Cancer of the Liver Italian Program staging system: a study based on 926 patients. *Cancer.* 2002;94(6):1760-9.
115. Llovet JM, Villanueva A, Lachenmayer A, Finn RS. Advances in targeted therapies for hepatocellular carcinoma in the genomic era. *Nat Rev Clin Oncol.* 2015;12(7):408-24.
116. Chung SW, Toth JL, Rezieg M, Cameron R, Taylor BR, Greig PD, et al. Liver transplantation for hepatocellular carcinoma. *Am J Surg.* 1994;167(3):317-21.
117. D'Amico G, Garcia-Tsao G, Pagliaro L. Natural history and prognostic indicators of survival in cirrhosis: a systematic review of 118 studies. *J Hepatol.* 2006;44(1):217-31.
118. Levy I, Sherman M, Toronto LCSGotUo. Staging of hepatocellular carcinoma: assessment of the CLIP, Okuda, and Child-Pugh staging systems in a cohort of 257 patients in Toronto. *Gut.* 2002;50(6):881-5.
119. Sarasin FP, Giostra E, Hadengue A. Cost-effectiveness of screening for detection of small hepatocellular carcinoma in western patients with Child-Pugh class A cirrhosis. *Am J Med.* 1996;101(4):422-34.
120. Kamath PS, Kim WR, Group ALDS. The model for end-stage liver disease (MELD). *Hepatology.* 2007;45(3):797-805.
121. Zhang JF, Shu ZJ, Xie CY, Li Q, Jin XH, Gu W, et al. Prognosis of unresectable hepatocellular carcinoma: comparison of seven staging systems (TNM, Okuda, BCLC, CLIP, CUPI, JIS, CIS) in a Chinese cohort. *PLoS One.* 2014;9(3):e88182.
122. Vauthey JN, Lauwers GY, Esnaola NF, Do KA, Belghiti J, Mirza N, et al. Simplified staging for hepatocellular carcinoma. *J Clin Oncol.* 2002;20(6):1527-36.

123. Bilimoria MM, Lauwers GY, Doherty DA, Nagorney DM, Belghiti J, Do KA, et al. Underlying liver disease, not tumor factors, predicts long-term survival after resection of hepatocellular carcinoma. *Arch Surg*. 2001;136(5):528-35.
124. Llovet JM, Bruix J. Prospective validation of the Cancer of the Liver Italian Program (CLIP) score: a new prognostic system for patients with cirrhosis and hepatocellular carcinoma. *Hepatology*. 2000;32(3):679-80.
125. Okuda K, Ohtsuki T, Obata H, Tomimatsu M, Okazaki N, Hasegawa H, et al. Natural history of hepatocellular carcinoma and prognosis in relation to treatment. Study of 850 patients. *Cancer*. 1985;56(4):918-28.
126. Farinati F, Rinaldi M, Gianni S, Naccarato R. How should patients with hepatocellular carcinoma be staged? Validation of a new prognostic system. *Cancer*. 2000;89(11):2266-73.
127. Llovet JM, Brú C, Bruix J. Prognosis of hepatocellular carcinoma: the BCLC staging classification. *Semin Liver Dis*. 1999;19(3):329-38.
128. Okuda K. Natural history of hepatocellular carcinoma including fibrolamellar and hepato-cholangiocarcinoma variants. *J Gastroenterol Hepatol*. 2002;17(4):401-5.
129. Vauthey JN, Ribero D, Abdalla EK, Jonas S, Bharat A, Schumacher G, et al. Outcomes of liver transplantation in 490 patients with hepatocellular carcinoma: validation of a uniform staging after surgical treatment. *J Am Coll Surg*. 2007;204(5):1016-27; discussion 27-8.
130. Del Pozo AC, López P. Management of hepatocellular carcinoma. *Clin Liver Dis*. 2007;11(2):305-21.
131. Donato F, Tagger A, Chiesa R, Ribero ML, Tomasoni V, Fasola M, et al. Hepatitis B and C virus infection, alcohol drinking, and hepatocellular carcinoma: a case-control study in Italy. *Brescia HCC Study*. *Hepatology*. 1997;26(3):579-84.
132. Marrero JA, Su GL, Wei W, Emick D, Conjeevaram HS, Fontana RJ, et al. Des-gamma carboxyprothrombin can differentiate hepatocellular carcinoma from nonmalignant chronic liver disease in american patients. *Hepatology*. 2003;37(5):1114-21.
133. Cho YK, Chung JW, Kim JK, Ahn YS, Kim MY, Park YO, et al. Comparison of 7 staging systems for patients with hepatocellular carcinoma undergoing transarterial chemoembolization. *Cancer*. 2008;112(2):352-61.

134. Liver EAFTSOT, Cancer EOFRATO. EASL-EORTC clinical practice guidelines: management of hepatocellular carcinoma. *J Hepatol*. 2012;56(4):908-43.
135. Chen JH, Chau GY, Lui WY, Tsay SH, King KL, Loong CC, et al. Surgical results in patients with hepatitis B-related hepatocellular carcinoma and positive hepatitis B early antigen. *World J Surg*. 2000;24(3):383-7; discussion 7-8.
136. Poon RT, Yu WC, Fan ST, Wong J. Long-term oral branched chain amino acids in patients undergoing chemoembolization for hepatocellular carcinoma: a randomized trial. *Aliment Pharmacol Ther*. 2004;19(7):779-88.
137. Poon RT, Fan ST, Tsang FH, Wong J. Locoregional therapies for hepatocellular carcinoma: a critical review from the surgeon's perspective. *Ann Surg*. 2002;235(4):466-86.
138. Bismuth H, Chiche L, Adam R, Castaing D, Diamond T, Dennison A. Liver resection versus transplantation for hepatocellular carcinoma in cirrhotic patients. *Ann Surg*. 1993;218(2):145-51.
139. Mazzaferro V, Regalia E, Doci R, Andreola S, Pulvirenti A, Bozzetti F, et al. Liver transplantation for the treatment of small hepatocellular carcinomas in patients with cirrhosis. *N Engl J Med*. 1996;334(11):693-9.
140. Sawada T, Kubota K. Liver transplantation for hepatocellular carcinoma. *Dig Surg*. 2007;24(2):126-30.
141. Wudel LJ, Chapman WC. Indications and limitations of liver transplantation for hepatocellular carcinoma. *Surg Oncol Clin N Am*. 2003;12(1):77-90, ix.
142. Cabrera R, Nelson DR. Review article: the management of hepatocellular carcinoma. *Aliment Pharmacol Ther*. 2010;31(4):461-76.
143. Sato M, Tateishi R, Yasunaga H, Horiguchi H, Yoshida H, Matsuda S, et al. Mortality and morbidity of hepatectomy, radiofrequency ablation, and embolization for hepatocellular carcinoma: a national survey of 54,145 patients. *J Gastroenterol*. 2012;47(10):1125-33.
144. Kaibori M, Saito T, Matsui Y, Uchida Y, Ishizaki M, Kamiyama Y. A review of the prognostic factors in patients with recurrence after liver resection for hepatocellular carcinoma. *Am J Surg*. 2007;193(4):431-7.
145. Fan ST, Lo CM, Liu CL, Lam CM, Yuen WK, Yeung C, et al. Hepatectomy for hepatocellular carcinoma: toward zero hospital deaths. *Ann Surg*. 1999;229(3):322-30.

146. Tateishi R, Shiina S, Teratani T, Obi S, Sato S, Koike Y, et al. Percutaneous radiofrequency ablation for hepatocellular carcinoma. An analysis of 1000 cases. *Cancer*. 2005;103(6):1201-9.
147. Bruix J, Sala M, Llovet JM. Chemoembolization for hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology*. 2004;127(5 Suppl 1):S179-88.
148. Forner A, Llovet JM, Bruix J. Chemoembolization for intermediate HCC: is there proof of survival benefit? *J Hepatol*. 2012;56(4):984-6.
149. Llovet JM, Ricci S, Mazzaferro V, Hilgard P, Gane E, Blanc JF, et al. Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med*. 2008;359(4):378-90.
150. Midorikawa Y, Sugiyama Y, Aburatani H. Molecular targets for liver cancer therapy: From screening of target genes to clinical trials. *Hepatol Res*. 2010;40(1):49-60.
151. Bruix J, Tak WY, Gasbarrini A, Santoro A, Colombo M, Lim HY, et al. Regorafenib as second-line therapy for intermediate or advanced hepatocellular carcinoma: multicentre, open-label, phase II safety study. *Eur J Cancer*. 2013;49(16):3412-9.
152. Wilhelm SM, Dumas J, Adnane L, Lynch M, Carter CA, Schütz G, et al. Regorafenib (BAY 73-4506): a new oral multikinase inhibitor of angiogenic, stromal and oncogenic receptor tyrosine kinases with potent preclinical antitumor activity. *Int J Cancer*. 2011;129(1):245-55.
153. Zender L, Kubicka S. Molecular pathogenesis and targeted therapy of hepatocellular carcinoma. *Onkologie*. 2008;31(10):550-5.
154. Thomas MB, Chadha R, Glover K, Wang X, Morris J, Brown T, et al. Phase 2 study of erlotinib in patients with unresectable hepatocellular carcinoma. *Cancer*. 2007;110(5):1059-67.
155. Zhu AX, Stuart K, Blaszkowsky LS, Muzikansky A, Reitberg DP, Clark JW, et al. Phase 2 study of cetuximab in patients with advanced hepatocellular carcinoma. *Cancer*. 2007;110(3):581-9.
156. Liu L, Cao Y, Chen C, Zhang X, McNabola A, Wilkie D, et al. Sorafenib blocks the RAF/MEK/ERK pathway, inhibits tumor angiogenesis, and induces tumor cell apoptosis in hepatocellular carcinoma model PLC/PRF/5. *Cancer Res*. 2006;66(24):11851-8.
157. Faivre S, Raymond E, Boucher E, Douillard J, Lim HY, Kim JS, et al. Safety and efficacy of sunitinib in patients with advanced hepatocellular carcinoma: an open-label, multicentre, phase II study. *Lancet Oncol*. 2009;10(8):794-800.

158. Papaetis GS, Syrigos KN. Sunitinib: a multitargeted receptor tyrosine kinase inhibitor in the era of molecular cancer therapies. *BioDrugs*. 2009;23(6):377-89.
159. Chapman PB, Hauschild A, Robert C, Haanen JB, Ascierto P, Larkin J, et al. Improved survival with vemurafenib in melanoma with BRAF V600E mutation. *N Engl J Med*. 2011;364(26):2507-16.
160. Flaherty KT, Infante JR, Daud A, Gonzalez R, Kefford RF, Sosman J, et al. Combined BRAF and MEK inhibition in melanoma with BRAF V600 mutations. *N Engl J Med*. 2012;367(18):1694-703.
161. Calvisi DF, Ladu S, Gorden A, Farina M, Conner EA, Lee JS, et al. Ubiquitous activation of Ras and Jak/Stat pathways in human HCC. *Gastroenterology*. 2006;130(4):1117-28.
162. Schmieder R, Puehler F, Neuhaus R, Kissel M, Adjei AA, Miner JN, et al. Allosteric MEK1/2 inhibitor refametinib (BAY 86-9766) in combination with sorafenib exhibits antitumor activity in preclinical murine and rat models of hepatocellular carcinoma. *Neoplasia*. 2013;15(10):1161-71.
163. Lim HY, Heo J, Choi HJ, Lin CY, Yoon JH, Hsu C, et al. A phase II study of the efficacy and safety of the combination therapy of the MEK inhibitor refametinib (BAY 86-9766) plus sorafenib for Asian patients with unresectable hepatocellular carcinoma. *Clin Cancer Res*. 2014;20(23):5976-85.
164. Kaposi-Novak P, Lee JS, Gómez-Quiroz L, Coulouarn C, Factor VM, Thorgeirsson SS. Met-regulated expression signature defines a subset of human hepatocellular carcinomas with poor prognosis and aggressive phenotype. *J Clin Invest*. 2006;116(6):1582-95.
165. Santoro A, Rimassa L, Borbath I, Daniele B, Salvagni S, Van Laethem JL, et al. Tivantinib for second-line treatment of advanced hepatocellular carcinoma: a randomised, placebo-controlled phase 2 study. *Lancet Oncol*. 2013;14(1):55-63.
166. Xiang Q, Chen W, Ren M, Wang J, Zhang H, Deng DY, et al. Cabozantinib suppresses tumor growth and metastasis in hepatocellular carcinoma by a dual blockade of VEGFR2 and MET. *Clin Cancer Res*. 2014;20(11):2959-70.
167. Llovet JM, Decaens T, Raoul JL, Boucher E, Kudo M, Chang C, et al. Brivanib in patients with advanced hepatocellular carcinoma who were intolerant to sorafenib or for whom sorafenib failed: results from the randomized phase III BRISK-PS study. *J Clin Oncol*. 2013;31(28):3509-16.

168. Johnson PJ, Qin S, Park JW, Poon RT, Raoul JL, Philip PA, et al. Brivanib versus sorafenib as first-line therapy in patients with unresectable, advanced hepatocellular carcinoma: results from the randomized phase III BRISK-FL study. *J Clin Oncol*. 2013;31(28):3517-24.
169. Llovet JM, Real MI, Montaña X, Planas R, Coll S, Aponte J, et al. Arterial embolisation or chemoembolisation versus symptomatic treatment in patients with unresectable hepatocellular carcinoma: a randomised controlled trial. *Lancet*. 2002;359(9319):1734-9.
170. Llovet JM, Bruix J. Systematic review of randomized trials for unresectable hepatocellular carcinoma: Chemoembolization improves survival. *Hepatology*. 2003;37(2):429-42.
171. Weinstein IB. Cancer. Addiction to oncogenes--the Achilles heel of cancer. *Science*. 2002;297(5578):63-4.
172. Torrecilla S, Llovet JM. New molecular therapies for hepatocellular carcinoma. *Clin Res Hepatol Gastroenterol*. 2015;39 Suppl 1:S80-5.
173. Forner A, Llovet JM, Bruix J. Hepatocellular carcinoma. *Lancet*. 2012;379(9822):1245-55.
174. Vasudevan S, Tong Y, Steitz JA. Switching from repression to activation: microRNAs can up-regulate translation. *Science*. 2007;318(5858):1931-4.
175. Calin GA, Croce CM. MicroRNA signatures in human cancers. *Nat Rev Cancer*. 2006;6(11):857-66.
176. Di Leva G, Garofalo M, Croce CM. MicroRNAs in cancer. *Annu Rev Pathol*. 2014;9:287-314.
177. Kent OA, Mendell JT. A small piece in the cancer puzzle: microRNAs as tumor suppressors and oncogenes. *Oncogene*. 2006;25(46):6188-96.
178. Lee Y, Kim M, Han J, Yeom KH, Lee S, Baek SH, et al. MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO J*. 2004;23(20):4051-60.
179. Iorio MV, Croce CM. MicroRNA dysregulation in cancer: diagnostics, monitoring and therapeutics. A comprehensive review. *EMBO Mol Med*. 2012;4(3):143-59.
180. Shenouda SK, Alahari SK. MicroRNA function in cancer: oncogene or a tumor suppressor? *Cancer Metastasis Rev*. 2009;28(3-4):369-78.

181. Bhayani MK, Calin GA, Lai SY. Functional relevance of miRNA sequences in human disease. *Mutat Res.* 2012;731(1-2):14-9.
182. Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell.* 2004;116(2):281-97.
183. Frankel LB, Christoffersen NR, Jacobsen A, Lindow M, Krogh A, Lund AH. Programmed cell death 4 (PDCD4) is an important functional target of the microRNA miR-21 in breast cancer cells. *J Biol Chem.* 2008;283(2):1026-33.
184. Harfe BD. MicroRNAs in vertebrate development. *Curr Opin Genet Dev.* 2005;15(4):410-5.
185. Reis PP, Tomenson M, Cervigne NK, Machado J, Jurisica I, Pintilie M, et al. Programmed cell death 4 loss increases tumor cell invasion and is regulated by miR-21 in oral squamous cell carcinoma. *Mol Cancer.* 2010;9:238.
186. Cummins JM, Velculescu VE. Implications of micro-RNA profiling for cancer diagnosis. *Oncogene.* 2006;25(46):6220-7.
187. Kim VN, Han J, Siomi MC. Biogenesis of small RNAs in animals. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2009;10(2):126-39.
188. Ha M, Kim VN. Regulation of microRNA biogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2014;15(8):509-24.
189. Kasinski AL, Slack FJ. Epigenetics and genetics. MicroRNAs en route to the clinic: progress in validating and targeting microRNAs for cancer therapy. *Nat Rev Cancer.* 2011;11(12):849-64.
190. Lu J, Getz G, Miska EA, Alvarez-Saavedra E, Lamb J, Peck D, et al. MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature.* 2005;435(7043):834-8.
191. Calin GA, Ferracin M, Cimmino A, Di Leva G, Shimizu M, Wojcik SE, et al. A MicroRNA signature associated with prognosis and progression in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med.* 2005;353(17):1793-801.
192. Yan LX, Huang XF, Shao Q, Huang MY, Deng L, Wu QL, et al. MicroRNA miR-21 overexpression in human breast cancer is associated with advanced clinical stage, lymph node metastasis and patient poor prognosis. *RNA.* 2008;14(11):2348-60.

193. Yu SL, Chen HY, Chang GC, Chen CY, Chen HW, Singh S, et al. MicroRNA signature predicts survival and relapse in lung cancer. *Cancer Cell*. 2008;13(1):48-57.
194. Gilad S, Meiri E, Yogev Y, Benjamin S, Lebanony D, Yerushalmi N, et al. Serum microRNAs are promising novel biomarkers. *PLoS One*. 2008;3(9):e3148.
195. Chen T, Li Z, Yan J, Yang X, Salminen W. MicroRNA expression profiles distinguish the carcinogenic effects of riddelliine in rat liver. *Mutagenesis*. 2012;27(1):59-66.
196. Iorio MV, Croce CM. MicroRNAs in cancer: small molecules with a huge impact. *J Clin Oncol*. 2009;27(34):5848-56.
197. Toffanin S, Hoshida Y, Lachenmayer A, Villanueva A, Cabellos L, Minguez B, et al. MicroRNA-based classification of hepatocellular carcinoma and oncogenic role of miR-517a. *Gastroenterology*. 2011;140(5):1618-28.e16.
198. Heneghan HM, Miller N, Kerin MJ. Circulating miRNA signatures: promising prognostic tools for cancer. *J Clin Oncol*. 2010;28(29):e573-4; author reply e5-6.
199. D'Anzeo M, Faloppi L, Scartozzi M, Giampieri R, Bianconi M, Del Prete M, et al. The role of micro-RNAs in hepatocellular carcinoma: from molecular biology to treatment. *Molecules*. 2014;19(5):6393-406.
200. Zhang L, Huang J, Yang N, Greshock J, Megraw MS, Giannakakis A, et al. microRNAs exhibit high frequency genomic alterations in human cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(24):9136-41.
201. Gulyaeva LF, Kushlinskiy NE. Regulatory mechanisms of microRNA expression. *J Transl Med*. 2016;14(1):143.
202. Hata A, Kashima R. Dysregulation of microRNA biogenesis machinery in cancer. *Crit Rev Biochem Mol Biol*. 2016;51(3):121-34.
203. Pogribny IP, Beland FA, Rusyn I. The role of microRNAs in the development and progression of chemical-associated cancers. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2015.
204. Song C, Xu Z, Jin Y, Zhu M, Wang K, Wang N. The network of microRNAs, transcription factors, target genes and host genes in human renal cell carcinoma. *Oncol Lett*. 2015;9(1):498-506.
205. Samuel N, Hudson TJ. The molecular and cellular heterogeneity of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2012;9(2):77-87.

206. Nasreen N, Mohammed KA, Antony VB. Silencing the receptor EphA2 suppresses the growth and haptotaxis of malignant mesothelioma cells. *Cancer*. 2006;107(10):2425-35.
207. Weiss GJ, Bemis LT, Nakajima E, Sugita M, Birks DK, Robinson WA, et al. EGFR regulation by microRNA in lung cancer: correlation with clinical response and survival to gefitinib and EGFR expression in cell lines. *Ann Oncol*. 2008;19(6):1053-9.
208. Webster RJ, Giles KM, Price KJ, Zhang PM, Mattick JS, Leedman PJ. Regulation of epidermal growth factor receptor signaling in human cancer cells by microRNA-7. *J Biol Chem*. 2009;284(9):5731-41.
209. Girard M, Jacquemin E, Munnich A, Lyonnet S, Henrion-Caude A. miR-122, a paradigm for the role of microRNAs in the liver. *J Hepatol*. 2008;48(4):648-56.
210. Li B, Ren S, Li X, Wang Y, Garfield D, Zhou S, et al. MiR-21 overexpression is associated with acquired resistance of EGFR-TKI in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer*. 2014;83(2):146-53.
211. Huang S, He X. The role of microRNAs in liver cancer progression. *Br J Cancer*. 2011;104(2):235-40.
212. Jopling CL, Yi M, Lancaster AM, Lemon SM, Sarnow P. Modulation of hepatitis C virus RNA abundance by a liver-specific MicroRNA. *Science*. 2005;309(5740):1577-81.
213. Goodrich JA, Kugel JF. Non-coding-RNA regulators of RNA polymerase II transcription. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2006;7(8):612-6.
214. John B, Enright AJ, Aravin A, Tuschl T, Sander C, Marks DS. Human MicroRNA targets. *PLoS Biol*. 2004;2(11):e363.
215. Lanford RE, Hildebrandt-Eriksen ES, Petri A, Persson R, Lindow M, Munk ME, et al. Therapeutic silencing of microRNA-122 in primates with chronic hepatitis C virus infection. *Science*. 2010;327(5962):198-201.
216. Lindow M, Kauppinen S. Discovering the first microRNA-targeted drug. *J Cell Biol*. 2012;199(3):407-12.
217. Murakami Y, Yasuda T, Saigo K, Urashima T, Toyoda H, Okanoue T, et al. Comprehensive analysis of microRNA expression patterns in hepatocellular carcinoma and non-tumorous tissues. *Oncogene*. 2006;25(17):2537-45.

218. Lynch TJ, Bell DW, Sordella R, Gurubhagavatula S, Okimoto RA, Brannigan BW, et al. Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *N Engl J Med*. 2004;350(21):2129-39.
219. Liu Y, Li M, Zhang G, Pang Z. MicroRNA-10b overexpression promotes non-small cell lung cancer cell proliferation and invasion. *Eur J Med Res*. 2013;18:41.
220. Ma Z, Chen Y, Min L, Li L, Huang H, Li J, et al. Augmented miR-10b expression associated with depressed expression of its target gene KLF4 involved in gastric carcinoma. *Int J Clin Exp Pathol*. 2015;8(5):5071-9.
221. Ouyang H, Gore J, Deitz S, Korc M. microRNA-10b enhances pancreatic cancer cell invasion by suppressing TIP30 expression and promoting EGF and TGF- β actions. *Oncogene*. 2014;33(38):4664-74.
222. Liao CG, Kong LM, Zhou P, Yang XL, Huang JG, Zhang HL, et al. miR-10b is overexpressed in hepatocellular carcinoma and promotes cell proliferation, migration and invasion through RhoC, uPAR and MMPs. *J Transl Med*. 2014;12:234.
223. Mestdagh P, Van Vlierberghe P, De Weer A, Muth D, Westermann F, Speleman F, et al. A novel and universal method for microRNA RT-qPCR data normalization. *Genome Biol*. 2009;10(6):R64.
224. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 2001;25(4):402-8.
225. Shirdel EA, Xie W, Mak TW, Jurisica I. NAViGaTing the micronome--using multiple microRNA prediction databases to identify signalling pathway-associated microRNAs. *PLoS One*. 2011;6(2):e17429.
226. Petryszak R, Keays M, Tang YA, Fonseca NA, Barrera E, Burdett T, et al. Expression Atlas update--an integrated database of gene and protein expression in humans, animals and plants. *Nucleic Acids Res*. 2016;44(D1):D746-52.
227. Chen J, Bardes EE, Aronow BJ, Jegga AG. ToppGene Suite for gene list enrichment analysis and candidate gene prioritization. *Nucleic Acids Res*. 2009;37(Web Server issue):W305-11.
228. Shannon P, Markiel A, Ozier O, Baliga NS, Wang JT, Ramage D, et al. Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome Res*. 2003;13(11):2498-504.

229. Robinson MD, McCarthy DJ, Smyth GK. edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics*. 2010;26(1):139-40.
230. Bushati N, Cohen SM. microRNA functions. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2007;23:175-205.
231. Alvarez-Garcia I, Miska EA. MicroRNA functions in animal development and human disease. *Development*. 2005;132(21):4653-62.
232. Díaz-López A, Moreno-Bueno G, Cano A. Role of microRNA in epithelial to mesenchymal transition and metastasis and clinical perspectives. *Cancer Manag Res*. 2014;6:205-16.
233. Li M, Li J, Ding X, He M, Cheng SY. microRNA and cancer. *AAPS J*. 2010;12(3):309-17.
234. Meng F, Henson R, Wehbe-Janek H, Ghoshal K, Jacob ST, Patel T. MicroRNA-21 regulates expression of the PTEN tumor suppressor gene in human hepatocellular cancer. *Gastroenterology*. 2007;133(2):647-58.
235. Shen K, Mao R, Ma L, Li Y, Qiu Y, Cui D, et al. Post-transcriptional regulation of the tumor suppressor miR-139-5p and a network of miR-139-5p-mediated mRNA interactions in colorectal cancer. *FEBS J*. 2014;281(16):3609-24.
236. Salvi A, Abeni E, Portolani N, Barlati S, De Petro G. Human hepatocellular carcinoma cell-specific miRNAs reveal the differential expression of miR-24 and miR-27a in cirrhotic/non-cirrhotic HCC. *Int J Oncol*. 2013;42(2):391-402.
237. Augello C, Vaira V, Caruso L, Destro A, Maggioni M, Park YN, et al. MicroRNA profiling of hepatocarcinogenesis identifies C19MC cluster as a novel prognostic biomarker in hepatocellular carcinoma. *Liver Int*. 2012;32(5):772-82.
238. Li W, Xie L, He X, Li J, Tu K, Wei L, et al. Diagnostic and prognostic implications of microRNAs in human hepatocellular carcinoma. *Int J Cancer*. 2008;123(7):1616-22.
239. Mizuguchi Y, Mishima T, Yokomuro S, Arima Y, Kawahigashi Y, Shigehara K, et al. Sequencing and bioinformatics-based analyses of the microRNA transcriptome in hepatitis B-related hepatocellular carcinoma. *PLoS One*. 2011;6(1):e15304.
240. Murakami Y, Tanahashi T, Okada R, Toyoda H, Kumada T, Enomoto M, et al. Comparison of hepatocellular carcinoma miRNA expression profiling as evaluated by next generation sequencing and microarray. *PLoS One*. 2014;9(9):e106314.

241. Sato F, Hatano E, Kitamura K, Myomoto A, Fujiwara T, Takizawa S, et al. MicroRNA profile predicts recurrence after resection in patients with hepatocellular carcinoma within the Milan Criteria. *PLoS One*. 2011;6(1):e16435.
242. Wong QW, Ching AK, Chan AW, Choy KW, To KF, Lai PB, et al. MiR-222 overexpression confers cell migratory advantages in hepatocellular carcinoma through enhancing AKT signaling. *Clin Cancer Res*. 2010;16(3):867-75.
243. Varnholt H, Drebber U, Schulze F, Wedemeyer I, Schirmacher P, Dienes HP, et al. MicroRNA gene expression profile of hepatitis C virus-associated hepatocellular carcinoma. *Hepatology*. 2008;47(4):1223-32.
244. Johnson SM, Grosshans H, Shingara J, Byrom M, Jarvis R, Cheng A, et al. RAS is regulated by the let-7 microRNA family. *Cell*. 2005;120(5):635-47.
245. Wang Z, Lin S, Li JJ, Xu Z, Yao H, Zhu X, et al. MYC protein inhibits transcription of the microRNA cluster MC-let-7a-1~let-7d via noncanonical E-box. *J Biol Chem*. 2011;286(46):39703-14.
246. Shirasaki T, Honda M, Shimakami T, Horii R, Yamashita T, Sakai Y, et al. MicroRNA-27a regulates lipid metabolism and inhibits hepatitis C virus replication in human hepatoma cells. *J Virol*. 2013;87(9):5270-86.
247. Li S, Li J, Fei BY, Shao D, Pan Y, Mo ZH, et al. MiR-27a promotes hepatocellular carcinoma cell proliferation through suppression of its target gene peroxisome proliferator-activated receptor γ . *Chin Med J (Engl)*. 2015;128(7):941-7.
248. Guttilla IK, White BA. Coordinate regulation of FOXO1 by miR-27a, miR-96, and miR-182 in breast cancer cells. *J Biol Chem*. 2009;284(35):23204-16.
249. Choi JE, Hur W, Kim JH, Li TZ, Lee EB, Lee SW, et al. MicroRNA-27a modulates HCV infection in differentiated hepatocyte-like cells from adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. *PLoS One*. 2014;9(5):e91958.
250. Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM, Fritz BR, Wyman SK, Pogosova-Agadjanyan EL, et al. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(30):10513-8.
251. Zhou L, Liang X, Zhang L, Yang L, Nagao N, Wu H, et al. MiR-27a-3p functions as an oncogene in gastric cancer by targeting BTG2. *Oncotarget*. 2016.

252. Guled M, Lahti L, Lindholm PM, Salmenkivi K, Bagwan I, Nicholson AG, et al. CDKN2A, NF2, and JUN are dysregulated among other genes by miRNAs in malignant mesothelioma -A miRNA microarray analysis. *Genes Chromosomes Cancer*. 2009;48(7):615-23.
253. Wang W, Peng B, Wang D, Ma X, Jiang D, Zhao J, et al. Human tumor microRNA signatures derived from large-scale oligonucleotide microarray datasets. *Int J Cancer*. 2011;129(7):1624-34.
254. Tang JT, Wang JL, Du W, Hong J, Zhao SL, Wang YC, et al. MicroRNA 345, a methylation-sensitive microRNA is involved in cell proliferation and invasion in human colorectal cancer. *Carcinogenesis*. 2011;32(8):1207-15.
255. Shiu TY, Huang SM, Shih YL, Chu HC, Chang WK, Hsieh TY. Hepatitis C virus core protein down-regulates p21(Waf1/Cip1) and inhibits curcumin-induced apoptosis through microRNA-345 targeting in human hepatoma cells. *PLoS One*. 2013;8(4):e61089.
256. Xiong D, Sheng Y, Ding S, Chen J, Tan X, Zeng T, et al. LINC00052 regulates the expression of NTRK3 by miR-128 and miR-485-3p to strengthen HCC cells invasion and migration. *Oncotarget*. 2016.
257. Zhang J, Yang Y, Yang T, Yuan S, Wang R, Pan Z, et al. Double-negative feedback loop between microRNA-422a and forkhead box (FOX)G1/Q1/E1 regulates hepatocellular carcinoma tumor growth and metastasis. *Hepatology*. 2015;61(2):561-73.
258. Navon R, Wang H, Steinfeld I, Tsalenko A, Ben-Dor A, Yakhini Z. Novel rank-based statistical methods reveal microRNAs with differential expression in multiple cancer types. *PLoS One*. 2009;4(11):e8003.
259. Pigati L, Yaddanapudi SC, Iyengar R, Kim DJ, Hearn SA, Danforth D, et al. Selective release of microRNA species from normal and malignant mammary epithelial cells. *PLoS One*. 2010;5(10):e13515.
260. Gu J, Chen Y, Huang H, Yin L, Xie Z, Zhang MQ. Gene module based regulator inference identifying miR-139 as a tumor suppressor in colorectal cancer. *Mol Biosyst*. 2014;10(12):3249-54.
261. Bobowicz M, Skrzypski M, Czapiewski P, Marczyk M, Maciejewska A, Jankowski M, et al. Prognostic value of 5-microRNA based signature in T2-T3N0 colon cancer. *Clin Exp Metastasis*. 2016.

262. Huang JY, Zhang K, Chen DQ, Chen J, Feng B, Song H, et al. MicroRNA-451: epithelial-mesenchymal transition inhibitor and prognostic biomarker of hepatocellular carcinoma. *Oncotarget*. 2015;6(21):18613-30.
263. Liu X, Zhang X, Xiang J, Lv Y, Shi J. miR-451: potential role as tumor suppressor of human hepatoma cell growth and invasion. *Int J Oncol*. 2014;45(2):739-45.
264. Lv G, Hu Z, Tie Y, Du J, Fu H, Gao X, et al. MicroRNA-451 regulates activating transcription factor 2 expression and inhibits liver cancer cell migration. *Oncol Rep*. 2014;32(3):1021-8.
265. Li HP, Zeng XC, Zhang B, Long JT, Zhou B, Tan GS, et al. miR-451 inhibits cell proliferation in human hepatocellular carcinoma through direct suppression of IKK- β . *Carcinogenesis*. 2013;34(11):2443-51.
266. Poortahmasebi V, Poorebrahim M, Najafi S, Jazayeri SM, Alavian SM, Arab SS, et al. How Hepatitis C Virus Leads to Hepatocellular Carcinoma: A Network-Based Study. *Hepat Mon*. 2016;16(2):e36005.
267. Goossens N, Hoshida Y. Hepatitis C virus-induced hepatocellular carcinoma. *Clin Mol Hepatol*. 2015;21(2):105-14.
268. Koike K. Molecular basis of hepatitis C virus-associated hepatocarcinogenesis: lessons from animal model studies. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2005;3(10 Suppl 2):S132-5.
269. Okuda M, Li K, Beard MR, Showalter LA, Scholle F, Lemon SM, et al. Mitochondrial injury, oxidative stress, and antioxidant gene expression are induced by hepatitis C virus core protein. *Gastroenterology*. 2002;122(2):366-75.
270. Pietschmann T, Lohmann V, Kaul A, Krieger N, Rinck G, Rutter G, et al. Persistent and transient replication of full-length hepatitis C virus genomes in cell culture. *J Virol*. 2002;76(8):4008-21.
271. Scholle F, Li K, Bodola F, Ikeda M, Luxon BA, Lemon SM. Virus-host cell interactions during hepatitis C virus RNA replication: impact of polyprotein expression on the cellular transcriptome and cell cycle association with viral RNA synthesis. *J Virol*. 2004;78(3):1513-24.
272. Schwer B, Ren S, Pietschmann T, Kartenbeck J, Kaehlcke K, Bartenschlager R, et al. Targeting of hepatitis C virus core protein to mitochondria through a novel C-terminal localization motif. *J Virol*. 2004;78(15):7958-68.

273. Tan YL, Bai ZG, Zou WL, Ma XM, Wang TT, Guo W, et al. miR-744 is a potential prognostic marker in patients with hepatocellular carcinoma. Clin Res Hepatol Gastroenterol. 2015;39(3):359-65.

ANEXO 1 - Certificado de Aprovação do estudo junto ao CEP



Universidade Estadual Paulista
Faculdade de Medicina de Botucatu

Distrito Rubião Junior, s/nº - Botucatu - S.P.
CEP: 18.618-970
Fone: (14) 3880-1608 / 3880-1609
e-mail secretaria: capellup@fmb.unesp.br
kleber@fmb.unesp.br
e-mail coordenadoria: tsarden@fmb.unesp.br



Registrado no Ministério da Saúde
em 30 de abril de 1997

Botucatu, 07 de agosto de 2013

OF. 111/2013-CEP

Ilustríssima Senhora
Profª Drª Patrícia Pintor dos Reis
Do Departamento de Cirurgia e Ortopedia da
Faculdade de Medicina de Botucatu

Prezada Drª Patrícia,

Informo que o Projeto de Pesquisa (Protocolo CEP 4382-2012) "MicroRNoma dos carcinomas de fígado, pâncreas e vias biliares", conduzido por Vossa Senhoria, com a colaboração dos Drs. Claudia Nishida Hasimoto, Giovanni Faria Silva, Igor Jurisica, Juan Carlos Llanos Leonardo Pelafsky, Luiz Lehmann Coutinho, Maria Aparecida Marchesan Rodrigues Kobayasi, Rodrigo Severo de Camargo Pereira e Robson Francisco Carvalho, aprovado por este colegiado 01/10/2012, conta com 02 sub-projetos à saber:

Sub-Projeto I: (Protocolo CEP 4382-2012-A) "MicroRNoma dos carcinomas de fígado" que será conduzido por Jovita Ramos Ariede (Objetivo Acadêmico de Doutorado) e terá a colaboração de: Dra Sandra Drigo Linde, Dr. Rui Manoel Vieira Reis, Márcia Maria Chiquitelli Marques Silveira, Cristóvan Scapulatempo Neto, André Lopes Carvalho e o Prof. Dr. Wan Lam (British Columbia Câncer Center, Vancouver, Canadá).

Sub-Projeto II: (Protocolo CEP 4382-2012-B) "MicroRNoma dos carcinomas de pâncreas" que será conduzido por Tainara Francini Felix (Objetivo Acadêmico de Mestrado) e terá a colaboração de: Dra Sandra Drigo Linde, Dr. Rui Manoel Vieira Reis, Márcia Maria Chiquitelli Marques Silveira, Cristóvan Scapulatempo Neto, André Lopes Carvalho e o Prof. Dr. Wan Lam (British Columbia Câncer Center, Vancouver, Canadá).

Situação do Projeto: **APROVADO**. Ao final da execução dos projetos, deverá ser apresentado ao CEP "Relatório Final de Atividades".

Atenciosamente,

Prof. Dr. Trajano Sardenberg
Coordenador do CEP.

ANEXO 2 - Artigo intitulado “Deregulated miRNA-mRNA-lncRNA networks associated with hepatitis virus infection in hepatocellular carcinoma”.

Deregulated miRNA-mRNA-lncRNA networks associated with hepatitis virus infection in hepatocellular carcinoma.

Jovita R Ariede¹, Fábio E Severino¹, Natália Bertoni¹, Maria A M Rodrigues², Claudia N Hasimoto¹, Leonardo Pelafsky¹, Juan C Llanos¹, Sandra A Drigo^{3,4}, Giovanni F Silva⁵, Patricia P Reis^{*1,3}.

¹Department of Surgery and Orthopedics, Faculty of Medicine, São Paulo State University – UNESP, Botucatu, SP, Brazil.

²Department of Pathology, Faculty of Medicine, São Paulo State University – UNESP, Botucatu, SP, Brazil.

³NeoGene Laboratory, Experimental Research Unity (UNIPEX), Faculty of Medicine, São Paulo State University – UNESP, Botucatu, Brazil.

⁴Department of Pathology, Faculty of Veterinary and Animal Science, São Paulo State University – UNESP, Botucatu, Brazil.

⁵Division of Gastroenterology, Department of Internal Medicine, Faculty of Medicine, São Paulo State University – UNESP, Botucatu, SP, Brazil.

*Corresponding author:

Patricia P Reis, Ph.D

Assistant Professor

Department of Surgery and Orthopedics, Faculty of Medicine, São Paulo State University – UNESP.

Av. Prof. Montenegro, S/N. Botucatu, SP. CEP 18618-970. Brazil.

Telephone: +55 (14) 3880-1635/3880-1451

Email: preis@fmb.unesp.br

Running title: non-coding RNAs in hepatocellular carcinoma

Keywords: Hepatocellular carcinoma, hepatitis virus, microRNA, networks, pathways, meta-analysis.

ABSTRACT

Hepatocellular carcinoma (HCC) is one of the most common and lethal cancers worldwide. Hepatitis B and C viral genes are associated with HCC development through promotion of chronic inflammation and hepatocyte proliferation, which leads to malignant transformation. Non-coding RNAs such as microRNAs (miRNAs) and long non-coding RNAs (lncRNAs) have been implicated as modulators of disease-associated pathways in cancer. However, globally deregulated networks modulated by miRNAs and lncRNAs associated with hepatitis virus infection in HCC are not fully understood. We performed a meta-analysis and bioinformatic mining of literature data in order to identify deregulated expression of miRNAs, miRNA-target genes, lncRNAs as well as biological functions that may be altered in hepatitis virus-associated HCC. We identified 45 significantly deregulated miRNAs in HCC, which target 32 genes expressed in liver tissue. In addition, the lncRNAs HOTAIR and MALAT-1 were also identified as deregulated in HCC. Based on integrative data analysis, we propose a putative regulatory mechanism by which miRNAs, target genes and lncRNAs play a cooperative role to alter key biological functions in hepatitis virus-associated HCC.

INTRODUCTION

Hepatocellular carcinoma (HCC) is the most common primary malignant liver tumor with (1,2) and the second most common cause of cancer death worldwide (2-4). HCC is the fifth most common cancer in men and the ninth in women (2). Approximately 60% of HCC cases occur in developing countries and this frequency is increasing (5). Development and progression of HCC occurs in a multistep process, with malignant transformation usually associated with chronic hepatitis and/or cirrhosis (6). The majority (~90%) of HCC arising from cirrhosis is associated with chronic hepatitis B and C viral infections (7), alcohol abuse, primary biliary cirrhosis, autoimmune hepatitis, nonalcoholic steatohepatitis, aflatoxin B1 infection, and hereditary diseases (8), e.g., hemochromatosis (9-11).

Hepatitis B and C viral genes are associated with HCC development through promotion of chronic inflammation and hepatocyte proliferation, which leads to malignant transformation. Therefore, understanding HCC pathogenesis mechanisms is of utmost importance for the development of effective cancer prevention and treatment strategies. Despite the continuous advances in surgical treatment, primary tumor recurrence as well as regional and/or distant metastasis are commonly observed in clinical practice and associated with the high mortality rates of patients with HCC (12, 13). Since tumor recurrence and metastasis are strongly associated with late diagnosis, identification of robust diagnostic, prognostic and predictive biomarkers is urgently needed in order to improve patient survival (11).

Deregulation of non-coding RNAs (ncRNAs), especially microRNAs (miRNAs) and long non-coding RNAs (lncRNAs) has been implicated in cancer (14). miRNAs are small RNAs (~18–24 nucleotide length) which post-transcriptionally regulate gene expression through binding to the 3' untranslated region (UTR) of mRNA and translational inhibition or mRNA degradation (canonical mechanism). In contrast, lncRNAs present >200 nucleotide-100 kb in length and are capable of regulating gene expression in diverse levels, including chromatin modification, transcription and post-transcriptional processing (15) and may have both functional roles and therapeutic relevance (16). Current literature data indicate that miRNA and lncRNA deregulation may directly promote initiation and progression of HCC (17).

Herein, we performed a meta-analysis with the goal of identifying deregulated expression of miRNAs, and to apply computational analyses to identify liver-specific miRNA target genes and lncRNAs as regulators of miRNA expression.

METHODS

Search strategy

We performed a meta-analysis focused on published miRNA expression profiling data publicly available in PubMed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>). Key words applied in the search were “carcinoma, hepatocellular (mesh terms)”, “carcinoma, hepatocellular (mesh terms) AND “microRNA profile”. Filters activated for the selection of the articles were publication dates (10 years), species (humans) and languages (English). Results were independently revised by J.R.A. and N.B. on December 15, 2016.

Study selection

Meta-analysis included eligible studies published during 2006-2016 which fulfilled the following inclusion criteria: studies assessing global miRNA expression in tissue samples of human hepatocellular carcinoma compared with adjacent non-neoplastic and or normal liver tissues and inclusion of confirmatory or validation analysis and with data included in the full text or in the supplementary material or publicly available. We further applied the following exclusion criteria: studies using exclusively animal models or cell lines, studies with duplicated, previously reported data, letters or case reports and studies with sample number <10.

Data extraction

Relevant data were retrieved from the full text or supplementary data of each selected study as follows: basic characteristics of studies such as name of the first author, year of publication, country of origin, patient characteristics, source of control samples and methods of miRNA and lncRNA quantification.

Computational identification of miRNA target genes expressed in liver tissue

The targets of miRNAs were predicted using microRNA Data Integration Portal, mirDIP (<http://ophid.utoronto.ca/mirDIP/>), which integrates data sets from different databases of miRNA prediction (18). Only target predictions in top 1% were considered for further analyses. Data were integrated using bioinformatics methods, and genes were mapped into proteins, which were then used to construct protein-protein interaction (PPI) networks. The PPI networks were generated using Metasearch STRING platform v9.1 (19, 20). Data visualization and annotation were performed using Cytoscape v3.1.1 (21, 22). Networks are

illustrated as graphs with the nodes representing the genes/miRNAs/proteins and the edges representing their interactions. The network was analyzed based on topological features like betweenness centrality (BC) and node degree using Cytoscape software. Proteins with altered expression (up- or down-regulated) in hepatocellular cancer were filtered based on dbDEPC (<http://lifecenter.sgst.cn/dbdepc/index.do>) and The Human Protein Atlas database (<http://www.proteinatlas.org/>).

Enrichment analysis

Relevant biological pathways for target genes was performed by BiNGO application, available in Cytoscape (23). BiNGO allows recognizing which of Gene Ontology (GO) categories are statistically more represented in a determined set of genes. Relevant biological pathways including drug-gene interactions were identified using Drug-Gene Interaction Database. Regulatory networks included genes with roles in cell growth and differentiation, cell signaling and transcription.

RESULTS

Eligible studies and meta-analysis databases

A total of 44 studies published between 2006 and 2016 were identified. These studies were carefully evaluated applying inclusion and exclusion criteria, which resulted in 8 eligible studies for meta-analysis (**Figure 1**). These 8 studies included 273 HCC samples and 253 non-neoplastic liver tissues (**Table 1**). A total of 199 differentially expressed miRNAs (113 over-expressed and 86 under-expressed) were identified in the meta-analysis. Downstream bioinformatic analyses were conducted using 45 miRNAs, which were identified as deregulated in at least two studies and with the same direction of expression level.

Target prediction of deregulated miRNAs

Computational target prediction identified 783 target genes of the 45 selected miRNAs, as above; the complete list of miRNAs and targets is available at https://drive.google.com/file/d/0B9MqsUMO6CYfZ0NMRTFudkZZYUNUNGYyTHNsVV_RJeHpsYy1j/view?usp=sharing. Thereafter, two strategies were used to filter this list of 783 target genes aiming at identifying the most relevant genes and their encoded proteins, which would be those expressed in liver and deregulated in HCC. First, we constructed protein-protein interaction (PPI) networks using as input the 783 target genes via STRING database

(**Supplementary Figure 1**). Results showed that five proteins: XRN1 (5'-3' exoribonuclease 1), ITGA2 (integrin subunit alpha 2), PCNA (proliferating cell nuclear antigen), RAD51 (RAD 51 recombinase) and SMAD2 (SMAD family member 2) had the top scores based on the betweenness centrality (BC) criteria, which denotes the importance of a node according to the total number of nodes they interact with directly (24). These data also suggest that these are “hub” proteins with important biological functions, since identified central nodes are highly influential on network behavior and are in the mainstream of information. Secondly, proteins with altered expression (up- or down-regulated) in HCC were identified according to data from the Database of Differentially Expressed Proteins in Human Cancer (<http://lifecenter.sgst.cn/dbdepc/index.do>) (25) and The Human Protein Atlas (<http://www.proteinatlas.org/>) (26), revealing that 32/783 proteins were expressed in liver tissue and deregulated in HCC. Interestingly, about 1/3 (10/32) of these proteins (XRN1, CPS1, HNRNPA2B1, HNRNPC, PABPC4, PCNA, TCP1, TUBA1A, VCL and VIM) were among the ones identified in the PPI network analysis. These 32 proteins are regulated by 21 of the 45 miRNAs described above. We then performed an integrative network analysis of the 32 proteins and their 21 regulatory miRNAs using STRING database (**Figure 2**). Expression patterns of most miRNAs and coding target genes showed inverse correlation. For instance, under-expression of miR-185 was associated with overexpression of TCP1 (t-complex polypeptide-1), an up-regulated chaperonin in hepatocellular carcinoma, which helps promote HCC proliferation (27). As expected, we identified miRNAs that regulate multiple targets and common targets regulated by different miRNAs; e.g., miR-26a and miR-26b under-expression regulating and associated with PCNA and ACADM (acyl-CoA dehydrogenase, C-4 to C-12 straight chain) over-expression (**Figure 2**). Notably, almost all of these proteins were altered in HCC associated with HCV or HBV infection, according to dbDEPC analysis results.

Further, we investigated interactions between miRNAs, target genes and long non-coding RNAs (lncRNAs) using Starbase v.2.0 (<http://starbase.sysu.edu.cn/>) (28). This analysis showed that XRN1 has multiple interactions, both with protein binding (TUBA1A, VPS35 and ACAT1) and RNA binding proteins (HNRNPA2B1, HNRNPC, PABPC4, DDX3X) as well as with miR-122 as a regulatory miRNA.

In addition, we identified that over-expression of the Metastasis-associated lung adenocarcinoma transcript 1 (MALAT-1) can down-regulate miRNAs miR-26a, miR-26b, miR-30a, miR-30e, miR-144, miR-185, miR-194 and miR-200a (**Figure 3**). Particularly, ACADM and PCNA, regulated by miR-26a and miR-26b; HSD3B1 by miR-194; TCP1 by

miR-185 and HNRNPA2B1 by miR-30a and miR-30e all showed an inverse correlation, suggesting that MALAT-1 can indirectly modulate proteins by regulating miRNAs that target their coding genes. Of note, proteins encoded by these genes have oxidoreductase activity, RNA and DNA binding properties, suggesting that regulatory networks including these miRNAs and MALAT-1 may play an important role in HCC. Moreover, our analysis identified the lncRNA HOTAIR as over-expressed in HCC and able to up-regulate miR-221, leading to under-expression of DDX3X, a DEAD box RNA helicase previously reported as involved in hepatitis virus-associated HCC (29).

Integrative analyses allowed us to identify a putative regulatory model by which miRNAs (miR-122, miR-30a, miR-30e and miR-200a) interact with target genes *XRN1*, *TUBA1A*, *HNRNPA2B1*, *HNRNPC* and *DDX3X* and the lncRNA MALAT-1 in hepatitis virus-associated HCC (**Figure 4**).

DISCUSSION

The molecular mechanisms of acute hepatitis viral infection, end-stage hepatitis and HCC development have been extensively studied. However, the regulatory changes associated with the presence or absence of HCV or HBV infection and liver oncogenesis have not been fully elucidated.

Herein, through a comprehensive meta-analysis of literature data, we were able to identify a main regulatory miRNA-mRNA-lncRNA network including miR-122, miR-10b, miR-200a and miR-221, which control the expression of target genes deregulated in HCC and the lncRNAs MALAT-1 and HOTAIR.

Among miRNA targets, *XRN1* is part of a general regulatory intracellular RNA metabolism mechanism by fragmentation of different RNA molecules. *XRN1* has 5'→3' exoribonuclease activity and also exerts important functions such as mRNA degradation, decapped mRNA and 3' intermediate from endonucleolytic cleavage, lncRNA and miRNA degradation (30). There is a cross-talk collaborative effect between mRNAs and exoribonucleases; upon translational inhibition, mRNA targets proceed to decay dependent deadenylation by *XRN1* (30). *XRN1* enzyme also interacts with PABPC4 protein (31), which is part of the PABPC family of poly(A) binding proteins and binds the 3' end poly(A) tail of mRNA regulating the initiation of translation and mRNA decay (32), likely having a protective effect on some mRNA molecules in human cells (33).

In addition, *XRN1* is known to interact with *DDX3X*, a DEAD-box RNA helicase

protein, which binds the hepatitis C virus core protein, becoming essential for viral replication (34). DDX3X expression is deregulated in hepatitis virus-associated hepatocellular carcinoma (29, 35) acting as tumor suppressor. It interacts with partner proteins as PAPB proteins (36, 37) and XRN1 in RNA processing bodies (P-body), wherein DDX3X and XRN1 are hijacked in HCV infection (38).

HCV replication has been shown to be dependent on miR-122, an abundant miRNA in the liver. Although this replication-dependent mechanism led to the development of a miR-122 antagomir as a host-targeting antiviral, the molecular mechanisms underlying this interaction remain to be defined. Reports suggest that miR-122 protects the viral RNA against decay mediated by the cellular 5' exoribonucleases XRN1 and XRN2 (39). In addition, the functions of miR-122 in the promotion of HCV life cycle are not fully understood. Another mechanism by which miR-122 could be contributing to viral replication would be by binding of miR-122 to each of the two binding sites in the HCV 5'-UTR, stimulating viral translation by internal ribosome entry site (IRES) (40, 41). XRN1 protein may also play a role in replication-dependent histone mRNA degradation, interacting directly with the enhancer of mRNA-decapping protein.

Bioinformatic analysis also showed that miR-10b may regulate XRN1, however functional validation is still required to verify miR-10b/XRN1 direct interaction. Of note, miR-10b is up-regulated and suggested to act as an oncomiR in several cancers types. miR-10b deregulation promoted tumorigenesis, increased proliferation, migration, and invasion of non-small cell lung cancer cell lines (42). In addition, miR-10b was over-expressed in gastric carcinoma (43) and enhanced pancreatic cancer cell invasion (44). In HCC, miR-10b is over-expressed in primary tumor tissues and cell lines, it stimulates cell proliferation and promotes metastasis (45). Is it still unknown whether miR-10b over-expression in numerous cancers cause a decline in XRN1 enzymatic levels, although there are data confirming the important role played by XRN1 in HCC, mainly in cases of viral origin. miR-10b has been suggested as an useful noninvasive biomarker in cancer, including HCC (46).

miR-200 family members (miR-200a, miR-200b, miR-200C, miR-141 and miR-429) were also identified herein and are broadly down-regulated in several cancers, having potent suppressive effects on cell transformation, cancer cell proliferation, migration, invasion, tumor growth and metastasis (47). miR-200a down-regulation has been identified herein as well as in previous studies being suggested as a potential biomarker for treatment of patients with HCC (48). miR-200a expression has a metastasis-suppressing effect via ZEB-2

downregulation (49). miR-200a targets the RNA binding protein PABPC4, which also interacts with XRN1, and regulates cell growth in cervical cancer cell lines (50) and is highly expressed in colorectal cancer (51).

miR-221 is over-expressed in many cancer types, such as gastric (52) and pancreatic carcinoma (53) and HCC, in which enhances cell growth and inhibits apoptosis (54). miR-221 regulates several genes in a multitude of regulatory pathways required for normal cell physiology (55). miR-221 also targets *DDX3X* and *IGF2BP2*, which are important genes for HCV life cycle, since they participate in the viral capsid assembly process (56, 57). miR-221 was able to inhibit cell proliferation and invasion, induced apoptosis and increased cellular radio sensitivity in gastric cancer (52).

Furthermore, lncRNAs have been shown to be deregulated during tumor development and progression. The HOTAIR-HOX (Antisense Intergenic RNA) is an oncogenic lncRNA that has been found to be a predictor of patient outcome, risk of metastasis development and death in breast cancer (58). This lncRNA is expressed from the HOXC locus and was discovered as a repressor of *HOXD* genes (58, 59). Evidence of interaction between HOTAIR and miR-148a was reported in breast cancer, wherein the lncRNA negatively regulates miR-148a (60). Interestingly, high HOTAIR expression in HCC was associated with an increased risk of recurrence after tumor resection (61). HOTAIR decreased HCC cell line Bel7402 proliferation by suppressing the levels of growth factor proteins, which are important for cell motility and metastasis (62).

MALAT-1, another lncRNA identified in our meta-analysis, is localized with the pre-mRNA-splicing factor SF2/ASF and CC3 antigen and is highly conserved within the mammalian lineage (63). MALAT-1 was first described in non-small cell lung cancer (NSCLC) and associated with metastasis (64). Interestingly, MALAT-1 is mapped at 11q13.1, a genomic location associated with chromosomal translocations in cancer and has been shown as a circulating diagnostic biomarker (65, 66) and new therapeutic target in prostate cancer (67). According to data from Lin et al. (68) MALAT-1 is over-expressed in HCC and it is a potential generic marker for human cancers since it is also widely over-expressed in cancers of colon, lung, pancreas and breast. MALAT-1 is thus considered to have an oncogenic effect and it also regulates invasion and metastasis (69). It interacts linking directly with the RNA-binding protein SFPQ, promoting cell proliferation and migration in colorectal cancer via PTBP2 (70) and is able to induce the expression of genes such as the pre-mRNA processing

factor HNRNP-A2B1/C, *TUBA1A* alpha tubulin (71) and *DDX3X* (72); all of them were herein identified to interact with XRN1.

Hepatitis viruses may positively regulate MALAT-1, increasing its expression levels in infected cells, similar as it has been reported for human papilloma virus (HPV) infection in cervical cancer (73) and in flavivirus infection (74). Therefore, MALAT-1 may downregulate important miRNAs associated with tumorigenesis, such as miR-26a, miR-26b, miR-30e, miR-144, miR-194, miR-185 and miR-200a and may interact with hepatitis viruses. Based on our integrative analysis results, we propose a putative regulatory mechanism by which miRNAs, target genes and lncRNAs interact in HCC associated with hepatitis viral infection. In this model, miR-122 binds to viral genomic RNA, protecting it against XRN1 enzymatic degradation (75). Hepatitis viruses would thus control the expression of proteins essential for replication through modulation of MALAT-1, which in turn represses the expression of miR-30a, miR-30e and miR-200a and induces expression of *TUBA1A*, *HNRNPA2B1*, *HNRNPC* and *DDX3X*. We acknowledge that functional studies are needed to elucidate the function and mechanisms of such molecules in hepatitis virus associated liver oncogenesis. However, by integrating miRNAs and lncRNA regulated mechanisms in HCC, we may be able to identify key biomarkers and pathways that are likely to contribute for the development of improved diagnostic and treatment strategies for patients.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflicts of interest.

REFERENCES

1. Khare S, Zhang Q, Ibdah JA. Epigenetics of hepatocellular carcinoma: role of microRNA. *World J Gastroenterol*. 2013;19(33):5439-45.
2. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer*. 2015;136(5):E359-86.
3. Perz JF, Armstrong GL, Farrington LA, Hutin YJ, Bell BP. The contributions of hepatitis B virus and hepatitis C virus infections to cirrhosis and primary liver cancer worldwide. *J Hepatol*. 2006;45(4):529-38.
4. Xu Y, Li L, Xiang X, Wang H, Cai W, Xie J, et al. Three common functional polymorphisms in microRNA encoding genes in the susceptibility to hepatocellular carcinoma: a systematic review and meta-analysis. *Gene*. 2013;527(2):584-93.
5. Parkin DM. The global health burden of infection-associated cancers in the year 2002. *Int J Cancer*. 2006;118(12):3030-44.
6. Borel F, Konstantinova P, Jansen PL. Diagnostic and therapeutic potential of miRNA signatures in patients with hepatocellular carcinoma. *J Hepatol*. 2012;56(6):1371-83.
7. Hanto DW, Curry MP, Sun M, Nasser I. Hepatocellular carcinoma (HCC) in a patient with hepatitis B virus (HBV) infection. *Am J Transplant*. 2012;12(3):786-7; quiz 8.
8. Sanyal AJ, Yoon SK, Lencioni R. The etiology of hepatocellular carcinoma and consequences for treatment. *Oncologist*. 2010;15 Suppl 4:14-22.
9. Kirstein MM, Vogel A. The pathogenesis of hepatocellular carcinoma. *Dig Dis*. 2014;32(5):545-53.
10. McGlynn KA, London WT. Epidemiology and natural history of hepatocellular carcinoma. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 2005;19(1):3-23.
11. Thorgeirsson SS, Grisham JW. Molecular pathogenesis of human hepatocellular carcinoma. *Nat Genet*. 2002;31(4):339-46.
12. McCormack VA, Boffetta P. Today's lifestyles, tomorrow's cancers: trends in lifestyle risk factors for cancer in low- and middle-income countries. *Ann Oncol*. 2011;22(11):2349-57.
13. Di Leva G, Calin GA, Croce CM. MicroRNAs: fundamental facts and involvement in human diseases. *Birth Defects Res C Embryo Today*. 2006;78(2):180-9.

14. Wang J, Liu X, Wu H, Ni P, Gu Z, Qiao Y, et al. CREB up-regulates long non-coding RNA, HULC expression through interaction with microRNA-372 in liver cancer. *Nucleic Acids Res.* 2010;38(16):5366-83.
15. Wang KC, Yang YW, Liu B, Sanyal A, Corces-Zimmerman R, Chen Y, et al. A long noncoding RNA maintains active chromatin to coordinate homeotic gene expression. *Nature.* 2011;472(7341):120-4.
16. Johnsson P, Lipovich L, Grandér D, Morris KV. Evolutionary conservation of long non-coding RNAs; sequence, structure, function. *Biochim Biophys Acta.* 2014;1840(3):1063-71.
17. Alarcón CR, Lee H, Goodarzi H, Halberg N, Tavazoie SF. N6-methyladenosine marks primary microRNAs for processing. *Nature.* 2015;519(7544):482-5.
18. Shirdel EA, Xie W, Mak TW, Jurisica I. NAViGaTing the micronome--using multiple microRNA prediction databases to identify signalling pathway-associated microRNAs. *PLoS One.* 2011;6(2):e17429.
19. Snel B, Lehmann G, Bork P, Huynen MA. STRING: a web-server to retrieve and display the repeatedly occurring neighbourhood of a gene. *Nucleic Acids Res.* 2000;28(18):3442-4.
20. Franceschini A, Szklarczyk D, Frankild S, Kuhn M, Simonovic M, Roth A, et al. STRING v9.1: protein-protein interaction networks, with increased coverage and integration. *Nucleic Acids Res.* 2013;41(Database issue):D808-15.
21. Shannon P, Markiel A, Ozier O, Baliga NS, Wang JT, Ramage D, et al. Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome Res.* 2003;13(11):2498-504.
22. Saito R, Smoot ME, Ono K, Ruscheinski J, Wang PL, Lotia S, et al. A travel guide to Cytoscape plugins. *Nat Methods.* 2012;9(11):1069-76.
23. Maere S, Heymans K, Kuiper M. BiNGO: a Cytoscape plugin to assess overrepresentation of gene ontology categories in biological networks. *Bioinformatics.* 2005;21(16):3448-9.
24. Sabidussi G. The centrality of a graph. *Psychometrika.* 1966;31(4):581-603.
25. He Y, Zhang M, Ju Y, Yu Z, Lv D, Sun H, et al. dbDEPC 2.0: updated database of differentially expressed proteins in human cancers. *Nucleic Acids Res.* 2012;40(Database issue):D964-71.

26. Uhlén M, Fagerberg L, Hallström BM, Lindskog C, Oksvold P, Mardinoglu A, et al. Proteomics. Tissue-based map of the human proteome. *Science*. 2015;347(6220):1260419.
27. Cui X, Hu ZP, Li Z, Gao PJ, Zhu JY. Overexpression of chaperonin containing TCP1, subunit 3 predicts poor prognosis in hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol*. 2015;21(28):8588-604.
28. Yang JH, Li JH, Shao P, Zhou H, Chen YQ, Qu LH. starBase: a database for exploring microRNA-mRNA interaction maps from Argonaute CLIP-Seq and Degradome-Seq data. *Nucleic Acids Res*. 2011;39(Database issue):D202-9.
29. Chang PC, Chi CW, Chau GY, Li FY, Tsai YH, Wu JC, et al. DDX3, a DEAD box RNA helicase, is deregulated in hepatitis virus-associated hepatocellular carcinoma and is involved in cell growth control. *Oncogene*. 2006;25(14):1991-2003.
30. Nagarajan VK, Jones CI, Newbury SF, Green PJ. XRN 5'→3' exoribonucleases: structure, mechanisms and functions. *Biochim Biophys Acta*. 2013;1829(6-7):590-603.
31. Brook M, Gray NK. The role of mammalian poly(A)-binding proteins in co-ordinating mRNA turnover. *Biochem Soc Trans*. 2012;40(4):856-64.
32. Kühn U, Wahle E. Structure and function of poly(A) binding proteins. *Biochim Biophys Acta*. 2004;1678(2-3):67-84.
33. Kini HK, Kong J, Liebhaber SA. Cytoplasmic poly(A) binding protein C4 serves a critical role in erythroid differentiation. *Mol Cell Biol*. 2014;34(7):1300-9.
34. Ariumi Y, Kuroki M, Abe K, Dansako H, Ikeda M, Wakita T, et al. DDX3 DEAD-box RNA helicase is required for hepatitis C virus RNA replication. *J Virol*. 2007;81(24):13922-6.
35. Chao CH, Chen CM, Cheng PL, Shih JW, Tsou AP, Lee YH. DDX3, a DEAD box RNA helicase with tumor growth-suppressive property and transcriptional regulation activity of the p21waf1/cip1 promoter, is a candidate tumor suppressor. *Cancer Res*. 2006;66(13):6579-88.
36. Lai MC, Lee YH, Tarn WY. The DEAD-box RNA helicase DDX3 associates with export messenger ribonucleoproteins as well as tip-associated protein and participates in translational control. *Mol Biol Cell*. 2008;19(9):3847-58.
37. Shih JW, Wang WT, Tsai TY, Kuo CY, Li HK, Wu Lee YH. Critical roles of RNA helicase DDX3 and its interactions with eIF4E/PABP1 in stress granule assembly and stress response. *Biochem J*. 2012;441(1):119-29.

38. Ariumi Y, Kuroki M, Kushima Y, Osugi K, Hijikata M, Maki M, et al. Hepatitis C virus hijacks P-body and stress granule components around lipid droplets. *J Virol.* 2011;85(14):6882-92.
39. Li Y, Yamane D, Lemon SM. Dissecting the roles of the 5' exoribonucleases Xrn1 and Xrn2 in restricting hepatitis C virus replication. *J Virol.* 2015;89(9):4857-65.
40. Henke JI, Goergen D, Zheng J, Song Y, Schüttler CG, Fehr C, et al. microRNA-122 stimulates translation of hepatitis C virus RNA. *EMBO J.* 2008;27(24):3300-10.
41. Jangra RK, Yi M, Lemon SM. Regulation of hepatitis C virus translation and infectious virus production by the microRNA miR-122. *J Virol.* 2010;84(13):6615-25.
42. Liu Y, Li M, Zhang G, Pang Z. MicroRNA-10b overexpression promotes non-small cell lung cancer cell proliferation and invasion. *Eur J Med Res.* 2013;18:41.
43. Ma Z, Chen Y, Min L, Li L, Huang H, Li J, et al. Augmented miR-10b expression associated with depressed expression of its target gene KLF4 involved in gastric carcinoma. *Int J Clin Exp Pathol.* 2015;8(5):5071-9.
44. Ouyang H, Gore J, Deitz S, Korc M. microRNA-10b enhances pancreatic cancer cell invasion by suppressing TIP30 expression and promoting EGF and TGF- β actions. *Oncogene.* 2014;33(38):4664-74.
45. Liao CG, Kong LM, Zhou P, Yang XL, Huang JG, Zhang HL, et al. miR-10b is overexpressed in hepatocellular carcinoma and promotes cell proliferation, migration and invasion through RhoC, uPAR and MMPs. *J Transl Med.* 2014;12:234.
46. Jiang L, Cheng Q, Zhang BH, Zhang MZ. Circulating microRNAs as biomarkers in hepatocellular carcinoma screening: a validation set from China. *Medicine (Baltimore).* 2015;94(10):e603.
47. Humphries B, Yang C. The microRNA-200 family: small molecules with novel roles in cancer development, progression and therapy. *Oncotarget.* 2015;6(9):6472-98.
48. Zhong C, Li MY, Chen ZY, Cheng HK, Hu ML, Ruan YL, et al. MicroRNA-200a inhibits epithelial-mesenchymal transition in human hepatocellular carcinoma cell line. *Int J Clin Exp Pathol.* 2015;8(9):9922-31.
49. Yang X, Wang J, Qu S, Zhang H, Ruan B, Gao Y, et al. MicroRNA-200a suppresses metastatic potential of side population cells in human hepatocellular carcinoma by decreasing ZEB2. *Oncotarget.* 2015;6(10):7918-29.

50. Katzenellenbogen RA, Vliet-Gregg P, Xu M, Galloway DA. Cytoplasmic poly(A) binding proteins regulate telomerase activity and cell growth in human papillomavirus type 16 E6-expressing keratinocytes. *J Virol.* 2010;84(24):12934-44.
51. Liu D, Yin B, Wang Q, Ju W, Chen Y, Qiu H, et al. Cytoplasmic poly(A) binding protein 4 is highly expressed in human colorectal cancer and correlates with better prognosis. *J Genet Genomics.* 2012;39(8):369-74.
52. Chun-Zhi Z, Lei H, An-Ling Z, Yan-Chao F, Xiao Y, Guang-Xiu W, et al. MicroRNA-221 and microRNA-222 regulate gastric carcinoma cell proliferation and radioresistance by targeting PTEN. *BMC Cancer.* 2010;10:367.
53. Sarkar S, Dubaybo H, Ali S, Goncalves P, Kollepara SL, Sethi S, et al. Down-regulation of miR-221 inhibits proliferation of pancreatic cancer cells through up-regulation of PTEN, p27(kip1), p57(kip2), and PUMA. *Am J Cancer Res.* 2013;3(5):465-77.
54. Rong M, Chen G, Dang Y. Increased miR-221 expression in hepatocellular carcinoma tissues and its role in enhancing cell growth and inhibiting apoptosis in vitro. *BMC Cancer.* 2013;13:21.
55. Lupini L, Bassi C, Ferracin M, Bartonicek N, D'Abundo L, Zagatti B, et al. miR-221 affects multiple cancer pathways by modulating the level of hundreds messenger RNAs. *Front Genet.* 2013;4:64.
56. Hämmerle M, Gutschner T, Uckelmann H, Ozgur S, Fiskin E, Gross M, et al. Posttranscriptional destabilization of the liver-specific long noncoding RNA HULC by the IGF2 mRNA-binding protein 1 (IGF2BP1). *Hepatology.* 2013;58(5):1703-12.
57. Chatel-Chaix L, Germain MA, Motorina A, Bonneil É, Thibault P, Baril M, et al. A host YB-1 ribonucleoprotein complex is hijacked by hepatitis C virus for the control of NS3-dependent particle production. *J Virol.* 2013;87(21):11704-20.
58. Gupta RA, Shah N, Wang KC, Kim J, Horlings HM, Wong DJ, et al. Long non-coding RNA HOTAIR reprograms chromatin state to promote cancer metastasis. *Nature.* 2010;464(7291):1071-6.
59. Rinn JL, Kertesz M, Wang JK, Squazzo SL, Xu X, Brugmann SA, et al. Functional demarcation of active and silent chromatin domains in human HOX loci by noncoding RNAs. *Cell.* 2007;129(7):1311-23.
60. Tao S, He H, Chen Q. Estradiol induces HOTAIR levels via GPER-mediated miR-148a inhibition in breast cancer. *J Transl Med.* 2015;13:131.

61. Yang Z, Zhou L, Wu LM, Lai MC, Xie HY, Zhang F, et al. Overexpression of long non-coding RNA HOTAIR predicts tumor recurrence in hepatocellular carcinoma patients following liver transplantation. *Ann Surg Oncol*. 2011;18(5):1243-50.
62. Geng YJ, Xie SL, Li Q, Ma J, Wang GY. Large intervening non-coding RNA HOTAIR is associated with hepatocellular carcinoma progression. *J Int Med Res*. 2011;39(6):2119-28.
63. Hutchinson JN, Ensminger AW, Clemson CM, Lynch CR, Lawrence JB, Chess A. A screen for nuclear transcripts identifies two linked noncoding RNAs associated with SC35 splicing domains. *BMC Genomics*. 2007;8:39.
64. Ji P, Diederichs S, Wang W, Böing S, Metzger R, Schneider PM, et al. MALAT-1, a novel noncoding RNA, and thymosin beta4 predict metastasis and survival in early-stage non-small cell lung cancer. *Oncogene*. 2003;22(39):8031-41.
65. Guo F, Guo L, Li Y, Zhou Q, Li Z. MALAT1 is an oncogenic long non-coding RNA associated with tumor invasion in non-small cell lung cancer regulated by DNA methylation. *Int J Clin Exp Pathol*. 2015;8(12):15903-10.
66. Ren S, Wang F, Shen J, Sun Y, Xu W, Lu J, et al. Long non-coding RNA metastasis associated in lung adenocarcinoma transcript 1 derived miniRNA as a novel plasma-based biomarker for diagnosing prostate cancer. *Eur J Cancer*. 2013;49(13):2949-59.
67. Ren S, Liu Y, Xu W, Sun Y, Lu J, Wang F, et al. Long noncoding RNA MALAT-1 is a new potential therapeutic target for castration resistant prostate cancer. *J Urol*. 2013;190(6):2278-87.
68. Lin R, Maeda S, Liu C, Karin M, Edgington TS. A large noncoding RNA is a marker for murine hepatocellular carcinomas and a spectrum of human carcinomas. *Oncogene*. 2007;26(6):851-8.
69. Tripathi V, Ellis JD, Shen Z, Song DY, Pan Q, Watt AT, et al. The nuclear-retained noncoding RNA MALAT1 regulates alternative splicing by modulating SR splicing factor phosphorylation. *Mol Cell*. 2010;39(6):925-38.
70. Ji Q, Zhang L, Liu X, Zhou L, Wang W, Han Z, et al. Long non-coding RNA MALAT1 promotes tumour growth and metastasis in colorectal cancer through binding to SFPQ and releasing oncogene PTBP2 from SFPQ/PTBP2 complex. *Br J Cancer*. 2014;111(4):736-48.

71. Tripathi V, Shen Z, Chakraborty A, Giri S, Freier SM, Wu X, et al. Long noncoding RNA MALAT1 controls cell cycle progression by regulating the expression of oncogenic transcription factor B-MYB. *PLoS Genet.* 2013;9(3):e1003368.
72. Bernard D, Prasanth KV, Tripathi V, Colasse S, Nakamura T, Xuan Z, et al. A long nuclear-retained non-coding RNA regulates synaptogenesis by modulating gene expression. *EMBO J.* 2010;29(18):3082-93.
73. Jiang Y, Li Y, Fang S, Jiang B, Qin C, Xie P, et al. The role of MALAT1 correlates with HPV in cervical cancer. *Oncol Lett.* 2014;7(6):2135-41.
74. Bhattacharyya S, Vratil S. The Malat1 long non-coding RNA is upregulated by signalling through the PERK axis of unfolded protein response during flavivirus infection. *Sci Rep.* 2015;5:17794.
75. Thibault PA, Huys A, Amador-Cañizares Y, Gailius JE, Pinel DE, Wilson JA. Regulation of Hepatitis C Virus Genome Replication by Xrn1 and MicroRNA-122 Binding to Individual Sites in the 5' Untranslated Region. *J Virol.* 2015;89(12):6294-311.li
76. Murakami Y, Yasuda T, Saigo K, Urashima T, Toyoda H, Okanoue T, et al. Comprehensive analysis of microRNA expression patterns in hepatocellular carcinoma and non-tumorous tissues. *Oncogene.* 2006;25(17):2537-45.
77. Wong QW, Ching AK, Chan AW, Choy KW, To KF, Lai PB, et al. MiR-222 overexpression confers cell migratory advantages in hepatocellular carcinoma through enhancing AKT signaling. *Clin Cancer Res.* 2010;16(3):867-75.
78. Li W, Xie L, He X, Li J, Tu K, Wei L, et al. Diagnostic and prognostic implications of microRNAs in human hepatocellular carcinoma. *Int J Cancer.* 2008;123(7):1616-22.
79. Murakami Y, Tanahashi T, Okada R, Toyoda H, Kumada T, Enomoto M, et al. Comparison of hepatocellular carcinoma miRNA expression profiling as evaluated by next generation sequencing and microarray. *PLoS One.* 2014;9(9):e106314.
80. Augello C, Vaira V, Caruso L, Destro A, Maggioni M, Park YN, et al. MicroRNA profiling of hepatocarcinogenesis identifies C19MC cluster as a novel prognostic biomarker in hepatocellular carcinoma. *Liver Int.* 2012;32(5):772-82.
81. Sato F, Hatano E, Kitamura K, Myomoto A, Fujiwara T, Takizawa S, et al. MicroRNA profile predicts recurrence after resection in patients with hepatocellular carcinoma within the Milan Criteria. *PLoS One.* 2011;6(1):e16435.

82. Mizuguchi Y, Mishima T, Yokomuro S, Arima Y, Kawahigashi Y, Shigehara K, et al. Sequencing and bioinformatics-based analyses of the microRNA transcriptome in hepatitis B-related hepatocellular carcinoma. *PLoS One*. 2011;6(1):e15304.
83. Varnholt H, Drebbler U, Schulze F, Wedemeyer I, Schirmacher P, Dienes HP, et al. MicroRNA gene expression profile of hepatitis C virus-associated hepatocellular carcinoma. *Hepatology*. 2008;47(4):1223-32.

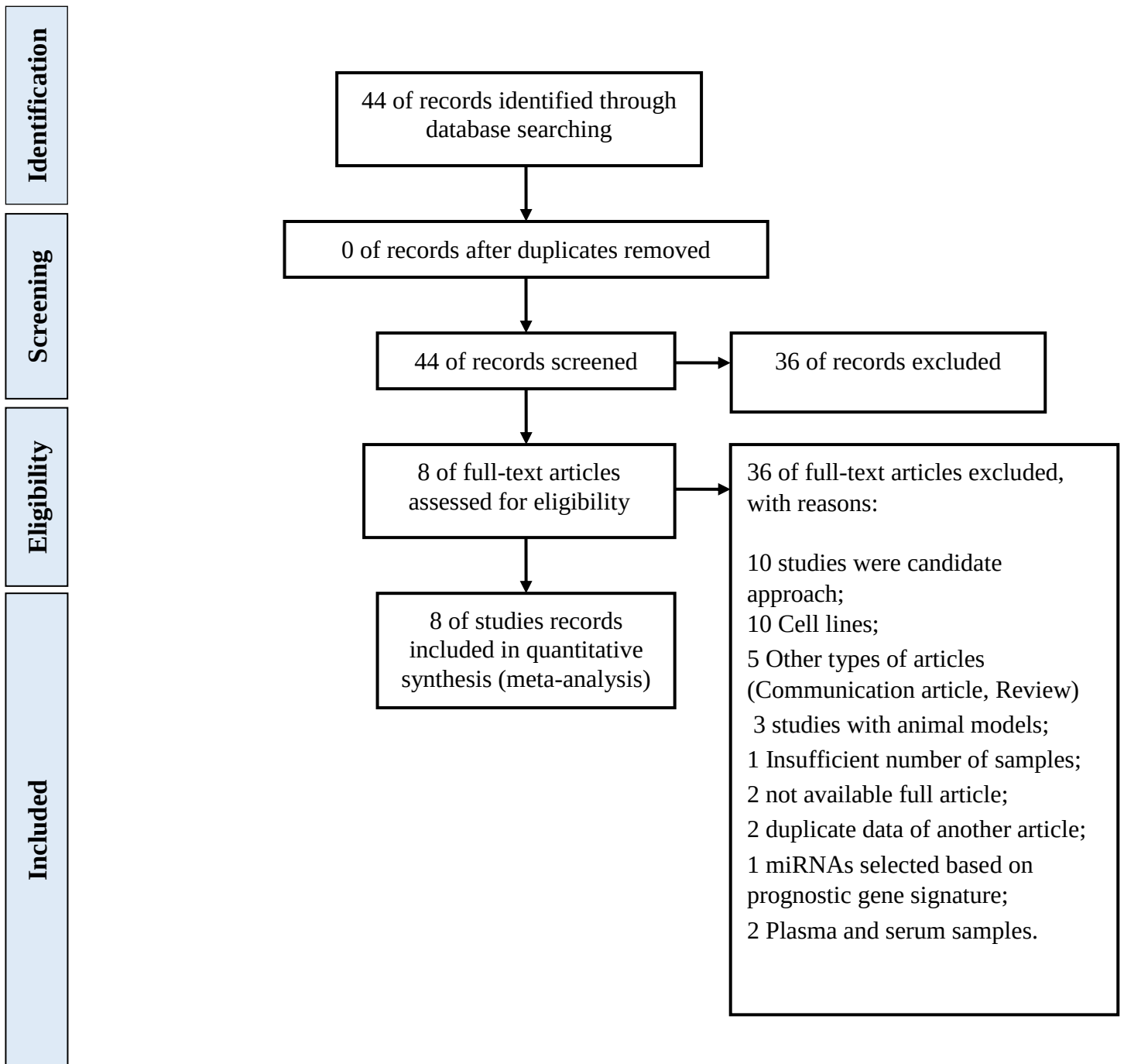


Figure 1. Flowchart of meta-analysis process.

Table 1. Description of the 8 studies used in the meta-analysis (76-83).

Public Data Set reference	Tumor samples	Control samples	Analysis platform
Murakami et al. Oncogene 2006	N=25	N=25	Custom oligonucleotide array
Wong et al. Clin Can Res 2010	N= 20	N= 12	TaqMan QPCR (Applied Biosystems)
Li et al. Int. J Cancer 2008	N=78	N=78	Custom array platform
Murakami et al. PLoS One 2014	N=14	N=6	Next-generation sequencing (NGS)
Augello et al. Liver Int 2012	N=30	N=10	Low-density array platform to profile the expression
Sato et al. PLoS One 2011	N=73	N=73	Toray's 3D-Gene™ human microRNA chips
Mizuguchi et al. Plos One 2011	N=22	N=6	Bioinformatics analysis of the sequence data
Varnholt et al. Hepatology 2008	N=11	N=1	TaqMan QPCR (Applied Biosystems)

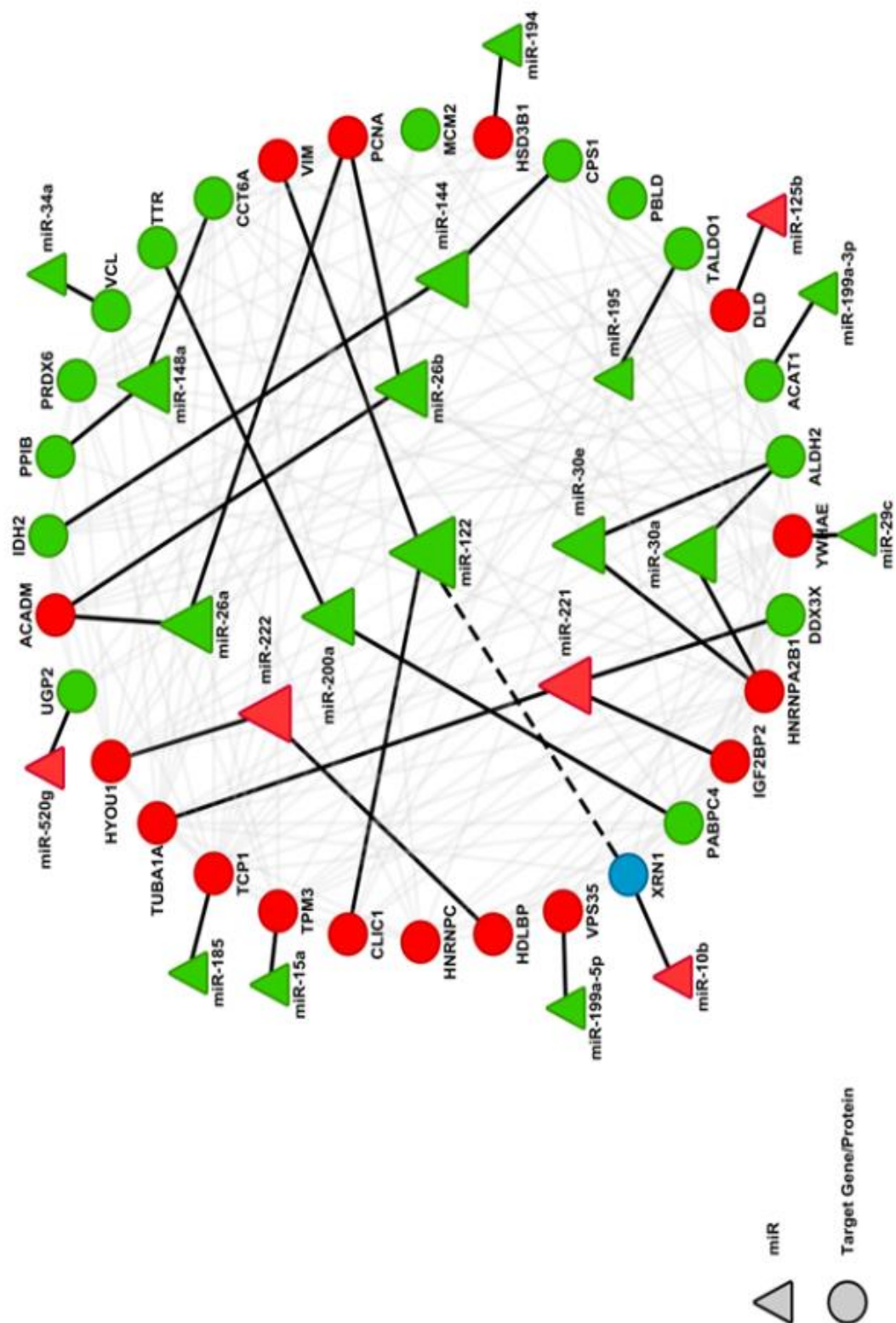


Figure 2. miRNA-gene interaction network. 32 proteins encoded by predicted genes, which have deregulated expression in HCC are shown. These proteins are predicted to be targeted by 21 miRNAs identified in the meta-analysis. The larger the triangle edge, the higher is the number of interactions identified. In red color up-regulate expression, in green down-regulated expression and in blue circle XRN1 highlighted. Dashed line represents indirect interaction between miR-122 and XRN1 enzyme upon infection by the hepatitis virus.

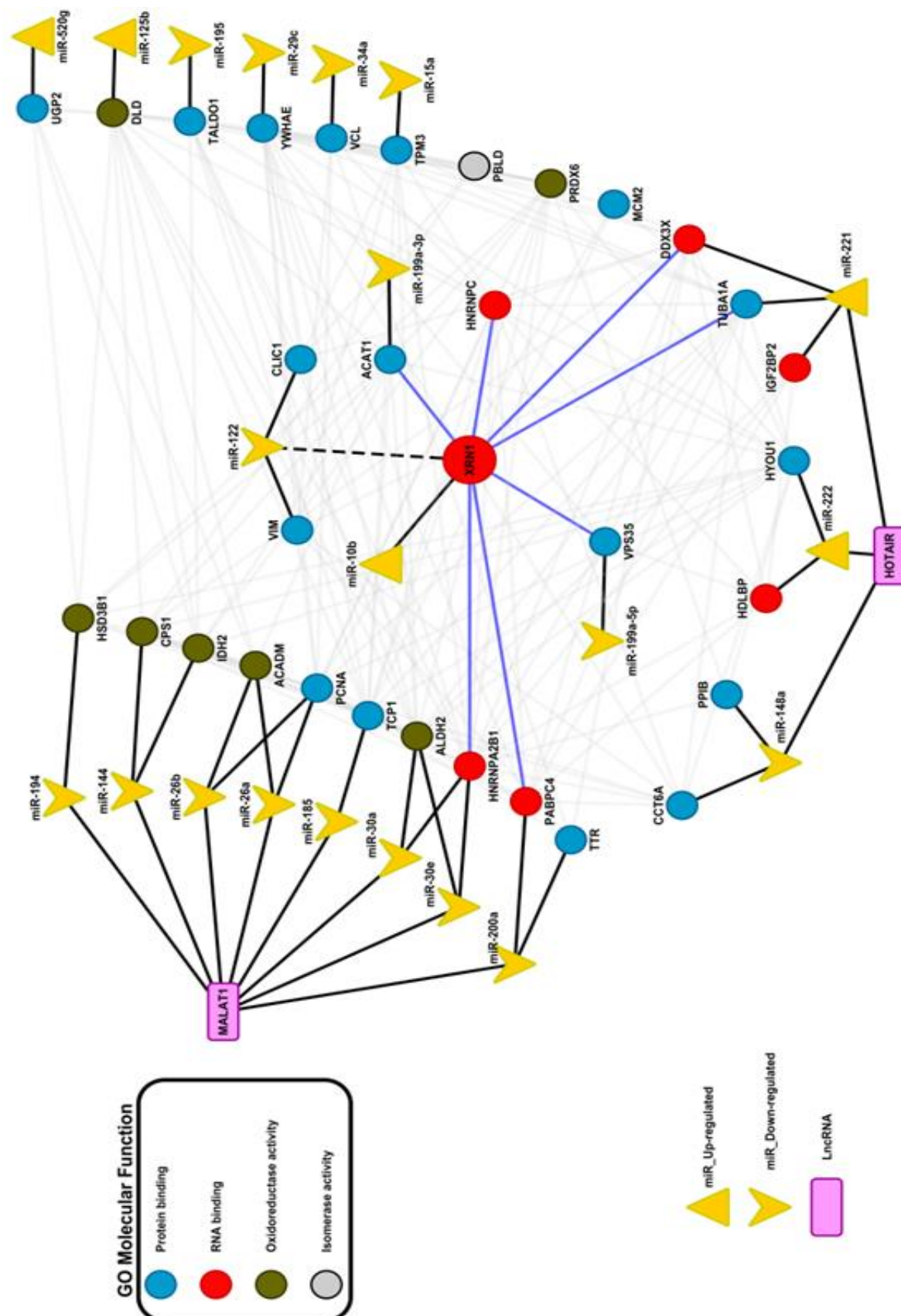


Figure 3. Integrated network and Gene Ontology molecular function of deregulated miRNAs and lncRNAs and their target genes. *XRN1* gene was detected as a central node with multiples interactions. The blue lines highlight the predicted interactions of *XRN1* with their partners. Dashed line indicates hypothetical interaction. BiNGO was used in its default settings with $p < 0.05$.

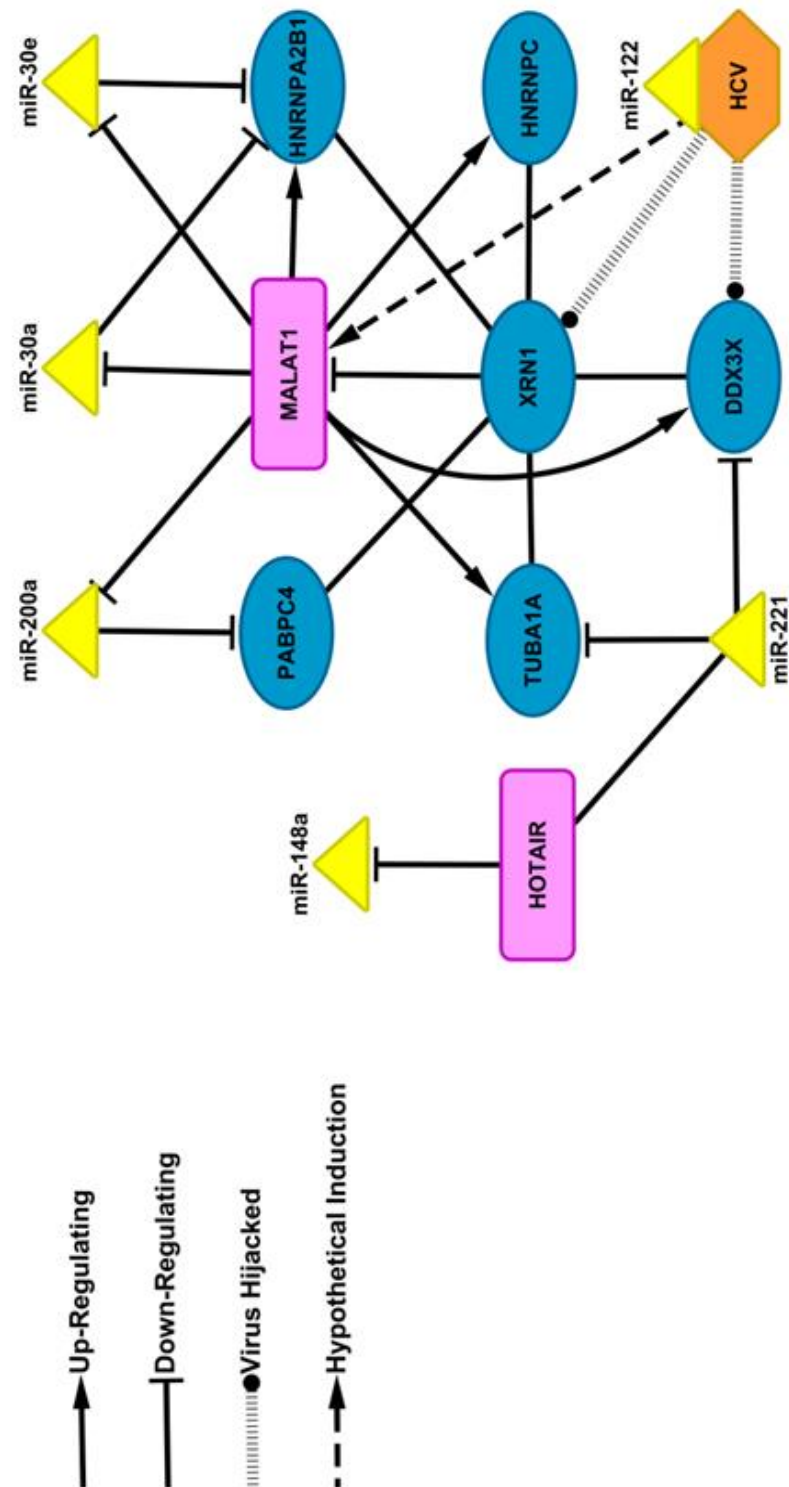
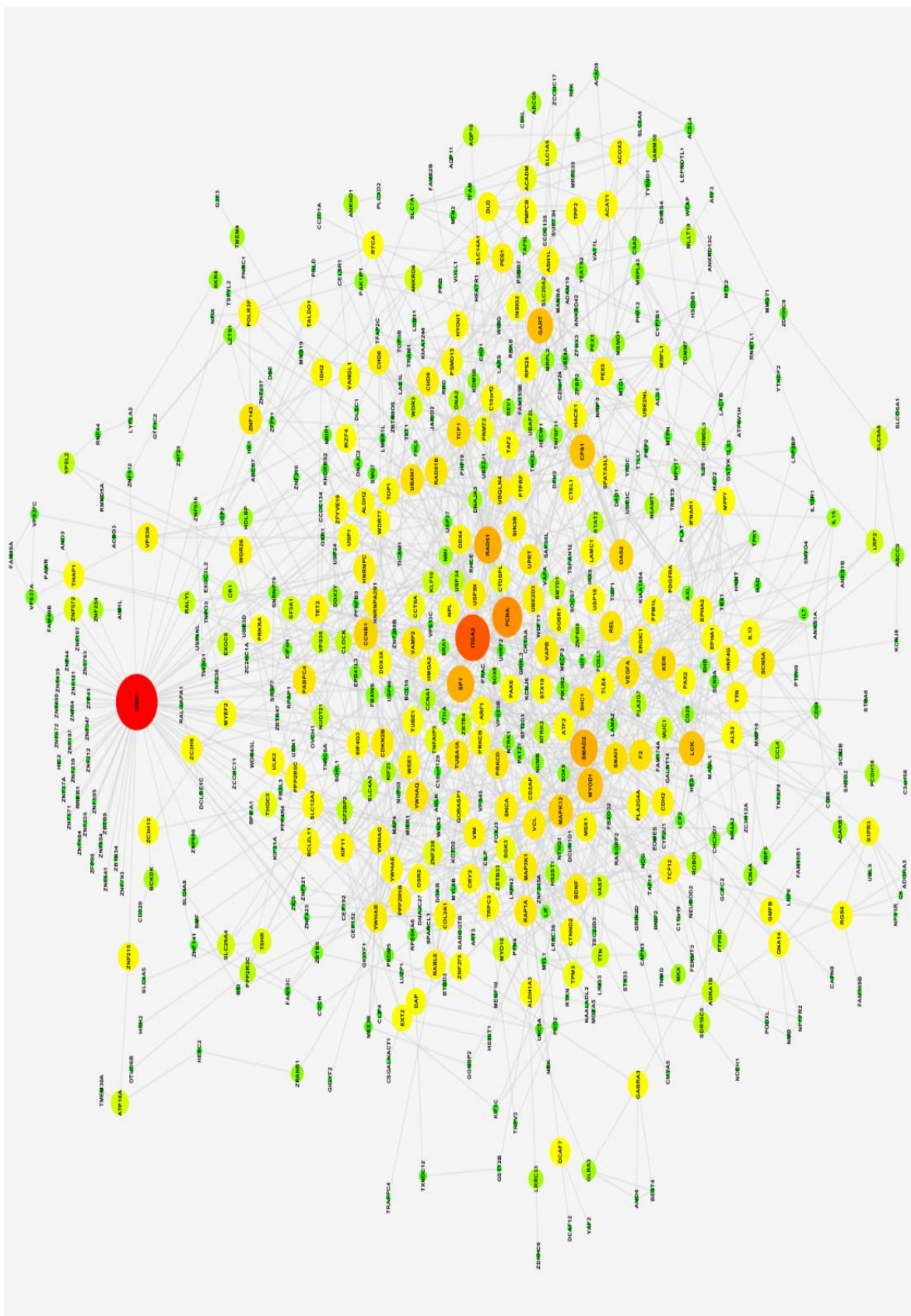


Figure 4. Putative model of regulation by key miRNAs, target genes and lncRNAs identified by meta-analysis and data integration in hepatitis virus-associated HCC. Target genes are represented by ellipses, miRNAs by triangles, lncRNAs by rectangles and hepatitis virus (HCV) by the orange hexagon.



Supplementary Figure 1. Overall protein-protein interaction (PPI) network. The diameter of the node is proportional to the betweenness centrality score. Red to yellow colors represent the highest to the lowest scores of interactions.