República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial.

(21) **PI0617560-0 A2**

BRPI0617560A2

(22) Data de Depósito: 28/09/2006
(43) Data da Publicação: 26/07/2011
(RPI 2116)

(51) Int.Cl.:
G01N 33/574 2006.01

(54) Título: **MÉTODO in vitro PARA DIAGNOSTICAR O CARCINOMA HEPATOCELULAR (HCC) EM UM INDIVÍDUO, OU PARA AVALIAR A PREDISPOSIÇÃO DE UM INDIVÍDUO AO DESENVOLVIMENTO DE HCC, OU PARA AVALIAR A PROGRESSÃO DA DITA DOENÇA EM UM INDIVÍDUO, OU PARA DETERMINAR O ESTÁGIO OU A GRAVIDADE DA DITA DOENÇA EM UM INDIVÍDUO, MÉTODO in vitro PARA A IDENTIFICAÇÃO E A AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DE TRATAMENTOS DE HCC, USO DE UMA SEQÜÊNCIA DE NUCLEOTÍDEO DE UM GENE, USO DE UM GENE SELECIONADO ENTRE OS GENES ADH, AOP2, SMP30, NSLT, ASAO, SAP, PGM, P4H, APOA1, CAIII, AdDHm, OAT, OCT E AS COMBINAÇÕES DESTES, E/OU DE UMA PROTEÍNA SELECIONADA DAS PROTEÍNAS ADH, AOP2, SMP30, NSLT, ASAO, SAP, PGM, P4H, APOA1, CAIII, AdDHm, OAT, OCT E AS COMBINAÇÕES DESTAS, MÉTODO PARA A SELEÇÃO, A BUSCA, A IDENTIFICAÇÃO, O DESENVOLVIMENTO E A AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DOS COMPOSTOS NO TRATAMENTO DE HCC, MÉTODO in vitro PARA IDENTIFICAR UM ESTÁGIO ANTERIOR AO DO DESENVOLVIMENTO DE CARCINOMA HEPATOCELULAR (HCC) EM UM INDIVÍDUO, USO DE UM GENE SELECIONADO ENTRE OS GENES ADH, AOP2, SMP30, NSLT, ASAO, SAP, PGM, E AS COMBINAÇÕES DESTES, E/OU DE UMA PROTEÍNA SELECIONADA ENTRE AS PROTEÍNAS ADH, AOP2, SMP30, NSLT, ASAO, SAP, PGM, E AS COMBINAÇÕES DESTAS, MÉTODO PARA A SELEÇÃO, A BUSCA, A IDENTIFICAÇÃO, O DESENVOLVIMENTO E A AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DOS COMPOSTOS NO TRATAMENTO DE UM ESTÁGIO ANTERIOR AO DO DESENVOLVIMENTO DE HCC, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, USO DE UM COMPOSTO QUE INTENSIFICA A EXPRESSÃO DOS GENES ADH, AOP2, SMP30, NSLT, ASAO, SAP, PGM, P4H, APOA1, CAIII, AdDHm, OAT E/OU OCT, OU A ATIVIDADE DAS PROTEÍNAS ADH, AOP2, SMP30, NSLT, ASAO, SAP, PGM, P4H, APOA1, CAIII, AdDHm, OAT E/OU OCT, USO DE UM COMPOSTO QUE INTENSIFICA A EXPRESSÃO DOS GENES ADH, AOP2, SMP30, NSLT, ASAO, SAP E/OU PGM, OU A ATIVIDADE DAS PROTEÍNAS ADH, AOP2, SMP30, NSLT, ASAO, SAP E/OU PGM, PAR DE OLIGONUCLEOTÍDEOS DE PRIMER PARA AMPLIFICAR ESPECIFICAMENTE UM FRAGMENTO DE mRNA OU DE cDNA DE UM GENE, SONDA,
ANTICORPO, SUPORTE SÓLIDO E KIT**

(30) Prioridade Unionista: 29/09/2005 ES P200502369

(73) Titular(es): Proyecto de Biomedicina Cima, S.L.

(72) Inventor(es): Enrique Santamaría Martínez, Fernando Corrales Izquierdo, Javier Munõz Peralta, Jesús Pietro Valtueña, Matías Ávila Zaragoza

(74) Procurador(es): David do Nascimento Advogados Associados

(86) Pedido Internacional: PCT EP06066863 de 28/09/2006

(87) Publicação Internacional: WO 2007/039550de 12/04/2007

(57) Resumo: MÉTODO in vitro PARA DIAGNOSTICAR O CARCINOMA HEPATOCELULAR (HCC) EM UM INDIVÍDUO, OU PARA AVALIAR A PREDISPOSIÇÃO DE UM INDIVÍDUO AO DESENVOLVIMENTO DE HCC, OU PARA AVALIAR A PROGRESSÃO DA DITA DOENÇA EM UM INDIVIDUO, OU PARA DETERMINAR O ESTAGIO OU A GRAVIDADE DA DITA DOENÇA EM UM INDIVÍDUO, MÉTODO in vitro PARA A IDENTIFICAÇAO E A AVALIAÇÃO DA EFICACIA DE TRATAMENTOS DE HCC, USO DE UMA SEQUÊNCIA DE NUCLEOTÍDEO DE UM GENE, USO DE UM GENE SELECIONADO ENTRE OS GENES ADH, AOP2, SMP3O, NSLT, ASAO, SAP, PGM, P4H, APOAI, CAIU, AdDHm, OAT, OCT E AS COMBINAÇÕES DESTES, E/OU DE UMA PROTEÍNA SELECIONADA DAS PROTEINAS ADH, AOP2, SMP3O, NSLT, ASAO, SAP, PGM, P4H, APOAI, CAIII, AdDHm, OAT, OCT E AS COMBINAÇÕES DESTAS, MÉTODO PARA A SELEÇÃO, A BUSCA, A IDENTIFICAÇÃO, O DESENVOLVIMENTO E A AVALIAÇÃO DA EFICACIA DOS COMPOSTOS NO TRATAMENTO DE HCC, MÉTODO in vítro PARA IDENTIFICAR UM ESTÁGIO ANTERIOR AO DO DESENVOLVIMENTO DE CARCINOMA HEPATOCELULAR (HCC) EM UM INDIVÍDUO, USO DE UM GENE SELECIONADO ENTRE OS GENES ADH, AOP2, SMP3O, NSLT, ASAO, SAP, PGM, E AS COMBINAÇÕES DESTES, E/OU DE UMA PROTEÍNA SELECIONADA ENTRE AS PROTEÍNAS ADH, AOP2, SMP3O, NSLT, ASAO, SAP, PGM, E AS COMBINAÇÕES DESTAS, MÉTODO PARA A SELEÇÃO, A BUSCA, A IDENTIFICAÇÃO, O DESENVOLVIMENTO E A AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DOS COMPOSTOS NO TRATAMENTO DE UM ESTÁGIO ANTERIOR AO DO DESENVOLVIMENTO DE HCC, COMPOSIÇÃO FARMACEUTICA, USO DE UM COMPOSTO QUE INTENSIFICA A EXPRESÃO DOS GENES ADH, AOP2, SMP3O, NSLT, ASAO, SAP, PGM, P4H, APOAI, CAIu, AdDHm, OAT E/OU OCT, OU A ATIVIDADE DAS PROTEÍNAS ADH, AOP2, SMP3O, NSLT, ASAO, SAP, PGM, P4H, APOAI, CAIII, AdDHm, OAT E/OU OCT, USO DE UM COMPOSTO QUE INTENSIFICA A EXPRESSÃO DOS GENES ADH, AOP2, SMP3O, NSLT, ASAQI SAP e/ou PGM, OU A ATIVIDADE DAS PROTEÍNAS ADH, AOP2, SMP3O, NSLT, ASAO, SAP E/OU PGM, PAR DE OLIGONUCLEOTÍDEOS DE PRIMER PARA AMPLIFICAR ESPECIFICAMENTE UM FRAGMENTO DE mRNA OU DE cDNA DE UM GENE, SONDA, ANTICORPO,SUPORTE SÓLIDO E KIT Por meio de uma abordagem proteômica, os marcadores do carcinoma hepatocelular (HCC) no figado de um camundongo de knockout (MATiA-!-) foram identificados para o gene MATIA (deficiente na síntese de 5-adenosilmetionina) . Vinte e sete proteínas foram detectadas cuja expressão é alterada em pelo menos 50% dos tumores analisados. Dentre elas, treze proteínas foram validadas em biápsias de pacientes com HCC de etiologia diferente e sete delas foram validadas em biápsias de pacientes com cirrose hepática, um estágio antes do desenvolvimento do HCC, o que torna possível a diferenciação entre estágios prévios da doença e até mesmo entre etiologias diferentes (viral e alcoólica). O fato de ter um quadro de marcadores disponível pode contribuir para definir com maior precisão as alterações associadas com o desenvolvimento do HCC e, desse modo, facilitar o prognóstico e o diagnóstico dessa doença.

PI_0614600-0

MÉTODO *in vitro* PARA DIAGNOSTICAR O CARCINOMA HEPATOCELULAR (HCC) EM UM INDIVÍDUO, OU PARA AVALIAR A PREDISPOSIÇÃO DE UM INDIVÍDUO AO DESENVOLVIMENTO DE HCC, OU PARA AVALIAR A PROGRESSÃO DA DITA DOENÇA EM UM INDIVÍDUO, OU PARA DETERMINAR O ESTÁGIO OU A GRAVIDADE DA DITA DOENÇA EM UM INDIVÍDUO, MÉTODO *in vitro* PARA A IDENTIFICAÇÃO E A AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DE TRATAMENTOS DE HCC, USO DE UMA SEQÜÊNCIA DE NUCLEOTÍDEO DE UM GENE, USO DE UM GENE SELECIONADO ENTRE OS GENES *ADH*, *AOP2*, *SMP30*, *NSLT*, *ASAO*, *SAP*, *PGM*, *P4H*, *APOA1*, *CAIII*, *AdDHm*, *OAT*, *OCT* E AS COMBINAÇÕES DESTES, E/OU DE UMA PROTEÍNA SELECIONADA DAS PROTEÍNAS ADH, AOP2, SMP30, NSLT, ASAO, SAP, PGM, P4H, APOA1, CAIII, AdDHm, OAT, OCT E AS COMBINAÇÕES DESTAS, MÉTODO PARA A SELEÇÃO, A BUSCA, A IDENTIFICAÇÃO, O DESENVOLVIMENTO E A AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DOS COMPOSTOS NO TRATAMENTO DE HCC, MÉTODO *in vitro* PARA IDENTIFICAR UM ESTÁGIO ANTERIOR AO DO DESENVOLVIMENTO DE CARCINOMA HEPATOCELULAR (HCC) EM UM INDIVÍDUO, USO DE UM GENE SELECIONADO ENTRE OS GENES *ADH*, *AOP2*, *SMP30*, *NSLT*, *ASAO*, *SAP*, *PGM*, E AS COMBINAÇÕES DESTES, E/OU DE UMA PROTEÍNA SELECIONADA ENTRE AS PROTEÍNAS ADH, AOP2, SMP30, NSLT, ASAO, SAP, PGM, E AS COMBINAÇÕES DESTAS, MÉTODO PARA A SELEÇÃO, A BUSCA, A IDENTIFICAÇÃO, O DESENVOLVIMENTO E A AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DOS COMPOSTOS NO TRATAMENTO DE UM ESTÁGIO ANTERIOR AO DO DESENVOLVIMENTO DE HCC, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, USO DE UM COMPOSTO QUE INTENSIFICA A EXPRESSÃO DOS GENES *ADH*, *AOP2*, *SMP30*, *NSLT*, *ASAO*, *SAP*, *PGM*, *P4H*, *APOA1*, *CAIII*, *AdDHm*, *OAT* E/OU *OCT*, OU A ATIVIDADE DAS PROTEÍNAS ADH, AOP2, SMP30, NSLT, ASAO, SAP, PGM, P4H, APOA1, CAIII, AdDHm, OAT E/OU OCT, USO DE UM COMPOSTO QUE INTENSIFICA A EXPRESSÃO DOS GENES *ADH*, *AOP2*, *SMP30*, *NSLT*, *ASAO*, *SAP* e/ou *PGM*, OU A ATIVIDADE DAS PROTEÍNAS ADH, AOP2, SMP30, NSLT, ASAO, SAP E/OU PGM, PAR DE OLIGONUCLEOTÍDEOS DE PRIMER PARA AMPLIFICAR ESPECIFICAMENTE UM FRAGMENTO DE mRNA OU DE cDNA DE UM GENE, SONDA, ANTICORPO,

SUPORTE SÓLIDO E KIT

CAMPO DA INVENÇÃO

A presente invenção refere-se, de maneira geral, à análise das mudanças na expressão de genes e de proteínas no tecido de tumor de fígado de pacientes com carcinoma hepatocelular (HCC). Em particular, a invenção refere-se a um conjunto de genes e de proteínas humanos que são expressos diferencialmente em tecido canceroso de fígado de um indivíduo que sofre de HCC em comparação à expressão dos mesmos genes e proteínas no tecido saudável do fígado. Os ditos genes e proteínas agem, portanto, como marcadores ou biomarcadores moleculares do HCC.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

O carcinoma hepatocelular (HCC), também conhecido como hepatoma maligno, é a doença neoplástica com a quinta incidência mais elevada e a terceira causa de morte por câncer, com mais de 500.000 novos casos diagnosticados a cada ano. Embora as causas principais do HCC sejam bem conhecidas, dentre elas, a infecção pelo vírus da hepatite B (HBV) ou pelo vírus da hepatite C (HCV), o consumo de produtos alimentícios contaminados com a aflatoxina ou o consumo abusivo de álcool, o prognóstico dos pacientes com HCC é ruim devido à agressividade da lesão e à falta de terapias eficazes.

O HCC é difícil de detectar nos estágios adiantados devido à não-especificidade dos sintomas que exibe, os quais incluem a perda de apetite e de peso, febre, fadiga e fraqueza. As únicas ferramentas atualmente disponíveis para a detecção precoce do HCC são a medição dos níveis de soro da alfa-fetoproteína (AFP) e a ultrassonografia do fígado. No entanto, os níveis de AFP exibem uma sensibilidade e especificidade baixas, razão pela qual as suas aplicações como um biomarcador são muito limitadas. Por outro lado, a

ultrassonografia depende do operador e limita a eficácia ao tentar diferenciar o HCC dos nódulos regenerativos. Os métodos de diagnóstico adicionais incluem os métodos de diagnóstico por imagem não-radioativos (raios X, angiogramas, varreduras por tomografia computadorizada, imagem por ressonância magnética, etc.), scanners do fígado que utilizam materiais radioativos ou biópsias do fígado. O tratamento contra o HCC é freqüentemente bastante ineficaz devido ao fato que a detecção ocorre tarde demais. Os métodos terapêuticos incluem a cirurgia, a quimioterapia e a radioterapia, individualmente ou em combinação.

Portanto, o incremento do conhecimento sobre a patogênese molecular do HCC e a identificação dos biomarcadores que permitem o diagnóstico precoce são de grande interesse e representam uma das prioridades principais em hepatologia clínica.

O desenvolvimento recente de técnicas tais como a genômica e a proteômica (técnicas que permitem a análise simultânea de milhares de genes e proteínas) conduziu ao surgimento de uma série de biomarcadores do HCC (Lok AS, Marrero J., Newer Markers for Hepatocellular Carcinoma. Gastroenterology 2004;127:S113-S119; Chen Li, Ye-Xiong Tan, Hu Zhou et al. Proteomic Analysis of Hepatitis B Virus Associated Hepatocellular Carcinoma: Identification of Potential Tumor Markers. Proteomics 2005; 5:1125-1139; Beretta L, Chignard N. Proteomics for Hepatocellular Carcinoma Marker Discovery. Gastroenterology 2004;127:S120-S125; Schwegler EE, Cazares L et al. SELDI-TOF MS Profiling of Serum for Detection of the Progression of Chronic Hepatitis C to Hepatocellular Carcinoma. Hepatology 2005; 41:634-42; Yokoyama Y, Kuramitsu Y et al. Proteomic Profiling of Proteins Decreased in Hepatocellular Carcinoma from Patients Infected with Hepatitis C Virus. Proteomics

2004;4:2111-6; Thorgeirsson S et al. Genome-Scale Profiling of Gene Expression in Hepatocellular Carcinoma: Classification, Survival Prediction and Identification of Therapeutic Targets. Gastroenterology 2004;127:851-855; María W. Smith, Zhaoxia N et al. Identification of Novel Tumors Markers in Hepatitis C Virus-Associated Hepatocellular Carcinoma. Cancer Research 2003; 63:859-864; Xin Chen, Siu Tim Cheung et al. Gene Expression Patterns in Human Liver Cancers. Molecular Biology of the Cell 2002; 13:1929-1939).

Utilizando proteômica diferencial, foi obtido um quadro de proteínas com um padrão de expressão especificamente alterado, as quais são propostas como biomarcadores do HCC e, ocasionalmente, às quais foi atribuído um papel chave no desenvolvimento da doença. No entanto, os repertórios diferentes de proteínas identificados nos diferentes estudos têm pouco em comum; por esta razão, elas têm somente um valor relativo como biomarcadores do HCC. As discrepâncias entre os estudos realizados em laboratórios diferentes poderiam ser causadas por diferenças na metodologia utilizada ou na natureza ou no tipo de amostra analisada.

Dentre os biomarcadores do HCC identificados em estudos pré-clínicos diferentes, podem ser encontrados aqueles relacionados abaixo (traduzidos a partir de Lok AS, Marrero J. Newer Markers for Hepatocellular Carcinoma. Gastroenterology 2004;127:S113-S119).

Marcadores de Fase I	Material Biológico	Sensibilidade (%)	Especificidade (%)
Glipican-3	Tecido FERUM	72 53	100
Proteína de Golgi 73	FERUM	76	69
Metilação de p16	FERUM	81	
Fator de crescimento de hepatócito humano	FERUM	100	64
Citoqueratina 19	FERUM	47	
Glicoproteína 90K-Mac-2BP	FERUM	46	61
TGF β1	FERUM	69	66

Lipoproteína (a)	FERUM	44	
Poliamina de ligação de eritrócito	FERUM	43	92
Antígeno de polipeptídeo específico de tecido	FERUM	73	71
Proteína C-reativa	FERUM	48	58
Anticorpos anti-p53	FERUM	41	
Gene CD24	Tecido	66	
Atividade de telomerase	Tecido	100	50
Alfa-protimosina	Tecido	82	
Análise de microsatélite de DNA	Tecido	100	80
Gene associado com carcinoma hepatocelular 1	Tecido	89	
γ-glutamiltransferase específica de hematoma	Tecido	85	97
Secreção de pseudouridina	Urina	70	
Receptor de fator de crescimento epidermal (EGFR)	Urina	62	

Apesar dos vários estudos realizados a fim de tentar compreender as características clínico-patológicas da doença e de incrementar o tratamento dos pacientes com HCC, os parâmetros clínico-patológicos convencionais têm uma capacidade prognóstica muito limitada. Conseqüentemente, ainda há a necessidade de identificar os biomarcadores moleculares associados com o HCC. A identificação dos ditos biomarcadores moleculares e o estudo de seus efeitos funcionais poderiam ajudar na prevenção e/ou no tratamento contra o HCC, bem como na busca e no desenvolvimento de drogas que fossem úteis no tratamento, preventivo e/ou curativo, do HCC.

DESCRIÇÃO RESUMIDA DA INVENÇÃO

Uma abordagem proteômica foi utilizada para a identificação dos marcadores da hepatocarcinogênese no fígado de um camundongo de knockout (*MAT1A*-/-) para o gene *MAT1A* (deficiente na síntese de S-adenosilmetionina). Vinte e sete proteínas foram detectadas, cuja expressão foi alterada em pelo menos 50% dos tumores analisados. Dentre elas, treze proteínas foram validadas em biópsias de pacientes com o HCC de etiologia diferente e sete delas foram validadas em biópsias de pacientes com cirrose hepática, um estágio antes

do desenvolvimento do HCC. Esse estudo tornou possível a diferenciação entre estágios prévios da doença e ainda entre etiologias diferentes (viral e alcoólica); portanto, o fato de ter um quadro de marcadores disponíveis pode contribuir para definir mais precisamente as alterações associadas com o desenvolvimento do HCC e desse modo facilitar o prognóstico e o diagnóstico desta doença.

Para a identificação dos ditos biomarcadores, o camundongo *MAT1A-/-* foi utilizado como um sistema de seleção antes da análise de amostras humanas. O dito modelo experimental torna possível a condução de estudos longitudinais a partir de estágios pré-neoplásticos e a identificação das proteínas associadas com o processo de hepatocarcinogênese; portanto, o dito modelo experimental é eficaz na identificação de marcadores do HCC. O padrão de expressão da proteína que foi gerado na presente invenção fornece um sistema para um prognóstico mais preciso da doença em comparação aos sistemas descritos até o momento, aqueles com base em biomarcadores bem como em critérios histológicos e clínicos.

Foi verificado agora que os níveis de expressão de determinados genes (*ADH, AOP2, SMP30, NSLT, SDH, SAP, PGM, P4H, APOA1, CAIII, AdDHm, OAT* e/ou *OCT*) e proteínas (*ADH, AOP2, SMP30, NSLT, SDH, SAP, PGM, P4H, APOA1, CAIII, AdDHm, OAT* e/ou *OCT*) são reduzidos em amostras de tecido de fígado de pacientes com HCC em comparação aos níveis de expressão dos mesmos genes e proteínas em amostras de tecido de fígado de indivíduos saudáveis, sem doença hepática (controles). Também foi verificado que os níveis de expressão de determinados genes (*ADH, AOP2, SMP30, NSLT, SDH, SAP* e/ou *PGM*) e proteínas (*ADH, AOP2, SMP30, NSLT, SDH, SAP* e/ou *PGM*) são reduzidos nas amostras de tecido de fígado de pacientes com cirrose, um estágio antes do desenvolvimento do HCC, em

comparação aos níveis de expressão dos mesmos genes e proteínas em amostras de tecido de fígado de indivíduos saudáveis (controles).

Portanto, a invenção refere-se, de maneira geral, à utilização dos genes *ADH, AOP2, SMP30, NSLT, SDH, SAP, PGM, P4H, APOA1, CAIII, AdDHm, OAT* e/ou *OCT* e/ou das proteínas correspondentes (*ADH, AOP2, SMP30, NSLT, SDH, SAP, PGM, P4H, APOA1, CAIII, AdDHm, OAT* e/ou *OCT*) como biomarcadores do HCC. A invenção também se refere à utilização dos genes *ADH, AOP2, SMP30, NSLT, SDH, SAP* e/ou *PGM* e/ou das proteínas correspondentes (*ADH, AOP2, SMP30, NSLT, SDH, SAP* e/ou *PGM*) como biomarcadores dos estágios antes do desenvolvimento do HCC. Além disso, a invenção refere-se a métodos e kits para a prática da presente invenção.

Em um aspecto, a invenção refere-se a um método *in vitro* para diagnosticar o HCC em um indivíduo ou para determinar o estágio ou a gravidade da dita doença em um indivíduo, ou para monitorar o efeito da terapia administrada a um indivíduo que sofre da dita doença, o qual compreende a utilização dos ditos genes (*ADH, AOP2, SMP30, NSLT, SDH, SAP, PGM, P4H, APOA1, CAIII, AdDHm, OAT* e/ou *OCT*) e/ou das proteínas (*ADH, AOP2, SMP30, NSLT, SDH, SAP, PGM, P4H, APOA1, CAIII, AdDHm, OAT* e/ou *OCT*) como biomarcadores do HCC.

Em um outro aspecto, a invenção refere-se a um método *in vitro* para identificar um estágio antes do desenvolvimento do HCC em um indivíduo, o qual compreende a utilização dos ditos genes *ADH, AOP2, SMP30, NSLT, SDH, SAP* e/ou *PGM*, e/ou das proteínas (*ADH, AOP2, SMP30, NSLT, SDH, SAP* e/ou *PGM*) como biomarcadores dos estágios antes do desenvolvimento do HCC.

As reivindicações contêm aspectos adicionais relacionados à invenção.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

A Figura 1 é um conjunto de fotografias de diferentes fígados de camundongos que mostram os nódulos de tumor analisados por meio de técnicas proteômicas. A) fígado de WT com 18 meses de idade. B) fígado *MAT1A*-/- em que se pode observar dois nódulos de tumor com aproximadamente 5 mm de tamanho. C) fígado *MAT1A*-/- em que se pode observar um nódulo de tumor com 10 mm.

A Figura 2 mostra a heterogeneidade do proteoma do tumor. A) Seções de gel bidimensionais que ilustram a variabilidade proteômica dos nódulos de tumor analisados. B) Gráfico que ilustra o aumento na variabilidade entre nódulos de tumor de camundongos *MAT1A*-/- diferentes. A variabilidade por cento foi definida como a porcentagem das diferenças observadas com respeito ao número total de faixas analisadas. Pelo menos três experiências independentes foram conduzidas para cada grupo.

A Figura 3 mostra a correlação linear entre o peso molecular (Mw) e o ponto isolétrico (pI) deduzido na base da seqüência das proteínas identificadas e a mobilidade relativa (Rf) das faixas correspondentes calculadas com base nos géis bidimensionais.

A Figura 4 mostra a análise total das proteínas que foram expressas diferencialmente nos nódulos de tumor. As cento e cinqüenta e uma proteínas identificadas foram classificadas A) com base no processo biológico em que estão envolvidas e B) com base em sua posição subcelular. As colunas indicam as proteínas alteradas (as proteínas diferencialmente expressas ou as proteínas cuja expressão é alterada) em cada um dos seis WT versus as comparações de tumor. Aquelas proteínas cuja expressão diminui ou aumenta são representadas em verde e em vermelho, respectivamente.

A Figura 5 mostra as proteínas associadas ao HCC cuja expressão é reduzida no fígado do camundongo *MAT1A*-/-.

A Figura 6 mostra as proteínas associadas ao HCC. A) Proteínas associadas ao HCC cuja expressão aumenta no fígado do camundongo *MAT1A-/-*. B) Proteínas associadas ao HCC que exibem um comportamento eletroforético anômalo.

A Figura 7 mostra os biomarcadores do HCC potenciais identificados na presente invenção. Os níveis de mRNA em indivíduos do controle e nos pacientes com doenças hepáticas diferentes foram comparados por meio de teste estatístico de Mann-Whitney U. O número de asteriscos refere-se ao nível de significância atingido (* indica $p < 0,05$; ** indica $p < 0,01$; *** indica $p < 0,001$).

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

Definições

A fim de facilitar a compreensão da invenção descrita neste pedido de patente, o significado de alguns termos e expressões no contexto da invenção é explicado abaixo:

O termo "indivíduo" refere-se a um membro de uma espécie de animal mamífero e inclui, mas sem ficar a eles limitado, animais domésticos, primatas e humanos; o indivíduo é preferivelmente um ser humano, homem ou mulher, de qualquer idade ou raça. Alternativamente, o termo "indivíduo" também é utilizado algumas vezes nesta descrição para se referir aos seres humanos.

O termo "HCC" refere-se ao carcinoma hepatocelular ou ao hepatoma maligno.

O termo "proteína" refere-se a uma cadeia molecular de aminoácidos, ligada por ligações covalentes ou não-covalentes. O termo inclui todas as formas de modificações pós-translacionais, por exemplo, glicosilação, fosforilação ou acetilação.

O termo "anticorpo" refere-se a uma proteína com a capacidade de se ligar especificamente a um "antígeno". O

termo "anticorpo" compreende anticorpos recombinantes, anticorpos monoclonais ou anticorpos policlonais, intactos, ou fragmentos destes, que mantêm a capacidade de se ligar ao antígeno, aos anticorpos combinatórios, etc., de origem humana ou humanizada e de origem não-humana.

O termo "oligonucleotídeo de primer", tal como utilizado na presente invenção, refere-se a uma seqüência de nucleotídeo, que é complementar a uma seqüência de nucleotídeo de um gene selecionado. Cada oligonucleotídeo de primer é hibridizado com sua seqüência de nucleotídeo alvo e age como um ponto de iniciação para a polimerização do DNA.

Biomarcadores moleculares do HCC e aplicações

Muitas funções biológicas são acompanhadas pela alteração da expressão de vários genes por meio do controle da transcrição (por exemplo, através do controle da iniciação, dos precursores do RNA, do processamento do RNA) e/ou do controle da tradução. Como uma ilustração, determinados processos biológicos essenciais, tais como o ciclo celular, a diferenciação celular e a morte celular, são caracterizados por variações nos níveis de expressão de grupos de genes.

De um modo similar, as mudanças na expressão de genes são associadas com a gênese de várias patologias (patogênese); por exemplo, a ausência de uma expressão suficiente de genes que suprime tumores funcionais e/ou a superexpressão de oncogenes/protooncogenes poderia conduzir à tumorigênese ou ao crescimento celular hiperplástico. Portanto, as mudanças na expressão de determinados genes (por exemplo, oncogenes ou supressores de tumor) podem ser utilizadas para avaliar a presença e a progressão de várias patologias.

O monitoramento das mudanças na expressão de genes também pode conferir determinadas vantagens durante a seleção

e o desenvolvimento de drogas.

Utilizando uma abordagem proteômica para a identificação dos marcadores de hepatocarcinogênese no fígado de um camundongo de knockout (*MAT1A*-/-) para o gene *MAT1A*, os autores da invenção detectaram vinte e sete proteínas cuja expressão é alterada em pelo menos 50% dos tumores analisados. Dentre eles, treze proteínas foram validadas em biópsias de pacientes com HCC de etiologia diferente e sete delas foram validadas em biópsias de pacientes com cirrose hepática, um estágio antes do desenvolvimento do HCC, o que torna possível distinguir entre estágios prévios diferentes da doença e ainda entre etiologias diferentes (viral e alcoólica); portanto, isto pode contribuir para definir com maior precisão as alterações associadas com o desenvolvimento do HCC e desse modo facilitar o prognóstico e o diagnóstico dessa doença.

A invenção apresenta composições e métodos projetados para detectar os níveis de expressão dos genes e proteínas que podem ser diferencialmente expressos dependendo do estado da célula (por exemplo, não-cancerosa versus cancerosa). Esses perfis de expressão fornecem ferramentas moleculares úteis para, dentre outras aplicações, diagnosticar a doença (HCC) ou avaliar a predisposição ou o risco que um indivíduo tem de desenvolver a dita doença, monitorar a dita doença, identificar as drogas potencialmente úteis para o tratamento da dita doença, bem como a toxicidade e o metabolismo das ditas drogas. As mudanças no perfil de expressão dos ditos genes e/ou proteínas em comparação à expressão da linha de base (nível de expressão basal) dos ditos genes e/ou proteínas em uma amostra de controle (valores de referência, normais ou de controle) podem ser utilizadas como uma indicação de tais efeitos. Um técnico no assunto pode utilizar qualquer uma dentre a variedade de

técnicas conhecidas projetadas para avaliar os níveis de expressão de um ou mais dos genes e/ou fragmentos destes e/ou proteínas identificadas na presente invenção a fim de observar mudanças no perfil de expressão em um tecido ou em uma amostra de interesse.

Em um aspecto, a invenção identifica alguns genes que são expressos diferencialmente em tecido canceroso (HCC) e não-canceroso de fígado. Especificamente, a presente invenção se baseia na descoberta de que o nível de expressão dos genes *ADH, AOP2, SMP30, NSLT, SDH, SAP, PGM, P4H, APOA1, CAIII, AdDHm, OAT* e/ou *OCT* e/ou das proteínas correspondentes (ADH, AOP2, SMP30, NSLT, SDH, SAP, PGM, P4H, APOA1, CAIII, AdDHm, OAT e/ou OCT) é reduzido em amostras de tecido canceroso de fígado de pacientes diagnosticados com o HCC com respeito ao nível dos mesmos genes e/ou proteínas em amostras de tecido de fígado de indivíduos não diagnosticados com o HCC ou sem um histórico clínico de HCC (indivíduos do controle).

Uma redução nos níveis de expressão dos ditos genes e/ou proteínas entre a amostra de tecido de fígado de um indivíduo sob estudo e uma amostra de tecido de fígado utilizada como um controle de pelo menos 5%, vantajosamente de pelo menos 10%, preferivelmente de pelo menos 15%, com mais preferência de pelo menos 20%, e ainda com mais preferência de pelo menos 25%, é indicativa que o indivíduo cuja amostra foi analisada sofre de HCC ou tem um risco ou uma predisposição para desenvolver o HCC.

Um técnico no assunto pode selecionar um ou mais dos ditos genes e/ou proteínas a fim de testar uma amostra particular. Como uma ilustração, pode-se selecionar 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 ou 13 dos ditos genes ou proteínas a fim de estudar uma amostra de tecido de fígado de um indivíduo. Em uma realização particular, 1, 2, 3, 4, 5, 6,

7, 8, 9, 10, 11 ou 12 dos ditos genes ou proteínas são selecionados. Em uma outra realização particular, os treze genes ou proteínas são selecionados a fim de estudar a amostra de tecido de fígado do indivíduo sob estudo. A expressão diferencial (reduzida versus o controle) dos treze ditos genes (*ADH, AOP2, SMP30, NSLT, SDH, SAP, PGM, P4H, APOA1, CAIII, AdDHm, OAT* e *OCT*) constitui uma impressão genômica (impressão digital) do HCC. De um modo similar, a expressão diferencial (reduzida versus o controle) das treze ditas proteínas (ADH, AOP2, SMP30, NSLT, SDH, SAP, PGM, P4H, APOA1, CAIII, AdDHm, OAT e OCT) constitui uma impressão proteômica (impressão digital) do HCC. A identificação de um quadro de marcadores, mais do que a utilização de marcadores individuais, poderia contribuir para que fosse feito um diagnóstico mais específico da patologia. Ter à disposição um quadro de marcadores torna possível, além disso, a avaliação da sua evolução a tempo e, dessa maneira, associar a progressão da doença (ou o estágio de evolução da mesma) com o surgimento de determinados marcadores representativos em um determinado momento.

Conseqüentemente, a avaliação e a comparação dos níveis de expressão dos ditos genes e/ou de suas proteínas correspondentes, em uma amostra de tecido de fígado de um indivíduo, podem ser utilizadas para finalidades de diagnóstico ou de prognóstico do HCC. Como uma ilustração, um nível reduzido de um ou mais dos marcadores do HCC identificados na presente invenção em uma amostra de tecido de fígado de um indivíduo com respeito aos níveis dos mesmos marcadores em amostras biológicas de indivíduos do controle (isto é, indivíduos sem um histórico clínico de HCC e/ou que não sofrem de HCC) ou com valores de referência normais (em geral, obtidos a partir de indivíduos do controle) é indicativo de HCC ou de um risco ou predisposição mais

elevado de um indivíduo desenvolver a dita doença. A comparação dos níveis dos ditos marcadores em um indivíduo, diagnosticado ou não com HCC, em um determinado momento, àqueles de amostras precedentes do mesmo indivíduo pode ser indicativa da evolução e do prognóstico da dita doença ou da eficácia do tratamento que está sendo administrado ao indivíduo (se for aplicável).

Portanto, os preceitos da presente invenção podem ser utilizados, dentre outras aplicações, em experimentações de diagnósticos ou ensaios ou experimentações para a avaliação do risco ou da predisposição de um indivíduo de desenvolver o HCC, em experimentações prognósticas, em experimentações de acompanhamento do efeito da terapia administrada ao indivíduo a fim de analisar a eficácia da terapia e a evolução da doença, e em experimentações de seleção para compostos potencialmente úteis no tratamento contra o HCC.

A invenção apresenta, dentre outras coisas, métodos projetados para detectar e quantificar a expressão dos genes *ADH, AOP2, SMP30, NSLT, SDH, SAP, PGM, P4H, APOA1, CAIII, AdDHm, OAT* e/ou *OCT* e/ou aquela de suas proteínas correspondentes (ADH, AOP2, SMP30, NSLT, SDH, SAP, PGM, P4H, APOA1, CAIII, AdDHm, OAT e/ou OCT), em uma amostra de tecido de fígado de um indivíduo.

Portanto, em um aspecto, a invenção refere-se a um método *in vitro* para diagnosticar o carcinoma hepatocelular (HCC) em um indivíduo ou para avaliar a predisposição de um indivíduo desenvolver o HCC ou para avaliar a progressão da dita patologia em um indivíduo, ou para determinar o estágio ou a gravidade da dita doença em um indivíduo, daqui por diante, em que o método da invenção compreende:

a) a quantificação do nível de expressão de um gene em uma amostra de tecido de fígado do dito indivíduo, em que

o dito gene é selecionado entre o gene que codifica o álcool desidrogenase (ADH) [gene *ADH*], o gene que codifica a proteína antioxidante 2 (AOP2) [gene *AOP2*], o gene que codifica a regucalcina (SMP30) [gene *SMP30*], o gene que codifica a proteína que transporta esterol 2 (NSLT) [gene *NSLT*], o gene que codifica o sorbitol desidrogenase (SDH) [gene *SDH*], o gene que codifica a albumina (SAP) [gene *SAP*], o gene que codifica a fosfoglucomutase (PGM) [o gene *PGM*], o gene que codifica a fenilalanina 4-hidroxilase (P4H) [gene *P4H*], o gene que codifica a apolipoproteína A1 (APOA1) [gene *APOA1*], o gene que codifica a anidrase carbônica III (CAIII) [gene *CAIII*], o gene que codifica a aldeído desidrogenase classe 2 (AdDHm) [gene *30AdDHm*], o gene que codifica a ornitina aminotransferase (OAT) [gene *OAT*], o gene que codifica a ornitina carbamoiltransferase (OCT) [gene *OCT*] e as combinações destes; e

b) a comparação do dito nível àquele de uma amostra de controle;

em que uma redução no dito nível com respeito ao nível da expressão na amostra de controle é indicativa de HCC;

ou, alternativamente,

a) a quantificação do nível de uma proteína em uma amostra de tecido de fígado do dito indivíduo, em que a dita proteína é selecionada entre álcool desidrogenase (ADH), proteína antioxidante 2 (AOP2), regucalcina (SMP30), proteína que transporta esterol 2 (NSLT), sorbitol desidrogenase (SDH), albumina (SAP), fosfoglucomutase (PGM), fenilalanina 4-hidroxilase (P4H), apolipoproteína A1 (APOA1), anidrase carbônica III (CAIII), aldeído desidrogenase classe 2 (AdDHm), ornitina aminotransferase (OAT), ornitina carbamoiltransferase (OCT) e combinações destes; e

b) a comparação do dito nível àquele de uma amostra

de controle;

em que uma redução no dito nível com respeito ao nível na amostra de controle é indicativa de HCC.

O método apresentado pela presente invenção exibe sensibilidade e especificidade elevadas e se baseia no fato de que o tecido (canceroso) do fígado de indivíduos diagnosticados com HCC exibe baixos níveis de mRNA que correspondem aos genes *ADH, AOP2, SMP30, NSLT, SDH, SAP, PGM, P4H, APOA1, CAIII, AdDHm, OAT* e/ou *OCT* e/ou concentrações reduzidas das proteínas ADH, AOP2, SMP30, NSLT, SDH, SAP, PGM, P4H, APOA1, CAIII, AdDHm, OAT e/ou OCT, em comparação aos ditos níveis de genes e/ou proteínas em amostras de tecido de fígado de indivíduos saudáveis, sem doença hepática e sem um histórico clínico de HCC, utilizadas como amostras de controle.

A fim de praticar o método da invenção, uma amostra de tecido de fígado do indivíduo a ser estudado é obtida. A dita amostra pode ser obtida por meio de qualquer método convencional, por exemplo, por meio de biópsias de tecido de fígado obtidas por ressecção cirúrgica. As amostras podem ser obtidas a partir de indivíduos diagnosticados previamente com HCC (pacientes) ou de indivíduos que não foram diagnosticados previamente com HCC ou de pacientes diagnosticados com HCC que estão sendo submetidos a tratamento ou de indivíduos diagnosticados com HCC que foram previamente tratados.

Em uma realização particular, o método da invenção compreende a quantificação do nível de expressão de um gene selecionado entre os genes *ADH, AOP2, SMP30, NSLT, SDH, SAP, PGM, P4H, APOA1, CAIII, AdDHm, OAT, OCT* e as combinações destes, em uma amostra de tecido de fígado de um indivíduo e a comparação do dito nível àquele de uma amostra de tecido de fígado do controle, em que uma redução no dito nível da expressão com respeito ao nível da expressão dos mesmos genes

na amostra de controle é indicativa de HCC. O método da invenção inclui a possibilidade de quantificar não somente o nível da expressão de apenas um dos ditos genes, mas a possibilidade de quantificar os níveis de expressão de todos os 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 ou 12 genes dos ditos genes e ainda o nível de expressão dos ditos treze genes.

O nível de expressão de um gene pode ser quantificado ao quantificar o nível de RNA mensageiro (mRNA) de um gene, resultante da transcrição do dito gene, ou, alternativamente, o nível de DNA complementar (cDNA) para o dito mRNA. Neste caso, o método da invenção inclui a execução de uma etapa de extração a fim de obter o RNA total, que pode ser executado por técnicas convencionais. Praticamente qualquer método convencional pode ser utilizado dentro do âmbito da invenção a fim de detectar e quantificar os níveis de mRNA dos genes *ADH, AOP2, SMP30, NSLT, SDH, SAP, PGM, P4H, APOA1, CAIII, AdDHm, OAT* e/ou *OCT* ou de seu DNAs correspondentes. Como uma ilustração, mas sem ficar limitado a esta, os níveis de mRNA dos ditos genes podem ser quantificados utilizando os métodos convencionais, por exemplo, os métodos que compreendem a amplificação do mRNA e a quantificação do produto da amplificação do dito mRNA por meio, por exemplo, de hibridização com uma sonda etiquetada apropriada e de detecção do sinal ou, alternativamente, por meio de transferência de Northern e da utilização de sondas específicas para o mRNA de interesse (*ADH, AOP2, SMP30, NSLT, SDH, SAP, PGM, P4H, APOA1, CAIII, AdDHm, OAT* ou *OCT*), mapeamento com a nuclease S1, RT-LCR, hibridização, microarranjos, etc. De um modo similar, os níveis dos cDNAS correspondentes ao dito mRNA dos genes *ADH, AOP2, SMP30, NSLT, SDH, SAP, PGM, P4H, APOA1, CAIII, AdDHm, OAT* e/ou *OCT* também podem ser quantificados utilizando técnicas convencionais; neste caso, o método da invenção inclui uma

etapa de síntese do cDNA pela transcrição reversa (RT) do mRNA correspondente, seguido pela amplificação e pela quantificação do produto da amplificação do dito cDNA; em uma realização particular, a amplificação é executada qualitativa ou quantitativamente, por meio de PCR (por exemplo, PCR quantitativa, PCR quantitativa em tempo real utilizando uma etiqueta apropriada, etc.), utilizando oligonucleotídeos de primers que amplificam especificamente as regiões dos genes *ADH, AOP2, SMP30, NSLT, SDH, SAP, PGM, P4H, APOA1, CAIII, AdDHm, OAT* ou *OCT*.

Em uma outra realização particular, o método da invenção compreende a quantificação do nível (concentração) de uma proteína selecionada entre as proteínas ADH, AOP2, SMP30, NSLT, SDH, SAP, PGM, P4H, APOA1, CAIII, AdDHm, OAT, OCT e as combinações destas, em uma amostra de tecido de fígado de um indivíduo e a comparação do dito nível àquele de uma amostra de tecido de fígado do controle, em que uma redução no dito nível com respeito ao nível das mesmas proteínas na amostra de controle é indicativa de HCC. O método da invenção inclui a possibilidade de quantificar não somente o nível de apenas uma das ditas proteínas, mas a possibilidade de quantificar os níveis de quaisquer 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 ou 12 das ditas proteínas e até mesmo o nível das treze ditas proteínas.

O nível (concentração) das ditas proteínas ADH, AOP2, SMP30, NSLT, SDH, SAP, PGM, P4H, APOA1, CAIII, AdDHm, OAT e/ou OCT pode ser quantificado por meio de qualquer método convencional que torna possível detectar e quantificar as ditas proteínas em uma amostra de um indivíduo. Neste caso, o método da invenção inclui a execução de uma etapa de extração a fim de obter um extrato da proteína que contenha as ditas proteínas, o qual pode ser executado ao utilizar as técnicas convencionais.

Praticamente qualquer método convencional pode ser utilizado dentro do âmbito da invenção a fim de detectar e quantificar os níveis de ADH, AOP2, SMP30, NSLT, SDH, SAP, PGM, P4H, APOA1, CAIII, AdDHm, OAT e/ou OCT. Como uma ilustração, mas sem ficar a ela limitados, os níveis das ditas proteínas podem ser quantificados utilizando métodos convencionais, por exemplo, a utilização dos anticorpos com a capacidade de se ligar ao ADH, AOP2, SMP30, NSLT, SDH, SAP, PGM, P4H, APOA1, CAIII, AdDHm, OAT ou OCT (ou aos fragmentos destes que contêm determinantes antigênicos) e a quantificação subseqüente dos complexos formados. Os anticorpos utilizados nesses ensaios podem ser etiquetados ou não-etiquetados. Os exemplos ilustrativos das etiquetas que podem ser utilizadas incluem isótopos radioativos, enzimas, fluoróforos, reagentes quimioluminescentes, substratos ou co-fatores de enzimas, inibidores de enzimas, partículas, manchas, etc. Há uma ampla faixa de ensaios conhecidos que podem ser utilizados na presente invenção, os quais utilizam anticorpos não-etiquetados (anticorpo primário) e anticorpos etiquetados (anticorpo secundário); essas técnicas incluem a absorção Western ou transferência Western, ELISA (ensaio imunossorvente ligado a enzimas), RIA (radioimunoensaio), EIA competitivo (imunoensaio de enzimas competitivo), DAS-ELISA (sandwich ELISA de anticorpo duplo), as técnicas imunocitoquímicas e imunohistoquímicas, as técnicas baseadas na utilização de biochips ou microarranjos de proteínas que incluem os anticorpos específicos ou os ensaios com base na precipitação coloidal em formatos tais como varetas. Outros métodos para detectar e quantificar as ditas proteínas ADH, AOP2, SMP30, NSLT, SDH, SAP, PGM, P4H, APOA1, CAIII, AdDHm, OAT ou OCT incluem técnicas de cromatografia por afinidade, ensaios de ligação de ligandos, etc.

Em uma realização particular, a quantificação dos

níveis de *ADH, AOP2, SMP30, NSLT, SDH, SAP, PGM, P4H, APOA1, CAIII, AdDHm, OAT* e/ou *OCT* é executada por meio da utilização dos anticorpos com a capacidade de se ligar a *ADH, AOP2, SMP30, NSLT, SDH, SAP, PGM, P4H, APOA1, CAIII, AdDHm, OAT* ou *OCT* (ou a fragmentos destes que contêm determinantes antigênicos) e quantificação subseqüente dos complexos formados, por exemplo, por meio das técnicas imunoquímicas que permitem a quantificação da ligação de antígeno-anticorpo, por exemplo, transferência Western, ELISA, biochips de proteína, etc.; preferivelmente, a quantificação dos níveis de ADH, AOP2, SMP30, NSLT, SDH, SAP, PGM, P4H, APOA1, CAIII, AdDHm, OAT e/ou OCT é executada por meio de biochips de proteína ou transferência Western utilizando os anticorpos apropriados que têm capacidade de se ligar às ditas proteínas. Os ditos anticorpos estão disponíveis no mercado ou podem ser obtidos pelos métodos convencionais conhecidos por um técnico no assunto.

O método da invenção também compreende a etapa em que os níveis de expressão dos genes *ADH, AOP2, SMP30, NSLT, SDH, SAP, PGM, P4H, APOA1, CAIII, AdDHm, OAT* e/ou *OCT* e/ou os níveis das proteínas ADH, AOP2, SMP30, NSLT, SDH, SAP, PGM, P4H, APOA1, CAIII, AdDHm, OAT e/ou OCT, determinados na amostra de tecido de fígado do indivíduo sob estudo, são comparados aos níveis dos ditos genes e/ou proteínas em uma amostra de tecido de fígado utilizada como um controle (isto é, com os valores de referência geralmente sendo obtidos de indivíduos saudáveis, sem doença hepática). Os níveis de expressão dos genes *ADH, AOP2, SMP30, NSLT, SDH, SAP, PGM, P4H, APOA1, CAIII, AdDHm, OAT* e/ou *OCT*, assim como os níveis das proteínas ADH, AOP2, SMP30, NSLT, SDH, SAP, PGM, P4H, APOA1, CAIII, AdDHm, OAT e/ou OCT, podem ser determinados por meio das técnicas acima mencionadas em amostras de tecido de fígado, preferivelmente de indivíduos saudáveis, sem doença

hepática. Uma redução nos níveis de expressão dos genes *ADH, AOP2, SMP30, NSLT, SDH, SAP, PGM, P4H, APOA1, CAIII, AdDHm, OAT* e/ou *OCT* ou nos níveis das proteínas ADH, AOP2, SMP30, NSLT, SDH, SAP, PGM, P4H, APOA1, CAIII, AdDHm, OAT e/ou OCT, na amostra de tecido de fígado do indivíduo sob estudo com respeito aos níveis correspondentes na amostra de tecido de fígado do controle é indicativa de HCC.

Em um outro aspecto, a invenção refere-se a um método *in vitro* para a identificação e a avaliação da eficácia de tratamentos contra o HCC. O método contempla a quantificação dos níveis das proteínas ADH, AOP2, SMP30, NSLT, SDH, SAP, PGM, P4H, APOA1, CAIII, AdDHm, OAT e/ou OCT e/ou os níveis de expressão dos genes *ADH, AOP2, SMP30, NSLT, SDH, SAP, PGM, P4H, APOA1, CAIII, AdDHm, OAT* e/ou *OCT* no mesmo indivíduo em todas as fases ou estágios diferentes da doença ou durante os períodos de tratamento e na ausência do mesmo, e a comparação do mesmo para controlar os valores que são considerados normais ou com valores precedentes para o mesmo indivíduo. Quando um agente terapêutico aumenta a expressão dos genes *ADH, AOP2, SMP30, NSLT, SDH, SAP, PGM, P4H, APOA1, CAIII, AdDHm, OAT* e/ou *OCT* ou das proteínas ADH, AOP2, SMP30, NSLT, SDH, SAP, PGM, P4H, APOA1, CAIII, AdDHm, OAT e/ou OCT, o dito agente transforma-se em um candidato para o tratamento contra o HCC.

Em uma realização particular, a invenção refere-se a um método *in vitro* para avaliar o efeito da terapia administrada a um indivíduo com HCC, o qual compreende (i) a quantificação do nível de expressão de um gene em uma amostra de tecido de fígado do dito indivíduo, em que o dito gene é selecionado entre os genes *ADH, AOP2, SMP30, NSLT, SDH, SAP, PGM, P4H, APOA1, CAIII, AdDHm, OAT, OCT* e as combinações destes e/ou o nível de uma proteína selecionada entre ADH, AOP2, SMP30, NSLT, SDH, SAP, PGM, P4H, APOA1, CAIII, AdDHm,

OAT, OCT e as combinações destes; e (ii) a comparação do dito nível àquele de uma amostra de tecido de fígado do mesmo indivíduo, antes da administração da terapia. Neste caso, um aumento no nível da expressão dos ditos genes e/ou proteínas com relação aos níveis antes da administração da terapia é indicativo que a terapia administrada ao indivíduo é eficaz. A quantificação dos níveis de expressão dos ditos genes e/ou proteínas e a comparação dos ditos níveis de expressão podem ser executadas por métodos convencionais, tal como foi descrito previamente com relação ao método da invenção.

As seqüências de nucleotídeos dos genes *ADH, AOP2, SMP30, NSLT, SDH, SAP, PGM, P4H, APOA1, CAIII, AdDHm, OAT* e/ou *OCT* podem ser utilizadas para projetar oligonucleotídeos de primers que são úteis para amplificar fragmentos específicos dos ditos genes, bem como para obter sondas potencialmente úteis na identificação dos ditos genes; portanto, as ditas seqüências de nucleotídeo dos ditos genes, assim como os ditos oligonucleotídeos de primers e as sondas podem ser utilizados para diagnosticar o HCC *in vitro* em um indivíduo ou avaliar a predisposição de um indivíduo desenvolver o HCC ou para avaliar a progressão da dita doença em um indivíduo ou para determinar o estágio ou a gravidade da dita doença em um indivíduo ou para identificar e avaliar a eficácia de um tratamento contra o HCC, por exemplo, para avaliar o efeito da terapia administrada a um indivíduo que sofre da dita doença.

De um modo similar, as proteínas ADH, AOP2, SMP30, NSLT, SDH, SAP, PGM, P4H, APOA1, CAIII, AdDHm, OAT e/ou OCT ou fragmentos destas que compreendem um ou mais determinantes antigênicos (epítopos) das ditas proteínas, podem ser utilizadas para produzir anticorpos contra as ditas proteínas. Portanto, as proteínas e os ditos fragmentos destas, assim como os ditos anticorpos com a capacidade de se

ligar às proteínas ou aos ditos fragmentos destas, podem ser utilizados para diagnosticar o HCC *in vitro* em um indivíduo ou avaliar a predisposição de um indivíduo desenvolver o HCC ou para avaliar a progressão da dita doença em um indivíduo ou para determinar o estágio ou a gravidade da dita doença em um indivíduo ou para identificar e avaliar a eficácia de um tratamento contra o HCC, por exemplo, para avaliar o efeito da terapia administrada a um indivíduo que sofre da dita doença.

Em um outro aspecto, a invenção refere-se à utilização de um anticorpo para diagnosticar o HCC *in vitro* em um indivíduo ou avaliar a predisposição de um indivíduo desenvolver o HCC ou para avaliar a progressão da dita doença em um indivíduo ou para determinar o estágio ou a gravidade da dita doença em um indivíduo ou para identificar e avaliar a eficácia de um tratamento contra o HCC, por exemplo, para avaliar o efeito da terapia administrada a um indivíduo que sofre da dita doença, em que o dito anticorpo é um anticorpo que tem a capacidade de se ligar a uma proteína selecionada entre ADH, AOP2, SMP30, NSLT, SDH, SAP, PGM, P4H,APOA1, CAIII, AdDHm, OAT e OCT ou fragmentos destas que contêm determinantes antigênicos das ditas proteínas. Os ditos anticorpos podem ser anticorpos recombinantes, anticorpos monoclonais, anticorpos policlonais, intactos ou fragmentos destes, que preservem a capacidade de se ligar às ditas proteínas (ADH, AOP2, SMP30, NSLT, SDH, SAP, PGM, P4H, APOA1, CAIII, AdDHm, OAT ou OCT), por exemplo, os fragmentos de Fab, scFv, etc., de anticorpos de seres humanos, humanizados ou não-humanos.

Os biomarcadores moleculares identificados na presente invenção, tais como os genes *ADH, AOP2, SMP30, NSLT, SDH, SAP, PGM, P4H, APOA1, CAIII, AdDHm, OAT* e/ou *OCT* e/ou proteínas ADH, AOP2, SMP30, NSLT, SDH, SAP, PGM, P4H, APOA1,

CAIII, AdDHm, OAT e/ou OCT, podem ser utilizados na seleção, na busca, na identificação, no desenvolvimento e na avaliação da eficácia dos compostos no tratamento contra o HCC.

Portanto, em um outro aspecto, a invenção refere-se a um método para a seleção, a busca, a identificação, o desenvolvimento e a avaliação da eficácia dos compostos no tratamento contra o HCC, o qual compreende (i) a colocação de um sistema celular que expressa um nível reduzido de um gene em contato com o composto candidato e (ii) a avaliação da expressão do dito gene, de uma maneira tal que, se a expressão do dito gene aumentar, o composto candidato será um composto potencialmente útil no tratamento contra o HCC, em que o dito gene é selecionado entre os genes ADH, AOP2, SMP30, NSLT, SDH, SAP, PGM, P4H, APOA1, CAIII, AdDHm, OAT, OCT e as combinações destes. O dito sistema celular pode ser praticamente qualquer sistema celular em que um ou mais dos ditos marcadores são reduzidos, por exemplo, as linhagens de células humanas transformadas que exibem uma diminuição no nível de tais marcadores, tais como as linhagens de células HepG2, Huh7, etc. A expressão dos ditos genes pode ser avaliada por meio de qualquer método convencional, por exemplo, pela quantificação dos níveis de mRNA dos ditos genes ou de seus cDNAs correspondentes ou pela quantificação das ditas proteínas ADH, AOP2, SMP30, NSLT, SDH, SAP, PGM, P4H, APOA1, CAIII, AdDHm, OAT ou OCT por meio de qualquer um dos métodos mencionados previamente com relação ao método da invenção. Quando um composto aumenta os níveis de expressão de qualquer um dos genes *ADH, AOP2, SMP30, NSLT, SDH, SAP, PGM, P4H, APOA1, CAIII, AdDHm, OAT* e/ou *OCT* ou os níveis (concentração) das proteínas ADH, AOP2, SMP30, NSLT, SDH, SAP, PGM, P4H, APOA1, CAIII, AdDHm, OAT e/ou OCT, o dito composto se torna um candidato potencialmente útil para o tratamento contra o HCC. Em um outro aspecto, a invenção

refere-se à utilização dos ditos genes *ADH, AOP2, SMP30, NSLT, SDH, SAP, PGM, P4H, APOA1, CAIII, AdDHm, OAT* e/ou *OCT* e/ou das ditas proteínas ADH, AOP2, SMP30, NSLT, SDH, SAP, PGM, P4H, APOA1, CAIII, AdDHm, OAT e/ou OCT, em um método para a seleção, a busca, a identificação, o desenvolvimento e a avaliação da eficácia dos compostos no tratamento contra o HCC.

Os compostos que intensificam a expressão dos genes *ADH, AOP2, SMP30, NSLT, SDH, SAP, PGM, P4H, APOA1, CAIII, AdDHm, OAT* e/ou *OCT* ou a atividade das proteínas ADH, AOP2, SMP30, NSLT, SDH, SAP, PGM, P4H, APOA1, CAIII, AdDHm, OAT e/ou OCT, podem ser utilizados no tratamento contra o HCC. Os exemplos ilustrativos, mas sem ficar a eles limitados, dos ditos compostos, incluem moduladores positivos da expressão dos ditos genes ou da atividade das ditas proteínas.

Em um outro aspecto, a invenção refere-se a uma composição farmacêutica que compreende uma quantidade terapeuticamente eficaz de um composto que intensifica a expressão dos genes *ADH, AOP2, SMP30, NSLT, SDH, SAP, PGM, P4H, APOA1, CAIII, AdDHm, OAT* e/ou *OCT* ou a atividade das proteínas ADH, AOP2, SMP30, NSLT, SDH, SAP, PGM, P4H, APOA1, CAIII, AdDHm, OAT e/ou OCT, juntamente com um ou mais excipientes e/ou veículos farmaceuticamente aceitáveis. Em uma realização particular, a dita composição farmacêutica compreende um modulador positivo da expressão dos ditos genes ou um modulador positivo da atividade das ditas proteínas.

Os excipientes, os veículos e as substâncias auxiliares devem ser farmacêutica e farmacologicamente toleráveis e devem poder ser combinados com outros componentes da formulação e não exercer nenhum efeito adverso no indivíduo sob o tratamento. As composições farmacêuticas podem ser oferecidas em qualquer forma de administração apropriada, por exemplo, nas formas farmacêuticas apropriadas

para a administração oral e parenteral (incluindo, por exemplo, a administração intravenosa, subcutânea, intradermal, intramuscular, intraperitoneal e intratecal). As formulações podem ser em dose única e serão preparadas de acordo com métodos galênicos clássicos. Uma revisão das diferentes formas farmacêuticas para a administração de drogas e a preparação destas pode ser encontrada no livro "Tratado de Farmacia Galénica", de C. Faulí i Trillo, 10ª Edição, 1993, Luzán 5, S. A. de Ediciones.

Em um outro aspecto, a invenção refere-se à utilização de um composto que intensifica a expressão dos genes *ADH, AOP2, SMP30, NSLT, SDH, SAP, PGM, P4H, APOA1, CAIII, AdDHm, OAT* e/ou *OCT* ou a atividade das proteínas ADH, AOP2, SMP30, NSLT, SDH, SAP, PGM, P4H, APOA1, CAIII, AdDHm, OAT e/ou OCT, na manufatura de uma composição farmacêutica para o tratamento contra o HCC.

Em um outro aspecto, a presente invenção refere-se a um par de oligonucleotídeos de primers que são úteis na amplificação específica de um fragmento de mRNA ou de cDNA de um gene, em que o dito gene é selecionado entre os genes *ADH, AOP2, SMP30, NSLT, SDH, SAP, PGM, P4H, APOA1, CAIII, AdDHm, OAT* e *OCT*. Em uma realização particular, o dito par de oligonucleotídeos de primers é selecionado a partir do grupo de pares de oligonucleotídeo que consistem na SEQ ID N°.:1 e SEQ ID N°.: 2, SEQ ID N°.: 3 e SEQ ID N°.: 4, SEQ ID N°.: 5 e SEQ ID N°.: 6, SEQ ID N°.: 7 e SEQ ID N°.: 8, SEQ ID N°.: 9 e SEQ ID N°.: 10, SEQ ID N°.: 11 e SEQ ID N°.: 12, SEQ ID N°.: 13 e SEQ ID N°.: 14, SEQ ID N°.: 15 e SEQ ID N°.: 16, SEQ ID N°.: 17 e SEQ ID N°.: 18, SEQ ID N°.: 19 e SEQ ID N°.: 20, SEQ ID N°.: 21 e SEQ ID N°.: 22, SEQ ID N°.: 23 e SEQ ID N°.: 24 e SEQ ID N°.: 25 e SEQ ID N°.: 26.

Em um outro aspecto, a presente invenção refere-se a uma sonda para identificar um gene selecionado entre os

genes *ADH, AOP2, SMP30, NSLT, SDH, SAP, PGM, P4H, APOA1, CAIII, AdDHm, OAT* e *OCT*. Em uma realização particular, a invenção apresenta 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 ou 13 sondas para identificar os ditos trezes genes, sendo que as ditas sondas são fixadas em um suporte sólido, tal como uma membrana, um plástico ou um vidro, tratado opcionalmente a fim de facilitar a fixação das ditas sondas no suporte. O dito suporte sólido, que compreende pelo menos uma sonda para identificar um gene, em que o dito gene é selecionado entre os genes *ADH, AOP2, SMP30, NSLT, SDH, SAP, PGM, P4H, APOA1, CAIII, AdDHm, OAT* e *OCT*, pode ser utilizado na identificação dos produtos da transcrição dos ditos genes (ou de seus cDNAs correspondentes) por meio da tecnologia de arranjo e constitui um aspecto adicional da presente invenção. Em uma realização particular, o dito suporte sólido compreende 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 ou 13 das ditas sondas.

Em um outro aspecto, a presente invenção refere-se a um anticorpo com a capacidade de se ligar a uma proteína selecionada entre ADH, AOP2, SMP30, NSLT, SDH, SAP, PGM, P4H, APOA1, CAIII, AdDHm, OAT e OCT. Em uma realização particular, a invenção apresenta 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 ou 13 anticorpos para a identificação das treze ditas proteínas, sendo que os ditos anticorpos são fixados em um suporte sólido, tal como uma membrana, um plástico ou um vidro, tratado opcionalmente a fim de facilitar a fixação dos ditos anticorpos no suporte. O dito suporte sólido, que compreende pelo menos um anticorpo com a capacidade de se ligar a uma proteína e identificar a mesma, em que a dita proteína é selecionada entre as proteínas ADH, AOP2, SMP30, NSLT, SDH, SAP, PGM, P4H, APOA1, CAIII, AdDHm, OAT e OCT, pode ser utilizado na identificação das proteínas por meio da tecnologia de arranjo e constitui um aspecto adicional da presente invenção. Em uma realização particular, o dito

suporte sólido compreende 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 ou 13 dos ditos anticorpos.

Em um outro aspecto, a invenção refere-se a um kit útil na execução da metodologia descrita na presente invenção. Desse modo, o dito kit pode conter todos ou uma parte dos reagentes necessários para a detecção dos níveis de expressão dos genes *ADH, AOP2, SMP30, NSLT, SDH, SAP, PGM, P4H, APOA1, CAIII, AdDHm, OAT* e/ou *OCT* ou para a detecção dos níveis das proteínas ADH, AOP2, SMP30, NSLT, SDH, SAP, PGM, P4H, APOA1, CAIII, AdDHm, OAT e/ou OCT, que incluem o que segue:

- um ou mais pares de oligonucleotídeos de primers para a amplificação específica de fragmentos dos mRNAs (ou de seus cDNAs correspondentes) dos genes *ADH, AOP2, SMP30, NSLT, SDH, SAP, PGM, P4H, APOA1, CAIII, AdDHm, OAT* e *OCT*; e/ou

- uma ou mais sondas para a identificação de um ou mais genes selecionados entre os genes *ADH, AOP2, SMP30, NSLT, SDH, SAP, PGM, P4H, APOA1, CAIII, AdDHm, OAT* e *OCT*; e/ou

- um ou mais anticorpos com a capacidade de se ligar a uma proteína selecionada entre ADH, AOP2, SMP30, NSLT, SDH, SAP, PGM, P4H, APOA1, CAIII, AdDHm, OAT e OCT ou os fragmentos destas que contêm determinantes antigênicos.

Esse kit pode conter 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 ou 13 pares de oligonucleotídeos de primers, sendo que cada um deles é específico para um dos ditos genes. Os exemplos ilustrativos e não limitadores dos pares de oligonucleotídeos de primers que podem ser incluídos no dito kit incluem os seguintes pares de oligonucleotídeos: SEQ ID N°.: 1 e SEQ ID N°.: 2, SEQ ID N°.: 3 e SEQ ID N°.: 4, SEQ ID N°.: 5 e SEQ ID N°.: 6, SEQ ID N°.: 7 e SEQ ID N°.: 8, SEQ ID N°.: 9 e SEQ ID N°.: 10, SEQ ID N°.: 11 e SEQ ID N°.: 12, SEQ ID N°.: 13 e SEQ ID N°.: 14, SEQ ID N°.: 15 e SEQ ID N°.: 16,

SEQ ID N°.: 17 e SEQ ID N°.: 18, SEQ ID N°.: 19 e SEQ ID N°.: 20, SEQ ID N°.: 21 e SEQ ID N°.: 22, SEQ ID N°.: 23 e SEQ ID N°.: 24 e/ou SEQ ID N°.: 25 e SEQ ID N°.: 26.

Alternativamente, o dito kit pode conter 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 ou 13 sondas, sendo que cada uma delas é específica para a identificação de um dos ditos genes. Em uma outra realização alternativa, o dito kit pode conter 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 ou 13 anticorpos, sendo que cada um deles tem a capacidade de se ligar a uma das ditas proteínas.

Os ditos reagentes, especificamente as sondas e os anticorpos, podem ser fixados em um suporte sólido, tal como mencionado previamente.

O dito kit pode ser utilizado para diagnosticar o HCC *in vitro* em um indivíduo ou avaliar a predisposição de um indivíduo desenvolver o HCC ou para avaliar a progressão da dita doença em um indivíduo ou para determinar o estágio ou a gravidade da dita doença em um indivíduo, ou para identificar e avaliar a eficácia de um tratamento contra o HCC, por exemplo, para avaliar o efeito da terapia administrada a um indivíduo que sofre da dita doença.

Marcadores de estágios antes do desenvolvimento do HCC

Conforme indicado previamente, a invenção também identifica alguns genes que são expressos diferencialmente no tecido cirrótico do fígado (isto é, em um estágio antes do desenvolvimento do HCC) e no tecido saudável do fígado; especificamente, também foi observado que o nível de expressão dos genes *ADH, AOP2, SMP30, NSLT, SDH, SAP* e/ou *PGM* e/ou das proteínas correspondentes (*ADH, AOP2, SMP30, NSLT, SDH, SAP* e/ou *PGM*), é reduzido em amostras de tecido de fígado de pacientes com cirrose (estágio antes do desenvolvimento do HCC) com respeito ao nível dos mesmos genes e/ou proteínas em amostras de tecido de fígado de

indivíduos saudáveis, sem doença hepática (indivíduos do controle). Uma redução nos níveis de expressão dos ditos genes e/ou proteínas entre a amostra de tecido de fígado de um indivíduo sob estudo e uma amostra de tecido de fígado utilizada como um controle de pelo menos 5%, vantajosamente de pelo menos 10%, preferivelmente de pelo menos 15%, com mais preferência de pelo menos 20%, ainda com mais preferência de pelo menos 25%, é indicativa que o indivíduo sob estudo sofre de cirrose a qual, com o tempo, pode evoluir para HCC.

Um técnico no assunto pode selecionar um ou mais dos ditos genes e/ou proteínas a fim de testar uma amostra específica. Como uma ilustração, 1, 2, 3, 4, 5, 6 ou 7 dos ditos genes ou proteínas podem ser selecionados a fim de estudar uma amostra de tecido de fígado de um indivíduo. Em uma realização particular, 1, 2, 3, 4, 5 ou 6 dos ditos genes ou proteínas são selecionados. Em uma outra realização particular, os sete genes ou proteínas são selecionados a fim de estudar a amostra de tecido de fígado do indivíduo sob estudo. A expressão diferencial (reduzida contra o controle) dos sete ditos genes (ADH, AOP2, SMP30, NSLT, SDH, SAP e PGM) constitui uma impressão genômica (impressão digital) de um estágio antes do desenvolvimento do HCC (cirrose). De um modo similar, a expressão diferencial (reduzida contra o controle) das ditas sete proteínas (ADH, AOP2, SMP30, NSLT, SDH, SAP e PGM) constitui uma impressão proteômica (impressão digital) de um estágio antes do desenvolvimento do HCC (cirrose).

Conseqüentemente, a avaliação e a comparação dos níveis de expressão dos ditos genes e/ou de suas proteínas correspondentes, em uma amostra de tecido de fígado de um indivíduo, podem ser utilizadas para identificar um estágio antes do desenvolvimento do HCC e tomar as medidas apropriadas.

Portanto, em um outro aspecto, a invenção refere-se a um método *in vitro* para identificar um estágio antes do desenvolvimento do carcinoma hepatocelular (HCC) em um indivíduo, o qual compreende:

a) a quantificação do nível de expressão de um gene em uma amostra de tecido de fígado do dito indivíduo, em que o dito gene é selecionado entre os genes *ADH, AOP2, SMP30, NSLT, SDH, SAP, PGM* e as combinações destes; e

b) a comparação do dito nível àquele de uma amostra de controle;

em que uma redução no dito nível com respeito ao nível da expressão na amostra de controle é indicativa de um estágio antes do desenvolvimento do HCC;

ou, alternativamente,

a) a quantificação do nível de uma proteína em uma amostra de tecido de fígado do dito indivíduo, em que a dita proteína é selecionada entre ADH, AOP2, SMP30, NSLT, SDH, SAP, PGM e as combinações destas; e

b) a comparação do dito nível àquele de uma amostra de controle;

em que uma redução no dito nível com respeito ao nível na amostra de controle é indicativa de um estágio antes do desenvolvimento do HCC.

Para a prática do dito método, uma amostra de tecido de fígado do indivíduo a ser estudado é obtida, por exemplo, por meio de uma biópsia, uma vez que foi indicado previamente com relação ao método *in vitro* projetado para diagnosticar o HCC fornecido pela presente invenção. As amostras podem ser obtidas a partir de indivíduos com cirrose.

Em uma realização particular, o método previamente descrito compreende a quantificação do nível de expressão de um gene selecionado entre os genes *ADH, AOP2, SMP30, NSLT,*

SDH, SAP, PGM e as combinações destes, em uma amostra de tecido de fígado de um indivíduo e a comparação do dito nível da expressão a uma amostra de tecido de fígado do controle, em que uma redução no dito nível da expressão com respeito ao nível da expressão dos mesmos genes na amostra de controle é indicativa de um estágio antes do desenvolvimento do HCC. A execução do dito método inclui a possibilidade de quantificar não somente o nível da expressão de apenas um dos ditos genes, mas a possibilidade de quantificar os níveis de expressão de quaisquer 2, 3, 4, 5 ou 6 dos ditos genes e até mesmo o nível da expressão dos sete ditos genes. O nível de expressão do dito gene pode ser quantificado por meio da quantificação do nível de mRNA do dito gene, ou, alternativamente, do nível de cDNA para o dito mRNA, tal como mencionado previamente com relação ao método *in vitro* projetado para diagnosticar o HCC fornecido pela presente invenção. Em uma realização particular, o nível de expressão do mRNA é determinado por meio de transferência Northern e da utilização de sondas específicas para o mRNA de interesse (*ADH, AOP2, SMP30, NSLT, SDH, SAP* ou *PGM*) ou por meio de PCR quantitativa, por exemplo, PCR quantitativa em tempo real, utilizando oligonucleotídeos de primers que amplifiquem especificamente as regiões dos genes *ADH, AOP2, SMP30, NSLT, SDH, SAP* ou *PGM*.

Em uma outra realização particular, o método previamente descrito compreende a quantificação do nível (concentração) de uma proteína selecionada entre as proteínas ADH, AOP2, SMP30, NSLT, SDH, SAP, PGM e as combinações destas, em uma amostra de tecido de fígado de um indivíduo e a comparação do dito nível àquele de uma amostra de tecido de fígado do controle, em que uma redução no dito nível com respeito ao nível das mesmas proteínas na amostra de controle é indicativa de um estágio antes do desenvolvimento do HCC. A

implementação do dito método inclui a possibilidade de quantificar não somente o nível de apenas uma das ditas proteínas, mas a possibilidade de quantificar os níveis de quaisquer 2, 3, 4, 5 ou 6 das ditas proteínas e até mesmo o nível das sete ditas proteínas. O nível das ditas proteínas ADH, AOP2, SMP30, NSLT, SDH, SAP e/ou PGM pode ser quantificado por meio de qualquer método convencional, tal como mencionado previamente com relação ao método *in vitro* projetado para diagnosticar o HCC fornecido pela presente invenção. Em uma realização particular, a quantificação dos níveis de ADH, AOP2, SMP30, NSLT, SDH, SAP e/ou PGM é executada por meio da utilização de anticorpos com a capacidade de se ligar às ditas proteínas (ou a fragmentos destas que contêm determinantes antigênicos) e a quantificação subseqüente dos complexos formados, por exemplo, por meio das técnicas imunoquímicas que permitem a quantificação do complexo de antígeno-anticorpo, por exemplo, transferência Western, ELISA, biochips de proteína, etc.

O método previamente descrito também compreende a etapa de comparação dos níveis de expressão dos genes *ADH, AOP2, SMP30, NSLT, SDH, SAP* e/ou *PGM* e/ou dos níveis das proteínas ADH, AOP2, SMP30, NSLT, SDH, SAP e/ou PGM, determinados na amostra de tecido de fígado do indivíduo sob estudo, aos níveis dos ditos genes e/ou proteínas em uma amostra de tecido de fígado utilizada como um controle (isto é, com os valores de referência obtidos geralmente de indivíduos saudáveis, sem doença hepática). Uma redução nos níveis de expressão dos genes *ADH, AOP2, SMP30, NSLT, SDH, SAP* e/ou *PGM* ou nos níveis das proteínas ADH, AOP2, SMP30, NSLT, SDH, SAP e/ou PGM, na amostra de tecido de fígado do indivíduo sob estudo com respeito aos níveis correspondentes na amostra de tecido de fígado do controle é indicativa de um estágio antes do desenvolvimento do HCC.

As seqüências de nucleotídeo dos genes *ADH, AOP2, SMP30, NSLT, SDH, SAP* e/ou *PGM* podem ser utilizadas para projetar oligonucleotídeos de primers para amplificar fragmentos específicos dos ditos genes bem como para obter as sondas que são potencialmente úteis na identificação dos ditos genes; portanto, as ditas seqüências de nucleotídeo dos ditos genes, assim como os ditos oligonucleotídeos de primers e as sondas, podem ser utilizadas para identificar *in vitro* um estágio antes do desenvolvimento do HCC em um indivíduo.

De um modo similar, as proteínas ADH, AOP2, SMP30, NSLT, SDH, SAP e/ou PGM ou fragmentos destas que compreendem um ou mais determinantes antigênicos (epítopos) das ditas proteínas, podem ser utilizadas para a produção de anticorpos contra as ditas proteínas. Portanto, as ditas proteínas e os fragmentos destas, assim como os ditos anticorpos com a capacidade de se ligar às ditas proteínas, podem ser utilizados para identificar *in vitro* um estágio antes do desenvolvimento do HCC em um indivíduo.

Em um outro aspecto, a invenção refere-se à utilização de um anticorpo para identificar *in vitro* um estágio antes do desenvolvimento do HCC em um indivíduo, em que o dito anticorpo é um anticorpo com a capacidade de se ligar a uma proteína selecionada entre ADH, AOP2, SMP30, NSLT, SDH, SAP e PGM ou a fragmentos destas que contêm determinantes antigênicos das ditas proteínas. Os ditos anticorpos podem ser anticorpos recombinantes, anticorpos monoclonais, anticorpos policlonais, intactos ou fragmentos destes, que preservam a capacidade de se ligar às ditas proteínas (ADH, AOP2, SMP30, NSLT, SDH, SAP ou PGM), por exemplo, os fragmentos de Fab, scFv, etc., de anticorpos de seres humanos, humanizados ou não-humanos.

Os biomarcadores moleculares identificados, tais como os genes *ADH, AOP2, SMP30, NSLT, SDH, SAP* e/ou *PGM* e/ou

as proteínas ADH, AOP2, SMP30, NSLT, SDH, SAP e/ou PGM, podem ser utilizados na seleção, na busca, na identificação, no desenvolvimento e na avaliação da eficácia dos compostos no tratamento dos estágios antes do desenvolvimento do HCC em um indivíduo.

Portanto, em um outro aspecto, a invenção refere-se a um método para a seleção, a busca, a identificação, o desenvolvimento e a avaliação da eficácia dos compostos no tratamento dos estágios antes do desenvolvimento do HCC em um indivíduo, o qual compreende (i) a colocação de um sistema celular que expressa um nível reduzido de um gene em contato com o composto candidato e ii) a avaliação da expressão do dito gene, de tal modo que, se a expressão do dito gene aumentar, o composto candidato será um composto potencialmente útil no tratamento de um estágio antes do desenvolvimento do HCC, em que o dito gene é selecionado entre os genes *ADH, AOP2, SMP30, NSLT, SDH, SAP, PGM* e as combinações destes. O dito sistema celular pode ser praticamente qualquer sistema celular em que um ou mais dos ditos marcadores são reduzidos, por exemplo, as linhagens de células humanas transformadas que exibem uma diminuição no nível de tais marcadores. A expressão dos ditos genes pode ser avaliada por meio de qualquer método convencional, por exemplo, pela quantificação dos níveis do mRNA que pertencem aos ditos genes ou a seus cDNAs correspondentes ou pela quantificação das ditas proteínas por meio de qualquer um dos métodos acima mencionados. Quando um composto aumenta a expressão de ADH, AOP2, SMP30, NSLT, SDH, SAP e/ou de PGM, o dito composto se torna um candidato potencialmente útil para o tratamento de um estágio antes do desenvolvimento do HCC.

Conseqüentemente, em um outro aspecto, a invenção refere-se à utilização dos ditos genes *ADH, AOP2, SMP30, NSLT, SDH, SAP* e/ou *PGM* e/ou das ditas proteínas *ADH, AOP2,*

SMP30, *NSLT*, *SDH*, *SAP* e/ou *PGM*, em um método para a seleção, a busca, a identificação, o desenvolvimento e a avaliação da eficácia dos compostos no tratamento dos estágios antes do desenvolvimento do HCC em um indivíduo.

Os compostos que intensificam a expressão dos genes *ADH*, *AOP2*, *SMP30*, *NSLT*, *SDH*, *SAP* e/ou *PGM* ou a atividade das proteínas *ADH*, *AOP2*, *SMP30*, *NSLT*, *SDH*, *SAP* e/ou *PGM* podem ser utilizados no tratamento dos estágios antes do desenvolvimento do HCC. Os exemplos ilustrativos, mas sem ficar a eles limitados, dos ditos compostos, incluem moduladores positivos da expressão dos ditos genes ou da atividade das ditas proteínas.

Em um outro aspecto, a invenção refere-se a uma composição farmacêutica que compreende uma quantidade terapeuticamente eficaz de um composto que intensifica a expressão dos genes *ADH*, *AOP2*, *SMP30*, *NSLT*, *SDH*, *SAP* e/ou *PGM* ou a atividade das proteínas *ADH*, *AOP2*, *SMP30*, *NSLT*, *SDH*, *SAP* e/ou *PGM*, junto com um ou mais excipientes e/ou veículos farmaceuticamente aceitáveis. Em uma realização particular, a dita composição farmacêutica compreende um modulador positivo da expressão dos ditos genes ou um modulador positivo da atividade das ditas proteínas.

Os excipientes, os veículos e as substâncias auxiliares devem ser farmacêutica e farmacologicamente toleráveis e devem poder ser combinados com outros componentes da formulação e não exercer nenhum efeito adverso no indivíduo sob tratamento. As composições farmacêuticas podem ser oferecidas em qualquer forma de administração apropriada, por exemplo, nas formas farmacêuticas apropriadas para a administração oral e parenteral (incluindo, por exemplo, a administração intravenosa, subcutânea, intradermal, intramuscular, intraperitoneal e intratecal). As formulações podem ser em dose única e serão preparadas de

acordo com métodos galênicos clássicos. Uma revisão das diferentes formas farmacêuticas para a administração de drogas e a preparação destas pode ser encontrada no livro "Tratado de Farmacia Galénica", de C. Faulí i Trillo, 10ª Edição, 1993, Luzán 5, S. A. de Ediciones.

Em um outro aspecto, a invenção refere-se à utilização de um composto que intensifica a expressão dos genes *ADH, AOP2, SMP30, NSLT, SDH, SAP* e/ou *PGM* ou a atividade das proteínas ADH, AOP2, SMP30, NSLT, SDH, SAP e/ou PGM, na manufatura de uma composição farmacêutica para o tratamento de um estágio antes do desenvolvimento do HCC.

Em um outro aspecto, a presente invenção refere-se a um par de oligonucleotídeos de primers para amplificar especificamente um fragmento de mRNA ou de cDNA de um gene, em que o dito gene é selecionado entre os genes *ADH, AOP2, SMP30, NSLT, SDH, SAP* e/ou *PGM*. Em uma realização particular, o dito par de oligonucleotídeos de primers é selecionado do grupo de pares de oligonucleotídeos que consistem na SEQ ID N°.:1 e SEQ ID N°.: 2, SEQ ID N°.: 3 e SEQ ID N°.: 4, SEQ ID N°.: 5 e SEQ ID N°.: 6, SEQ ID N°.: 7 e SEQ ID N°.: 8, SEQ ID N°.: 9 e SEQ ID N°.: 10, SEQ ID N°.: 11 e SEQ ID N°.: 12 e SEQ ID N°.: 13 e SEQ ID N°.: 14.

Em um outro aspecto, a presente invenção refere-se a uma sonda para identificar um gene selecionado entre os genes *ADH, AOP2, SMP30, NSLT, SDH, SAP* e *PGM*. Em uma realização particular, a invenção apresenta 1, 2, 3, 4, 5, 6 ou 7 sondas para identificar os sete ditos genes, sendo que as ditas sondas são fixadas em um suporte sólido, tal como uma membrana, um plástico ou um vidro, tratado opcionalmente a fim de facilitar a fixação das ditas sondas no suporte. O dito suporte sólido, que compreende pelo menos uma sonda para identificar um gene, em que o dito gene é selecionado entre os genes *ADH, AOP2, SMP30, NSLT, SDH, SAP* e/ou *PGM*, pode ser

utilizado na identificação dos produtos da transcrição dos ditos genes (ou de seus cDNAs correspondentes) por meio da tecnologia de arranjo e constitui um aspecto adicional da presente invenção. Em uma realização particular, o dito suporte sólido compreende 1, 2, 3, 4, 5, 6 ou 7 das ditas sondas.

Em um outro aspecto, a presente invenção refere-se a um anticorpo com a capacidade de se ligar a uma proteína selecionada entre *ADH, AOP2, SMP30, NSLT, SDH, SAP* e *PGM*. Em uma realização particular, a invenção fornece 1, 2, 3, 4, 5, 6 ou 7 anticorpos para identificar as sete ditas proteínas, sendo que os ditos anticorpos são fixados em um suporte sólido, tal como uma membrana, um plástico ou um vidro, tratado opcionalmente a fim de facilitar a fixação dos ditos anticorpos ao suporte. O dito suporte sólido, que compreende pelo menos um anticorpo com a capacidade de se ligar a uma proteína e identificar a mesma, em que a dita proteína é selecionada das proteínas ADH, AOP2, SMP30, NSLT, SDH, SAP e PGM, pode ser utilizado na identificação das proteínas por meio da tecnologia de arranjo e constitui um aspecto adicional da presente invenção. Em uma realização particular, o dito suporte sólido compreende 1, 2, 3, 4, 5, 6 ou 7 dos ditos anticorpos.

Em um outro aspecto, a invenção refere-se a um kit útil na execução do método *in vitro* projetado para identificar um estágio antes do desenvolvimento do HCC, descrito previamente. O dito kit pode conter todos ou uma parte dos reagentes necessários para detectar os níveis de expressão dos genes *ADH, AOP2, SMP30, NSLT, SDH, SAP* e/ou *PGM* ou das proteínas ADH, AOP2, SMP30, NSLT, SDH, SAP e/ou PGM, que incluem os seguintes:

- um ou mais pares de oligonucleotídeos de primers para amplificar especificamente fragmentos dos mRNAs (ou de

seus cDNAs correspondentes) dos genes *ADH*, *AOP2*, *SMP30*, *NSLT*, *SDH*, *SAP* ou *PGM*; e/ou

- uma ou mais sondas para identificar um ou mais genes selecionados dos genes *ADH*, *AOP2*, *SMP30*, *NSLT*, *SDH*, *SAP* e *PGM*; e/ou

- um ou mais anticorpos com a capacidade de se ligar a uma proteína selecionada entre ADH, AOP2, SMP30, NSLT, SDH, SAP e PGM ou a fragmentos destas que contêm determinantes antigênicos.

Esse kit pode conter 1, 2, 3, 4, 5, 6 ou 7 pares de oligonucleotídeos de primers, sendo que cada um deles é específico para um dos ditos genes. Os exemplos ilustrativos não limitadores dos pares de oligonucleotídeos de primers que podem ser incluídos no dito kit incluem os seguintes pares de oligonucleotídeos: SEQ ID N°.: 1 e SEQ ID N°.: 2, SEQ ID N°.: 3 e SEQ ID N°.: 4, SEQ ID N°.: 5 e SEQ ID N°.: 6, SEQ ID N°.: 7 e SEQ ID N°.: 8, SEQ ID N°.: 9 e SEQ ID N°.: 10, SEQ ID N°.: 11 e SEQ ID N°.: 12 e/ou SEQ ID N°.: 13 e SEQ ID N°.: 14.

Alternativamente, o dito kit pode conter 1, 2, 3, 4, 5, 6 ou 7 sondas, sendo que cada uma delas é específica para a identificação de um dos ditos genes. Em uma outra realização alternativa, o dito kit pode conter 1, 2, 3, 4, 5, 6 ou 7 anticorpos, sendo que cada um deles tem a capacidade de se ligar disso a uma das ditas proteínas ou a fragmentos que contêm determinantes antigênicos.

Os ditos reagentes, especificamente as sondas e os anticorpos, podem ser fixados em um suporte sólido, tal como mencionado previamente.

O seguinte exemplo ilustra a invenção, embora não se deva considerar como limitador do âmbito da mesma.

EXEMPLO 1

MATERIAL E MÉTODOS

Animais de laboratório

Foram utilizados camundongos *MAT1A-/-* criados na própria colônia dos autores da invenção e que se desenvolveram no laboratório dos autores da invenção (Lu SC, Alvarez L, Huang ZZ, Chen L, An W, Corrales FJ, Avila MA, Kanel G, Mato JM. Methionine Adenosyltransferase 1A Knockout Mice Are Predisposed to Liver Injury and Exhibit Increased Expression of Genes Involved in Proliferation. Proc Natl Acad Sci EUA 2001; 98: 5560-65). Depois do sacrifício dos camundongos do tipo selvagem (WT) e *MAT1A-/-* e da extração do fígado destes, o tamanho dos tumores presentes no fígado *MAT1A-/-* foram medidos. As amostras de fígado foram congeladas imediatamente em nitrogênio líquido e mantidas a -80°C. Todos os procedimentos experimentais foram executados de acordo com as diretrizes institucionais da Universidade de Navarra a respeito da utilização e do trabalho com animais de laboratório.

Pacientes

As amostras de fígado de diversos grupos foram obtidas:

a) Amostras de indivíduos de controle (n=10). As amostras do grupo de controle foram obtidas dos pacientes que foram submetidos a uma colecistectomia para o tratamento da colelitíase assintomática e deram seu consentimento para serem submetidos a uma biópsia de fígado. Esses pacientes exibiram histologia de fígado normal e suas funções hepáticas estavam normais.

b) Amostras de pacientes que sofrem de cirrose alcoólica (n=5).

c) Pacientes que sofrem de cirrose viral (n=5).

d) Pacientes com HCC de etiologia diferente (n=10).

e) Amostras de fígado da área de não-tumor de pacientes com HCC obtido de fígado saudável (n=7).

f) Amostras de fígado da área de não-tumor de pacientes com HCC de etiologia diferente: 3 de hepatite C e 5 de cirrose viral (n=8).

As amostras patológicas foram obtidas durante a cirurgia ou no momento do transplante de fígado.

Todos os tecidos foram imediatamente congelados em nitrogênio líquido a fim de, subseqüentemente, executar a extração do RNA. Esse estudo foi aprovado pelo Comitê de Pesquisa da Universidade de Navarra. Os estudos foram realizados de acordo com os padrões éticos formulados na Declaração de Helsinki de 1975 (revisada em 1983).

Análise proteômica

A caracterização do proteoma de fígado e as alterações associadas com o modelo experimental foram executadas ao combinar a definição da mistura das proteínas das amostras biológicas por meio da eletroforese bidimensional e da identificação subseqüente das proteínas de interesse pela espectrometria de massa de acordo com a abordagem proteômica esboçada abaixo:

A) FASE PREPARATÓRIA

Homogeneização/Solubilização das proteínas

Enfoque isoelétrico (1ª D)

Redução/alquilação

SDS-PAGE (2ª D)

Tingimento/destingimento

B) FASE PREPARATÓRIA

Análise de imagens

Excisão de faixa diferencial

Digestão de enzimas

Identificação por meio de Espectrometria de Massa (MS)

50 mg de partes de tecido de fígado de camundongos WT e de camundongos *MAT1A*-/- foram homogeneizadas em 20

volumes de tampão de lise, que tinha a seguinte composição: 7 M de uréia, 2 M de tiouréia, 4% (v/v) de 3-[(3-cloramidopropil)dimetil-amonio]-1-propanosulfonato (CHAPS), 1% (v/v) de ditiotreitol (DTT) e 0,5% de 3-10 anfólitos (BioRad). Os extratos foram centrifugados em 100.000 x g por uma hora a 15°C. A concentração de proteínas nos sobrenadantes obtidos foi medida por meio do método de Bradford (BioRad) utilizando a albumina bovina como padrão.

A 1ª dimensão foi executada em fontes de enfoque isoelétrico (célula Protean IEF da BioRad), utilizando géis de 17 cm (tiras ReadyStrips IPG da BioRad) com escalas de pH diferentes. A amostra (150-1,000 µg) foi carregada por meio de um processo de reidratação ativa por doze horas a 50 V e a 20°C. Depois da reidratação, os géis foram submetidos à voltagem progressivamente crescente, até que se atingiu 60,000 V x hora, utilizando o protocolo recomendado pelo fabricante. As tiras foram equilibradas em um tampão com a seguinte composição: 50 mM de Tris/HCl, pH 7,5, 6 M de uréia, 30%(v/v) de glicerol, 2%(v/v) de dodecilsulfato de sódio (SDS), 2% (v/v) de DTT e traços de azul de bromofenol e, subseqüentemente, foram incubadas no mesmo tampão, que continha 2,5% de iodoacetamida na ausência de DTT. As tiras foram colocadas diretamente em 12,5% de géis de poliacrilamida (18 cm x 20 cm x 1 mm) e foram lacradas com 1% de agarose de baixo ponto de fusão a fim de fixar a sua posição. Os géis de SDS-PAGE (2ª dimensão) foram fundidos por catorze horas em 90 V e foram tingidos com Coomassie Safe Stain (Invitrogen). Alternativamente, o tingimento de prata (Amersham Biosciences) e o tingimento fluorescente Sypro Ruby (BioRad) foram utilizados. Os géis tingidos com Coomassie ou com prata foram digitalizados em um densitômetro calibrado GS-800 (Bio-Rad). Os géis tingidos com fluorescência foram escaneados com o densitômetro Molecular Imager FX (Bio-Rad).

As imagens obtidas foram analisadas utilizando o software PDQuest 7.1 da BioRad. As únicas diferenças que foram consideradas como sendo válidas foram aquelas que mostraram uma variação maior do que três vezes nos níveis de expressão e foram confirmadas em pelo menos três experiências independentes. Todas as amostras foram processadas em duplicata. As faixas pertencentes às proteínas diferencialmente expressas foram extraídas manualmente do gel e foram processadas automaticamente em um robô (estação MassPrep da Micromass). As faixas de interesse tingidas com Coomassie ou com fluorescência foram destingidas com 50 mM de bicarbonato de amônio e 50%(v/v) de acetonitrila, sendo que as faixas tingidas com prata foram destingidas com 15 mM de ferrocianeto de potássio e 50 mM de tiossulfato de sódio. As proteínas foram reduzidas com 10 mM de DTT em 100 mM de bicarbonato de sódio e alquiladas com 55 mM de iodoacetamida no mesmo tampão. Subseqüentemente, a digestão foi executada com 6 ng/µl de tripsina em 50 mM de bicarbonato de amônio por cinco horas a 37°C. Alternativamente, o procedimento desenvolvido pela Sigma foi utilizado. O hidrolisado de peptídeo obtido foi extraído com 1%(v/v) de ácido fórmico e 2%(v/v) de acetonitrila. Subseqüentemente, 1.2 µl de cada digestão foram misturados com 1.2 µl de uma solução saturada de ácido α-ciano-4-hidróxi-trans-cinâmico em 0,1%(v/v) de ácido trifluoroacético e 50% de acetonitrila. As misturas foram depositadas em placas compatíveis com a espectrometria de massa de MALDI TOF. As digestões foram analisadas por meio de espectrometria de massa utilizando o espectrômetro MALDI-TOF GL-REF da Waters. A seqüenciação e caracterização dos peptídeos foram executadas em um microespectrômetro Q-TOF da Waters. A cromatografia de nanolíquido foi executada utilizando um sistema CapLC™ da Waters. A separação da digestão tríptica pela cromatografia de fase reversa foi

executada em uma coluna Atlantis C-18, 3 µm, 75 µm x 10 cm, Nano Ease™ da Waters. A coluna foi equilibrada em 5% de acetonitrila e em 0.2% de ácido fórmico. Depois de uma injeção de 6 µl da amostra, a coluna foi lavada por cinco minutos com o mesmo tampão e os peptídeos foram eluídos com um gradiente linear de 5-50% de acetonitrila por trinta minutos com um fluxo constante de 0.2 µl/min. A coluna foi conectada ao espectrômetro de massa utilizando uma fonte de ionização de nano-eletrospray PicoTip (Waters). A temperatura capilar era de 80°C e a voltagem era de 1.8-2.2 Kv. Os dados de fragmentação obtidos foram coletados automaticamente utilizando o programa estabelecido. Os três íons mais intensos a cada tempo de retenção foram fragmentados pela colisão induzida (CID) com uma janela de 2.5 e uma energia de colisão relativa de 35%. Os dados da espectrometria de massa foram processados utilizando o software Masslynx 4.0 (Waters). Para a identificação da proteína, o software Proteinlynx Global Server 2.0 (Waters) foi utilizado. Os bancos de dados utilizados para as buscas eram SwissProt (Swiss-Prot Release 46.3 com 176,469 entradas) e Ensembl (Ensembl Mouse Release 29,33 com 31,535 entradas). Finalmente, a classificação e a interpretação funcional das proteínas identificadas foram executadas utilizando o software GARBAN (Luis A, Martínez-Cruz, Angel Rubio, María L. Martínez-Chantar, Alberto Labarga, Isabel Barrio, Adam Podhorski, Víctor Segura, José L. Sevilla Campo, Matías A. Ávila e Jose M. Mato. GARBAN: A New Tool for Genomic Analysis and Rapid Biological Annotation of cDNA Microarray and Proteomic Data. Bioinformatics 2003; 19:2158-60).

Isolamento de RNA, RT-PCR e PCR em tempo real

Para a extração do RNA presente nas amostras humanas, o reagente TRI da Sigma foi utilizado. O RNA (2 µg) foi tratado com DNAse I (Invitrogen) antes da execução da

transcrição reversa com M-MLV Reverse Transcriptase (Invitrogen) na presença de RNAse OUT (Invitrogen). Todos os oligonucleotídeos de primers utilizados foram projetados para distinguir entre a amplificação do DNA genômico e do cDNA. Todos os produtos da PCR foram arranjados em seqüência a fim de confirmar a especificidade. A PCR em tempo real foi executada com 1/20 da reação de RT utilizando um iCycler (Bio-Rad) e a mistura iQ SYBR Green Supermix (Bio-Rad). Os seguintes oligonucleotídeos de primers foram utilizados:

Álcool desidrogenase (ADH): 5'-GATGCCTCTGATTGGTCTGG-3' (SEQ ID N°.: 1) e 5'-CTTGGATGTCACAAACAGCTC-3' (SEQ ID N°.: 2);

Proteína antioxidante 2 (AOP2): 5'-CAACTTTGAGGCCAATACCAC-3' (SEQ ID N°.: 3) e 5'-TCCTTGCTCCAGGCAAGATG-3' (SEQ ID N°.: 4);

Proteína do marcador de senescência 30 (SMP30): 5'-TCAATGATGGGAAGGTGGATC-3' (SEQ ID N°.: 5) e 5'-AGGTCATAGTCAAAGGCATCC-3' (SEQ ID N°.: 6);

Proteína lipídeo transferência de não-específica (NSLT): 5'-TGGCTCTTGGGTTTGAGAAG-3' (SEQ ID N°.: 7) e 5'-CATCTTGGAACTGGGAATACG-3' (SEQ ID N°.: 8);

Sorbitol desidrogenase (SDH): 5'-ATCTTCTTCTGTGCCACGCC-3' (SEQ ID N°.: 9) e 5'-GCTCCCATTGCTTTGGCCAC-3' (SEQ ID N°.: 10);

Albumina de soro (SAP): 5'-ATGCCTGCTGACTTGCCTTC-3' (SEQ ID N°.: 11) e 5'-CTGAGGCTCTTCCACAAGAG-3' (SEQ ID N°.: 12);

Fosfoglucomutase (PGM): 5'-AAGAAGATCCTCTGTGAAGAAC-3' (SEQ ID N°.: 13) e 5'-GAATGCTGAAGATGTTGGCAG-3' (SEQ ID N°.: 14);

fenilalanina 4-hidroxilase (P4H): 5'-GGTGCCACTGTCCATGAGC-3' (SEQ ID N°.: 15) e 5'-GGCGGTAGTTGTAGGCAATG-3' (SEQ ID N°.: 16);

Apolipoproteína A1 (APOA1): 5'-GACAGCGGCAGAGACTATG-3' (SEQ ID N°.: 17) e 5'-CCACCTTCTGGCGGTAGAG-3' (SEQ ID N°.: 18);

Anidrase carbônica III (CAIII): 5'-TCCTGACCACTGGCATGAAC-3' (SEQ ID N°.: 19) e 5'-TGCTCAGAGCCATGATCATC-3' (SEQ ID N°.: 20);

Aldeído mitocondrial desidrogenase (AdDHm): 5'-GAGCAGCAACCTCAAGAGAG-3' (SEQ ID N°.: 21) e 5'-CGAGGATCTTCTTAAACTGAG-3' (SEQ ID N°.: 22);

Ornitina aminotransferase (OAT): 5'-TGTGTCTGCAGTGCTGTGTG-3' (SEQ ID N°.: 23) e 5'-AGACACACCTTCCAAGCATC-3' (SEQ ID N°.: 24);

Ornitina carbamoiltransferase (OCT): 5'-GGAACAATATCCTGCACTCC-3' (SEQ ID N°.: 25) e 5'-CTGTAATTAATACATTGCCTCC-3' (SEQ ID N°.: 26);

Maleato desidrogenase: 5'-GGAGCAGCTGGTCAAATTGC-3' (SEQ ID N°.: 27) e 5'-TCCATGCCTTCCCTTCTTGG-3' (SEQ ID N°.: 28);

glicina N-metiltransferase: 5'-GCTGGTGGAAGAGGGCTTC-3' (SEQ ID N°.: 29) e 5'-CCTTTGCAGTCTGGCAAGTG-3' (SEQ ID N°.: 30);

Apolipoproteína E: 5'-GTTGCTGGTCACATTCCTGG-3' (SEQ ID N°.: 31) e 5'-TAGGCCTTCAACTCCTTCATG-3' (SEQ ID N°.: 32);

Glutationa S-transferase P2: 5'-AGTTCCAGGACGGAGACCTC-3' (SEQ ID N°.: 33) e 5'-CAGGGTCTCAAAAGGCTTCAG-3' (SEQ ID N°.: 34);

Metionina adenosiltransferase I: 5'-AGTCATCCCTGTGCGCATC-3' (SEQ ID N°.: 35) e 5'-GGTCCACCTTGGTGTAGTC-3' (SEQ ID N°.: 36);

proteína dissulfeto isomerase: 5'-TCTCCAAATACCAGCTCGAC-3' (SEQ ID N°.: 37) e 5'-CAGGATCTTGCCCTTGAAGC-3' (SEQ ID N°.: 38);

Adenosilomocisteinase: 5'-GTCCAGCTGCAACATCTTCTC-3'

(SEQ ID N°.: 39) e 5'-CAGTCGTGGTCTCCTCAGAG-3' (SEQ ID N°.: 40);

Proteína de choque térmico 71kDa: 5'-GATGAAGGAAATTGCAGAAGC-3' (SEQ ID N°.: 41) e 5'-CAATAGTGAGGATTGACACATC-3' (SEQ ID N°.: 42);

Arginase 1: 5'-CAGGATTCTCCTGGGTGAC-3' (SEQ ID N°.: 43) e 5'-GATGTAGAGACCTTCTCTG-3' (SEQ ID N°.: 44);

Proteínas de ligação de selênio: 5'-CTTCAGCAACTGGCTTGCATG-3' (SEQ ID N°.: 45) e 5'-GCTGAGCTGGATCATCTGAG-3' (SEQ ID N°.: 46);

Glutamina sintase: 5'-AGCCCAAGTGTGTGGAAGAG-3' (SEQ ID N°.: 47) e 5'-TGCTGGTTGCTCACCATGTC-3' (SEQ ID N°.: 48);

Glutationa S-transferase Mu1: 5'-CCTGGAATACACAGACTCAAG-3' (SEQ ID N°.: 49) e 5'-TCTTCTCCTCTTCTGTCTCC-3' (SEQ ID N°.: 50).

A especificidade dos produtos da PCR foi analisada por meio das curvas de desnaturação e da eletroforese. A quantidade de transcrito foi calculada e expressa como a diferença relativa com respeito ao gene do controle H3F3A Histona ($2^{\Delta Ct}$, onde ΔCt representa a diferença no número de ciclo entre o gene alvo e o gene do controle), conforme descrito previamente (K.J. Livak, T. D. Schmittgen. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta CT}$ Method. Methods 2001; 25:402-408). Uma mistura de RNA de cinco indivíduos de controle foi utilizada como um controle positivo para a reação e a água milliQ foi utilizada como um controle negativo.

Análise bioestatística

A fim de comparar os níveis do mRNA entre indivíduos do controle e os pacientes com doença hepática, o teste estatístico aplicado foi o teste de Mann-Whitney U com um valor de significância de $p < 0,05$.

RESULTADOS

1.1 Perfil proteômico do HCC no fígado de camundongo *MAT1A-/-*

100% dos camundongos *MAT1A-/-* desenvolvem o HCC com dezoito meses de idade. Os hepatócitos transformados são caracterizados pelo fato de que exibem um núcleo oval e um nucléolo proeminente. Esses hepatócitos formam cordões trabeculares revestidos com células endoteliais. A análise macroscópica dos nódulos de tumor presentes em camundongos *MAT1A-/-* diferentes apresentou heterogeneidade no tamanho destes (Figura 1).

A homogeneidade proteômica que foi observada em cada um dos grupos analisados é um dos parâmetros-chave em estudos proteômicos diferenciais. Nesse estudo, a variabilidade medida (definida como a porcentagem de faixas diferenciais com respeito ao número total de faixas analisadas) entre os fígados de camundongos do tipo selvagem era de 1% ($p < 0,01$). No entanto, quando da comparação dos nódulos de tumor do mesmo fígado *MAT1A-/-*, a variabilidade do proteoma atingiu 3% ($p < 0,01$) nas lesões maiores do que 10 mM e aumentou para 10% quando os nódulos de camundongos diferentes foram comparados, independentemente do tamanho do tumor ($p < 0,05$). Esses dados sugerem que o crescimento do tumor bem como os fatores específicos do indivíduo podem contribuir para a instabilidade do proteoma após a transformação neoplástica (Figura 2).

A fim de definir as mudanças no proteoma do fígado associadas com a hepatocarcinogênese, as amostras de fígado de camundongos *MAT1A-/-* e do tipo selvagem com dezoito meses de idade foram analisadas por meio de eletroforese bidimensional e de espectrometria de massa. Todas as análises foram feitas em duplicata e as únicas diferenças que foram consideradas como tais foram aquelas proteínas que exibiram uma diferença na expressão de, pelo menos, três vezes em

ambas as réplicas. Seis nódulos de tumor de camundongos diferentes foram comparados às amostras de fígado de camundongos do tipo selvagem. Dentre todas as alterações detectadas nos nódulos de tumor, 151 proteínas foram identificadas. A fim de verificar as identificações obtidas, uma representação foi feita do Mw e do pI teóricos calculados com base na seqüência de proteína, contra a Rf experimental das faixas correspondentes calculadas com base nos géis 2D. Conforme se pode observar na Figura 3, uma boa correlação entre os parâmetros teóricos e experimentais foi obtida, com alguns desvios no Mw e pI experimentais, provavelmente devido à modificação pós-translacional ou a um processamento alternativo da espécie de proteína. Alguns exemplos de comportamento eletroforético anômalo observado em alguns tumores são: aldeído desidrogenase (classe 2), albumina e glutationa transferase Mu1. A fim de confirmar a identificação correta dessas proteínas, elas foram arranjadas parcialmente em seqüência por meio da espectrometria de massa de ESI/MS/MS.

As proteínas identificadas foram classificadas com base em sua posição subcelular e no processo biológico em que estão envolvidas, de acordo com o critério de Gene Ontology (Ashburner M, Ball CA, Blake JA et al. Gene Ontology: Tool for the Unification of Biology. The Gene Ontology Consortium. Nat Genet 2000; 25: 25-9), utilizando o programa de biocomputador GARBAN. Os resultados obtidos são mostrados na Figura 4, onde se pode observar que as proteínas identificadas estão localizadas nas mitocôndrias (para a maioria), no citossol, no citoesqueleto, no retículo endoplasmático, no núcleo e em outras posições subcelulares. Os processos biológicos em que as proteínas identificadas são envolvidas compreendem a resposta a estímulos externos, transdução de sinal, organização e biogênese, metabolismo

(para a maioria) e transporte celular.

Das 151 proteínas identificadas, 61,3% das alterações correspondem às proteínas cujos níveis foram reduzidos no tumor, provavelmente em conseqüência da desdiferenciação progressiva dos hepatócitos durante o processo de transformação. Apesar da disparidade observada entre as diferentes análises, a sinalização, a organização, o metabolismo e o transporte celular eram as funções biológicas geralmente afetadas. As análises indicaram que o citoesqueleto e o retículo endoplasmático foram danificados, embora a mitocôndria fosse a organela subcelular que acumulou o maior número de alterações. O estudo das alterações metabólicas ao qual foi submetido o fígado *MAT1A-/-* indicou que, como era o caso na esteatoepatite não-alcoólica (NASH), a maioria delas pertenciam ao metabolismo dos carboidratos, dos lipídeos e dos aminoácidos. Além disso, um aumento foi observado na expressão das enzimas relacionadas ao metabolismo das purinas e das pirimidinas. Essa observação poderia refletir a necessidade da síntese do material genético pela proliferação de células.

A fim de identificar as proteínas associadas com o HCC humano, foi decidido focalizar o estudo unicamente nas 27 proteínas cuja expressão foi alterada em, pelo menos, 50% dos tumores de *MAT1A-/-* analisados (Tabela 1).

Tabela 1: Alterações associadas ao HCC em pelo menos 50% dos nódulos de tumor analisados

Proteína	**Código**	**Nº. de Acesso**	**Função**	**Casos**
Metionina adenosiltransferase	MAT	Q91X83	Síntese de Adomet	6\6
Anidrase carbônica III	CAIII	P16015	Hidratação reversível de dióxido de carbono	6\6
Proteína Rik 1300018L09	Q9DBB8	Q9DBB8	Catabolismo de hidrocarboneto policíclico	5\6
Glutamina Sintetase	GS	P15105	Homeostase de nitrogênio	5\6
Proteína de ligação de selênio 2	SBP2	Q63836	Ligação a selênio e acetaminofen	5\6
Adenosil homocisteinase	SAHH	P50247	Regula os níveis de S-	5\6

			adenosil homocisteína	
Proteína antioxidante 2	AOP2	O08709	Envolvida na regulação redox da célula	5\6
Regucalcina	SMP30	Q64374	Homeostase de cálcio	5\6
Apolipoproteína A1	APOA1	Q00623	Transporte reverso de colesterol ao fígado	4\6
Apolipoproteína E	APOE	P08226	Ligação e internalização de lipoproteínas	4\6
Albumina	SAP	P07724	Regula a pressão osmótica do sangue	4\6
Sorbitol desidrogenase	SDH	Q64442	Envolvida na passagem de poliol	3\6
fenilalanina 4-hidroxilase	P4H	P16331	Catabolismo de fenilalanina	3\6
Desidrogenase de malato	MDH	P14152	Envolvida no clico de Krebs	3\6
Arginase 1	ARG	Q61176	Degradação da arginina (Ciclo da Uréia)	3\6
Fosfoglucomutase	PGM	Q9D0F9	Degradação/ síntese da glicose	3\6
Ornitina aminotransferase	OAT	P29758	Controla os níveis de L-ornitina nos tecidos	3\6
Ornitina carbamoiltransferase	OCT	P00481	Participa da biosíntese da arginina	3\6
Proteína que transporta esterol 2	NSLT	P32020	Transporta grupos Acil-CoA	3\6
glicina N-metiltransferase	GNMT	Q91WN7	Metilação de glicina	3\6
Álcool desidrogenase	ADH	Q9JII6	Metabolismo de etanol	3\6
Proteína Rik 2810435D12	Q9CYW4	Q9CYW4	Atividade de hidrolase	3\6
Aldeído mitocondrial desidrogenase	AdDHm	P44738	Envolvida na utilização de etanol	3\6
Glutationa transferase Mu1	GST Mu1	P10649	Detoxificação de eletrófilos hidrofóbicos	3\6
Glutationa transferase P2	GST P2	P46425	Detoxificação de eletrófilos hidrofóbicos	3\6
Proteína de choque térmico 71kDa	HSC71	P63017	Proteína de stress	3\6
proteína dissulfeto isomerase	PDI	P09103	Chaperonina, isomerase com atividade redox	3\6

Das 27 proteínas, 19 reduziram a sua expressão no fígado *MAT1A-/-* (metionina adenosiltransferase, anidrase carbônica III, proteína 1300018L09 Rik, glutamina sintetase, proteína de ligação ao selênio 2, adenosilomocisteinase, proteína antioxidante 2, regucalcina, sorbitol desidrogenase, fenilalanina 4-hidroxilase, maleato desidrogenase, arginase 1, fosfoglucomutase, ornitina aminotransferase, ornitina carbamoiltransferase, proteína que transporta esterol 2, glicina N-metiltransferase, álcool desidrogenase e proteína Rik 2810435D12) (Figura 5). As oito proteínas restantes (glutationa transferase P2, proteína de choque térmico 71kDa,

apolipoproteína A1 e E, albumina, aldeído desidrogenase classe 2, glutationa transferase Mu1 e proteína dissulfeto isomerase) foram aumentadas nos tumores analisados. Quatro delas foram analisadas com base nas faixas recém-surgidas, que exibiram um comportamento eletroforético anômalo devido às mudanças observadas no pI e no Mw. Não foi possível concluir que essas proteínas são superexpressas, uma vez que essas isoformas anômalas são possivelmente produzidas em conseqüência das modificações pós-translacionais (Figura 6).

1.2 Análise da expressão de genes em HCC humano

A fim de investigar se as alterações previamente observadas em camundongos *MAT1A-/-* podem ser consideradas como sendo biomarcadores do HCC potenciais em seres humanos, os níveis de 23 das 27 proteínas foram analisados em dez HCC de várias etiologias, por meio da técnica de PCR quantitativa. A redução na expressão da metionina adenosiltransferase e da glicina N-metiltransferase tinha sido demonstrada previamente no laboratório dos autores da invenção (Ávila MA, Berasain C, Torres L, Martín-Duce A, Corrales FJ, Yang H, Prieto J, Lu SC, Caballería J, Rodes J, Mato JM. Reduced ARNm Abundance of the Main Enzymes Involved in Methionine Metabolism in Human Liver Cirrhosis and Hepatocellular Carcinoma. J Hepatol 2000; 33: 907-914). As proteínas 1300018L09 e 2810435D12 Rik não foram incluídas neste estudo, uma vez que sua atribuição nos bancos de dados se dá devido à homologia da seqüência com outras proteínas e, portanto, sua função ainda deve ser demonstrada experimentalmente. A fim de verificar os oligonucleotídeos de primers projetados, 23 reações de RT-PCR foram executadas em uma mistura de linhagens de células de tumor humanas e verificou-se que a expressão de todas diminuiu com respeito aos fígados do controle. A quantidade de transcrito foi expressa como a diferença relativa com respeito ao gene do

controle de Histona H3F3A ($2^{\Delta Ct}$, onde ΔCt representa a diferença no número do ciclo entre o gene alvo e o gene do controle). O teste estatístico de Mann-Whitney U, com um valor de significância de $p<0,05$, foi aplicado em todas as análises conduzidas. As análises da expressão executadas por meio de RT-PCR mostraram que 13 das 23 proteínas exibiram alterações significativas com respeito ao grupo de controle. Estas proteínas eram: álcool desidrogenase, proteína antioxidante 2, regucalcina, proteína que transporta esterol 2, sorbitol desidrogenase, albumina, fosfoglucomutase, fenilalanina 4-hidroxilase, apolipoproteína A1, anidrase carbônica III, aldeído desidrogenase classe 2, ornitina aminotransferase e ornitina carbamoiltransferase. A fim de investigar se as alterações observadas eram exclusivas do HCC ou estavam presentes em um estágio de pré-tumor tal como a cirrose, os níveis de expressão das treze proteínas alteradas (proteínas que têm um padrão de expressão alterado) foram analisados por meio de RT-PCR nas amostras de pacientes cirróticos de etiologia alcoólica (n=5) e de etiologia viral (n=5) que não tinham desenvolvido um tumor. As análises de expressão refletiram que a expressão de sete das treze proteínas (álcool desidrogenase, proteína antioxidante 2, regucalcina, proteína que transporta esterol 2, sorbitol desidrogenase, albumina e fosfoglucomutase) foi alterada significativamente nos pacientes com cirrose com respeito ao grupo de controle. Essas alterações foram detectadas também em cinco amostras de tecido peritumoral de indivíduos que sofrem de cirrose viral e de HCC. Independentemente se ou o tecido analisado foi associado com um tumor ou não, nenhuma diferença significativa foi observada; portanto, foi decidido agrupar os pacientes com cirrose viral (n=10) em estudos subseqüentes. Subseqüentemente, a expressão das treze proteínas foi analisada em amostras de tecido peritumoral de

indivíduos com HCC e sem cirrose. Para esta finalidade, foram feitas medições, por meio de RT-PCR, dos níveis de expressão nas amostras de pacientes com hepatite (n=3) e nas amostras de pacientes que tinham desenvolvido HCC em um fígado saudável (n=7). O álcool desidrogenase era a única proteína em que diferenças de expressão significativas foram observadas com respeito ao grupo de controle (n=6).

Em suma, a análise proteômica do HCC em camundongos *MAT1A* -/- tornou possível identificar 27 proteínas alteradas (proteínas que têm um padrão de expressão alterado) em, pelo menos, 50% dos casos estudados. Dentre elas, treze foram detectadas em hepatocarcinomas humanos por meio de PCR quantitativa. Finalmente, a identificação de sete das treze alterações na cirrose peritumoral ou na cirrose não-associada com o HCC sugere a utilidade deste quadro de biomarcadores potenciais (Figura 7), não somente no diagnóstico, mas também na detecção precoce de estágios de pré-tumor.

DISCUSSÃO

A comparação de proteomas do fígado de camundongos do tipo selvagem e de nódulos de tumor de camundongos *MAT1A*-/- tornou possível identificar 151 proteínas diferenciais que fornecem uma impressão proteômica do HCC, ao ajustar uma base molecular para algumas das alterações que caracterizam a biologia do tumor. A variabilidade no grupo de proteínas diferenciais identificadas é uma reflexão da heterogeneidade proteômica dos nódulos de tumor. Além disso, foi observado que 61,3% das alterações pertencem às proteínas cujos níveis são reduzidos no tumor, provavelmente em conseqüência da desdiferenciação progressiva dos hepatócitos durante o processo de transformação. A análise funcional das alterações observadas indica que, nos hepatócitos transformados, há uma diminuição na atividade metabólica, bem como um aumento nas proteínas associadas com a resposta ao estresse, que poderia

ser considerada como sendo uma adaptação à pressão imposta pela deficiência de AdoMet. As proteínas diferenciais estão situadas preferencialmente na mitocôndria, no citoplasma, no retículo endoplasmático e no citoesqueleto. Apesar do baixo nível de coincidência observado quando da comparação das proteínas ou dos genes diferenciais, a deficiência metabólica e respiratória, bem como a resposta ao estresse, constitui um perfil funcional do HCC comum a diferentes estudos que utilizam uma abordagem genômica ou proteômica (Xu XR, Huang J, Xu ZG, Qian BZ et al. Insight into Hepatocellular Carcinogenesis at Transcriptome Level by Comparing Gene Expression Profiles of Hepatocellular Carcinoma with Those of Corresponding Noncancerous Liver. Proc Natl Acad Sci EUA 2001; 98: 15089-94; Cynthia RM Yliang, Chon Kar Leow et al. Proteome Analysis of Human Hepatocellular Carcinoma Tissues by Two-Dimensional Difference Gel Electrophoresis and Mass Spectrometry. Proteomics 2005; 5: 2258-2271) e, portanto, pode-se excluir que são produzidos especificamente no modelo experimental utilizado. Ainda deve ser resolvido se essas mudanças representam simplesmente a alteração funcional do fígado uma vez que a lesão é estabelecida ou se participam realmente da patogênese do HCC humano. No entanto, as alterações do metabolismo do fígado e a diminuição na atividade mitocondrial, que foi proposta como um dos fatores envolvidos na patogênese de diversos tipos de câncer, são produzidas no fígado do camundongo *MAT1A*-/- desde seu nascimento, bem antes que qualquer manifestação da doença seja detectada no nível histológico, o que sugere sua participação no desenvolvimento do HCC.

Das 151 proteínas alteradas (proteínas que têm um padrão de expressão alterado) no fígado do camundongo *MAT1A*-/-, 27 foram detectadas como diferenças em, pelo menos, 50% dos tumores analisados e, por esta razão, foram consideradas

como sendo marcadores do HCC potenciais. Vale a pena reforçar que este grupo de alterações selecionadas por sua incidência elevada reproduz o fenótipo funcional previamente descrito dos tumores: as enzimas metabólicas cuja alteração representa um metabolismo deficiente de carboidratos (fosfoglucomutase), de aminoácidos (arginase 1, ornitina carbamoiltransferase), metabolismo do grupo metila (metionina adenosiltransferase, adenosilomocisteinase, glicina N-metiltransferase), metabolismo e transporte de lipídeos (proteína que transporta esterol 2, apolipoproteínas A1 e E) e um aumento nas proteínas envolvidas na resposta à desintoxicação e ao estresse (proteína de choque térmico 71-kDA, proteína dissulfeto isomerase, isoformas de glutationa transferases Mu1 e P2). Além disso, a proteína de ligação ao selênio foi relacionada à fibrose e ao envelhecimento, razão pela qual a sua redução poderia favorecer o desenvolvimento do tumor. A alteração da atividade da sorbitol desidrogenase (SDH) foi utilizada como um parâmetro indicativo de danos ao fígado. A redução da SDH nos nódulos de tumor do camundongo *MAT1A-/-* está correlacionada com a perda da capacidade de metabolização do sorbitol nas células transformadas. A regucalcina (também chamada de proteína de marcação de senescência) é uma proteína de ligação ao cálcio que desempenha um papel decisivo na manutenção da homeostase e da função celular no fígado. Finalmente, a glutamina sintetase e a ornitina aminotransferase são as enzimas envolvidas no metabolismo da glutamina e a superexpressão das mesmas, em parte através da passagem de Wnt/β-catenina, está associada com a carcinogênese hepática. Nos roedores, foi demonstrado que um fenótipo da glutamina sintetase positivo favorece o crescimento do tumor, embora essa alteração não esteja presente em todas as lesões. A redução nos níveis da glutamina sintetase nos tumores de camundongo *MAT1A-/-*

poderia ser um aspecto característico deste modelo experimental da deficiência de AdoMet no fígado. No entanto, os resultados obtidos pelos autores da invenção não permitem excluir as modificações pós-translacionais potenciais que podem fazer surgir uma nova espécie que não seja detectável sob as condições de análise utilizadas.

Há estudos, genômicos e proteômicos, em que o tecido peritumoral é utilizado como uma referência a fim de detectar mudanças na expressão associada com o HCC (Kim JW, Ye Q, Forgues M, Chen Y et al. Cancer-Associated Molecular Signature in the Tissue Samples of Patients with Cirrhosis. Hepatology 2004; 39: 518-27; Xu XR, Huang J, Xu ZG, Qian BZ et al. Insight into Hepatocellular Carcinogenesis at Transcriptome Level by Comparing Gene Expression Profiles of Hepatocellular Carcinoma with Those of Corresponding Noncancerous Liver. Proc Natl Acad Sci EUA 2001; 98: 15089-94; Lim SO, Park SJ, Kim W, Park SG, Kim HJ et al. Proteome Analysis of Hepatocellular Carcinoma. Biochem Biophys Res Commun 2002; 291: 1031-37; Kim J, Kim SH, Lee SU, Ha GH, Kang DG et al. Proteome Analysis of Human Liver Tumour Tissue by Two Dimensional Gel Electrophoresis and Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation Mass Spectrometry for Identification of Disease-Related Proteins. Electrophoresis 2002; 23: 4142-4156; Kim W, Lim SO, Ryu YH, Byeon JY et al. Comparison of Proteome between Hepatitis B Virus and Hepatitis C Virus Associated Hepatocellular Carcinoma. Clin Cancer Res 2003; 9: 5493-5500; Li C, Hong Y, Tan YX, Zhou H, Ai JH et al. Accurate Quality and Quantitative Proteomic Analysis of Clinical Hepatocellular Carcinoma Using Laser Capture Microdissection Coupled with Isotope-Coded Affinity Tag and Two Dimensional Liquid Chromatography Mass Spectrometry. Mol Cell Proteomics 2004; 3: 399-409; Li C, Tan YX, Zhou H, Ding SJ, Li SJ et al. Proteomic Analysis of Hepatitis B Virus-

Associated Hepatocellular Carcinoma: Identification of Potential Tumour Markers. Proteomics 2005; 5: 1125-1135). Essa estratégia não permitiria a detecção das alterações comuns à parte de não-tumor e de tumor, impedindo a identificação daquelas proteínas cuja expressão é alterada inicialmente na hepatite ou na cirrose, estágios antes do desenvolvimento do HCC.

O uso do camundongo *MAT1A-/-* como um sistema de seleção antes da análise de amostras humanas provou ser eficaz na identificação de marcadores do HCC. A complexidade proteômica é reduzida a 27 marcadores potenciais deduzidos das análises conduzidas com o camundongo *MAT1A-/-*, dos quais 13 foram validados no HCC humano por meio de estudos de PCR quantitativa. A redução na ornitina carbamoiltransferase, ornitina aminotransferase, aldeído desidrogenase classe 2 mitocondrial, anidrase carbônica III, apolipoproteína A1 e 4-hidroxilase fenilalanina foi observada somente nos tumores e, portanto, poderia ser considerada como sendo marcadores da transformação neoplástica. No entanto, as alterações no álcool desidrogenase, proteína antioxidante 2, regucalcina, proteína que transporta esterol 2, sorbitol desidrogenase, albumina e fosfoglucomutase, bem como na metionina adenosiltransferase e na glicina N-metiltransferase foram detectadas no fígado cirrótico, independentemente se o tecido analisado estava associado com um tumor ou não. A cirrose é considerada uma situação de alto risco para o desenvolvimento do HCC e, portanto, estas alterações, que permanecem no tumor, poderiam representar marcadores precoces que devem permitir a definição de um estágio pré-neoplástico. A análise desses marcadores em amostras de tecido saudável ou de tecido infectado pelo vírus da hepatite C ou pelo vírus da hepatite B dos fígados com HCC foi negativa, com a única exceção de álcool desidrogenase, que foi associada previamente com os

processos de lesão do fígado de etiologia muito diferente. Em suma, um repertório de marcadores do HCC potenciais é descrito, alguns precoces e outros específicos de tumor, que poderiam ser de grande utilidade na monitoração da população em risco e na detecção precoce desta doença.

REIVINDICAÇÕES

1. MÉTODO *in vitro* PARA DIAGNOSTICAR O CARCINOMA HEPATOCELULAR (HCC) EM UM INDIVÍDUO, OU PARA AVALIAR A PREDISPOSIÇÃO DE UM INDIVÍDUO AO DESENVOLVIMENTO DE HCC, OU PARA AVALIAR A PROGRESSÃO DA DITA DOENÇA EM UM INDIVÍDUO, OU PARA DETERMINAR O ESTÁGIO OU A GRAVIDADE DA DITA DOENÇA EM UM INDIVÍDUO, caracterizado pelo fato de compreender:

a) a quantificação do nível de expressão de um gene em uma amostra de tecido do fígado do dito indivíduo, em que o dito gene é selecionado entre o gene que codifica a desidrogenase de álcool (ADH) [gene *ADH*], o gene que codifica a proteína antioxidante 2 (AOP2) [gene *AOP2*], o gene que codifica a regucalcina (SMP30) [gene *SMP30*], o gene que codifica a proteína que contém esterol 2 (NSLT) [gene *NSLT*], o gene que codifica a desidrogenase de sorbitol (ASAO) [gene *ASAO*], o gene que codifica a albumina (SAP) [gene *SAP*], o gene que codifica a fosfoglucomutase (PGM) [gene *PGM*], o gene que codifica a fenilalanina 4-hidroxilase (P4H) [gene *P4H*], o gene que codifica a apolipoproteína A1 (APOA1) [gene *APOA1*], o gene que codifica a anidrase carbônica III (CAIII) [gene *CAIII*], o gene que codifica a desidrogenase de aldeído da classe 2 (AdDHm) [gene *30AdDHm*], o gene que codifica a aminotransferase de ornitina (OAT) [gene *OAT*], o gene que codifica a carbamoiltransferase de ornitina (OCT) [gene *OCT*],e as combinações destes; e

b) a comparação do dito nível àquele de uma amostra de controle;

em que uma redução no dito nível com respeito ao nível da expressão na amostra de controle é indicativa de HCC;

ou, alternativamente,

a) a quantificação do nível de uma proteína em uma amostra de tecido do fígado do dito indivíduo, em que a dita proteína é selecionada entre a desidrogenase de álcool (ADH),

a proteína antioxidante 2 (AOP2), a regucalcina (SMP30), a proteína que contém esterol 2 (NSLT), a desidrogenase de sorbitol (ASAO), a albumina (SAP), a fosfoglucomutase (PGM), a fenilalanina 4-hidroxilase (P4H), a apolipoproteína A1 (APOA1), a anidrase carbônica III (CAIII), a desidrogenase de aldeído da classe 2 (AdDHm), a aminotransferase de ornitina (OAT), a carbamoiltransferase de ornitina (OCT), e as combinações destes; e

b) a comparação do dito nível àquele de uma amostra de controle;

em que uma redução no dito nível com respeito ao nível na amostra de controle é indicativa de HCC.

2. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de compreender a quantificação do nível da expressão de todos os 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 ou 12 genes dos ditos genes *ADH*, *AOP2*, *SMP30*, *NSLT*, *ASAO*, *SAP*, *PGM*, *P4H*, *APOA1*, *CAIII*, *AdDHm*, *OAT* e *OCT*.

3. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de compreender a quantificação do nível da expressão dos 13 genes *ADH*, *AOP2*, *SMP30*, *NSLT*, *ASAO*, *SAP*, *PGM*, *P4H*, *APOA1*, *CAIII*, *AdDHm*, *OAT* e *OCT*.

4. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de compreender a quantificação do nível de todas as 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 ou 12 proteínas das ditas proteínas ADH, AOP2, SMP30, NSLT, ASAO, SAP, PGM, P4H, APOA1, CAIII, AdDHm, OAT e OCT.

5. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de compreender a quantificação do nível da expressão das 13 proteínas ADH, AOP2, SMP30, NSLT, ASAO, SAP, PGM, P4H, APOA1, CAIII, AdDHm, OAT e OCT.

6. MÉTODO *in vitro* PARA A IDENTIFICAÇÃO E A AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DE TRATAMENTOS DE HCC, caracterizado pelo fato de compreender a quantificação dos níveis das

proteínas ADH, AOP2, SMP30, NSLT, ASAO, SAP, PGM, P4H, APOA1, CAIII, AdDHm, OAT e/ou OCT, e/ou os níveis da expressão dos genes *ADH, AOP2, SMP30, NSLT, ASAO, SAP, PGM, P4H, APOA1, CAIII, AdDHm, OAT* e/ou *OCT* no mesmo indivíduo durante todas as fases ou os estágios diferentes da doença, ou durante os períodos de tratamento ou da ausência do mesmo, e a comparação dos mesmos aos valores de controle considerados como normais ou aos valores precedentes do mesmo indivíduo, em que, quando um agente terapêutico aumenta os níveis da expressão dos genes *ADH, AOP2, SMP30, NSLT, ASAO, SAP, PGM, P4H, APOA1, CAIII, AdDHm, OAT* e/ou *OCT*, ou os níveis das proteínas ADH, AOP2, SMP30, NSLT, ASAO, SAP, PGM, P4H, APOA1, CAIII, AdDHm, OAT e/ou OCT, e o dito agente se torna um candidato para o tratamento de HCC.

7. USO DE UMA SEQÜÊNCIA DE NUCLEOTÍDEO DE UM GENE, selecionado dos genes *ADH, AOP2, SMP30, NSLT, ASAO, SAP, PGM, P4H, APOA1, CAIII, AdDHm, OAT* e/ou *OCT*, ou de um par de oligonucleotídeos de primer, caracterizado pelo fato de servir para amplificar um fragmento específico de um dos ditos genes, ou de uma sonda para identificar um dos ditos genes, para o diagnóstico *in vitro* de HCC em um indivíduo, ou para avaliar a predisposição de um indivíduo ao desenvolvimento de HCC, ou para avaliar a progressão da dita doença em um indivíduo, ou para determinar o estágio ou a gravidade da dita doença em um indivíduo, ou para identificar e avaliar a eficácia de um tratamento de HCC.

8. USO DE UMA PROTEÍNA, selecionada entre ADH, AOP2, SMP30, NSLT, ASAO, SAP, PGM, P4H, APOA1, CAIII, AdDHm, OAT e/ou OCT, caracterizado pelo fato de servir para o diagnóstico *in vitro* de HCC em um indivíduo, ou para avaliar a predisposição de um indivíduo ao desenvolvimento de HCC, ou para avaliar a progressão da dita doença em um indivíduo, ou para determinar o estágio ou a gravidade da dita doença em um

indivíduo, ou para identificar e avaliar a eficácia de um tratamento de HCC.

9. USO DE UM ANTICORPO, com a capacidade de se ligar a uma proteína selecionada entre ADH, AOP2, SMP30, NSLT, ASAO, SAP, PGM, P4H, APOA1, CAIII, AdDHm, OAT e OCT, caracterizado pelo fato de servir para o diagnóstico *in vitro* de HCC em um indivíduo, ou avaliar a predisposição de um indivíduo ao desenvolvimento de HCC, ou para avaliar a progressão da dita doença em um indivíduo, ou para determinar o estágio ou a gravidade da dita doença em um indivíduo, ou para identificar e avaliar a eficácia de um tratamento de HCC.

10. USO DE UM GENE SELECIONADO ENTRE OS GENES *ADH*, *AOP2*, *SMP30*, *NSLT*, *ASAO*, *SAP*, *PGM*, *P4H*, *APOA1*, *CAIII*, *AdDHm*, *OAT*, *OCT* E AS COMBINAÇÕES DESTES, E/OU DE UMA PROTEÍNA SELECIONADA DAS PROTEÍNAS ADH, AOP2, SMP30, NSLT, ASAO, SAP, PGM, P4H, APOA1, CAIII, AdDHm, OAT, OCT E AS COMBINAÇÕES DESTAS, caracterizado pelo fato de servir para a seleção, a busca, a identificação, o desenvolvimento e a avaliação da eficácia dos compostos no tratamento de HCC.

11. MÉTODO PARA A SELEÇÃO, A BUSCA, A IDENTIFICAÇÃO, O DESENVOLVIMENTO E A AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DOS COMPOSTOS NO TRATAMENTO DE HCC, caracterizado pelo fato de compreender (i) a colocação de um sistema celular que expressa um nível reduzido de um gene em contato com um composto candidato, e (ii) a avaliação da expressão do dito gene, de maneira tal que, se a expressão do dito gene aumentar, o composto candidato é um composto potencialmente útil no tratamento de HCC, em que o dito gene é selecionado dos genes *ADH*, *AOP2*, *SMP30*, *NSLT*, *ASAO*, *SAP*, *PGM*, *P4H*, *APOA1*, *CAIII*, *AdDHm*, *OAT*, *OCT* e das combinações destes.

12. MÉTODO *in vitro* PARA IDENTIFICAR UM ESTÁGIO ANTERIOR AO DO DESENVOLVIMENTO DE CARCINOMA HEPATOCELULAR

(HCC) EM UM INDIVÍDUO, caracterizado pelo fato de compreender:

a) a quantificação do nível de expressão de um gene em uma amostra de tecido do fígado do dito indivíduo, em que o dito gene é selecionado entre os genes *ADH*, *AOP2*, *SMP30*, *NSLT*, *ASAO*, *SAP*, *PGM*, e as combinações destes; e

b) a comparação do dito nível àquele de uma amostra de controle;

em que uma redução no dito nível com respeito ao nível da expressão na amostra de controle é indicativa de um estágio anterior ao do desenvolvimento de HCC;

ou, alternativamente,

a) a quantificação do nível de uma proteína em uma amostra de tecido do fígado do dito indivíduo, em que a dita proteína é selecionada entre ADH, AOP2, SMP30, NSLT, ASAO, SAP, PGM, e as combinações destes; e

b) a comparação do dito nível àquele de uma amostra de controle;

em que uma redução no dito nível com respeito ao nível na amostra de controle é indicativa de um estágio anterior ao do desenvolvimento de HCC.

13. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 12, caracterizado pelo fato de compreender a quantificação do nível de todos os 1, 2, 3, 4, 5, 6 ou 7 genes dos ditos genes *ADH*, *AOP2*, *SMP30*, *NSLT*, *ASAO*, *SAP* e *PGM*.

14. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 12, caracterizado pelo fato de compreender a quantificação do nível dos sete genes *ADH*, *AOP2*, *SMP30*, *NSLT*, *ASAO*, *SAP* e *PGM*.

15. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 12, caracterizado pelo fato de compreender a quantificação do nível de todas as 1, 2, 3, 4, 5, 6 ou 7 proteínas das ditas proteínas ADH, AOP2, SMP30, NSLT, ASAO, SAP e PGM.

16. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 12,

caracterizado pelo fato de compreender a quantificação do nível de expressão das sete proteínas ADH, AOP2, SMP30, NSLT, ASAO, SAP e PGM.

17. USO DE UMA SEQÜÊNCIA DE NUCLEOTÍDEO DE UM GENE, selecionado entre os genes *ADH*, *AOP2*, *SMP30*, *NSLT*, *ASAO*, *SAP* e *PGM*, ou de um par de oligonucleotídeos de primer, caracterizado pelo fato de servir para amplificar um fragmento específico de um dos ditos genes, ou de uma sonda para identificar um dos ditos genes, para identificar um estágio anterior ao do desenvolvimento de HCC *in vitro*.

18. USO DE UMA PROTEÍNA, selecionada entre ADH, AOP2, SMP30, NSLT, ASAO, SAP e/ou PGM, caracterizado pelo fato de servir para identificar um estágio anterior ao do desenvolvimento de HCC *in vitro*.

19. USO DE UM ANTICORPO, com a capacidade de se ligar a uma proteína selecionada entre ADH, AOP2, SMP30, NSLT, ASAO, SAP e PGM, caracterizado pelo fato de servir para identificar um estágio anterior ao do desenvolvimento de HCC *in vitro*.

20. USO DE UM GENE SELECIONADO ENTRE OS GENES *ADH*, *AOP2*, *SMP30*, *NSLT*, *ASAO*, *SAP*, *PGM*, E AS COMBINAÇÕES DESTES, E/OU DE UMA PROTEÍNA SELECIONADA ENTRE AS PROTEÍNAS ADH, AOP2, SMP30, NSLT, ASAO, SAP, PGM, E AS COMBINAÇÕES DESTAS, caracterizado pelo fato de servir na seleção, na busca, na identificação, no desenvolvimento e na avaliação da eficácia dos compostos no tratamento de um estágio anterior ao do desenvolvimento de HCC.

21. MÉTODO PARA A SELEÇÃO, A BUSCA, A IDENTIFICAÇÃO, O DESENVOLVIMENTO E A AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DOS COMPOSTOS NO TRATAMENTO DE UM ESTÁGIO ANTERIOR AO DO DESENVOLVIMENTO DE HCC, caracterizado pelo fato de compreender (i) a colocação de um sistema celular que expressa um nível reduzido de um gene em contato com um

composto candidato, e (ii) a avaliação da expressão do dito gene, de maneira tal que, se a expressão do dito gene aumentar, o composto candidato é um composto potencialmente útil no tratamento de um estágio anterior ao do desenvolvimento de HCC, em que o dito gene é selecionado entre os genes *ADH*, *AOP2*, *SMP30*, *NSLT*, *ASAO* , *SAP*, *PGM*, e as combinações destes.

22. COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, caracterizada pelo fato de ser selecionada de uma composição farmacêutica que compreende uma quantidade terapeuticamente eficaz de um composto que intensifica a expressão dos genes *ADH*, *AOP2*, *SMP30*, *NSLT*, *ASAO*, *SAP*, *PGM*, *P4H*, *APOA1*, *CAIII*, *AdDHm*, *OAT* e/ou *OCT*, ou a atividade das proteínas ADH, AOP2, SMP30, NSLT, ASAO, SAP, PGM, P4H, APOA1, CAIII, AdDHm, OAT e/ou OCT, conjuntamente com um ou mais excipientes e/ou veículos farmaceuticamente aceitáveis, e uma composição farmacêutica que compreende uma quantidade terapeuticamente eficaz de um composto que intensifica a expressão dos genes *ADH*, *AOP2*, *SMP30*, *NSLT*, *ASAO*, *SAP* e/ou *PGM*, ou a atividade das proteínas ADH, AOP2, SMP30, NSLT, ASAO, SAP e/ou PGM, conjuntamente com um ou mais excipientes e/ou veículos farmaceuticamente aceitáveis.

23. USO DE UM COMPOSTO QUE INTENSIFICA A EXPRESSÃO DOS GENES *ADH*, *AOP2*, *SMP30*, *NSLT*, *ASAO*, *SAP*, *PGM*, *PGH*, *APOA1*, *CAIII*, *AdDHm*, *OAT* E/OU *OCT*, OU A ATIVIDADE DAS PROTEÍNAS ADH, AOP2, SMP30, NSLT, ASAO, SAP, PGM, P4H, APOA1, CAIII, AdDHm, OAT E/OU OCT, caracterizado pelo fato de servir na manufatura de uma composição farmacêutica para o tratamento de HCC.

24. USO DE UM COMPOSTO QUE INTENSIFICA A EXPRESSÃO DOS GENES *ADH*, *AOP2*, *SMP30*, *NSLT*, *ASAO*, *SAP* e/ou *PGM*, OU A ATIVIDADE DAS PROTEÍNAS ADH, AOP2, SMP30, NSLT, ASAO, SAP E/OU PGM, caracterizado pelo fato de servir na manufatura de uma composição farmacêutica para o tratamento de um estágio

anterior ao do desenvolvimento de HCC.

25. PAR DE OLIGONUCLEOTÍDEOS DE PRIMER PARA AMPLIFICAR ESPECIFICAMENTE UM FRAGMENTO DE mRNA OU DE cDNA DE UM GENE, caracterizado pelo fato de que o dito gene é selecionado entre os genes *ADH, AOP2, SMP30, NSLT, ASAO, SAP, PGM, P4H, APOA1, CAIII, AdDHm, OAT* e *OCT*.

26. SONDA, caracterizada pelo fato de servir para identificar um ou mais genes selecionados entre os genes *ADH, AOP2, SMP30, NSLT, ASAO, SAP, PGM, P4H, APOA1, CAIII, AdDHm, OAT* e *OCT*.

27. ANTICORPO, caracterizado pelo fato de ter a capacidade de se ligar a uma proteína selecionada entre ADH, AOP2, SMP30, NSLT, ASAO, SAP, PGM, P4H, APOA1, CAIII, AdDHm, OAT e OCT.

28. SUPORTE SÓLIDO, caracterizado pelo fato de ser selecionado entre (i) um suporte sólido que compreende uma ou mais sondas para identificar um ou mais genes selecionados entre os genes *ADH, AOP2, SMP30, NSLT, ASAO, SAP, PGM, P4H, APOA1, CAIII, AdDHm, OAT* e *OCT*, e (ii) um suporte sólido que compreende um ou mais anticorpos com a capacidade de se ligar a uma proteína selecionada entre ADH, AOP2, SMP30, NSLT, ASAO, SAP, PGM, P4H, APOA1, CAIII, AdDHm, OAT e OCT.

29. KIT, caracterizado pelo fato de compreender um reagente para a detecção dos níveis de expressão dos genes *ADH, AOP2, SMP30, NSLT, ASAO, SAP, PGM, P4H, APOA1, CAIII, AdDHm, OAT* e/ou *OCT*, ou das proteínas ADH, AOP2, SMP30, NSLT, ASAO, SAP, PGM, P4H, APOA1, CAIII, AdDHm, OAT e/ou OCT.

30. KIT, de acordo com a reivindicação 29, caracterizado pelo fato de compreender:

- um ou mais pares de oligonucleotídeos de primer para amplificar especificamente fragmentos de mRNAs, ou de seus cDNAS correspondentes, dos genes *ADH, AOP2, SMP30, NSLT, ASAO, SAP, PGM, P4H, APOA1, CAIII, AdDHm, OAT* e *OCT*; e/ou

- uma ou mais sondas para identificar um ou mais genes selecionados entre os genes *ADH, AOP2, SMP30, NSLT, ASAO, SAP, PGM, P4H, APOA1, CAIII, AdDHm, OAT* e *OCT*; e/ou

- um ou mais anticorpos com a capacidade de se ligar a uma proteína selecionada entre ADH, AOP2, SMP30, NSLT, ASAO, SAP, PGM, P4H, APOA1, CAIII, AdDHm, OAT e OCT, ou os seus fragmentos que contêm determinantes antigênicos.

31. KIT, de acordo com a reivindicação 29 ou 30, caracterizado pelo fato de compreender 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 ou 13 pares de oligonucleotídeos de primer, cada um deles específico para um dos ditos genes *ADH, AOP2, SMP30, NSLT, ASAO, SAP, PGM, P4H, APOA1, CAIII, AdDHm, OAT* ou *OCT*; ou 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 ou 13 sondas, cada uma delas específica para a identificação de um dos ditos genes *ADH, AOP2, SMP30, NSLT, ASAO, SAP, PGM, P4H, APOA1, CAIII, AdDHm, OAT* ou *OCT*; ou 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 ou 13 anticorpos, cada um deles com a capacidade de se ligar a uma das ditas proteínas ADH, AOP2, SMP30, NSLT, ASAO, SAP, PGM, P4H, APOA1, CAIII, AdDHm, OAT e OCT, ou aos seus fragmentos que contêm determinantes antigênicos.

32. KIT, de acordo com qualquer uma das reivindicações 29 a 31, caracterizado pelo fato de que as ditas sondas e os ditos anticorpos são fixados em um suporte sólido.

33. KIT, de acordo com qualquer uma das reivindicações 29 a 32, caracterizado pelo fato de servir para diagnosticar HCC *in vitro* em um indivíduo, ou para avaliar a predisposição de um indivíduo ao desenvolvimento de HCC, ou para avaliar a progressão da dita doença em um indivíduo, ou para determinar o estágio ou a gravidade da dita doença em um indivíduo, ou para identificar e avaliar a eficácia de um tratamento de HCC.

34. KIT para a execução do método *in vitro* para identificar um estágio anterior ao do desenvolvimento de HCC, caracterizado pelo fato de compreender um reagente para a detecção dos níveis de expressão dos genes *ADH, AOP2, SMP30, NSLT, ASAO, SAP* e/ou *PGM*, ou das proteínas ADH, AOP2, SMP30, NSLT, ASAO, SAP e/ou PGM.

35. KIT, de acordo com a reivindicação 34, caracterizado pelo fato de compreender:

- um ou mais pares de oligonucleotídeos de primer para amplificar especificamente fragmentos de mRNAs, ou de seu cDNAS correspondentes, dos genes *ADH, AOP2, SMP30, NSLT, ASAO, SAP* e *PGM*; e/ou

- uma ou mais sondas para identificar um ou mais genes selecionados entre os genes *ADH, AOP2, SMP30, NSLT, ASAO, SAP* e *PGM*; e/ou

- um ou mais anticorpos com a capacidade de se ligar a uma proteína selecionada entre ADH, AOP2, SMP30, NSLT, ASAO, SAP e PGM, ou aos seus fragmentos que contêm determinantes antigênicos.

36. KIT, de acordo com a reivindicação 34 ou 35, caracterizado pelo fato de compreender 1, 2, 3, 4, 5, 6 ou 7 pares de oligonucleotídeos de primer, cada um deles específico para um dos ditos genes *ADH, AOP2, SMP30, NSLT, ASAO, SAP* ou *PGM*; ou 1, 2, 3, 4, 5, 6 ou 7 sondas, cada uma delas específica para a identificação de um dos ditos genes *ADH, AOP2, SMP30, NSLT, ASAO, SAP* ou *PGM*; ou 1, 2, 3, 4, 5, 6 ou 7 anticorpos, cada um deles com a capacidade de se ligar a uma das ditas proteínas ADH, AOP2, SMP30, NSLT, ASAO, SAP ou PGM, ou aos fragmentos que contêm determinantes antigênicos.

37. KIT, de acordo com qualquer uma das reivindicações 34 a 36, caracterizado pelo fato de que as ditas sondas e os ditos anticorpos são fixados em um suporte sólido.

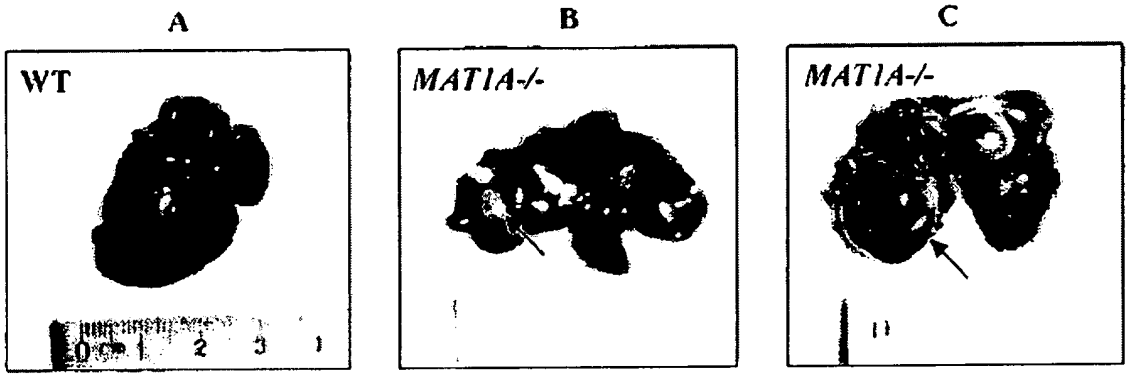
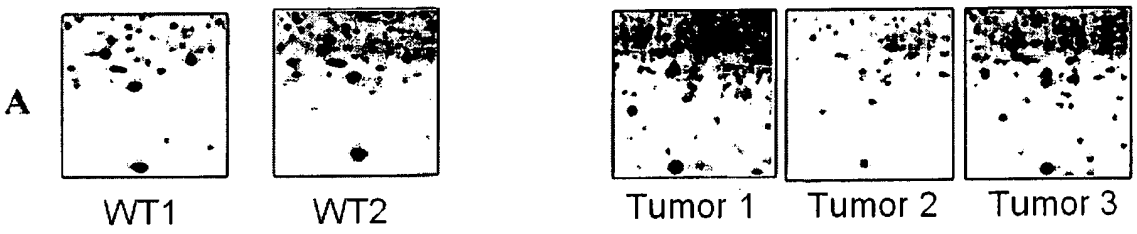

A
B
C
WT
MAT1A-/-
MAT1A-/-

FIG. 1


A
WT1
WT2
Tumor 1
Tumor 2
Tumor 3

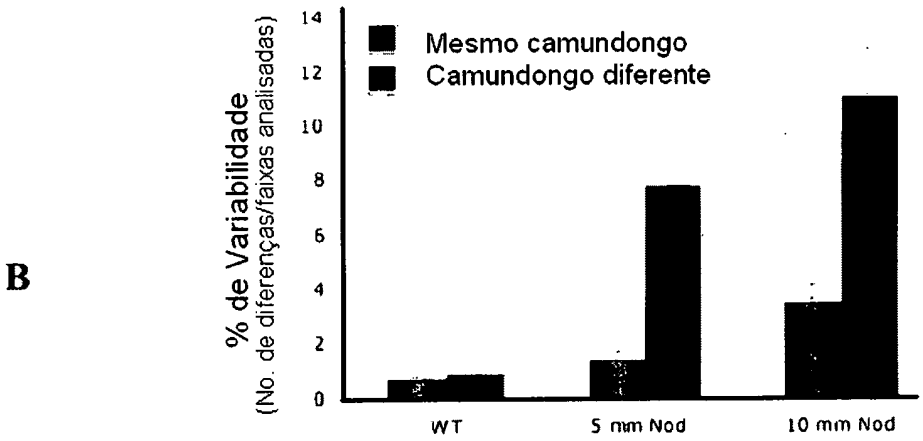

B
% de Variabilidade
(No. de diferenças/faixas analisadas)
Mesmo camundongo
Camundongo diferente
0
2
4
6
8
10
12
14
WT
5 mm Nod
10 mm Nod

FIG. 2

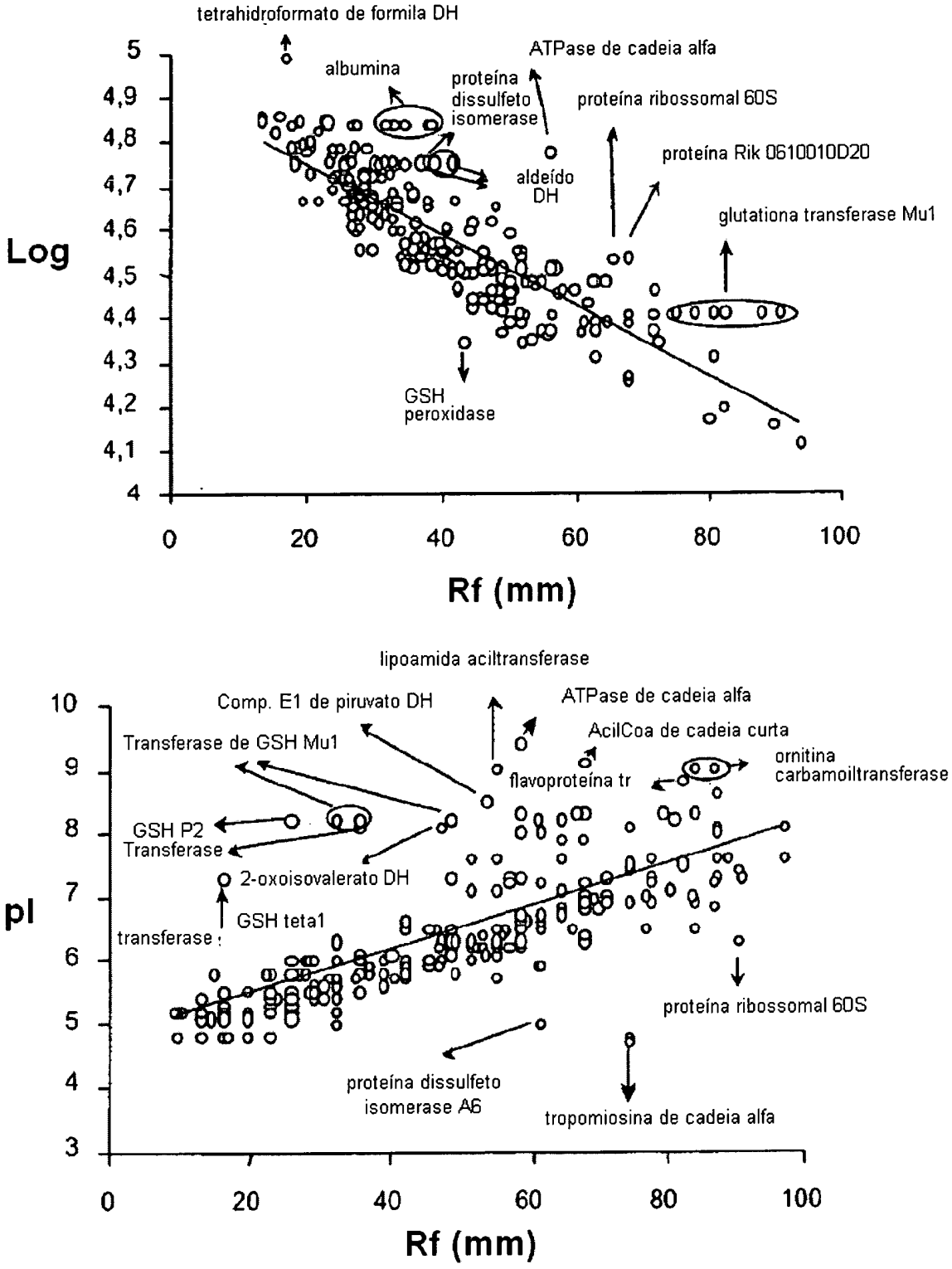

tetrahidroformato de formila DH
ATPase de cadeia alfa
albumina
proteína dissulfeto isomerase
proteína ribossomal 60S
proteína Rik 0610010D20
aldeído DH
glutationa transferase Mu1
GSH peroxidase
Log
5
4,9
4,8
4,7
4,6
4,5
4,4
4,3
4,2
4,1
4
0
20
40
60
80
100
Rf (mm)
lipoamida aciltransferase
Comp. E1 de piruvato DH
ATPase de cadeia alfa
AcilCoa de cadeia curta
Transferase de GSH Mu1
flavoproteína tr
ornitina carbamoiltransferase
GSH P2 Transferase
2-oxoisovalerato DH
GSH teta1 transferase
proteína ribossomal 60S
proteína dissulfeto isomerase A6
tropomiosina de cadeia alfa
pI
10
9
8
7
6
5
4
3
0
20
40
60
80
100
Rf (mm)

FIG. 3

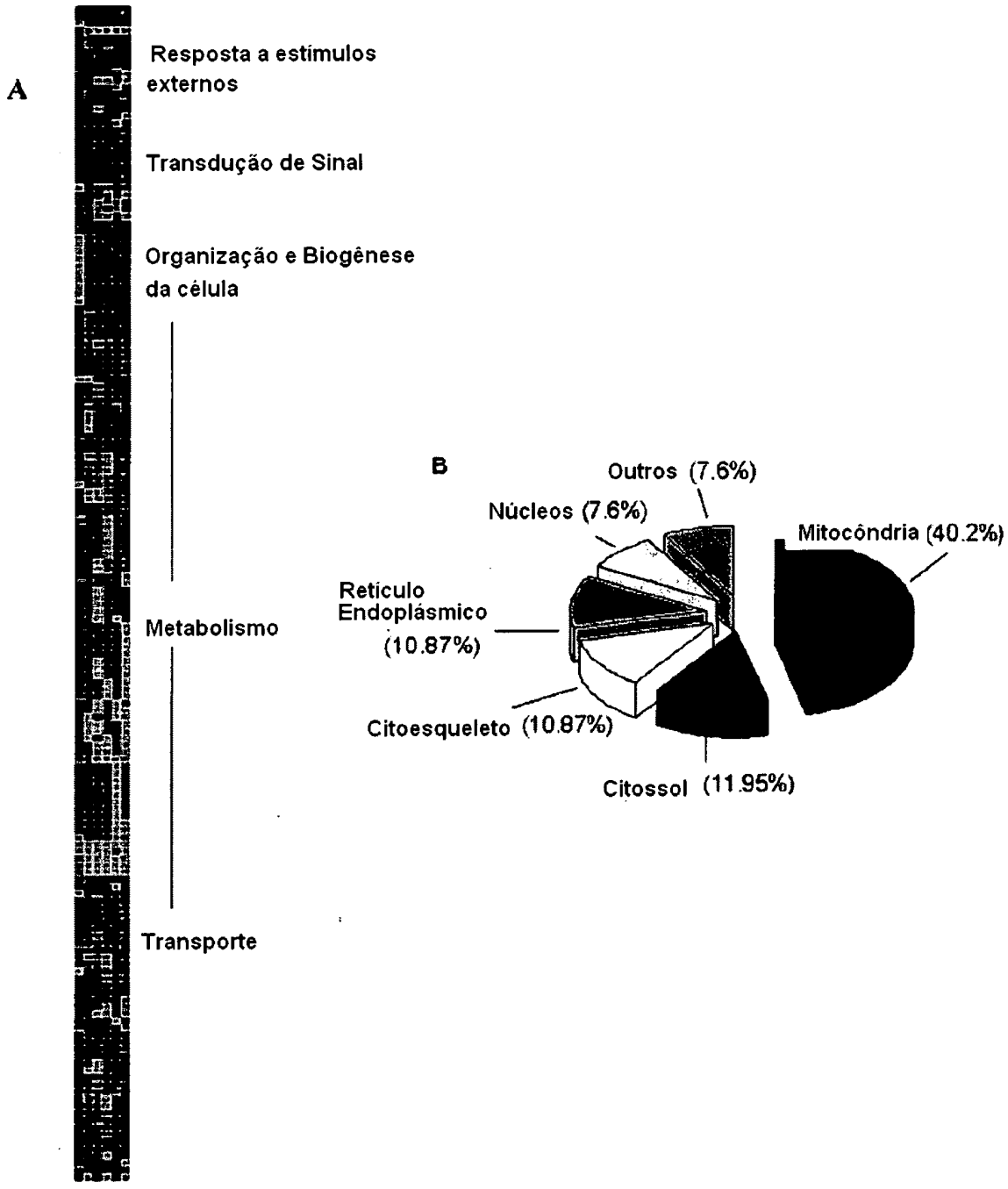

A
Resposta a estímulos externos
Transdução de Sinal
Organização e Biogênese da célula
Metabolismo
Transporte
B
Outros (7.6%)
Núcleos (7.6%)
Mitocôndria (40.2%)
Retículo Endoplásmico (10.87%)
Citoesqueleto (10.87%)
Citossol (11.95%)

FIG. 4

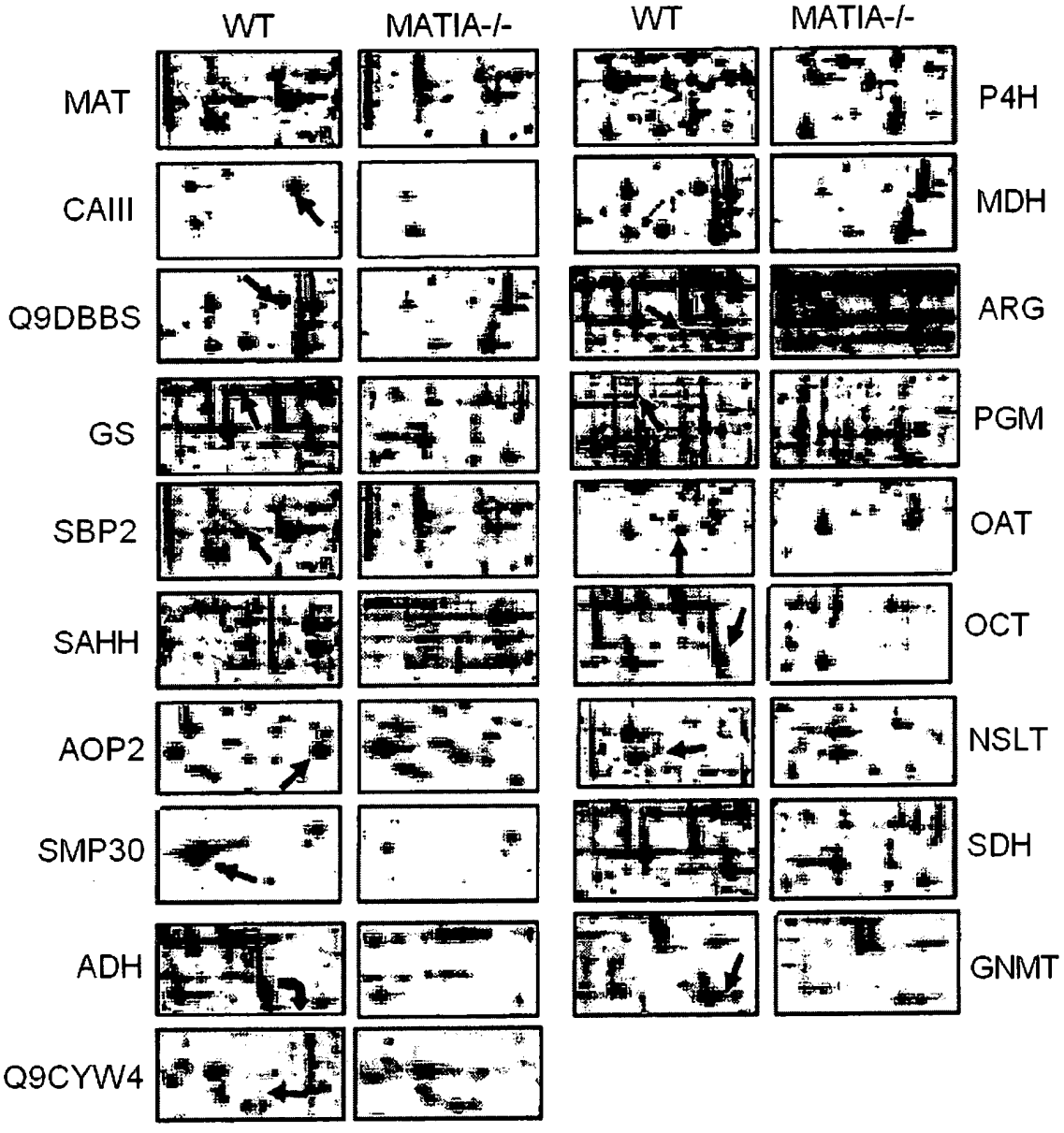

WT
MATIA-/-
WT
MATIA-/-
MAT
CAIII
Q9DBBS
GS
SBP2
SAHH
AOP2
SMP30
ADH
Q9CYW4
P4H
MDH
ARG
PGM
OAT
OCT
NSLT
SDH
GNMT

FIG. 5

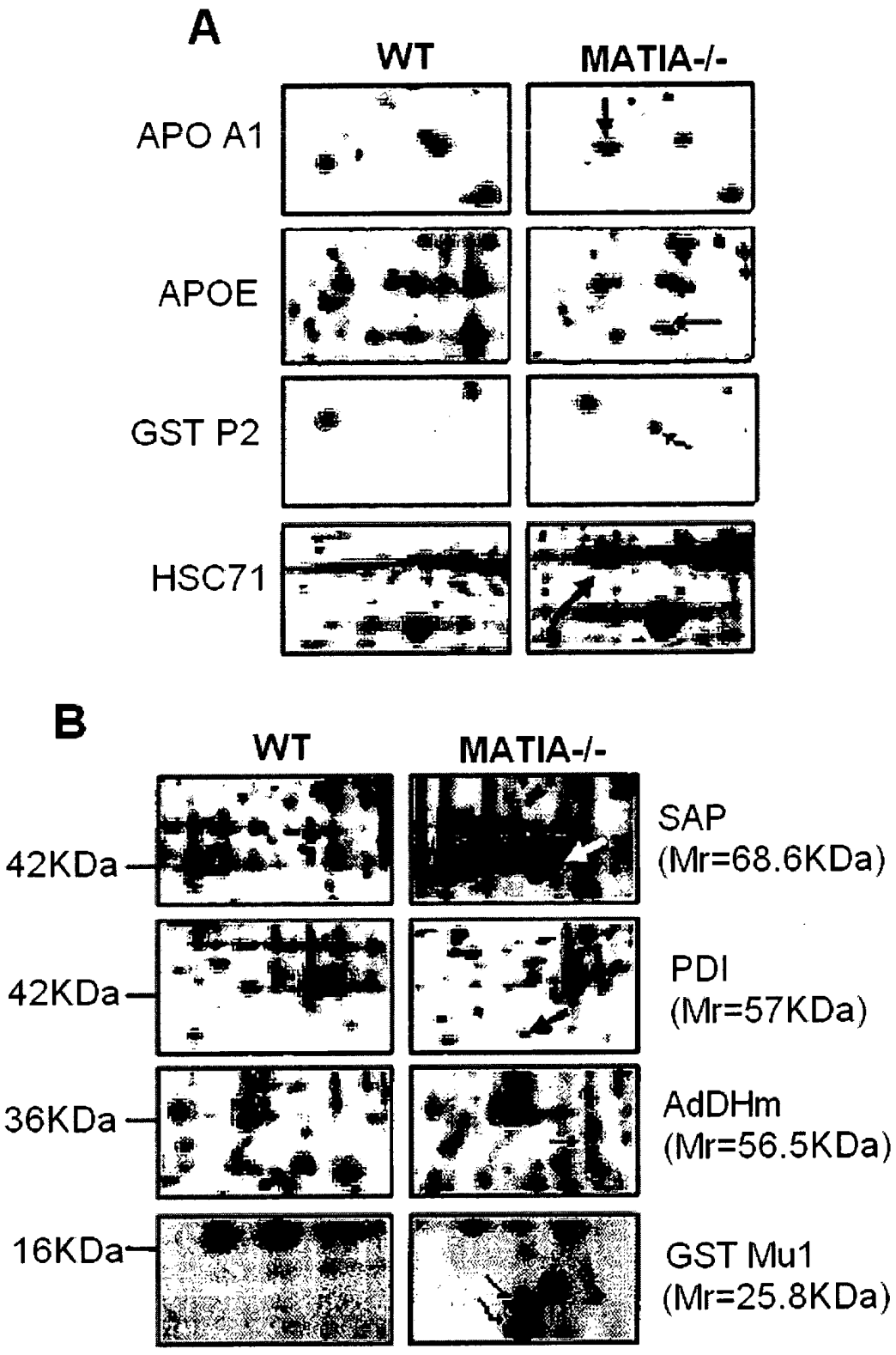

A
WT
MATIA-/-
APO A1
APOE
GST P2
HSC71
B
WT
MATIA-/-
42KDa
SAP
(Mr=68.6KDa)
42KDa
PDI
(Mr=57KDa)
36KDa
AdDHm
(Mr=56.5KDa)
16KDa
GST Mu1
(Mr=25.8KDa)

FIG. 6

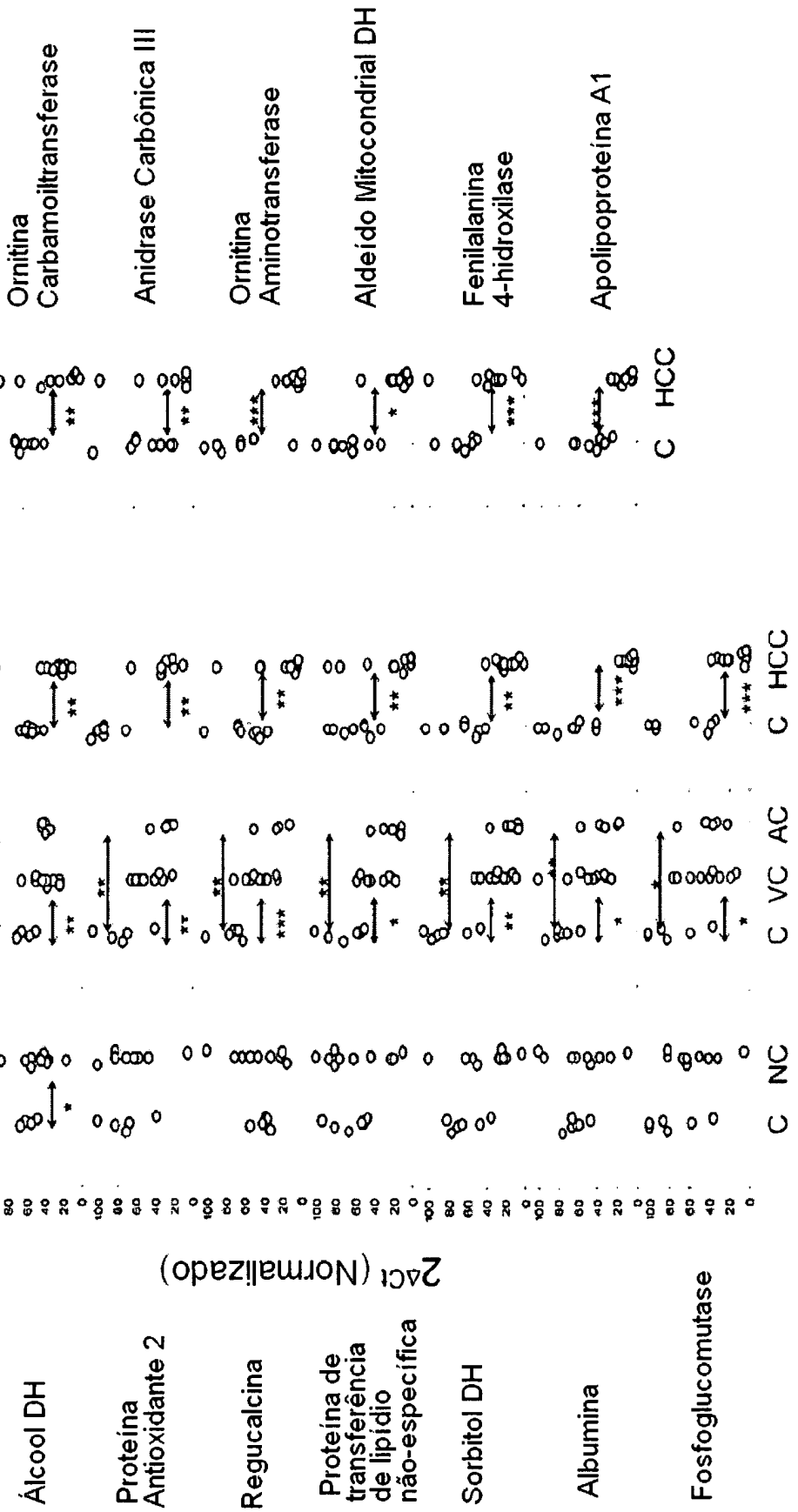

Não-Cirrose
Cirrose
HCC
Não-específica
Específica
Álcool DH
Proteína Antioxidante 2
Regucalcina
Proteína de transferência de lipídio não-específica
Sorbitol DH
Albumina
Fosfoglucomutase
Ornitina Carbamoiltransferase
Anidrase Carbônica III
Ornitina Aminotransferase
Aldeído Mitocondrial DH
Fenilalanina 4-hidroxilase
Apolipoproteína A1
2ΔCt (Normalizado)
C NC
C VC AC
C HCC
C HCC

FIG. 7

PI 0617560-0

RESUMO

MÉTODO *in vitro* PARA DIAGNOSTICAR O CARCINOMA HEPATOCELULAR (HCC) EM UM INDIVÍDUO, OU PARA AVALIAR A PREDISPOSIÇÃO DE UM INDIVÍDUO AO DESENVOLVIMENTO DE HCC, OU PARA AVALIAR A PROGRESSÃO DA DITA DOENÇA EM UM INDIVÍDUO, OU PARA DETERMINAR O ESTÁGIO OU A GRAVIDADE DA DITA DOENÇA EM UM INDIVÍDUO, MÉTODO *in vitro* PARA A IDENTIFICAÇÃO E A AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DE TRATAMENTOS DE HCC, USO DE UMA SEQÜÊNCIA DE NUCLEOTÍDEO DE UM GENE, USO DE UM GENE SELECIONADO ENTRE OS GENES *ADH*, *AOP2*, *SMP30*, *NSLT*, *ASAO*, *SAP*, *PGM*, *P4H*, *APOA1*, *CAIII*, *AdDHm*, *OAT*, *OCT* E AS COMBINAÇÕES DESTES, E/OU DE UMA PROTEÍNA SELECIONADA DAS PROTEÍNAS ADH, AOP2, SMP30, NSLT, ASAO, SAP, PGM, P4H, APOA1, CAIII, AdDHm, OAT, OCT E AS COMBINAÇÕES DESTAS, MÉTODO PARA A SELEÇÃO, A BUSCA, A IDENTIFICAÇÃO, O DESENVOLVIMENTO E A AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DOS COMPOSTOS NO TRATAMENTO DE HCC, MÉTODO *in vitro* PARA IDENTIFICAR UM ESTÁGIO ANTERIOR AO DO DESENVOLVIMENTO DE CARCINOMA HEPATOCELULAR (HCC) EM UM INDIVÍDUO, USO DE UM GENE SELECIONADO ENTRE OS GENES *ADH*, *AOP2*, *SMP30*, *NSLT*, *ASAO*, *SAP*, *PGM*, E AS COMBINAÇÕES DESTES, E/OU DE UMA PROTEÍNA SELECIONADA ENTRE AS PROTEÍNAS ADH, AOP2, SMP30, NSLT, ASAO, SAP, PGM, E AS COMBINAÇÕES DESTAS, MÉTODO PARA A SELEÇÃO, A BUSCA, A IDENTIFICAÇÃO, O DESENVOLVIMENTO E A AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DOS COMPOSTOS NO TRATAMENTO DE UM ESTÁGIO ANTERIOR AO DO DESENVOLVIMENTO DE HCC, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, USO DE UM COMPOSTO QUE INTENSIFICA A EXPRESSÃO DOS GENES *ADH*, *AOP2*, *SMP30*, *NSLT*, *ASAO*, *SAP*, *PGM*, *P4H*, *APOA1*, *CAIII*, *AdDHm*, *OAT* E/OU *OCT*, OU A ATIVIDADE DAS PROTEÍNAS ADH, AOP2, SMP30, NSLT, ASAO, SAP, PGM, P4H, APOA1, CAIII, AdDHm, OAT E/OU OCT, USO DE UM COMPOSTO QUE INTENSIFICA A EXPRESSÃO DOS GENES *ADH*, *AOP2*, *SMP30*, *NSLT*, *ASAO*, *SAP* e/ou *PGM*, OU A ATIVIDADE DAS PROTEÍNAS ADH, AOP2, SMP30, NSLT, ASAO, SAP E/OU PGM, PAR DE OLIGONUCLEOTÍDEOS DE PRIMER PARA AMPLIFICAR ESPECIFICAMENTE

PI0617560-0

UM FRAGMENTO DE mRNA OU DE cDNA DE UM GENE, SONDA, ANTICORPO, SUPORTE SÓLIDO E KIT

Por meio de uma abordagem proteômica, os marcadores do carcinoma hepatocelular (HCC) no fígado de um camundongo de knockout (*MAT1A*-/-) foram identificados para o gene *MAT1A* (deficiente na síntese de S-adenosilmetionina). Vinte e sete proteínas foram detectadas cuja expressão é alterada em pelo menos 50% dos tumores analisados. Dentre elas, treze proteínas foram validadas em biópsias de pacientes com HCC de etiologia diferente e sete delas foram validadas em biópsias de pacientes com cirrose hepática, um estágio antes do desenvolvimento do HCC, o que torna possível a diferenciação entre estágios prévios da doença e até mesmo entre etiologias diferentes (viral e alcoólica). O fato de ter um quadro de marcadores disponível pode contribuir para definir com maior precisão as alterações associadas com o desenvolvimento do HCC e, desse modo, facilitar o prognóstico e o diagnóstico dessa doença.