

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

---

**Graciele Domitila Tenani**

**Expressão Gênica e Haplótipos de Genes  
Envolvidos na Sinalização Celular e o Risco  
para Carcinoma Hepatocelular**

**São José do Rio Preto**

**2016**

**Graciele Domitila Tenani**

**Expressão Gênica e Haplótipos de Genes  
Envolvidos na Sinalização Celular e o Risco para  
Carcinoma Hepatocelular**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto para Obtenção do Título de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Eixo Temático: Medicina e Ciências Correlatas.

Orientadora: Profa. Dra. Dorotéia Rossi Silva Souza

São José do Rio Preto  
2016

Tenani, Graciele Domitila

Expressão Gênica e Haplótipos de Genes Envolvidos na Sinalização Celular  
e o Risco para Carcinoma Hepatocelular

São José do Rio Preto, 2016

146p.

Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto –  
FAMERP

Eixo Temático: Medicina e Ciências Correlatas

Orientadora: Profa. Dra. Dorotéia Rossi Silva Souza

1. Polimorfismos; 2. Fígado; 3. PTEN.

**Graciele Domitila Tenani**

**Expressão Gênica e Haplótipos de Genes  
Envolvidos na Sinalização Celular e o Risco para  
Carcinoma Hepatocelular**

**BANCA EXAMINADORA**

**DISSERTAÇÃO PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE**

**Presidente e Orientadora: Profa. Dra. Dorotéia Rossi Silva Souza**

**2º Examinador: Prof. Dr. William José Duca**

**3º Examinador: Profa. Dra. Ana Elizabete Silva**

**Suplentes: Profa. Dra. Heloísa Cristina Caldas**

**Profa. Dra. Joyce Aparecida Martins Lopes Ferraz**

**São José do Rio Preto, 14/03/2016.**



## SUMÁRIO

<b>DEDICATÓRIA .....</b>	<b>vi</b>
<b>AGRADECIMENTOS ESPECIAIS .....</b>	<b>viii</b>
<b>AGRADECIMENTOS .....</b>	<b>xiii</b>
<b>EPÍGRAFE .....</b>	<b>xv</b>
<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>xvii</b>
<b>LISTA DE QUADROS.....</b>	<b>xxi</b>
<b>LISTA DE TABELAS .....</b>	<b>xxiii</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....</b>	<b>xxvii</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>xxxii</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>xxxiv</b>
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>2</b>
<b>1.1 Aspectos Epidemiológicos e Clínicos do Carcinoma Hepatocelular .....</b>	<b>2</b>
<b>1.2 Vias de Sinalização e Carcinoma Hepatocelular .....</b>	<b>7</b>
<b>1.2.1 Fosfatidilinositol-4-5 bifosfato 3-quinase (subunidade catalítica alfa) - PIK3CA .....</b>	<b>8</b>
<b>1.2.2 Fosfatase e homólogo da tensina - PTEN .....</b>	<b>10</b>
<b>1.2.3 Fator de crescimento endotelial vascular A (VEGF-A) .....</b>	<b>12</b>
<b>1.3 OBJETIVOS .....</b>	<b>14</b>
<b>1.3.1 Objetivos Específicos.....</b>	<b>15</b>
<b>2. CASUÍSTICA E MÉTODOS .....</b>	<b>17</b>
<b>2.1 Casuística.....</b>	<b>17</b>
<b>2.2 Métodos .....</b>	<b>20</b>
<b>2.2.1 Extração de DNA .....</b>	<b>20</b>
<b>2.2.2 Análise genotípica .....</b>	<b>22</b>
<b>2.2.3 Extração de RNA .....</b>	<b>29</b>

2.2.4	Análise de expressão gênica e qPCR.....	30
2.2.5	Estadiamento e classificação do carcinoma hepatocelular e cirrose.....	31
2.2.6	Perfil clínico e hábitos de vida .....	32
2.2.7	Análise estatística.....	33
3.	RESULTADOS .....	35
3.1	Perfil da Casuística.....	35
3.2	Análise de Polimorfismos Genéticos .....	35
3.3	Relação entre Polimorfismos Genéticos, Hábitos de Vida e Comorbidades .....	43
3.4	Análise de Regressão Logística.....	50
3.5	Análise de Expressão Gênica .....	52
3.6	Expressão Gênica e Estadiamento de CHC e Cirrose.....	52
3.7	Correlação entre Idade, Marcadores de Função Hepática e Expressão Gênica .....	54
3.8	Haplótipos de <i>PTEN</i> e <i>VEGF-A</i> .....	55
4.	DISCUSSÃO .....	58
5.	CONCLUSÃO.....	67
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	69
	ANEXO I - Termo de Consentimento.....	80
	ANEXO II – Aprovação do Comitê de Ética .....	82
	APÊNDICE I – Artigo Publicado ( <i>Canadian Journal of Gastroenterology and Hepatology</i> ).....	85





## **DEDICATÓRIA**

### **Dedico este trabalho**

Aos meus pais, Antenor e Vilma, que com toda simplicidade, mas com muita sabedoria guiaram meus passos para chegar até aqui. Vocês são meu alicerce sem os quais eu não seria absolutamente nada. Ao meu noivo Marcelo, muito obrigada por todos os ensinamentos e pelo amor incondicional a mim devotado. Meu eterno amor e gratidão. Amo vocês!

---

***AGRADECIMENTOS ESPECIAIS***

## AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

A Deus, pelo dom da vida e por me oferecer tantas oportunidades e com elas obstáculos que foram matérias-primas de aprendizado. Por ter iluminado meus passos durante minha caminhada e por ter possibilitado encontrar pessoas maravilhosas com as quais aprendo dia-a-dia.

À Profa. Dra. Dorotéia Rossi Silva Souza, minha querida orientadora, por todo apoio e credibilidade. Agradeço por acreditar no meu trabalho e contribuir para meu desenvolvimento científico e pessoal, pela paciência, pelo respeito e carinho sempre presente. Minha sincera admiração e amor.

Ao meu amado noivo Marcelo:

*“Ainda que eu falasse*

*A língua dos homens*

*E falasse a língua dos anjos*

*Sem amor eu nada seria*

*É só amor! É só o amor!*

*Que conhece o que é verdade*

*O amor é bom, não quer o mal*

*Não sente inveja ou se envaidece*

*O amor é fogo que arde sem se ver*

*É ferida que dói e não se sente*

*É um contentamento descontente*

*É dor que desatina sem doer”*

*(Renato Russo).*

Meu companheiro e amigo fiel, obrigada pelo amor, dedicação, incentivo e orgulho ao meu trabalho. Por toda compreensão e por acreditar tanto em mim, me ensinando a ser melhor a cada dia. Amo você!

Aos queridos professores Dra. Rita Silva e Dr. Renato Silva, todo meu agradecimento e carinho. Sempre tão incentivadores e conselheiros. Obrigada por todos os ensinamentos e apoio na minha vida científica.

Às minhas amigas irmãs, Days, Maria Clara, Sabrina, Adriana e Ana Beatriz Felice que sempre me ajudaram em tudo. Agradeço por todo o companheirismo e amizade verdadeira, por me apoiarem nos momentos difíceis e por estarem presentes nos momentos de descontração. Quero vocês sempre em minha vida. Amo vocês!

À minha querida irmã de alma Tayanne, pela amizade, conselhos, carinho, brigas (sempre procurando me fazer enxergar o caminho certo), honestidade e exemplo de caráter. Agradeço a Deus por te reencontrar nessa vida. Amo você!

Aos alunos de iniciação científica Bruna e Victor Nowicki. Agradeço pela oportunidade de ensinar e aprender com vocês.

Aos meus queridos companheiros de trabalho e amigos Rafael, Maria Eduarda e Victor Nogueira, vocês são a melhor equipe do mundo. Obrigada pela parceria, competência, lealdade, amor, amizade e principalmente por me suportarem todos os dias, pois eu sei que essa tarefa não é fácil!

À querida equipe de trabalho do NPBIM: Angélica Lopes, Beatriz Brait, Denise Poltronieri, Elisa Takinaga, Fernanda Ferris, Isabela Facincani, Michele Gregório, Milton Pires, Sara Patrícia, Vitor e Simone Lima, vocês alegam meus dias. Muito obrigada pela parceria e amizade.

Aos meus familiares: minhas queridas tias e tios Neuza, Vânia, Cássia, Elizabete, Sandra, Dê, Aparecida, Sônia, Marco, José Valentim e José Roberto, que

mesmo sem entender meu trabalho, sempre rezaram pelo meu sucesso. A todos os meus primos e primas que sempre estiveram ao meu lado.

Ao Prof. Dr. Moacir Fernandes de Godoy, pela disposição em explicar os testes estatísticos e na análise dos meus dados. Obrigada por todos os ensinamentos, pela alegria e pela energia positiva que transmite sempre.

À Marcela por toda a confiança e ajuda, sem você eu jamais teria alcançado meus objetivos, muito obrigada por toda a amizade.

À Joyce por toda a ajuda com a estatística. Muito obrigada por me proporcionar novos aprendizados.

À Camila Oliveira por toda paciência e dedicação ao meu trabalho, por me fazer aprender com meus próprios erros.

À equipe LITEX, Camila Mazeti, Heloisa Caldas, Natalia Fiorilli, Greiciani Florim, Cinthia Dias e Carla Graça, por toda amizade e carinho que sempre recebi desde o início, vocês são muito importantes pra mim.

A todo o pessoal da UPGEM, sempre de portas abertas para nos socorrer.

A todos os pesquisadores e funcionários do bloco U6 da FAMERP, que sempre foram solícitos em questão de ajuda. Obrigada por tudo!

A todos os funcionários do Ambulatório de Gastroenterologia, INCA e 8º Andar por toda ajuda.

À minha afilhada Maria Clara por alegrar meus dias, mesmo nos momentos mais difíceis. Obrigada pelo amor incondicional.

Aos meus sogros Eliana e Carlos (*in memoriam*) e aos meus cunhados Máira e Gessé, pela paciência, tolerância, carinho e amor. Agradeço pelo lar acolhedor. Amo vocês.

Aos irmãos de luz, Santo Expedito, Nossa Senhora Aparecida e Santa Rita de Cássia, por nunca deixarem com que eu caísse ou perdesse a fé.

Ao Pitty, Lilica e Bobby, meus queridos amores de quatro patas, agradeço pelo amor incondicional, alegria e companhia durante os estudos.



## AGRADECIMENTOS

Aos pacientes, familiares e cuidadores que contribuíram para a realização deste trabalho. Obrigada por entenderem a importância deste estudo e colaborarem com a nossa pesquisa.

À Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto – FAMERP e Hospital de Base - HB e seus dirigentes, pela cooperação e apoio.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da FAMERP, pela oportunidade oferecida, atenção, eficiência e por todo o suporte necessário.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro na execução deste trabalho e bolsa de mestrado (Processo: 2013/21622-0).

À Fundação de Amparo à Pesquisa de Rio Preto (FAPERP) pelo apoio financeiro.

Agradeço a todas as pessoas que estiveram ao meu lado durante meu mestrado na FAMERP, àqueles que a mim dedicaram seu tempo, amizade e ajuda, pelos conselhos que me engrandeceram, pelo carinho e apoio que me ajudaram a crescer e a entender melhor o mundo da ciência. Muito Obrigada a todos que de alguma forma vivenciaram comigo minha vida acadêmica na FAMERP.





**EPIÍGRAFE**

*“A mente que se abre a uma nova ideia jamais voltará ao seu tamanho original.” (Albert Einstein)*

*“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes”.*

*(Marthin Luther King)*

---

***LISTA DE FIGURAS***

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Fotografia do fígado (peça anatômica), mostrando tecido cirrótico e carcinoma hepatocelular à esquerda (cedido pelo Serviço de Hepatologia do Hospital de Base da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto- FAMERP). 7
- Figura 2.** Esquema da Via de Sinalização PI3K (fosfatidilinositol-3-quinase) destacando o papel do proto-oncogene PIK3CA (fosfatidilinositol-4-5 bifosfato 3-quinase (subunidade catalítica alfa), que fosforilisa o PIP2 (fosfatidilinositol (4,5)- bifosfato) produzindo o segundo mensageiro PIP3 (fosfatidilinositol (3,4,5)- trifosfato), desencadeando uma cascata de sinalização que induz o crescimento, sobrevivência e proliferação celular. PTEN= fosfatase e homólogo da tensina; AKT= proteína quinase B; NFkB= fator nuclear kappa B; BAD= *BCL2 associated agonist of cell death*; mTOR= alvo da rapamicina em mamíferos; KRAS= *Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog*; BRAF= *B-Raf proto-oncogene (serine/threonine kinase)* ; MEK/MAPK= proteína quinase ativada por mitógeno. 10
- Figura 3.** Esquema da Via de Sinalização PI3K (fosfatidilinositol-3-quinases), destacando o supressor de tumor PTEN (fosfatase e homólogo da tensina), cujo papel é desfosforilar PIP3(fosfatidilinositol (3,4,5)- trifosfato) revertendo-o a PIP2 (fosfatidilinositol (4,5)- bifosfato); VEGF= fator de crescimento endotelial vascular; AKT= proteína quinase B. 12
- Figura 4.** Esquema da Via de Sinalização PI3K (fosfatidilinositol-3-quinases), destacando-se VEGF (fator de crescimento endotelial vascular), o qual se liga ao receptor de membrana desencadeando a cascata de sinalização responsável pela permeabilidade, sobrevivência, migração e proliferação celular; AKT= proteína quinase B; p38MAPK= p38 mapa quinase; 14

RAF= *proto-oncogene (serine/threonine kinase)*; MEK= proteína quinase ativada por mitógeno; ERK= quinase regulada por sinal extracelular.

- Figura 5.** Fluxograma ilustrando a distribuição dos grupos estudados, incluindo pacientes com CHC (GE= grupo de estudo), indivíduos sem a doença (GC= grupo controle), pacientes com CHC para expressão gênica (GEeg= grupo de estudo para expressão gênica); pacientes com cirrose sem CHC (GCi= grupo com cirrose para expressão gênica); pacientes sem CHC para expressão gênica (GCeg= grupo controle para expressão gênica) e as respectivas análises realizadas. N= número de indivíduos; DNA= Ácido desoxirribonucleico; RNA= ácido ribonucleico; *PTEN*= fosfatase e homólogo da tensina; *VEGF*= fator de crescimento endotelial vascular; *PIK3CA*= fosfatidilinositol-4-5 bifosfato 3-quinase (subunidade catalítica alfa). **19**
- Figura 6.** Padrão de bandas (perfil eletroforético) para o polimorfismo *PTEN*- rs10490920; pb= pares de bases (A). Fotografia de gel de agarose 3% submetido à eletroforese para análise dos genótipos de *PTEN*- rs10490920. Nota-se genótipo *T/T* na coluna 1, *T/C* nas colunas 2 e 4 e *C/C* na coluna 3. O padrão de bandas (Ladder 100pb – Fermentas) pode ser visto na coluna M (B). **24**
- Figura 7.** Padrão de bandas (perfil eletroforético) para o polimorfismo *PTEN*- rs532678; pb = pares de bases (A). Fotografia de gel de agarose 4% submetido à eletroforese para análise dos genótipos de *PTEN*- rs532678. Nota-se genótipo *T/C* nas colunas 1,3 e 5, *C/C* na coluna 2 e *T/T* na coluna 4. O padrão de bandas (Ladder 100pb – Fermentas) pode ser visto na coluna M (B). **25**

- Figura 8.** Padrão de bandas (perfil eletroforético) para o polimorfismo *PTEN*- rs701848; pb = pares de bases (A). Fotografia de gel de agarose 4% submetido à eletroforese para análise dos genótipos de *PTEN*- rs701848. Nota-se genótipo *T/C* nas colunas 1,3 e 5, *T/T* na coluna 2 e *C/C* na coluna 4. O padrão de bandas (Ladder 100pb – Fermentas) pode ser visto na coluna M (B). **26**
- Figura 9.** Padrão de bandas (perfil eletroforético) para o polimorfismo *VEGF-A*- rs3025039; pb = pares de bases (A). Fotografia de gel de agarose 2,5% submetido à eletroforese para análise dos genótipos de *VEGF*- rs3025039. Nota-se genótipo *C/C* nas colunas 1 e 3 e *C/T* na coluna 2. O padrão de bandas (Ladder 100pb – Fermentas) pode ser visto na coluna M (B). **27**
- Figura 10.** Padrão de bandas (perfil eletroforético) para o polimorfismo *VEGF-A*- rs1570360; pb = pares de bases (A). Fotografia de gel de agarose 4% submetido à eletroforese para análise dos genótipos de *VEGF*- rs1570360. Nota-se genótipo *A/A* na coluna 1, *G/G* nas colunas 2 e 3 e o genótipo *A/G* na coluna 4. O padrão de bandas (Ladder 100pb – Fermentas) pode ser visto na coluna M (B). **28**
- Figura 11.** Representação esquemática por “box-plot” da expressão de RNAm de *PTEN* e *PIK3CA*. **53**



**LISTA DE QUADROS**

- Quadro 1.** *Primers*, etapas de amplificação e eletroforese dos polimorfismos **23**  
*PTEN*- rs10490920/rs532678/rs701848 e *VEGF-A*- rs3025039/  
rs1570360.
- Quadro 2.** Classificação BCLC (Estadiamento da Clínica de Câncer Hepático **31**  
de Barcelona).
- Quadro 3.** Classificação de *Child-Turcotte-Pugh*. **32**





## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b>	Perfil demográfico, hábitos de vida e comorbidades em pacientes com carcinoma hepatocelular (GE) e indivíduos controle (GC).	<b>37</b>
<b>Tabela 2.</b>	Heterozigose observada (Ho) e esperada (He) para os SNPs dos genes <i>PTEN</i> e <i>VEGF-A</i> , com correspondente valor de P para o teste de equilíbrio de Hardy Weinberg (EHW), em pacientes com carcinoma hepatocelular (CHC) e indivíduos sem a doença (controle).	<b>38</b>
<b>Tabela 3.</b>	Distribuição das frequências alélicas e genóticas para o polimorfismo <i>PTEN</i> - rs10490920 em pacientes com carcinoma hepatocelular (GE) e indivíduos sem a doença (GC).	<b>40</b>
<b>Tabela 4.</b>	Distribuição das frequências alélicas e genóticas para o polimorfismo <i>PTEN</i> - rs532678 em pacientes com carcinoma hepatocelular (GE) e indivíduos sem a doença (GC).	<b>41</b>
<b>Tabela 5.</b>	Distribuição das frequências alélicas e genóticas para o polimorfismo <i>PTEN</i> - rs701848 em pacientes com carcinoma hepatocelular (GE) e indivíduos sem a doença (GC).	<b>42</b>
<b>Tabela 6.</b>	Distribuição das frequências alélicas e genóticas para o polimorfismo <i>VEGF-A</i> - rs3025039 em pacientes com carcinoma hepatocelular (GE) e indivíduos sem a doença (GC).	<b>43</b>
<b>Tabela 7.</b>	Distribuição das frequências alélicas e genóticas para o polimorfismo <i>VEGF-A</i> - rs1570360 em pacientes com carcinoma hepatocelular (GE) e indivíduos sem a doença (GC).	<b>44</b>
<b>Tabela 8.</b>	Frequência do hábito tabagista distribuída de acordo com os genótipos de <i>PTEN</i> (rs10490920, rs532678, rs701848) e <i>VEGF-A</i> (rs3025039 e rs1570360) em pacientes com carcinoma hepatocelular (GE) e indivíduos controles (GC).	<b>46</b>

<b>Tabela 9.</b>	Frequência do hábito etilista, distribuída de acordo com os genótipos de <i>PTEN</i> (rs10490920, rs532678, rs701848) e <i>VEGF-A</i> (rs3025039 e rs1570360), em pacientes com carcinoma hepatocelular (GE) e indivíduos controles (GC).	<b>47</b>
<b>Tabela 10.</b>	Frequência de diabetes mellitus (DM) distribuída de acordo com os genótipos de <i>PTEN</i> (rs10490920, rs532678, rs701848) e <i>VEGF-A</i> (rs3025039 e rs1570360) em pacientes com carcinoma hepatocelular (GE) e indivíduos controles (GC).	<b>49</b>
<b>Tabela 11.</b>	Frequência de hipertensão arterial sistêmica (HAS) distribuída de acordo com os genótipos de <i>PTEN</i> (rs10490920, rs532678, rs701848) e <i>VEGF-A</i> (rs3025039 e rs1570360) em pacientes com carcinoma hepatocelular (GE) e indivíduos controles (GC).	<b>50</b>
<b>Tabela 12.</b>	Análise de regressão logística de fosfatase e homólogo da tensina ( <i>PTEN</i> ) e fator de crescimento endotelial vascular A ( <i>VEGF-A</i> ) no carcinoma hepatocelular em relação aos respectivos genótipos de risco.	<b>51</b>
<b>Tabela 13.</b>	Análise de regressão logística considerando fatores de risco para carcinoma hepatocelular.	<b>52</b>
<b>Tabela 14.</b>	Níveis de expressão gênica de fosfatase e homólogo da tensina ( <i>PTEN</i> ) e fosfatidilinositol-4-5 bifosfato 3-quinase ( <i>PIK3CA</i> ) em pacientes com carcinoma hepatocelular, classificados de acordo com critérios de <i>Barcelona Clinic Liver Cancer Group</i> .	<b>54</b>
<b>Tabela 15.</b>	Níveis de expressão gênica de fosfatase e homólogo da tensina ( <i>PTEN</i> ) e fosfatidilinositol-4-5 bifosfato 3-quinase ( <i>PIK3CA</i> ) em pacientes com cirrose, classificados de acordo com <i>Child-Turcotte-Pugh</i> .	<b>55</b>

- Tabela 16.** Correlação entre idade, marcadores de função hepática e expressão gênica de *PTEN* e *PIK3CA* em pacientes com carcinoma hepatocelular. **56**
- Tabela 17.** Análise de desequilíbrio de ligação para SNPs dos genes *PTEN* e *VEGF-A* em pacientes com carcinoma hepatocelular (CHC) e controles. **57**
- Tabela 18.** Análise de haplótipos do gene *PTEN* (fosfatase e homólogo da tensina) em pacientes com o carcinoma hepatocelular (CHC) e controles. **57**

---

***LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS***

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

<b>%</b>	Porcentagem
<b>/</b>	Por
<b>&lt;</b>	Menor
<b>&gt;</b>	Maior
<b>μL</b>	Microlitro
<b>AASLD</b>	Associação Americana para o Estudo de Doenças do Fígado
<b>ACTB</b>	Beta actina
<b>AFT</b>	Alfa-fetoproteína
<b>AKT/PKB</b>	Proteína quinase B
<b>ALT</b>	Alanina aminotransferase
<b>AST</b>	Aspartato aminotransferase
<b>B1</b>	Tipo de Aflatoxina
<b>BAD</b>	<i>BCL2 associated agonist of cell death</i>
<b>BCLC</b>	Clínica de Câncer Hepático de Barcelona
<b>BRAF</b>	<i>B-Raf proto-oncogene (serine/threonine kinase)</i>
<b>cDNA</b>	DNA complementar
<b>CHC</b>	Carcinoma hepatocelular
<b>CLIP</b>	Programa Italiano de Câncer Hepático
<b>cm</b>	Centímetro
<b>CUPI</b>	Escore de Tóquio e Índice Prognóstico Universidade Chinesa
<b>DEPC</b>	Água ultrapura
<b>DL</b>	Desequilíbrio de ligação
<b>DM</b>	Diabetes Mellitus
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>DNTPs</b>	Desoxirribonucléotídeos fosfalados (A, G, T e C)
<b>EDTA</b>	Ácido etilenodiamino tetra-acético
<b>ERK</b>	Quinase regulada por sinal extracelular
<b>FAMERP</b>	Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto
<b>g</b>	Gramas
<b>GAPDH</b>	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase

<b>GC</b>	Grupo Controle
<b>GCeg</b>	Grupo controle da expressão gênica
<b>GCieg</b>	Grupo com cirrose da expressão gênica
<b>GE</b>	Grupo de Estudo
<b>GEeg</b>	Grupo de estudo da expressão gênica
<b>GGT</b>	Gama glutamil transferase
<b>H0</b>	Heterozigose observada
<b>HAS</b>	Hipertensão arterial sistêmica
<b>HB/FAMERP</b>	Hospital de Base da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto
<b>He</b>	Heterozigose esperada
<b>HW</b>	Hardy Weinberg
<b>EHW</b>	Equilíbrio de Hardy Weinberg
<b>ICA</b>	Instituto do Câncer
<b>IL-1 beta</b>	Interleucina 1 beta
<b>IMC</b>	Índice de Massa Corporal
<b>JIS</b>	Estadiamento de Okuda, Integrado Japonês
<b>Kb</b>	Kilo Base
<b>KDa</b>	Kilo Dalton
<b>Kg/m<sup>2</sup></b>	Quilograma por metro quadrado
<b>KRAS</b>	<i>Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog</i>
<b>M</b>	Marcador <i>Ladder</i>
<b>MEK/MAPK</b>	Proteína quinase ativada por mitógeno
<b>Mg/mL</b>	Miligrama por mililitro
<b>MiliQ</b>	Água deionizada
<b>min</b>	Minutos
<b>mL</b>	Mililitro
<b>mmHg</b>	Mililitros de mercúreo
<b>Mmol/L</b>	Milimol por litro
<b>mTOR</b>	Alvo da rapamicina em mamíferos
<b>N</b>	Números de indivíduos
<b>NASH</b>	Esteato-hepatite não alcoólica
<b>NFKB</b>	Fator nuclear kappa B
<b>ng</b>	Nanograma

<b>°C</b>	Grau Celsius
<b>P1</b>	<i>Primer sense</i>
<b>P2</b>	<i>Primer antisense</i>
<b>p38MAPK</b>	p38 mapa quinase
<b>P53</b>	Gene Supressor de Tumor
<b>pb</b>	Pares de bases
<b>PCR</b>	<i>Polymerase chain reaction</i>
<b>PI3K</b>	Fosfatidilinositol-3-quinases
<b>PIK3CA</b>	Fosfatidilinositol-4-5 bifosfato 3-quinase (subunidade catalítica alfa)
<b>PIP2</b>	Fosfatidilinositol (4,5)- bifosfato
<b>PIP3</b>	Fosfatidilinositol (3,4,5)- trifosfato
<b>PTEN</b>	Fosfatase e homólogo da tensina
<b>qPCR</b>	<i>Quantitative Polymerase chain reaction</i>
<b>RAF</b>	<i>Proto-oncogene (serine/threonine kinase)</i>
<b>RM</b>	Ressonância Magnética
<b>RNA</b>	Ácido ribonucleico
<b>RNA<sub>m</sub></b>	Ácido ribonucléico mensageiro
<b>rpm</b>	Rotação por minuto
<b>s</b>	Segundos
<b>SNPs</b>	Polimorfismos de nucleotídeo único
<b>TA</b>	Temperatura ambiente
<b>TC</b>	Tomografia Computadorizada
<b>TNF-alfa</b>	Fator de necrose tumoral alfa
<b>U/<math>\mu</math>L</b>	Unidade por microlitro
<b>v</b>	Volts
<b>VEGF-A</b>	Fator de crescimento endotelial vascular A
<b>VEGFR</b>	Receptor de VEGF (Fator de crescimento endotelial vascular)
<b>VHB</b>	Vírus da Hepatite B
<b>VHC</b>	Vírus da Hepatite C
<b>X<sup>2</sup></b>	Teste Qui-quadrado





## RESUMO

**Introdução** - O carcinoma hepatocelular (CHC) destaca-se como o mais agressivo tumor maligno do fígado. A identificação de genes candidatos a biomarcadores pode contribuir para esclarecer a fisiopatologia do CHC e auxiliar no diagnóstico precoce da doença com novas intervenções terapêuticas. **Objetivos** - Avaliar a associação de variantes genéticas e expressão gênica envolvidas no processo de sinalização celular, apoptose e angiogênese com CHC, visando caracterizar subgrupos de risco e identificar marcadores biológicos para diagnóstico precoce, prognóstico e tratamento da doença.

**Casuística e Métodos** – Foram estudados 343 indivíduos, sendo 102 com CHC (GE= Grupo de estudo) e 215 controles (GC= Grupo controle) para a análise dos polimorfismos de *PTEN* (rs10490920, rs532678, rs701848) e *VEGF-A* (rs3025039 e rs1570360). Para a análise de expressão gênica de *PTEN* e *PIK3CA*, foram selecionados 24 pacientes com CHC (GEeg= Grupo de estudo da expressão gênica), 16 com cirrose (GCieg= Grupo cirrose da expressão gênica) e 10 controles submetidos a cirurgias bileo-digestivas (GCeg= Grupo controle da expressão gênica). Os polimorfismos dos referidos genes foram analisados por PCR/RFLP (*polymerase chain reaction/restriction fragments length polymorphism*), enquanto a expressão gênica (tecido hepático fresco) por qPCR (*quantitative/polymerase chain reaction*). Dados do perfil clínico, hábitos de vida e comorbidades foram obtidos em prontuário médico e questionário. Admitiu-se erro  $\alpha$  de 5%.

**Resultados** - O gênero masculino, idade avançada, tabagismo, etilismo e diabetes mellitus (DM) prevaleceram no grupo com CHC, comparado ao controle ( $P < 0,05$ ). Polimorfismos genéticos: *PTEN*- rs10490920- O genótipo T/T destacou-se em ambos os grupos, seguido de T/C, assim como o alelo T ( $P > 0,05$ ). *PTEN*- rs532678- O genótipo T/C foi o mais frequente em ambos os grupos, seguido de C/C, assim como o

alelo C predominou em GE comparado a GC ( $P>0,05$ ). *PTEN*- rs701848- O genótipo T/C destacou-se em GE compado a GC, seguido de T/T, assim como o alelo T ( $P>0,05$ ). *VEGF-A*- rs3025039- O genótipo C/C destacou-se em ambos os grupos ( $P>0,05$ ), o mesmo ocorreu para o alelo C ( $P=0,4226$ ). *VEGF-A*- rs1570360 – O genótipo G/G prevaleceu em ambos os grupos ( $P>0,05$ ), assim como o alelo G ( $P=0,6387$ ). Embora detectada semelhança entre os grupos para distribuição genotípica e alélica, alelos mutantes de *PTEN* e *VEGF-A* prevaleceram em pacientes com CHC e hábitos tabagista e etilista, comparado ao controle ( $P<0,05$ ). A análise de haplótipos de *PTEN* e *VEGF-A* mostrou semelhança entre os grupos ( $P>0,05$ ). Expressão gênica- Houve diminuição dos níveis de expressão de *PTEN* em pacientes com CHC (mediana= 0,908) comparado aos cirróticos (mediana= 5,93;  $P= 0,0347$ ). Níveis de expressão de *PIK3CA* (mediana- CHC=0,108; cirrose= 0,493) foram semelhantes entre os grupos ( $P>0,05$ ). **Conclusão** – Variantes genéticas de *PTEN* e *VEGF-A*, assim como seus haplótipos, não se associam ao CHC. Expressão gênica reduzida de *PTEN* no tecido tumoral hepático pode estar associado a CHC, enquanto *PIK3CA* não diferencia pacientes com CHC daqueles com cirrose. Destacam-se como fatores de risco independentes para CHC tabagismo, etilismo, sexo masculino, idade avançada e DM. Alelos mutantes de *PTEN* e *VEGF-A*, particularmente na presença de tabagismo e etilismo podem potencializar o risco para CHC.

**Palavras-Chave:** Polimorfismos; Fígado; *PTEN*; Fator A do Crescimento do Endotélio Vascular; Ciclo Celular.



## ABSTRACT

**Background** - Hepatocellular carcinoma (HCC) is highlighted as the most aggressive malignant liver tumor. The identification of candidate genes to become biomarkers may help to clarify the pathophysiology of HCC, as well as the diagnosis of the disease at early stage, leading to new therapeutic interventions. **Objectives** -To evaluate the association of genetic variants and the gene expression involved in the cell signaling process, apoptosis, and angiogenesis with HCC, to characterize risk subgroups and identify biological markers for early diagnosis, prognosis and treatment of the disease.

**Casuistics and Methods** – We studied 343 subjects, 102 with HCC (SG = study group) and 215 controls (CG = control group) for the analysis of *PTEN* polymorphisms (rs10490920, rs532678 and rs701848) and *VEGF-A* (rs3025039 and rs1570360). For gene expression analysis of *PTEN* and *PIK3CA*, 24 patients with HCC were selected (SGge = Study Group of gene expression), 16 with cirrhosis (CiGge = Cirrhosis Group of gene expression) and 10 controls who underwent bileo and digestive surgery (CGge = Group control of gene expression). The polymorphisms of related genes were analyzed by PCR/RFLP (polymerase chain reaction/restriction fragments length polymorphism), while the gene expression (fresh liver tissue) by qPCR (quantitative/polymerase chain reaction). Data from the clinical profile, lifestyle and comorbidities were obtained from medical records and questionnaire. Alpha error level was set at 5%.

**Results** - Male gender, advanced age, smoking, alcohol consumption and diabetes mellitus (DM) prevailed in the group with HCC compared to the control ( $P < 0.05$ ). Genetic polymorphisms: *PTEN*- rs10490920 - The T/T genotype was noted in both groups followed by T/C, and the T allele ( $P > 0.05$ ). *PTEN*- rs532678- The genotype

T/C was the most common in both groups, followed by C/C, and the C allele was predominant in GE compared to control group ( $P>0.05$ ). *PTEN*- rs701848- The genotype C/C was highlighted in SG compared to CG, followed by T/T, and the T allele ( $P>0.05$ ). *VEGF-A*- rs3025039- The C/C genotype is distinguished in both groups ( $P>0.05$ ), the same occurred for the C allele ( $P = 0.4226$ ). *VEGF-A*- rs1570360 – G/G genotype prevailed in both groups ( $P>0.05$ ), as well as the G allele ( $P=0.6387$ ). Although similarity between the groups for genotypic and allelic distribution was observed, mutant *PTEN* and *VEGF-A* alleles prevailed in patients with HCC and tobacco and alcohol consumption, compared to the control group ( $P <0.05$ ). *PTEN* and *VEGF* haplotype analysis was similar among the groups ( $P>0.05$ ). Gene expression - *PTEN* expression levels was decreased in patients with HCC (median= 0,908) compared to cirrhotic patients (median = 5.93,  $P=0.0347$ ). *PIK3CA* expression levels (median-HCC= 0,108; cirrhosis= 0,493) were similar between groups ( $P> 0.05$ ). **Conclusion** – *PTEN* and *VEGF-A* genetic variants, as well as their haplotypes were not associated to HCC. Reduced gene expression of *PTEN* in tumor tissue can be associated with HCC, while *PIK3CA* does not differentiate between patients with HCC from those with cirrhosis. It stands out as independent risk factors for HCC, smoking, alcohol consumption, male sex, advanced age and DM. *PTEN* and *VEGF-A* mutant alleles, particularly in the presence of smoking and alcohol consumption may enhance the risk for HCC.

**Keywords:** Polimorphisms; Liver; *PTEN*; Vascular Endothelial Factor A; Cell Cycle.



## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 Aspectos Epidemiológicos e Clínicos do Carcinoma Hepatocelular

Os tumores de fígado são classificados como primários ou secundários dependendo da origem no próprio órgão ou em outro atingindo, nesse caso, também o fígado<sup>1</sup>. Os tumores primários podem ser classificados segundo sua origem em: colangiocarcinoma (ductos biliares do fígado), angiossarcoma (vasos sanguíneos), hepatoblastomas (fígado em recém-nascidos e crianças nos primeiros anos de vida) e carcinoma hepatocelular (hepatócitos)<sup>1,2</sup>.

O carcinoma hepatocelular (CHC), representa o principal tumor maligno<sup>3</sup> e o mais agressivo, responsável por 90% dos casos<sup>4</sup>. É o quinto tipo de câncer mais frequente, com incidência elevada principalmente em países asiáticos, e a segunda principal causa de óbito por câncer. Em 2008, cerca de 749.000 novos casos da doença foram relatados em todo o mundo, com 695.000 mortes, aumentando para 782.000 em 2012<sup>5</sup>. Ressalta-se sua incidência no sexo masculino como quinto tipo mais comum de câncer, com 554 mil casos por ano, representando 7,5% de todos os tipos de câncer. Enquanto entre as mulheres ocupa o sétimo lugar, correspondendo a 228 mil casos por ano e 3,4% do total<sup>6</sup>. Nos Estados Unidos e Europa há predomínio entre sexta e sétima décadas de vida, enquanto nas áreas de grande incidência o tumor ocorre em pacientes mais jovens, entre a terceira e quinta décadas<sup>7,8</sup>.

No Brasil, são escassos os dados acerca da real incidência desse tumor. Em 1997, um estudo mostrou a hepatite por vírus B (VHB) como sendo a maior causa de doença hepática em pacientes com CHC<sup>9</sup>. Os Estados do Espírito Santo e Bahia<sup>10</sup> são apontados como as regiões de maior frequência. Por outro lado, o Estado de São Paulo é reconhecido pela maior taxa de incidência do país, correspondendo a 2,4 e 0,6 casos/100 mil, respectivamente, para homens e mulheres<sup>11</sup>.



A alta mortalidade associada ao CHC é atribuída principalmente à dificuldade de diagnóstico em estágio inicial<sup>12</sup>, sendo a maioria (até 75%) dos pacientes diagnosticados em estágio avançado, o que impede a ressecção cirúrgica<sup>13</sup>. O diagnóstico é obtido por técnicas de imagem, tais como tomografia computadorizada e ressonância magnética<sup>12</sup>. Nos casos em que os exames radiológicos e sinais clínicos se apresentam inconclusivos, a histologia (biópsia) permanece como padrão ouro<sup>14</sup>.

Entre as modalidades terapêuticas se destacam cirurgia para ressecção e transplante, além de ablação percutânea por radiofrequência ou alcoolização e quimioterapia, sistêmica ou regional<sup>15</sup>. A recidiva ou metástase é frequente em pacientes que realizaram a ressecção e a taxa de recorrência atinge 50% em dois anos<sup>16</sup>. Ainda, devido à detecção tardia e ao avanço das doenças subjacentes, esses tratamentos não estão disponíveis para a maioria dos pacientes<sup>17</sup>.

A avaliação do prognóstico é um passo importante na conduta dos pacientes com CHC. Vários sistemas de estadiamento são utilizados na classificação clínica dos pacientes. Destacam-se os sistemas *Barcelona Clinic Liver Cancer (BCLC)*, *Cancer of the Liver Italian (CLIP)*, Estadiamento de Okuda, *Japanese Industrial Standard (JIS)*, Escore de Tóquio e *Chinese University Prognostic Index (CUPI)*<sup>18</sup>. Nesse contexto, é evidente a necessidade de sistema de estratificação preciso para o prognóstico de CHC, em paralelo com o advento de opções de tratamento<sup>19</sup>.

A Associação Americana para o Estudo de Doenças do Fígado (AASLD) estabeleceu diretrizes para a vigilância de pacientes de alto risco, incluindo modalidades adequadas de triagem e da frequência com que tais métodos de rastreamento devem ser usados. Para nódulos menores que 1 cm, recomenda-se o emprego de ultra-som a cada 3-6 meses. Em contraste, para nódulos maiores que 1 cm, as diretrizes sugerem o uso da tomografia computadorizada (TC) ou ressonância magnética (RM)<sup>20</sup>.

No Brasil, em 1997, a maioria dos pacientes com CHC foi diagnosticada pelo exame histológico (91%). No entanto, em outro estudo mais recente, 63% dos pacientes com CHC foram diagnosticados com base em exames de imagens e apenas 15% submetidos à biópsia hepática para confirmar o diagnóstico<sup>21</sup>.

O CHC, ao contrário de alguns tipos de câncer, tem fatores de risco bem definidos. Geralmente, desenvolve-se a partir de hepatopatia crônica e sua incidência depende do tipo de doença hepática presente. Cerca de 90% dos casos de CHC progridem de quadro cirrótico<sup>22</sup>. A principal causa de cirrose hepática é a infecção pelos vírus da hepatite B (VHB) e C (VHC), que juntos respondem por três quartos de todos os casos de CHC no mundo<sup>23</sup>. Outros fatores de risco para o desenvolvimento desse tipo de tumor incluem hepatite autoimune, abuso de álcool<sup>24</sup>, exposição prolongada à aflatoxina B1<sup>25</sup>, tabaco<sup>26</sup>, hepatopatias hereditárias metabólicas como hemocromatose, diabetes mellitus, obesidade e esteato-hepatite não alcoólica (NASH)<sup>27-29</sup>.

A hepatite autoimune, cuja etiologia é desconhecida, consiste em inflamação do fígado na qual as células do sistema imune confundem as células hepáticas como nocivas e as atacam. O risco para CHC em pacientes com hepatite autoimune é considerado baixo comparado a outras doenças hepáticas crônicas<sup>30</sup>. A relação causal entre o consumo de álcool e o CHC foi confirmada por diversos estudos<sup>31,32</sup>. O consumo excessivo de álcool (>80 g/dia) durante mais de dez anos pode aumentar em até cinco vezes a chance de desenvolver CHC<sup>5</sup>. A aflatoxina é uma micotoxina produzida pela espécie do gênero *Aspergillus*. Existem quatro tipos principais de aflatoxinas: B1, B2, G1 e G2. A B1, produzida pelo *Aspergillus flavus*, é considerada com maior potencial carcinogênico. A produção dessa toxina é especialmente abundante em regiões tropicais, sendo o milho, arroz e amendoim os principais hospedeiros. Estudos

experimentais e epidemiológicos relacionam a exposição a aflatoxina a mutações no códon 246 do gene supressor de tumor *p53*<sup>33</sup>.

O tabaco, outro fator de risco importante para CHC, tem mais de 40 compostos ativos metabolizados pelo fígado, alguns com papel carcinogênico bem definido, tais como hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, nitrosaminas e aminas aromáticas. O tabagismo está associado com aumento dos níveis plasmáticos de citocinas inflamatórias, tais como Fator-alfa de Necrose Tumoral (TNF-alfa) e Interleucina 1 Beta (IL-1 beta), que podem contribuir para alterações inflamatórias do fígado, o que pode levar a CHC<sup>34</sup>.

O acúmulo de ferro ou hemocromatose é uma condição autossômica recessiva que é caracterizada pela deposição de ferro nos hepatócitos, devido a aumento da absorção intestinal. Entre os pacientes com hemocromatose, 6% dos homens e 1,5% das mulheres são suscetíveis a desenvolverem CHC<sup>35</sup>.

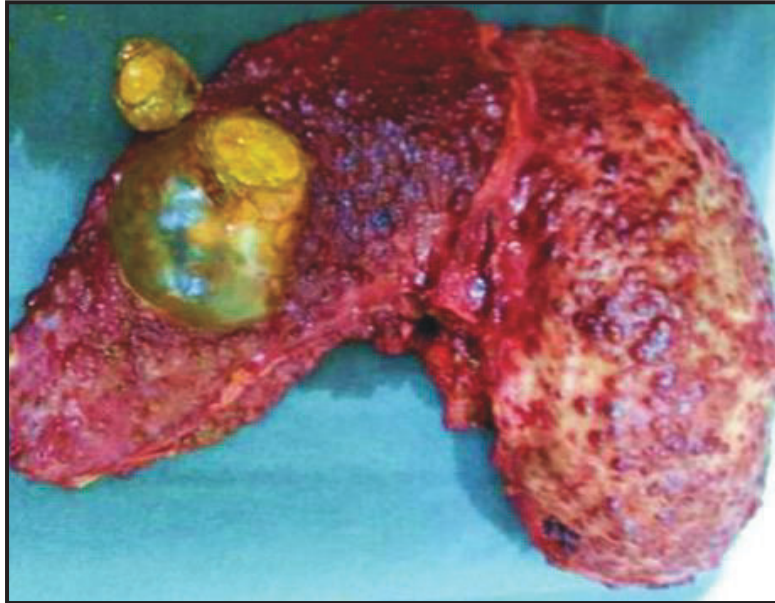
Destacam-se também fatores relacionados à síndrome metabólica como diabetes mellitus (DM) e aumento do índice de massa corporal (IMC). Embora ainda não elucidados os mecanismos relacionados com DM e CHC, resistência à insulina e hiperinsulinemia secundária são as hipóteses mais aceitas<sup>30</sup>. Adicionalmente, valores elevados de IMC (>30 kg/m<sup>2</sup>) associam-se a risco aumentado para CHC, principalmente em homens, cujas taxas são cinco vezes maiores do que naqueles com IMC normal<sup>36</sup>.

NASH é responsável por um processo de inflamação com danos nos hepatócitos, com ou sem fibrose. Uma vez estabelecidas essas alterações podem ocasionar a progressão para CHC<sup>37</sup>. Têm sido crescentes os relatos na literatura de pacientes diagnosticados com NASH que desenvolveram CHC sem passar pela cirrose<sup>38</sup>.

Em relação à hepatocarcinogênese, a cirrose destaca-se como fator de risco para a doença, resultando em proliferação celular e aumento da síntese de DNA nos

nódulos de regeneração. Esse processo pode ocasionar rearranjos aberrantes e alterações da função proteica reguladora<sup>39</sup>. As aflatoxinas, por outro lado, se ligam covalentemente ao DNA podendo causar mutações em proto-oncogenes ou genes supressores de tumor, particularmente no gene *p53*. Essas mutações ocorrem em células mitoticamente ativas, como no caso de fígado com infecção crônica por VHB e VHC ou cirrótico. A tumorigênese envolve também fatores adicionais de ordem genética, como a angiogênese necessária ao crescimento e metástases<sup>25</sup>.

O CHC pode ser classificado quanto à forma e tamanho ou padrão de crescimento, como massa unifocal grande; nódulos multifocais, amplamente distribuídos, de tamanhos variáveis; câncer difusamente infiltrante, às vezes comprometendo o fígado inteiro. Esses padrões podem ocasionar aumento do fígado, especialmente o maciço unifocal e o multinodular. Há grande tendência de disseminação local do tumor com invasão de vasos sanguíneos, particularmente da veia porta (32-70%). Além disso, pode invadir diretamente o diafragma e cólon, ocasionar ruptura e sangramento na cavidade peritoneal ou espalhar-se via corrente sanguínea, ocasionando metástases distantes, nos ossos, pulmão, cérebro e glândulas suprarrenais<sup>40</sup>. Na Figura 1, observa-se o fígado com tecido cirrótico e CHC.



**Figura 1.** Fotografia de fígado humano (peça anatômica), mostrando tecido cirrótico e carcinoma hepatocelular à esquerda (cedido pelo Serviço de Hepatologia do Hospital de Base da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto- FAMERP).

## 1.2 Vias de Sinalização e Carcinoma Hepatocelular

O acúmulo gradual de mutações em determinados genes e alterações cromossômicas estão envolvidos na carcinogênese humana<sup>41</sup>. Estudos em CHC mostraram também que a malignidade abrange um processo de múltiplas vias e acúmulo de eventos genéticos e epigenéticos, ocasionando ativação anormal ou inativação de diversas vias de sinalização celular, incluindo proliferação, sobrevivência, diferenciação celular e angiogênese<sup>42</sup>. A compreensão de marcadores moleculares mostra a complexidade da transdução de sinal em células de câncer de fígado. As fosfatidilinositol-3-quinases (PI3K) são fundamentais para crescimento, sobrevivência e morte celular. A ativação desta via de sinalização desempenha papel importante em vários tipos de câncer humanos, incluindo CHC<sup>43</sup>.

A identificação de alterações de novos genes candidatos a biomarcadores como, por exemplo, fosfatidilinositol-4-5 bifosfato 3-quinase (subunidade catalítica alfa) (*PIK3CA*), fosfatase e homólogo da tensina (*PTEN*) e fator de crescimento endotelial vascular A (*VEGF-A*) pode contribuir para esclarecer a fisiopatologia do CHC, auxiliar no diagnóstico precoce da doença e novas intervenções terapêuticas.

### **1.2.1 Fosfatidilinositol-4-5 bifosfato 3-quinase (subunidade catalítica alfa) - PIK3CA**

A premissa para o funcionamento celular é a correta transdução de sinais inter e intracelular. As células abrigam múltiplos sensores que traduzem informações a partir do ambiente extracelular em sinais moleculares, que são transmitidos através da célula em cascatas de sinalização e regulam a transcrição e programas de vias metabólicas. A arquitetura modular permite múltiplas entradas sensoriais que, integradas a uma resposta celular específica, tornam as células capazes de atender suas próprias necessidades. Alterações genômicas podem desregular essa sinalização resultando em síndromes e doenças graves, como o câncer<sup>44</sup>.

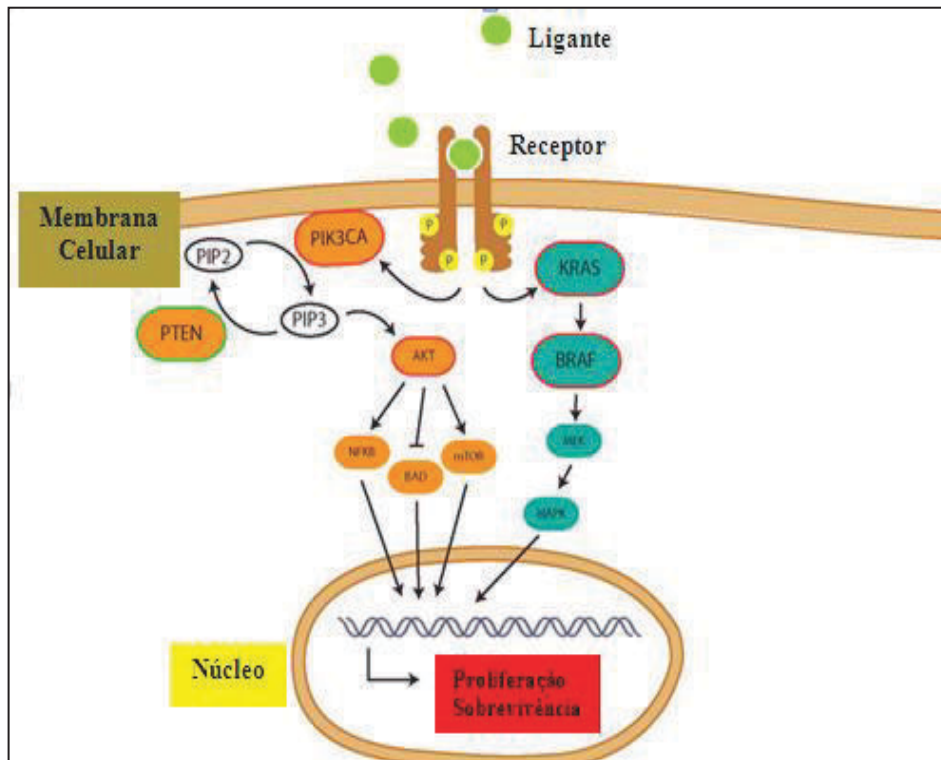
Uma das principais vias de sinalização intracelular que induz o crescimento celular envolve PI3K, um grupo de quinases lipídicas que atuam no crescimento, proliferação, motilidade e sobrevivência celular. Existem três classes de PI3K: I, II, e III. A Classe I são heterodímeros compostos por um catalisador e uma subunidade reguladora e são subdivididos em duas subclasses: IA e IB. A Classe II consiste em três membros, PI3KC2 $\alpha$ , PI3KC2 $\beta$ , e PI3KC2 $\gamma$ , enquanto a Classe III contem apenas um membro codificado pelo gene *vacuolar protein-sorting defective 34 (Vps34)*<sup>45</sup>.

A Classe I é formada por uma subunidade reguladora (p85) e uma catalítica (p110- $\alpha$ ), sendo esta última codificada pelo proto-oncogene *PIK3CA*. Este gene de 34

Kb está localizado no cromossomo 3q26.32 humano, é composto por 20 exons e codifica uma proteína de 124 kDa<sup>46</sup>. Inúmeras mutações, com frequência de 4 a 32%, foram identificadas em *PIK3CA*, em diversos tipos de câncer como de mama, colorretal, endometrial, cerebral, gástrico e de pulmão<sup>47</sup>.

As PI3Ks regulam várias atividades celulares pela produção de fosfatidilinositol (3,4,5)-trifosfato (PIP<sub>3</sub>). Nesse caso, ativam diretamente a proteína quinase B (PKB) (também conhecida como AKT) pela fosforilação do fosfatidilinositol (4,5)-bifosfato (PIP<sub>2</sub>) com produção de segundo mensageiro (PIP<sub>3</sub>), mantendo o sinal de sobrevivência celular<sup>48,49</sup>. Reconhecidamente, a ativação da via PI3K/AKT é fundamental para as funções celulares essenciais, como proliferação e diferenciação, que são a base biológica do câncer. Desse modo, sua ativação de forma descontrolada contribui para resistência às drogas em diferentes tipos de células cancerosas, como CHC<sup>50,51</sup>.

A ação da PI3K é revertida por *PTEN*, uma enzima que hidrolisa o fosfato na posição três do PIP<sub>3</sub>, regenerando PIP<sub>2</sub>. *PTEN* é um supressor de tumor, bem caracterizado, sugerindo que os genes que codificam para as PI3K podem ser oncogênes<sup>52</sup>. Assim, a sinalização através da PI3K, ao promover a sobrevivência celular, mostra que sua maior expressão esta fortemente associada com a formação de tumores hepáticos<sup>53</sup>. A Figura 2 apresenta o gene *PIK3CA* e seu papel na via de sinalização PI3K.



**Figura 2.** Esquema da via de sinalização PI3K (fosfatidilinositol-3-quinase) destacando o papel do proto-oncogene *PIK3CA* (fosfatidilinositol-4-5 bifosfato 3-quinase (subunidade catalítica alfa), que fosforila o PIP2 (fosfatidilinositol (4,5)- bifosfato) produzindo o segundo mensageiro PIP3 (fosfatidilinositol (3,4,5)- trifosfato), desencadeando uma cascata de sinalização que induz o crescimento, sobrevivência e proliferação celular. PTEN= fosfatase e homólogo da tensina; AKT= proteína quinase B; NFKB= fator nuclear kappa B; BAD= *BCL2 associated agonist of cell death*; mTOR= alvo da rapamicina em mamíferos; KRAS=*Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog*; BRAF=*B-Raf proto-oncogene (serine/threonine kinase)*; MEK/MAPK= proteína quinase ativada por mitógeno<sup>54</sup>.

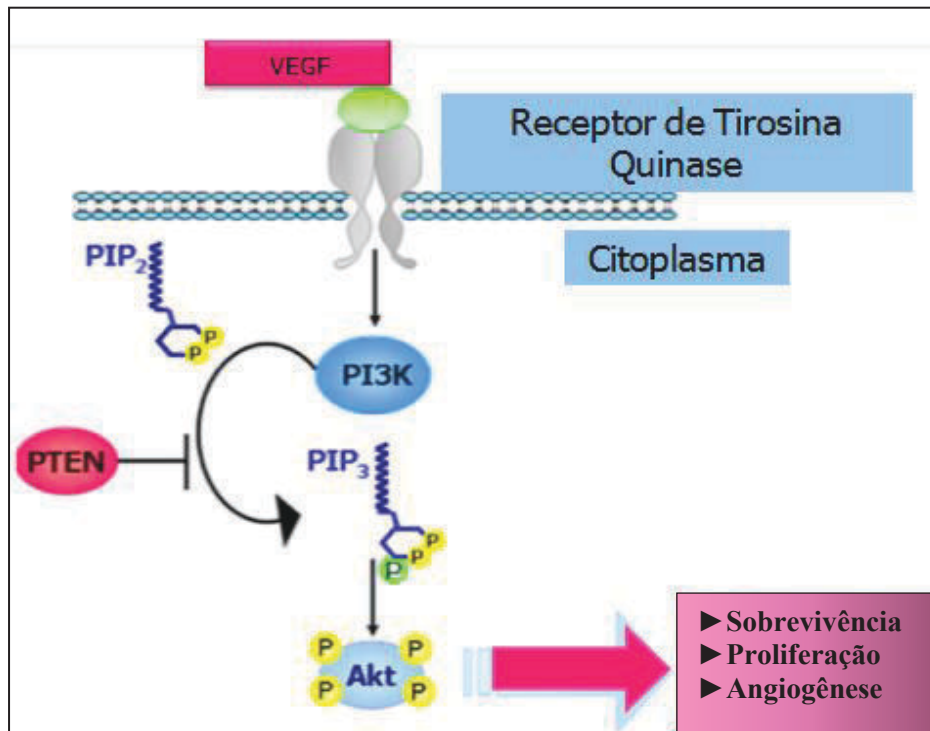
### 1.2.2 Fosfatase e homólogo da tensina - PTEN

O estudo do gene *PTEN* iniciou-se em 1997, por dois grupos que buscavam uma forma independente para supressores de tumor no cromossomo 10 humano. Desde a sua identificação mais de 7.800 publicações têm descrito diferentes aspectos da função supressora de tumor de *PTEN* e sua relação com o câncer e outras doenças<sup>55</sup>.



*PTEN*, localizado no cromossomo 10q23.31 humano, apresenta 105 Kb e nove exons. Codifica uma proteína citoplasmática com 403 aminoácidos, cuja função é a retirada de grupos fosfato de outras proteínas e lipídios<sup>56</sup>. Essa proteína é encontrada em quase todos os tecidos do corpo e atua como parte de um processo químico que sinaliza as células detendo o ciclo de divisão celular, com consequente autodestruição por meio de apoptose<sup>57</sup>. Há referência de sua participação, ainda, no controle da migração celular, adesão aos tecidos circundantes e angiogênese, como também na manutenção da estabilidade da informação genética da célula<sup>58</sup>.

A estrutura da proteína consiste em um domínio fosfatase, que realiza a função enzimática, e um domínio C2, pelo qual se liga à fosfolípidios de membrana<sup>59</sup>. *PTEN* antagoniza a atividade de PI3K revertendo PIP3 à PIP2 por desfosforilação, inibindo a proteína-quinase (AKT), a qual é responsável pela transdução de sinais de sobrevivência, proliferação celular e inibição de apoptose. Desse modo, *PTEN* antagoniza a via PI3K/AKT, promovendo a parada do ciclo celular<sup>60</sup>. Esta função de evitar o crescimento descontrolado de células pode impedir a formação de tumores. A Figura 3 ilustra o papel de *PTEN* na via de sinalização PI3K.



**Figura 3.** Esquema da via de sinalização PI3K (fosfatidilinositol-3-quinases), destacando o supressor de tumor *PTEN* (fosfatase e homólogo da tensina), cujo papel é desfosforilar PIP<sub>3</sub>(fosfatidilinositol (3,4,5)-trifosfato) revertendo-o a PIP<sub>2</sub>(fosfatidilinositol (4,5)- bifosfato); VEGF= fator de crescimento endotelial vascular; AKT= proteína quinase B<sup>61,62</sup>.

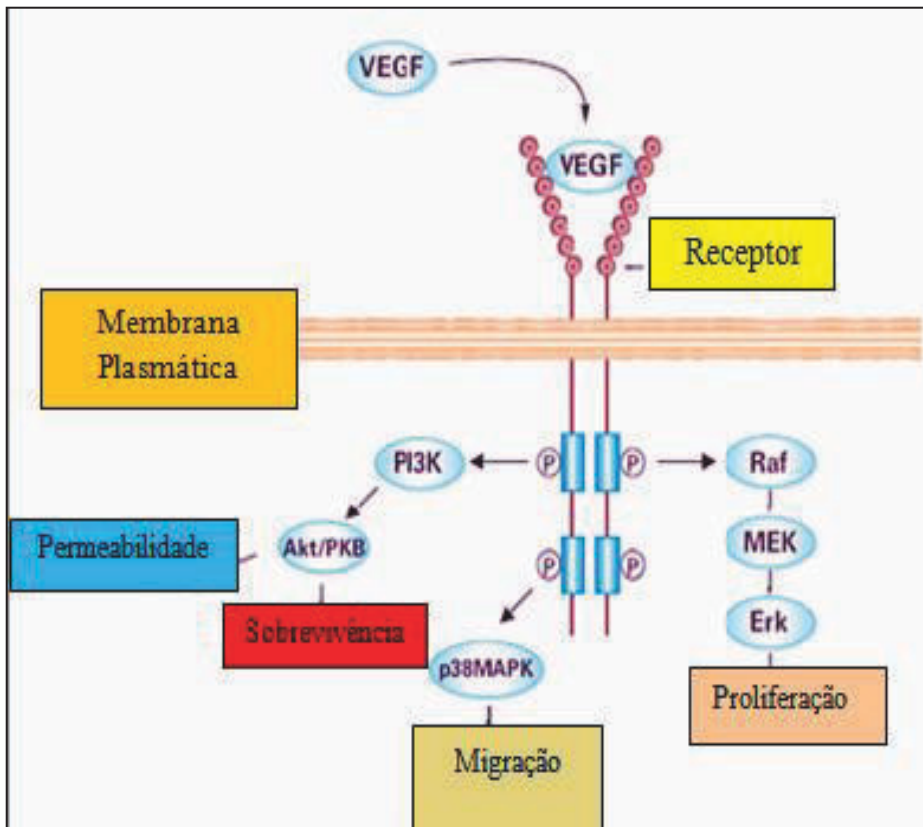
### 1.2.3 Fator de crescimento endotelial vascular A (VEGF-A)

Os fatores de crescimento endotelial vascular são uma família composta por quatro genes *VEGF* (*A-D*), os quais codificam glicoproteínas homodiméricas. Os membros da família VEGF realizam sua função biológica pela ligação a receptores da superfície das células (VEGFR)<sup>63</sup>, ativando múltiplas redes de sinalização que promovem o crescimento celular endotelial, migração, diferenciação e controle da permeabilidade vascular<sup>64</sup>. Nesse contexto, destaca-se o gene *VEGF-A* localizado no cromossomo 6p21.3 humano, o qual está organizado em oito exons<sup>65</sup>e produz cinco

isoformas da proteína de mesmo nome (VEGF-A). Sabe-se que a expressão de *VEGF-A* é regulada por hipóxia, hipertermia, estresse oxidativo e vários oncogenes<sup>66,67</sup>.

A angiogênese desempenha papel importante nos estágios iniciais da carcinogênese. É importante notar que as etapas que conduzem à transição de um nódulo pré-maligno mal vascularizado para um fenótipo maligno, no qual há crescimento tumoral, ocorrem com maior fornecimento de sangue arterial<sup>68,69</sup>. CHC é um típico tumor hipervascularizado, sendo um dos critérios para seu diagnóstico a constatação radiológica de padrão hipervascular arterial<sup>70</sup>.

Em meta-análise, ressaltam-se polimorfismos de *VEGF* como determinantes para suscetibilidade e evolução dos principais tumores sólidos<sup>71,72</sup>. Nesse contexto, *VEGF-A* tem sido relatado como o fator angiogênico mais importante no desenvolvimento de CHC<sup>73,74</sup>. Estudos mostram a associação de vários polimorfismos de *VEGF* com a doença<sup>74-76</sup>. Em população chinesa demonstrou-se a relação entre haplótipos de dois polimorfismos de *VEGF-A* (rs1570360 e rs833061) com suscetibilidade ao CHC<sup>74</sup>. Outros estudos, em populações chinesa e italiana, identificaram relação entre o polimorfismo rs3025039 com recorrência do tumor após transplante e suscetibilidade ao CHC, respectivamente<sup>77,78</sup>. Constata-se a associação dos polimorfismos de *VEGF-A* e CHC em várias populações, no entanto, são escassos estudos em casuística brasileira. A Figura 4 ilustra o papel de *VEGF-A* na via PI3K.



**Figura 4.** Esquema da via de sinalização PI3K (fosfatidilinositol-3-quinases), destacando-se VEGF (fator de crescimento endotelial vascular), o qual se liga ao receptor de membrana desencadeando a cascata de sinalização responsável pela permeabilidade, sobrevivência, migração e proliferação celular; AKT= proteína quinase B; p38MAPK=p38 mapa quinase; RAF=*proto-oncogene (serine/threonine kinase)*; MEK= proteína quinase ativada por mitógeno; ERK= quinase regulada por sinal extracelular<sup>79</sup>.

### 1.3 OBJETIVOS

Avaliar a associação de variantes genéticas e expressão gênica envolvidas no processo de sinalização celular, apoptose e angiogênese com CHC, visando caracterizar subgrupos de risco e identificar marcadores biológicos para diagnóstico precoce, prognóstico e tratamento da doença.

### 1.3.1 Objetivos Específicos

- 1- Analisar a distribuição de polimorfismos de *PTEN* (rs10490920, rs532678, rs701848) e *VEGF-A* (rs3025039 e rs1570360) em pacientes com CHC e indivíduos controles.
- 2- Avaliar a associação de CHC com hábitos de vida, perfil demográfico, e comorbidades considerando-se as respectivas variantes genéticas.
- 3- Analisar a expressão dos genes *PTEN* e *PIK3CA* em tecido hepático de pacientes com cirrose e CHC.
- 4- Avaliar a razão de chance para CHC por meio da combinação dos haplótipos de *PTEN* e *VEGF-A*.



## 2. CASUÍSTICA E MÉTODOS

### 2.1 Casuística

Trata-se de um estudo do tipo caso-controle em que foram selecionados 343 indivíduos no período de 2013 a 2015. Todos foram atendidos no Ambulatório de Gastroenterologia e Instituto do Câncer (ICA) do Hospital de Base da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (HB/FAMERP) e incluídos no estudo após confirmação diagnóstica.

Para as análises de polimorfismos genéticos os indivíduos, de etnia miscigenada<sup>80</sup>, independente do sexo foram distribuídos em dois grupos: Grupo Estudo (GE) - 102 pacientes com diagnóstico de CHC, com idade entre 26 e 83 anos (75% do sexo masculino), e Grupo Controle (GC) - 215 indivíduos sem sinais clínicos e bioquímicos de qualquer hepatopatia, com idade de 20 a 81 anos (55% do sexo masculino). Todos os indivíduos foram submetidos a coleta de amostra de sangue periférico e preencheram questionário específico para antecedentes pessoais e histórico médico (Anexo A).

Para análise de expressão gênica os indivíduos foram distribuídos em três grupos: Grupo de Estudo para Expressão Gênica (GEeg) - 24 pacientes com CHC, idade de 41 a 71 anos (75% do sexo masculino); Grupo Cirrose para Expressão Gênica (GCieg) - 16 pacientes com cirrose sem CHC (75% do sexo masculino), idade de 27 a 70 anos e Grupo Controle para Expressão Gênica (GCeg) - 10 indivíduos submetidos a cirurgias gastrointestinais sem relação com a doença estudada, com idade de 23 a 60 anos (10% do sexo masculino). Todos os indivíduos foram submetidos a biópsia hepática.

Os critérios de inclusão para o estudo foram: diagnóstico de CHC realizado pela AASLD, portanto, nos casos de nódulos com diâmetro acima de 2 cm foi realizado apenas um exame de imagem, e para nódulos entre 1 e 2 cm de diâmetro dois métodos de imagem com achados típicos de CHC, ou seja, hipervascularização arterial e *washout* tardio. Nos casos em que o diagnóstico não foi possível pelos métodos de imagem utilizou-se biópsia hepática. Foram excluídos pacientes com outros tipos de câncer de fígado ou metástases hepáticas a partir de outros órgãos. Os dados clínicos e aqueles referentes a CHC foram de responsabilidade do Grupo de Estudo dos Tumores de Fígado (GETF) HB/FAMERP, coordenado pelo Prof. Dr. Renato Ferreira da Silva.

Indivíduos doadores de sangue selecionados no Banco de Sangue (Hemocentro HB/FAMERP) constituíram o grupo controle (GC). Nesse caso, foram realizados como triagem os exames sorológicos que excluem o principal fator de risco para CHC, que são as hepatites virais (vírus da hepatite B e C). Além disso, exames bioquímicos (aspartato aminotransferase – AST e alanina aminotransferase – ALT) confirmaram a ausência de agressão hepatocítica.

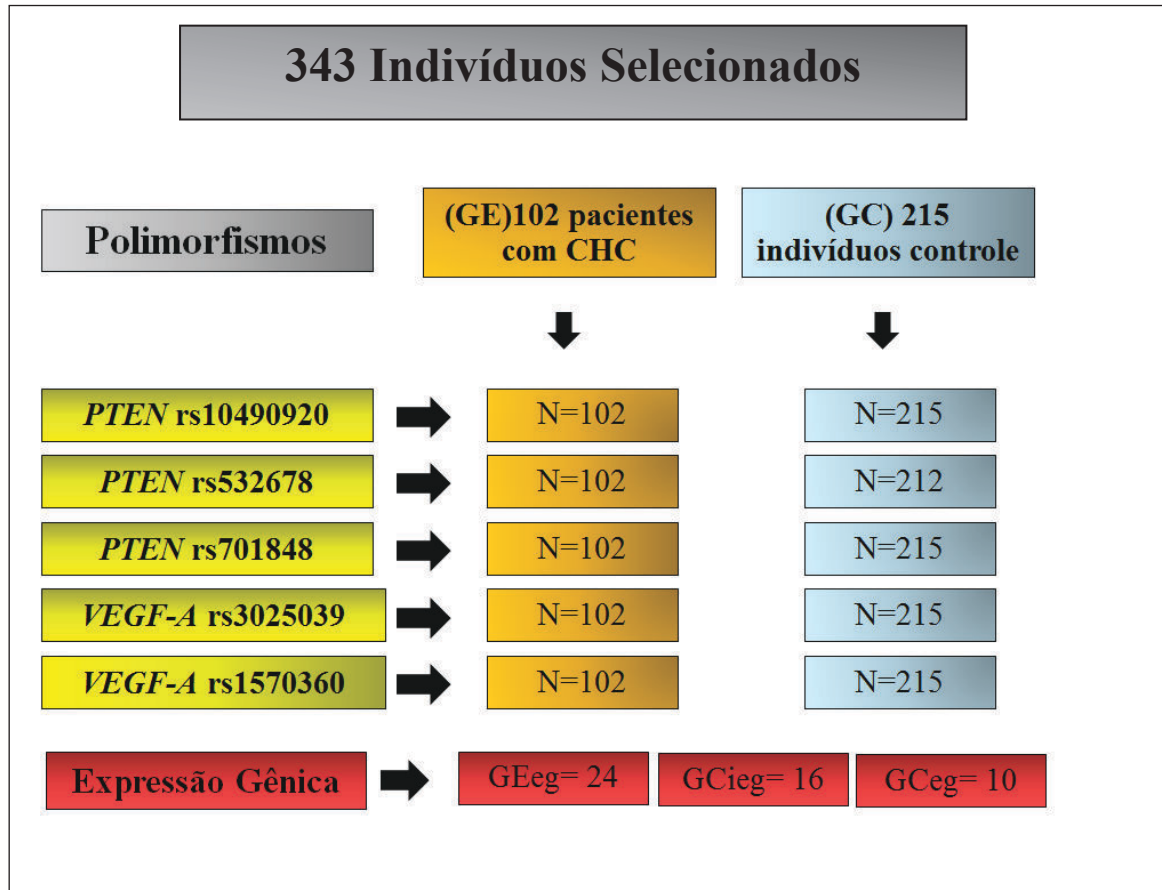
O grupo GCieg foi constituído por pacientes diagnosticados por exames de imagem e biópsia hepática, a qual identificou o grau de fibrose presente. Já o grupo GCeg foi constituído por indivíduos submetidos a cirurgias gastrointestinais sem relação com o CHC.

Foram excluídos indivíduos portadores de HIV (vírus da imunodeficiência humana), gestantes, doenças psiquiátricas e outras neoplasias.

Todos os participantes foram informados das características do estudo, confirmando sua participação pelo Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Instituição (CEP/FAMERP-Parecer nº.435/2011; Anexo B).



A Figura 5 apresenta a distribuição de pacientes e controles, considerando as análises realizadas, incluindo variantes de *PTEN* (rs10490920, rs532678, rs701848), *VEGF-A* (rs3025039 e rs1570360) e expressão gênica de *PTEN* e *PIK3CA* em pacientes com CHC, controle e cirrose.



**Figura 5.** Fluxograma ilustrando a distribuição dos grupos estudados, incluindo pacientes com carcinoma hepatocelular (CHC) (GE= grupo de estudo), indivíduos sem a doença (GC= grupo controle), pacientes com CHC para expressão gênica (GEeg= grupo de estudo para expressão gênica); pacientes com cirrose sem CHC (GCi= grupo cirrose para expressão gênica); pacientes sem CHC para expressão gênica (GCeg= grupo controle para expressão gênica) e as respectivas análises realizadas. N=número de indivíduos; DNA= Ácido desoxirribonucleico; RNA= ácido ribonucleico; *PTEN*=fosfatase e homólogo da tensina; *VEGF-A*= fator de crescimento endotelial vascular A; *PIK3CA*= fosfatidilinositol-4-5 bifosfato 3-quinase (subunidade catalítica alfa).

## 2.2 Métodos

### 2.2.1 Extração de DNA

O DNA genômico foi extraído de leucócitos de sangue periférico coletado com EDTA. A técnica de extração de DNA genômico consistiu no método *salting-out*<sup>81</sup>, realizado em três etapas, compreendendo: 1) lise das células sanguíneas; 2) desproteinização; 3) precipitação do DNA e ressuspensão, seguindo-se o protocolo apresentado a seguir.

O sangue periférico total foi coletado em tubo *vacutaner* com EDTA (1 mg/mL de sangue), transferido 1 mL de sangue para um tubo estéril de microcentrífuga de 2 mL, seguido de centrifugação a 5.000 rpm por 5 minutos, à temperatura ambiente (TA), sendo o plasma descartado. Foram adicionados ao sedimento 900 µL de Tampão 1x contendo Triton. O próximo passo consistiu na homogeneização com Vortex durante 1 minuto. A amostra foi centrifugada novamente a 5.000 rpm por 5 minutos. Posteriormente, realizou-se o descarte do sobrenadante por inversão vagarosa e constante, seguida da adição de 1mL de tampão 1x. Esse procedimento foi repetido por cerca de três vezes, ou até que o *pellet* estivesse isento de hemoglobina.

O próximo passo consistiu na ressuspensão do sedimento (núcleos de leucócitos) com 200 µL de Tampão 2 1X seguido do acréscimo de 20 µL de SDS (dodecil sulfato de sódio) 10%, que tem por função o rompimento da membrana nuclear. Incubou-se a amostra no banho à 56°C por 15 minutos. Em seguida, foram adicionados 100 µL de NaCl 5 M, a amostra então homogeneizada e centrifugada a 12.000 rpm durante 5 minutos a TA, o que favoreceu a precipitação das proteínas.

Na etapa seguinte o sobrenadante (DNA) foi transferido para outro tubo de microcentrífuga, e o precipitado descartado, ou seja, o tubo com proteínas. O DNA foi misturado com 1mL de etanol absoluto gelado e homogeneizado por inversão lenta do tubo, de modo que o etanol promoveu a purificação do DNA e sua precipitação. A amostra foi mantida em freezer a  $-20^{\circ}\text{C}$ , *overnight*.

A próxima fase, conhecida como precipitação de DNA, iniciou-se com a retirada das amostras do freezer e centrifugação a 12.000 rpm por 5 minutos à TA. O etanol absoluto foi removido e as amostras lavadas com etanol a 70% gelado e centrifugadas a 12.000 rpm por 5 minutos. Essa etapa foi repetida. Depois, foi removido todo o etanol. O tubo contendo a amostra foi colocado sobre papel absorvente para a evaporação do etanol (cerca de 5 horas).

A terceira parte da extração incluiu a ressuspensão do precipitado (DNA) em 100  $\mu\text{L}$  de Tampão TE (pH 8,0), seguido de incubação em banho-maria a  $56^{\circ}\text{C}$  por 15 minutos, reidratando o DNA (para não degradar). A concentração e a pureza foram analisados pelo equipamento NanoDrop-ND-1000 (Thermo Scientific, Wilmington, Delaware - USA), segundo o manual do fabricante. A absorbância da amostra foi medida sobre a proporção 260 nm e 280 nm, e utilizou-se a proporção 260/280 para avaliar a pureza do DNA, considerando-se a proporção de 1.8 – 2.0. Observou-se a integridade da amostra em gel de agarose 1%. Em seguida a amostra foi armazenada a  $-20^{\circ}\text{C}$  até o processamento para análise dos polimorfismos.

### 2.2.2 Análise genotípica

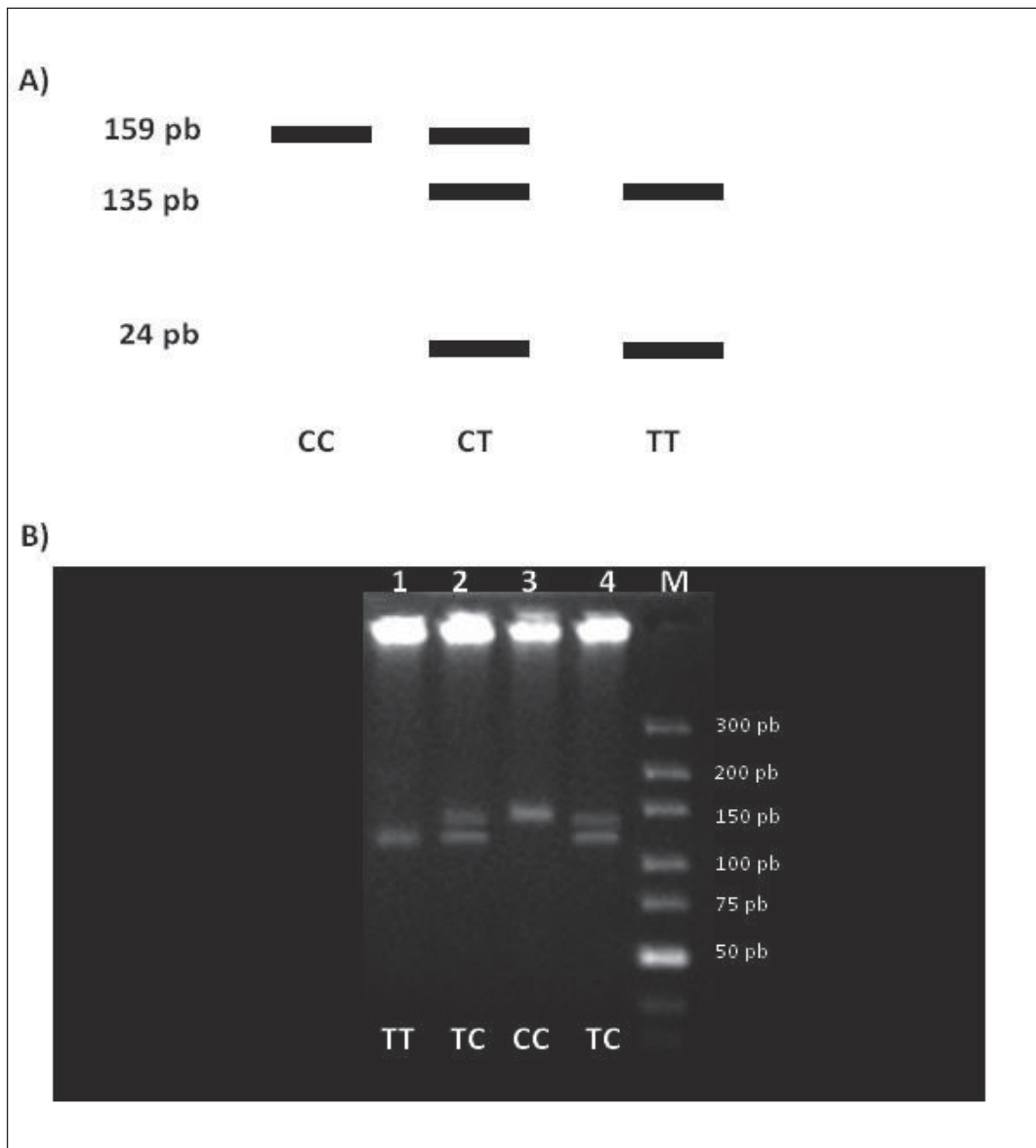
Após a extração de DNA genômico procedeu-se a análise dos polimorfismos de *PTEN* (rs10490920, rs532678 e rs701848) e *VEGF-A* (rs3025039 e rs1570360), com amplificação do DNA por PCR (*polymerase chain reaction*) convencional, sendo cada tubo de reação composto por 50 ng de DNA genômico em volume final de 25  $\mu$ L, contendo 20 mmol de cada *primer*; 0,1 mmol/L dNTPs; 0,75 mmol/L de  $MgCl_2$ ; 5 mmol/L de tampão PCR 10 X; 0,25 U de Taq polimerase (5 U/ $\mu$ L) e 7  $\mu$ L de água MiliQ.

O produto de amplificação foi submetido às enzimas de restrição *NcoI*, *BpiI*, *HaeIII*, *NlaIII* e *Mn1I* (Fermentas<sup>®</sup>), seguido de coloração com GelRed (Uniscience<sup>®</sup>), eletroforese e análise em sistema de foto documentação. Os respectivos *primers*, e as etapas de amplificação e eletroforese para os referidos polimorfismos são apresentados no Quadro 1. As Figuras de 6 a 10 mostram o perfil eletroforético dos polimorfismos estudados.

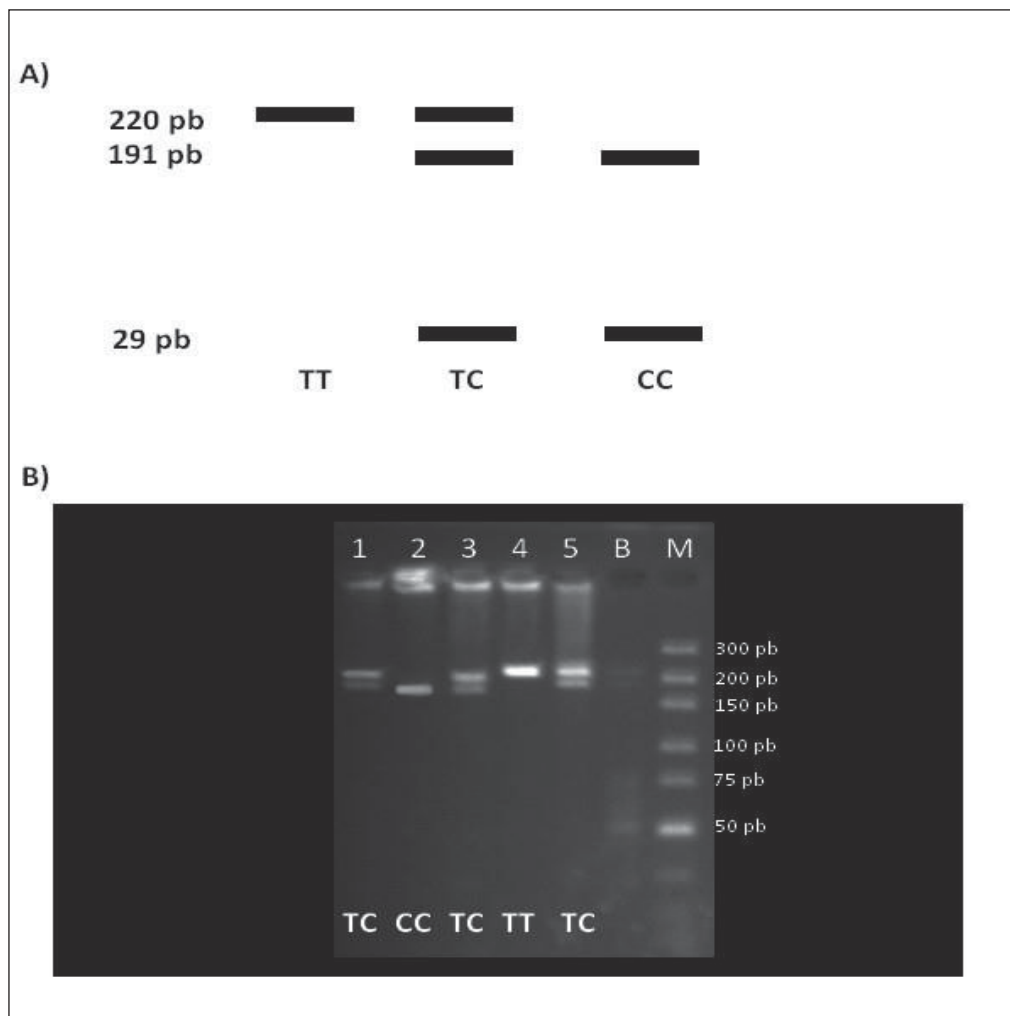
**Quadro 1.** *Primers*, etapas de amplificação e eletroforese dos polimorfismos *PTEN*- rs10490920/rs532678/rs701848 e *VEGF-A*-rs3025039/ rs1570360.

Polimorfismo	Primer	Desnaturação Inicial	Ciclagem (Ciclos)	Desnaturação (Temperatura/tempo)	Anelamento	Extensão Final	Ciclo Final	Restrição Enzimática	Fragmento (pb)	Eletroforese	Genótipo
<i>PTEN</i> - rs10490920	P1:5'TGTAAAGCACTAATAGCATCTTCCA3' P2:5'CAAGCCACCTAATTCAGCAATT 3'	94°C/5 min	35	94°C/ 45 s	62°C/45 s	72°C/ 45 s	72°C/ 7 min	<i>NcoI</i>	159,135 e 24	Gel agarose 3% 100 v 120 min	C/C T/C T/T
<i>PTEN</i> - rs532678	P1:5'CAAGAAAACCAGTCCAAGTGTGAAGA3' P2:5'AGGGGCAAGAAGCAAACAT3'	94°C/5 min	35	94°C/ 45 s	61°C/45 s	72°C/ 45 s	72°C/ 7 min	<i>BpiI</i>	220,191 e 29	Gel agarose 4% 100v 120 min	C/C T/C T/T
<i>PTEN</i> - rs701848	P1:5'GAATCGTTTCTACATAGTGCT3' P2:5'AAGTCCAGCACCAAGTAAGTTA3'	94°C/5 min	35	94°C/ 45 s	55°C/45 s	72°C/ 45 s	72°C/ 7 min	<i>HaeIII</i>	199,117 e 82	Gel agarose 4% 100v 90 min	C/C T/C T/T
<i>VEGF-A</i> - rs3025039	P1:5'AAGGAAGAGGAGACTCTGCGC3' P2:5'TATGTGGGTGGGTGTGTCTACAGG3'	95°C/5 min	30	95°C/ 60 s	59°C/60 s	72°C/ 60 s	72°C/ 10 min	<i>NlaIII</i>	208,122 e 86	Gel agarose 2,5% 90v 90 min	T/T T/C C/C
<i>VEGF-A</i> - rs1570360	P1:5'TCCTGCTCCCTCCTGCCCAATG3' P2:5'GGCGGGGACAGGCGAGCATC3'	94°C/5 min	35	94°C/ 45 s	61°C/45 s	72°C/ 45 s	72°C/ 7min	<i>MnII</i>	185,150, 34 e 22	Gel agarose 4% 105v 90 min	A/A A/G G/G

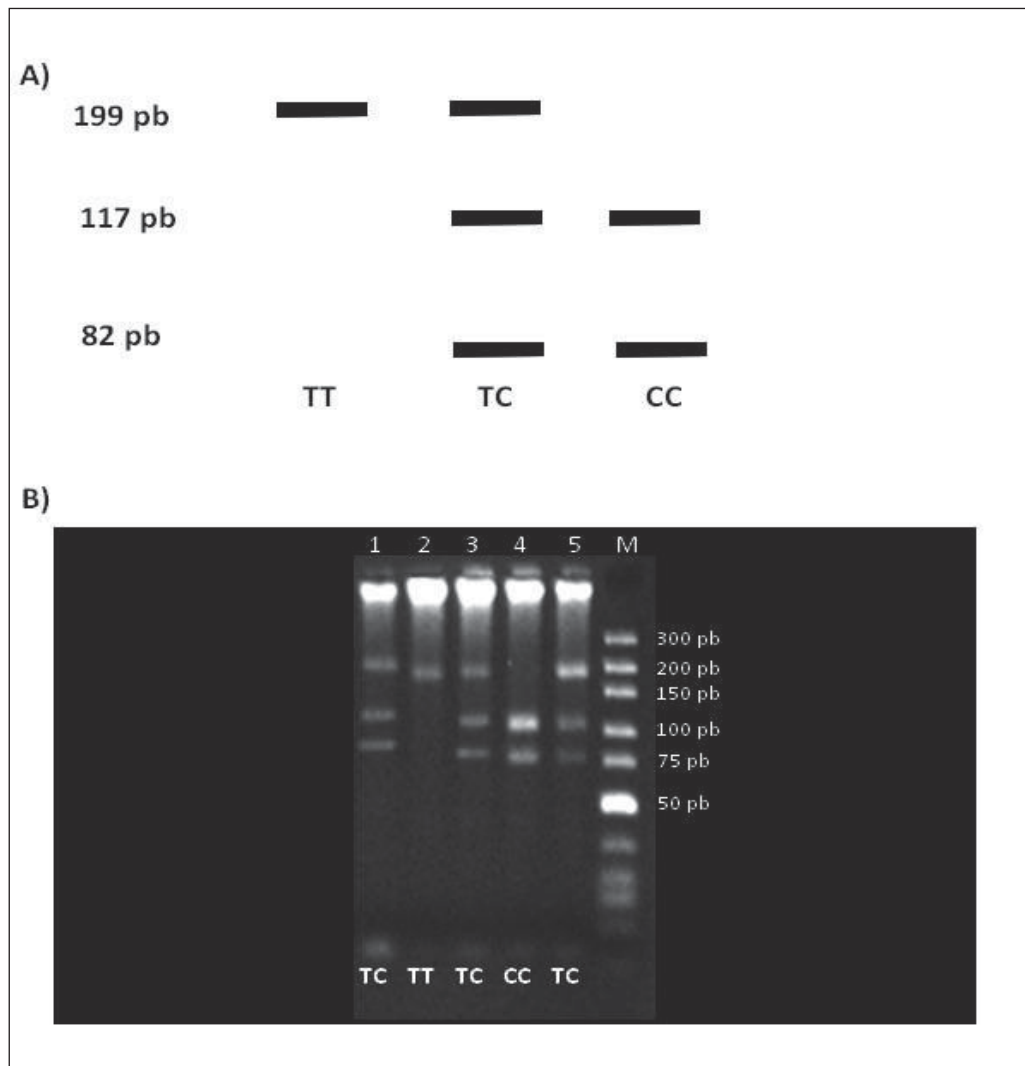
*PTEN*= Fosfatase e homólogo da tensina; *VEGF-A*= Fator de crescimento endotelial vascular A; pb=pares de base;v=volts; s= segundo; m= minuto.



**Figura 6.** Padrão de bandas (perfil eletroforético) para o polimorfismo *PTEN*-rs10490920; pb= pares de bases (A). Fotografia de gel de agarose 3% submetido à eletroforese para análise dos genótipos de *PTEN* -rs10490920. Nota-se genótipo *T/T* na coluna 1, *T/C* nas colunas 2 e 4 e *C/C* na coluna 3. O padrão de bandas (Ladder 100pb – Fermentas) pode ser visto na coluna M (B). *PTEN*= fosfatase e homólogo da tensina.

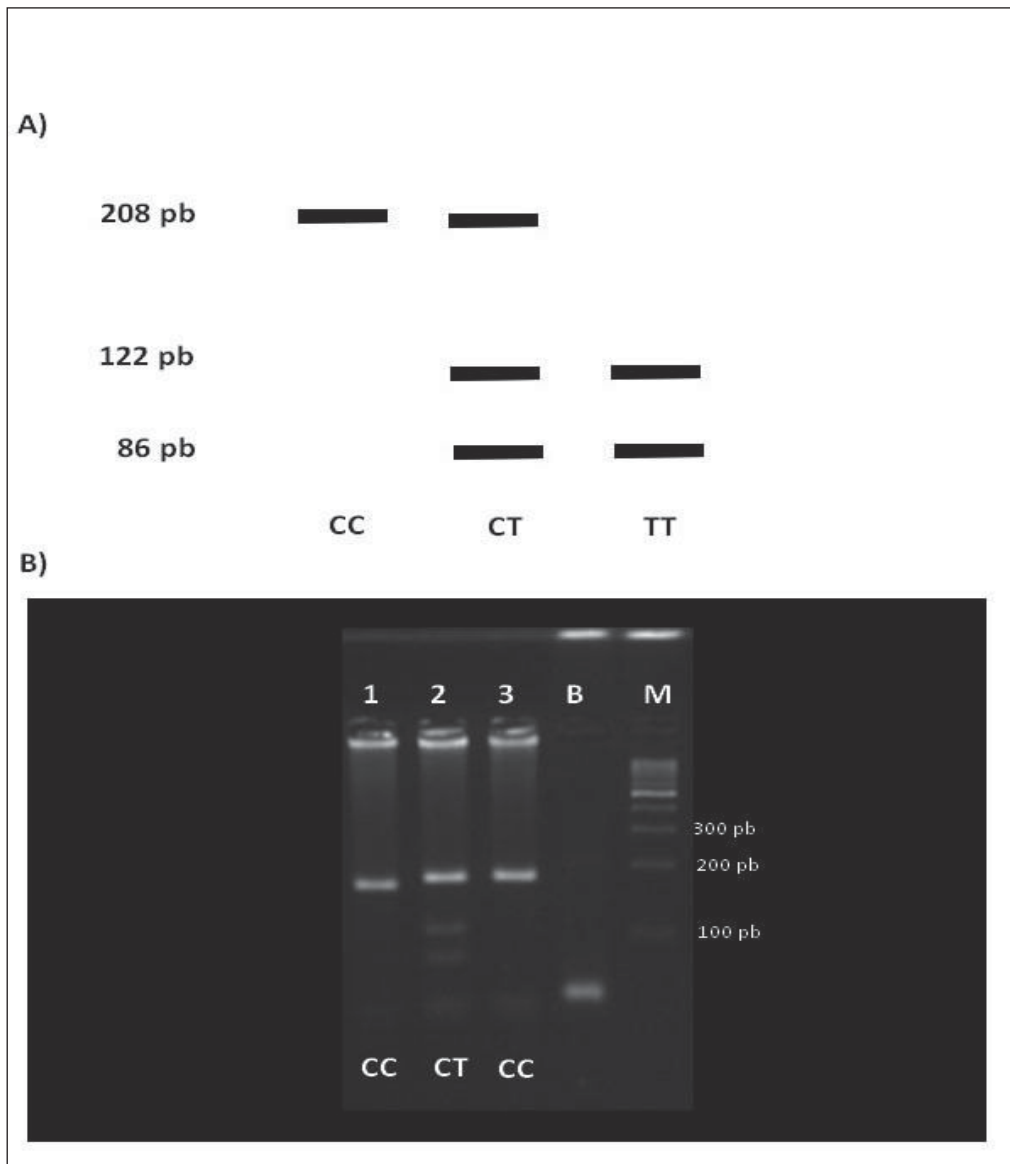


**Figura 7.** Padrão de bandas (perfil eletroforético) para o polimorfismo *PTEN*-rs532678; pb = pares de bases (A). Fotografia de gel de agarose 4% submetido à eletroforese para análise dos genótipos de *PTEN* -rs532678. Nota-se genótipo *T/C* nas colunas 1,3 e 5, *C/C* na coluna 2 e *T/T* na coluna 4. O branco, ou seja, livre de DNA, pode ser observado na coluna B. O padrão de bandas (Ladder 100pb – Fermentas) pode ser visto na coluna M (B). *PTEN*= fosfatase e homólogo da tensina.

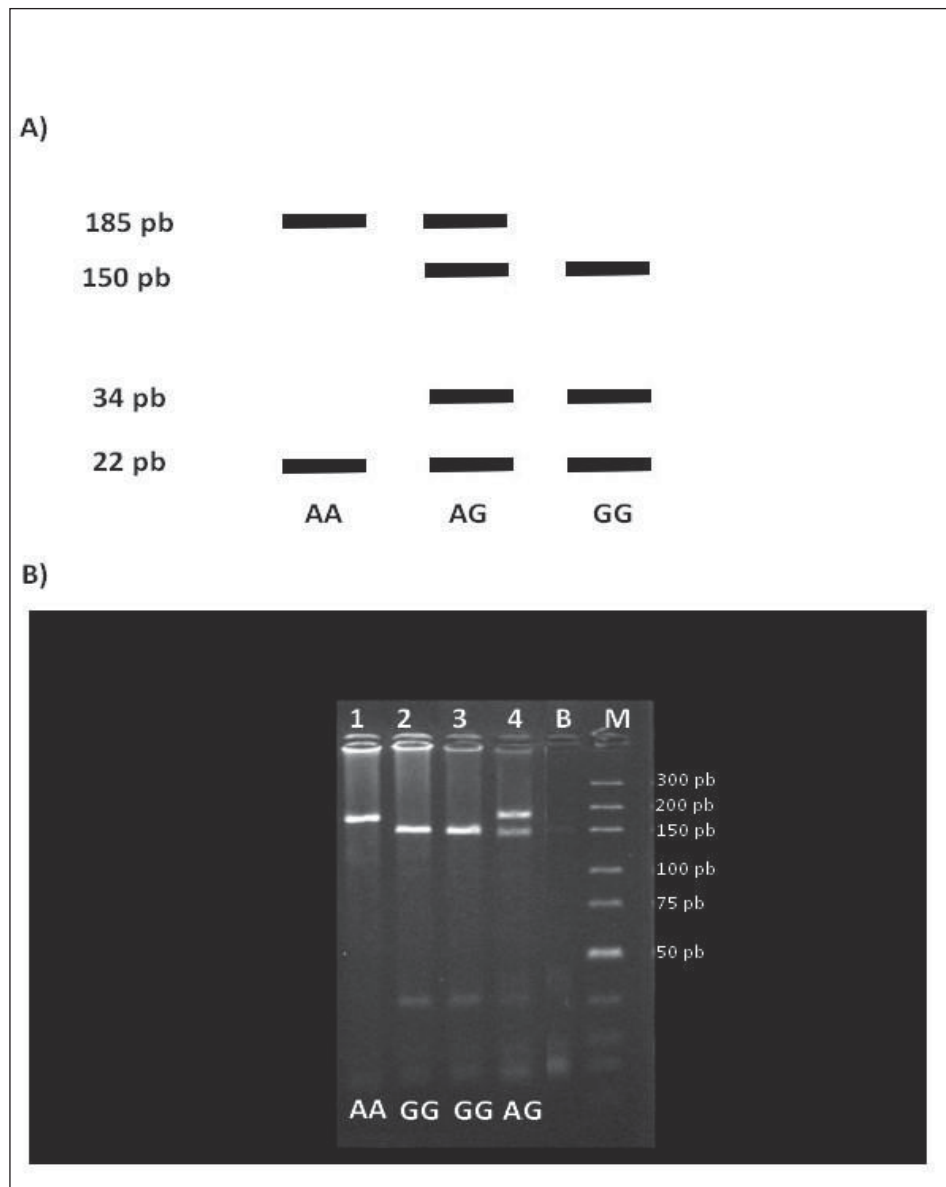


**Figura 8.** Padrão de bandas (perfil eletroforético) para o polimorfismo *PTEN*-rs701848; pb = pares de bases (A). Fotografia de gel de agarose 4% submetido à eletroforese para análise dos genótipos de *PTEN* -rs701848. Nota-se genótipo *T/C* nas colunas 1,3 e 5, *T/T* na coluna 2 e *C/C* na coluna 4. O padrão de bandas (Ladder 100pb – Fermentas) pode ser visto na coluna M (B). *PTEN*= fosfatase e homólogo da tensina.





**Figura 9.** Padrão de bandas (perfil eletroforético) para o polimorfismo *VEGF-A*- rs3025039; pb = pares de bases (A). Fotografia de gel de agarose 2,5% submetido à eletroforese para análise dos genótipos de *VEGF-A*- rs3025039. Nota-se genótipo *C/C* nas colunas 1 e 3 e *C/T* na coluna 2. O branco, ou seja, livre de DNA, pode ser observado na coluna B. O padrão de bandas (Ladder 100pb – Fermentas) pode ser visto na coluna M (B). *VEGF-A*= fator de crescimento endotelial vascular A.



**Figura 10.** Padrão de bandas (perfil eletroforético) para o polimorfismo *VEGF-A*-rs1570360; pb = pares de bases (A). Fotografia de gel de agarose 4% submetido à eletroforese para análise dos genótipos de *VEGF-A*-rs1570360. Nota-se genótipo *A/A* na coluna 1, *G/G* nas colunas 2 e 3 e o genótipo *A/G* na coluna 4. O branco, ou seja, livre de DNA, pode ser observado na coluna B. O padrão de bandas (Ladder 100pb – Fermentas) pode ser visto na coluna M (B). *VEGF-A*= fator de crescimento endotelial vascular A.

### 2.2.3 Extração de RNA

Fragmentsos de tecido hepático foram obtidos por biópsia percutânea por agulha *tru-cut* ou cirurgia (transplante de fígado) e armazenados em tubos criogênicos com solução estabilizadora (RNA later<sup>®</sup>-Life Technologies). O RNA total do tecido hepático foi extraído com o método de Trizol<sup>®</sup> (Ambion) de acordo com o protocolo do fabricante. A amostra foi macerada em cadinho após adição de nitrogênio líquido, colocada em tubo *ependorf* com 1mL de Trizol com auxílio de pipeta e centrifugada a 12.000g por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo, seguido da adição de 200µL de clorofórmio, com inversão do tubo por um minuto, manutenção à TA por cinco minutos para iniciar a separação das fases, e centrifugação a 12.000g por 15 minutos a 4°C. Após, o sobrenadante foi transferido para um novo tubo de 2,0 mL, adicionou-se 500 µL de isopropanol, agitando-se o tubo por inversão durante um minuto. A solução precipitou à TA por 20 minutos. Em seguida, o material foi centrifugado por 30 minutos a 14.000 rotações por minuto (rpm) à 4 °C, descartado o sobrenadante emborcando-se os tubos e o *pellet* lavado duas vezes com 1mL de etanol 70% gelado, preparado com água DEPC, e centrifugado por dois minutos a 14.000 rpm a 4 °C. Descartou-se cuidadosamente o sobrenadante por inversão do tubo a cada lavagem, retirando o excesso de álcool para secar o *pellet*. Para ressuspensão do RNA foram adicionados 20 µL de água ultrapura tratada com DEPC, mantendo-se a solução em banho-maria a 55 °C por 10 minutos para melhor solubilização. Posteriormente, o tubo com a amostra foi colocado no gelo e agitado em vórtex à rotação baixa (aproximadamente 5.000 rpm), para posterior quantificação das amostras e estocagem a 20 °C.

Amostras de RNA foram quantificadas em fluorômetro Qubit<sup>®</sup> 2.0 (Life Technologies), segundo o manual do fabricante, e armazenadas a 4°C. Para a solução de trabalho acrescentou-se 199 µL do *Buffer* multiplicado pelo número de amostras e 1µL de

amostra. Para as quantificações foram utilizados dois padrões (*Standard 1 e 2*), aos quais adicionou-se 10uL dos respectivos *Standards* e 190µL de solução de trabalho, obtendo o volume final de 200 uL. Após, as amostras foram homogeneizadas no Vórtex por três segundos e incubadas a TA por dois minutos, em seguida realizou-se a leitura.

#### 2.2.4 Análise de expressão gênica e qPCR

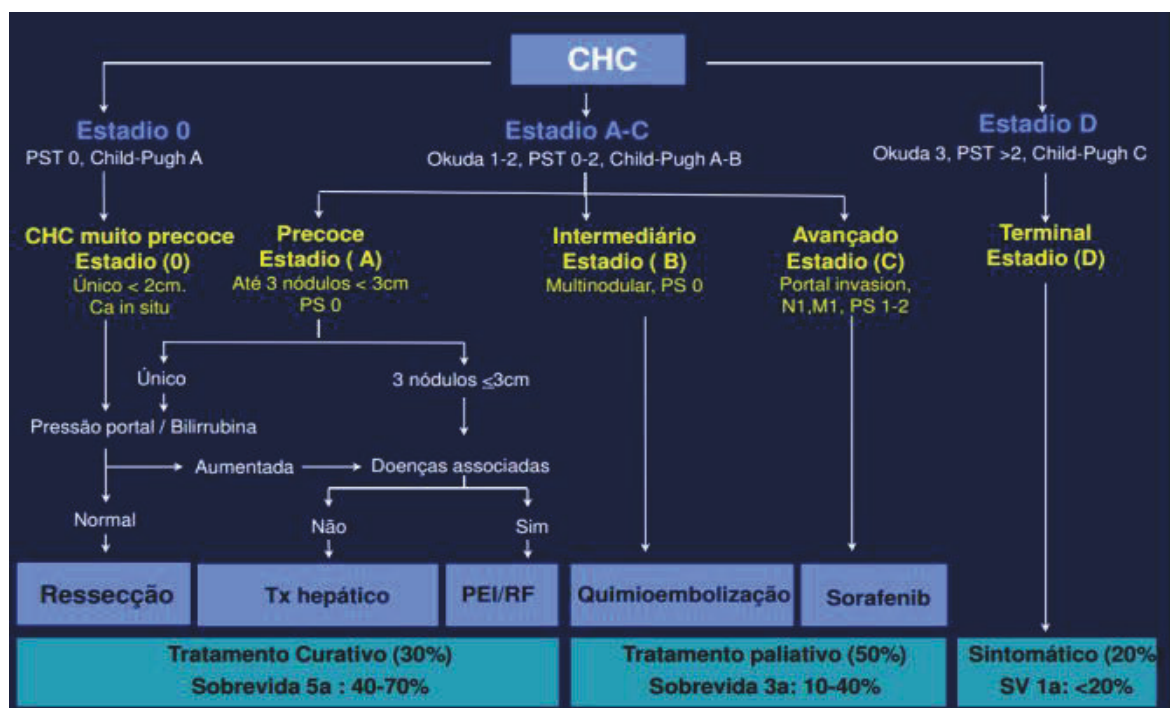
Após a quantificação das amostras, a fita de cDNA foi sintetizada utilizando o Kit *High Capacity cDNA* (Applied Biosystems®, Foster City, CA, EUA) em volume total de 20 µL das misturas da reação na concentração final de 100 ng/µL de cDNA, 10 mL *TaqMan Universal Master Mix*, 8 mL de solução de água DEPC e 1 mL *TaqMan Gene Expression* para *PTEN* e *PIK3CA* (Sondas Hs02621230\_s1 e Hs00907957\_m1 - AppliedBiosystems® - respectivamente). Os níveis de transcrição foram normalizados pelos genes *GAPDH* e *ACTB*, frequentemente usados em estudos para determinar o melhor normalizador para as amostras analisadas<sup>82,83</sup>.

Os dados foram armazenados no programa *Step One Plus* (Applied Biosystems), e utilizados para analisar a curva de expressão. A expressão relativa dos genes de interesse foi determinada pelo método comparativo  $\Delta\Delta C_t$ , que relaciona a média da expressão dos genes normalizadores utilizados como controle endógeno e a média da expressão dos genes de interesse para cada amostra (Livak e Schmittgen, 2008). O grupo controle (GCeg=10) foi utilizado como normalizador para a análise. Todas as amostras foram testadas em triplicata e expressas como diferença relativa de n-vezes com relação ao calibrador (controles). Para todas as reações foram incluídos controle negativo.

## 2.2.5 Estadiamento e classificação do carcinoma hepatocelular e cirrose

Os pacientes, com CHC (n=24) e cirrose (n=16), submetidos às análises de expressão gênica foram classificados clinicamente de acordo com a evolução da doença, utilizando os Critérios de Barcelona (BCLC) ou *Child-Pugh*, (Quadros 2 e 3).

**Quadro 2.** Classificação BCLC (Estadiamento da Clínica de Câncer Hepático de Barcelona).



PST: *Performance Status Test*; TX: Transplante; PEI: Injeção percutânea de etanol; RF: Radio frequência; SV: Sobrevivência<sup>18</sup>.

**Quadro 3.** Classificação de *Child-Turcotte-Pugh*.

<b>Crítérios avaliados / pontos</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>
Albumina (g/dl)	>3,5	3,5 – 2,8	<2,8
Bilirrubina (mg/dl)	<2	2 – 3	>3
CEP e CBP	<4	4 - 10	>10
Tempo de protrombina (seg)	>50%	50 - 30%	<30%
INR	<1,7	1,7 – 2,3	>2,3
Encefalopatia hepática	sem	1 ou 2	3 ou 4
Ascite	ausente	Leve ou controlada	Moderada ou tensa

CEP: Colangite Esclerosante Primária; CBP: Cirrose Biliar Primária; INR: Relação Internacional Normalizadora da Protrombina; Child A: 5 – 6 pontos / Child B: 7 – 9 pontos / Child C: 10 – 15 pontos<sup>18</sup>.

### 2.2.6 Perfil clínico e hábitos de vida

Para a caracterização clínica e de hábitos de vida, além da aplicação de um questionário, os resultados de exames laboratoriais (aspartato aminotransferase- AST, alanina aminotransferase- ALT, gama glutamil transferase- GGT e alfa-fetoproteína- AFP), diagnóstico de comorbidades (hipertensão arterial sistêmica - HAS e diabetes mellitus - DM) e hábitos de vida (tabagismo e etilismo) foram obtidos de prontuários médicos.

Define-se por HAS valor de pressão arterial sistólica maior ou igual a 140 mmHg e pressão arterial diastólica maior ou igual a 90 mmHg, na ausência de medicação anti-hipertensiva<sup>84</sup>. Para diagnóstico de DM foram considerados valores séricos de glicemia: >200mg/dL (glicemia de duas horas ou a qualquer hora do dia, independente do horário de refeições)<sup>85</sup>.

Tabagismo foi caracterizado como consumo de qualquer tipo ou quantidade de tabaco, diariamente, há pelo menos seis meses; enquanto ex-fumante aquele que, tendo

sido fumante, não tenha fumado qualquer tipo ou quantidade de tabaco nos últimos seis meses; e não fumante aquele que nunca tenha fumado, ou por pouco tempo ou de forma esporádica, qualquer tipo ou quantidade de tabaco, qualquer período da vida. Considerou-se etilismo o consumo de mais do que 21 unidades de álcool por semana para homens, e até 14 unidades de álcool por semana para mulheres, sendo que cada unidade de álcool equivale a 10g de álcool<sup>86</sup>.

### 2.2.7 Análise estatística

Foram utilizados os programas MiniTab, Stats Direct e GraphPad. A análise descritiva das variáveis foi apresentada como valores de mediana, mínimo e máximo. As variáveis qualitativas foram analisadas pelo teste de Fisher ou teste Qui-quadrado ( $\chi^2$ ). Para as variáveis quantitativas sem distribuição gaussiana foi empregado teste de Kruskal Wallis na comparação entre três ou mais grupos e Mann Whitney para dois grupos. A análise de regressão logística verificou a chance do evento (CHC) na presença de diferentes variáveis, utilizando teste de comparação múltipla. A análise de correlação de Spearman foi realizada entre a expressão de *PTEN* e *PIK3CA* e os principais marcadores bioquímicos para CHC. Empregou-se representação gráfica por meio de box-plot incluindo valor mínimo, mediana e valor máximo, além de eventuais *outliers*. Foi admitido erro alfa de 5%.

O equilíbrio de Hardy-Weinberg foi avaliado para cada SNP, com aplicação do programa Arlequin v.3.5.1.3<sup>87,88</sup>, utilizando-se dados genotípicos. Com o mesmo programa, realizou-se a análise do desequilíbrio de ligação (DL) entre os três SNPs de *PTEN* e os dois SNPs de *VEGF-A*. Diferenças na distribuição haplotípica dos grupos CHC e controle foram acessadas pelo teste exato de diferenciação populacional do programa Arlequin v.3.5.1.3<sup>87,88</sup>.

---

**RESULTADOS**



### 3. RESULTADOS

#### 3.1 Perfil da Casuística

Dados demográficos, hábitos de vida e comorbidades são apresentados na Tabela 1. Os valores de mediana para idade em pacientes e controles foram 61 e 49 anos, respectivamente ( $P < 0,0001$ ). O gênero masculino, tabagismo, etilismo e DM prevaleceram no grupo com CHC (75%, 60%, 57% e 30%, respectivamente), comparado ao controle (55%; 21%, 13% e 3%; respectivamente;  $P < 0,05$ ). Para HAS, observou-se semelhança entre os grupos ( $P > 0,05$ ).

#### 3.2 Análise de Polimorfismos Genéticos

##### ***PTEN-rs10490920***

O genótipo selvagem (T/T) destacou-se em ambos os grupos (GE= 69,6%; GC= 67,4%), seguido do genótipo heterozigoto (T/C) e homozigoto mutante. O alelo selvagem (T) prevaleceu em CHC e controle (GE= 0,78; GC= 0,79). A distribuição de genótipos e alelos foi semelhante entre os grupos ( $P = 0,9863$ ; Tabela 2).

##### ***PTEN-rs532678***

O genótipo heterozigoto (T/C) prevaleceu em CHC (53,9%) e controle (52,8%), seguido do homozigoto mutante (C/C) e homozigoto selvagem (T/T), sem diferença significativa entre os grupos ( $P > 0,05$ ). Houve predominância do alelo mutante (C) em GE (0,63) e GC (0,61;  $P = 0,7076$ ; Tabela 3).

**Tabela 1.** Perfil demográfico, hábitos de vida e comorbidades em pacientes com carcinoma hepatocelular (GE) e indivíduos controle (GC).

Variável	GE (N=102)		GC (N=215)		P GExGC
<b>Idade (anos)</b>					
Mediana	61		49		
Mínimo	26		20		<0,0001*
Máximo	83		81		
<b>Gênero</b>	N	%	N	%	
Masculino	76	75	118	55	0,0013**
Feminino	26	25	97	45	
<b>Hábitos de vida</b>	N	%	N	%	
Tabagismo	49 <sup>Δ</sup>	60	45	21	<0,0001**
Etilismo	56 <sup>•</sup>	57	27	13	<0,0001**
<b>Comorbidades</b>	N	%	N	%	
DM	30 <sup>•</sup>	30	6	3	<0,0001**
HAS	36 <sup>•</sup>	36	64	30	0,3005**

\*Mann Whitney; \*\*Teste Qui-quadrado; DM= Diabetes Mellitus; HAS= hipertensão arterial sistêmica; N=número de indivíduos; <sup>Δ</sup> cálculo considerando 81 indivíduos; <sup>•</sup> cálculo considerando 99 indivíduos.

***PTEN- rs701848***

O genótipo heterozigoto (T/C) destacou-se em GE (45,1%) e GC (47,4%), seguido de (T/T) e (C/C) ( $P>0,05$ ; Tabela 4). O alelo selvagem (T) prevaleceu em pacientes (0,61) e controles (0,62;  $P=0,8628$ ; Tabela 4).

***VEGF-A rs3025039***

O genótipo selvagem (C/C) prevaleceu em ambos os grupos (GE= 73,5%; GC= 78,6%;  $P>0,05$ ), o mesmo ocorreu para o alelo selvagem (C) (0,87; 0,89, respectivamente), no entanto, sem diferença estatística entre os grupos ( $P=0,4226$ ). O genótipo homozigoto mutante não foi observado em pacientes e controles (Tabela 5).

***VEGF-A rs1570360***

O genótipo homozigoto selvagem (G/G) mostrou-se prevalente em ambos os grupos (GE= 58,8%; GC= 57,2%), seguido dos genótipos heterozigoto (G/A) e mutante (A/A), com semelhança entre os grupos ( $P>0,05$ ; Tabela 7). Em relação à frequência alélica, pacientes e controles apresentaram prevalência do alelo G (0,77 e 0,75, respectivamente;  $P=0,6387$ ; Tabela 6).

O equilíbrio de Hardy-Weinberg foi avaliado para todos os SNPs nos grupos CHC e controle e, apenas, o SNP rs10490920 encontrou-se fora do equilíbrio em ambos os grupos ( $P=0,00000$ ; Tabela 7).

**Tabela 2.** Distribuição das frequências alélicas e genótípicas para o polimorfismo *PTEN*- rs10490920 em pacientes com carcinoma hepatocelular (GE) e indivíduos sem a doença (GC).

Genótipo	Polimorfismo <i>PTEN</i> rs10490920 T>C	GE		GC		*P GExGC
		N	%	N	%	
Selvagem	T/T	71	69,6	145	67,4	0,7967
Heterozigoto	T/C	18	17,6	48	22,3	0,4177
Mutante	C/C	13	12,8	22	10,3	0,6348
	<b>Total</b>	102	100	215	100	
	<b>Alelo</b>	<b>N</b>	<b>Freq. Abs.</b>	<b>N</b>	<b>Freq. Abs.</b>	
	T	160	0,78	338	0,79	0,9863
	C	44	0,22	92	0,21	
	<b>Total</b>	204	1	430	1	

\*Teste Qui-Quadrado; N= número de indivíduos; Freq. Abs.=Frequência absoluta; *PTEN*= fosfatase e homólogo da tensina; T= alelo selvagem; C=alelo de risco.

**Tabela 3.** Distribuição das frequências alélicas e genótípicas para o polimorfismo *PTEN*- rs532678 em pacientes com carcinoma hepatocelular (GE) e indivíduos sem a doença (GC).

Genótipo	Polimorfismo <i>PTEN</i> rs532678 T>C	GE		GC		*P GExGC
		N	%	N	%	
Selvagem	T/T	10	9,80	26	12,3	0,6515
Heterozigoto	T/C	55	53,9	112	52,8	0,9516
Mutante	C/C	37	36,3	74	34,9	0,9112
	<b>Total</b>	102	100	212	100	
	<b>Alelo</b>	<b>N</b>	<b>Freq. Abs.</b>	<b>N</b>	<b>Freq. Abs.</b>	
	T	75	0,37	164	0,39	0,7076
	C	129	0,63	260	0,61	
	<b>Total</b>	204	1	424	1	

\*Teste Qui-Quadrado; N= número de indivíduos; Freq. Abs.= Frequência absoluta; *PTEN*= fosfatase e homólogo da tensina; T= alelo selvagem; C=alelo de risco.

**Tabela 4.** Distribuição das frequências alélicas e genótípicas para o polimorfismo *PTEN*- rs701848 em pacientes com carcinoma hepatocelular (GE) e indivíduos sem a doença (GC).

Genótipo	Polimorfismo <i>PTEN</i> 701878 T>C	GE		GC		*P GExGC
		N	%	N	%	
Selvagem	T/T	39	38,2	82	38,1	0,9869
Heterozigoto	T/C	46	45,1	102	47,4	
Mutante	C/C	17	16,7	31	14,5	
	<b>Total</b>	102	100	215	100	
	<b>Alelo</b>	<b>N</b>	<b>Freq. Abs.</b>	<b>N</b>	<b>Freq. Abs.</b>	0,8628
	T	124	0,61	266	0,62	
	C	80	0,39	164	0,38	
	<b>Total</b>	204	1	430	1	

\*Teste Qui-Quadrado; N= número de indivíduos; Freq. Abs.= Frequência absoluta; *PTEN*= fosfatase e homólogo da tensina; T= alelo selvagem; C=alelo de risco.

**Tabela 5.** Distribuição das frequências alélicas e genóticas para o polimorfismo *VEGF-A*-rs3025039 em pacientes com carcinoma hepatocelular (GE) e indivíduos sem a doença (GC).

Genótipo	Polimorfismo <i>VEGF-A</i> rs3025039 C>T	GE		GC		*P GExGC
		N	%	N	%	
Selvagem	C/C	75	73,5	169	78,6	0,3899
Heterozigoto	T/C	27	26,5	46	21,4	0,3899
Mutante	T/T	0	0	0	0	NC
	<b>Total</b>	102	100	215	100	
	<b>Alelo</b>	<b>N</b>	<b>Freq. Abs.</b>	<b>N</b>	<b>Freq. Abs.</b>	
	C	177	0,87	384	0,89	0,4226
	T	27	0,13	46	0,11	
	<b>Total</b>	204	1	430	1	

\*Teste Qui-Quadrado N= número de indivíduos; Freq. Abs.= Frequência absoluta; *VEGF-A*=fator de crescimento endotelial vascular A; NC= Não calculado; C= alelo selvagem; T=alelo de risco.

**Tabela 6.** Distribuição das frequências alélicas e genóticas para o polimorfismo *VEGF-A*-rs1570360 em pacientes com carcinoma hepatocelular (GE) e indivíduos sem a doença (GC).

Genótipo	Polimorfismo <i>VEGF-A</i> rs1570360 G>A	GE		GC		*P GExGC
		N	%	N	%	
Selvagem	G/G	60	58,8	123	57,2	0,8807
Heterozigoto	G/A	37	36,3	76	35,3	0,9719
Mutante	A/A	5	4,9	16	7,5	0,5434
	<b>Total</b>	102	100	215	100	
	<b>Alelo</b>	N	<b>Freq. Abs.</b>	N	<b>Freq. Abs.</b>	
	G	157	0,77	322	0,75	0,6387
	A	47	0,23	108	0,25	
	<b>Total</b>	204	1	430	1	

\*Teste Qui-Quadrado; N= número de indivíduos; Freq. Abs.= Frequência absoluta; *VEGF-A*=fator de crescimento endotelial vascular A; G= alelo selvagem; A=alelo de risco.



**Tabela 7.** Heterozigose observada (Ho) e esperada (He) para os SNPs dos genes *PTEN* e *VEGF-A*, com correspondente valor de P para o teste de Equilíbrio de Hardy Weinberg (EHW), em pacientes com carcinoma hepatocelular (CHC) e indivíduos sem a doença (controle).

SNP	CHC (N=102)			Controle (N=215)		
	Ho	He	P-EHW	Ho	He	P-EHW
<b>rs10490920</b>	0,17647	0,34000	<b>0,00000</b>	0,22326	0,33714	<b>0,00000</b>
<b>rs532678</b>	0,52941	0,46460	0,19278	0,52830	0,47549	0,10674
<b>rs701848</b>	0,45098	0,47909	0,67866	0,47442	0,47297	1,00000
<b>rs3025039</b>	0,26471	0,23080	0,20742	0,21395	0,19151	0,14679
<b>rs1570360</b>	0,36275	0,35637	1,00000	0,35349	0,37704	0,37329

SNP= polimorfismo de nucleotídeo único; *PTEN*= fosfatase e homólogo da tensina; *VEGF-A*= fator de crescimento endotelial vascular A.

### 3.3 Relação entre Polimorfismos Genéticos, Hábitos de Vida e Comorbidades

Análise comparativa da distribuição dos genótipos em relação ao tabagismo é apresentada na Tabela 8. Em *PTEN*- rs10490920 e *PTEN*- rs701848, considerando apenas os indivíduos portadores do genótipo de risco ( $\_ / C$ , para ambos), houve prevalência de tabagismo em GC comparado a GE ( $P < 0,0001$ , para ambos). Para *PTEN*- rs532678, *VEGF-A*- rs3025039 e rs1570360 houve prevalência do genótipo de risco ( $\_ / C$ ,  $\_ / T$  e  $\_ / A$ , respectivamente) em tabagistas do grupo com CHC (90%, 23% e 43%, respectivamente), comparado ao grupo controle (84%, 20% e 38%, respectivamente;  $P < 0,05$ ). A análise intragrupo não mostrou diferença significativa ( $P > 0,05$ ).

A Tabela 9 apresenta frequência de etilismo de acordo com os genótipos. Na análise intragrupo observou-se semelhança entre os grupos ( $P > 0,05$ ). A análise entre grupos mostrou para *PTEN*- rs10490920 e *VEGF-A*- rs1570360 menor frequência de etilismo e genótipo de risco ( $\_ / C$  e  $\_ / A$ , respectivamente) em pacientes (34% e 46%,

respectivamente), em relação aos controles (41% e 48%, respectivamente;  $P < 0,05$ ). Para *PTEN*- rs532678, rs701848, e *VEGF-A*- rs3025039 prevaleceu etilismo com genótipo de risco (C/C) em pacientes (86%, 55% e 30%, respectivamente), comparado ao grupo controle (81,5%, 48% e 26%;  $P < 0,05$ ).

**Tabela 8.** Frequência do hábito tabagista distribuída de acordo com os genótipos de *PTEN* (rs10490920, rs532678, rs701848) e *VEGF-A* (rs3025039 e rs1570360) em pacientes com carcinoma hepatocelular (GE) e indivíduos controles (GC).

Genótipo	GE				GC				*P GEXGC
	Tabagista		Não Tabagista		Tabagista		Não Tabagista		
	N	%	N	%	N	%	N	%	
<b><i>PTEN</i>-rs10490920</b>									
<u>/C</u>	18	37	7	22	17	38	53	31	< 0,0001
<u>T/T</u>	31	63	25	78	28	62	117	69	< 0,0001
<b>Total</b>	49	100	32	100	45	100	170	100	
<b>*P</b>			0,2423				0,5083		
<b><i>PTEN</i>-rs532678</b>									
<u>/C</u>	44	90	30	94	38	84	148	89	<0,0001
<u>T/T</u>	5	10	2	6	7	16	19	11	0,0709
<b>Total</b>	49	100	32	100	45	100	167	100	
<b>*P</b>			0,6978				0,4479		
<b><i>PTEN</i>-rs701848</b>									
<u>/C</u>	29	59	22	69	29	64	104	61	< 0,0001
<u>T/T</u>	20	41	10	31	16	36	66	39	< 0,0001
<b>Total</b>	49	100	32	100	45	100	170	100	
<b>*P</b>			0,5246				0,8191		
<b><i>VEGF-A</i>-rs3025039</b>									
<u>/T</u>	11	23	9	28	9	20	37	22	0,0097
<u>C/C</u>	38	77	23	72	36	80	133	78	< 0,0001
<b>Total</b>	49	100	32	100	45	100	170	100	
<b>*P</b>			0,7523				0,9583		
<b><i>VEGF-A</i>-rs1570360</b>									
<u>/A</u>	21	43	13	41	17	38	75	44	< 0,0001
<u>G/G</u>	28	57	19	59	28	62	95	56	< 0,0001
<b>Total</b>	49	100	32	100	45	100	170	100	
<b>*P</b>			0,8423				0,5519		

N= números de indivíduos; *PTEN*=fosfatase e homólogo da tensina; *VEGF-A*= fator de crescimento endotelial vascular A; \*Teste de Fisher ou Qui-Quadrado.

**Tabela 9.** Frequência do hábito etilista, distribuída de acordo com os genótipos de *PTEN* (rs10490920, rs532678, rs701848) e *VEGF-A* (rs3025039 e rs1570360), em pacientes com carcinoma hepatocelular (GE) e indivíduos controles (GC).

Genótipo	GE				GC				*P
	Etilista		Não Etilista		Etilista		Não Etilista		
	N	%	N	%	N	%	N	%	GEXGC
<b><i>PTEN</i>-rs10490920</b>									
<u>/C</u>	19	34	11	26	11	41	59	31	< 0,0001
<u>T/T</u>	37	66	32	74	16	59	129	69	< 0,0001
<b>Total</b>	56	100	43	100	27	100	188	100	
<b>*P</b>			0,4996			0,4528			
<b><i>PTEN</i>-rs532678</b>									
<u>/C</u>	48	86	41	95	22	81	164	89	< 0,0001
<u>T/T</u>	8	14	2	5	5	19	21	11	0,0013
<b>Total</b>	56	100	43	100	27	100	185	100	
<b>*P</b>			0,1793			0,3417			
<b><i>PTEN</i>-rs701848</b>									
<u>/C</u>	31	55	30	70	13	48	120	64	< 0,0001
<u>T/T</u>	25	45	13	30	14	52	68	36	< 0,0001
<b>Total</b>	56	100	43	100	27	100	188	100	
<b>*P</b>			0,2102			0,1748			
<b><i>VEGF-A</i>-rs3025039</b>									
<u>/T</u>	17	30	9	21	7	26	39	21	< 0,0001
<u>C/C</u>	39	70	34	79	20	74	149	79	< 0,0001
<b>Total</b>	56	100	43	100	27	100	188	100	
<b>*P</b>			0,4087			0,7166			
<b><i>VEGF-A</i>-rs1570360</b>									
<u>/A</u>	26	46	14	33	13	48	79	42	< 0,0001
<u>G/G</u>	30	54	29	67	14	52	109	58	< 0,0001
<b>Total</b>	56	100	43	100	27	100	188	100	
<b>*P</b>			0,2350			0,6938			

N= número de indivíduos; *PTEN*= fosfatase e homólogo da tensina; *VEGF-A*= fator de crescimento endotelial vascular A; \*Teste de Fisher ou Qui-Quadrado.

Para DM, distribuída de acordo com os genótipos dos respectivos polimorfismos, destacou-se na análise intragrupo para o polimorfismo *PTEN*- rs701848, o genótipo de risco (C/C) em não diabéticos (71%), em relação aos diabéticos (40%; P= 0,0071; Tabela 10). Na análise entre grupos observou-se para todos os polimorfismos (*PTEN* e *VEGF-A*), prevalência de genótipos de risco nos controles com DM, comparado aos pacientes (P<0,05; Tabela 10).

Com relação a HAS (Tabela 11), notou-se semelhança intra e entre grupos para *PTEN*- rs10490920/rs532678/rs701848 e *VEGF-A* rs3025039 (P>0,05). Para o polimorfismo *VEGF-A*-rs157036 destacou-se o genótipo selvagem (G/G) em pacientes com HAS (72%), comparado aos controles (47%;P=0,0117).

**Tabela 10.** Frequência de diabetes mellitus (DM) distribuída de acordo com os genótipos de *PTEN* (rs10490920, rs532678, rs701848) e *VEGF-A* (rs3025039 e rs1570360) em pacientes com carcinoma hepatocelular (GE) e indivíduos controles (GC).

Genótipo	GE				GC				*P
	DM		Não DM		DM		Não DM		GEXGC
	N	%	N	%	N	%	N	%	
<b><i>PTEN</i>-rs10490920</b>									
_/C	12	40	17	25	3	50	67	32	< 0,0001
T/T	18	60	52	75	3	50	142	68	< 0,0001
<b>Total</b>	30	100	69	100	6	100	209	100	
<b>*P</b>			0,1925				0,3936		
<b><i>PTEN</i>-rs532678</b>									
_/C	26	87	64	93	6	100	180	87,4	< 0,0001
T/T	4	13	5	7	0	0	26	12,6	0,0024
<b>Total</b>	30	100	69	100	6	100	206	100	
<b>*P</b>			0,4477				1		
<b><i>PTEN</i>-rs701848</b>									
_/C	12	40	49	71	4	67	129	62	0,0002
T/T	18	60	20	29	2	33	80	38	< 0,0001
<b>Total</b>	30	100	69	100	6	100	209	100	
<b>*P</b>			0,0071				1		
<b><i>VEGF-A</i>- rs3025039</b>									
_/T	9	30	16	23	2	33	44	21	0,0009
C/C	21	70	53	77	4	67	165	79	< 0,0001
<b>Total</b>	30	100	69	100	6	100	209	100	
<b>*P</b>			0,6418				0,6106		
<b><i>VEGF-A</i>-rs1570360</b>									
_/A	13	43	27	39	3	50	89	43	< 0,0001
G/G	17	57	42	61	3	50	120	57	< 0,0001
<b>Total</b>	30	100	69	100	6	100	209	100	
<b>*P</b>			0,8659				1		

N= número de indivíduos; *PTEN*= fosfatase e homólogo da tensina; *VEGF-A*= fator de crescimento endotelial vascular A; \*Teste de Fisher ou Qui-Quadrado.

**Tabela 11.** Frequência de hipertensão arterial sistêmica (HAS) distribuída de acordo com os genótipos de *PTEN* (rs10490920, rs532678, rs701848) e *VEGF-A* (rs3025039 e rs1570360) em pacientes com carcinoma hepatocelular (GE) e indivíduos controles (GC).

Genótipo	GE				GC				*P GEXGC
	N	HAS %	N	Não HAS %	N	HAS %	N	Não HAS %	
<b><i>PTEN</i>-rs10490920</b>									
<u>/C</u>	11	31	18	29	20	31	50	33	0,4992
<u>T/T</u>	25	69	45	71	44	69	101	67	0,5258
<b>Total</b>	36	100	63	100	64	100	151	100	
<b>*P</b>			0,8347				0,9145		
<b><i>PTEN</i>-rs532678</b>									
<u>/C</u>	32	88	58	92	55	88,7	131	87,3	0,3869
<u>T/T</u>	4	12	5	8	7	11,3	19	12,7	0,3999
<b>Total</b>	36	100	63	100	62	100	150	100	
<b>*P</b>			0,7197				0,9619		
<b><i>PTEN</i>-rs701848</b>									
<u>/C</u>	22	62	39	62	39	61	94	63	0,4398
<u>T/T</u>	14	38	24	38	25	39	57	37	0,6299
<b>Total</b>	36	100	63	100	64	100	151	100	
<b>*P</b>			0,9377				0,9778		
<b><i>VEGF-A</i>- rs3025039</b>									
<u>/T</u>	9	25	16	25	13	20	33	22	0,6856
<u>C/C</u>	27	75	47	75	51	80	118	78	0,4121
<b>Total</b>	36	100	63	100	64	100	151	100	
<b>*P</b>			0,9651				0,9440		
<b><i>VEGF-A</i>- rs1570360</b>									
<u>/A</u>	10	28	30	48	34	53	58	38	0,2550
<u>G/G</u>	26	72	33	52	30	47	93	62	<b>0,0117</b>
<b>Total</b>	36	100	63	100	64	100	151	100	
<b>*P</b>			0,0850				0,0653		

N=número de indivíduos; *PTEN*= fosfatase e homólogo da tensina; *VEGF-A*= fator de crescimento endotelial vascular A; \*Teste de Fisher ou Qui-Quadrado.

### 3.4 Análise de Regressão Logística

Na análise de regressão logística para identificação de variáveis independentes e respectiva chance de o indivíduo ter CHC, foram utilizados os genótipos com pelo menos um alelo de risco para a doença, no entanto, sem diferença significativa ( $P > 0,05$ ; Tabela 12).

Para as demais variáveis foram identificados como fatores de risco independentes para CHC: tabagismo, etilismo, DM, AST e ALT ( $P = 0,0001$ ;  $P < 0,0001$ ;  $P = 0,0003$ ,  $P < 0,0001$  e  $P = 0,0002$  respectivamente; Tabela 13). Equação da regressão logística: (logit  $Y = -4,505959 - 0,056346$  Sexo Masculino  $+1,843982$  Tabagismo  $+2,497218$  Etilismo  $+2,391002$  Diabetes  $+0,751214$  Hipertensão  $+2,503129$  AST  $+2,477241$  ALT).

**Tabela 12.** Análise de regressão logística de fosfatase e homólogo da tensina (*PTEN*) e fator de crescimento endotelial vascular A (*VEGF-A*) no carcinoma hepatocelular em relação aos respectivos genótipos de risco.

Variáveis	Razão de Chance (IC 95%)	Valor P
<i>PTEN</i> -rs10490920 _/C	0,96(0,56-1,65)	0,8992
<i>PTEN</i> -rs532678 _/C	1,34(0,59-3,07)	0,4767
<i>PTEN</i> -rs701848 _/C	1,04(0,61-1,77)	0,8601
<i>VEGF-A</i> - rs3025039 _/T	1,35(0,76-2,39)	0,2959
<i>VEGF-A</i> - rs1570360 _/A	1,07(0,65-1,76)	0,7685



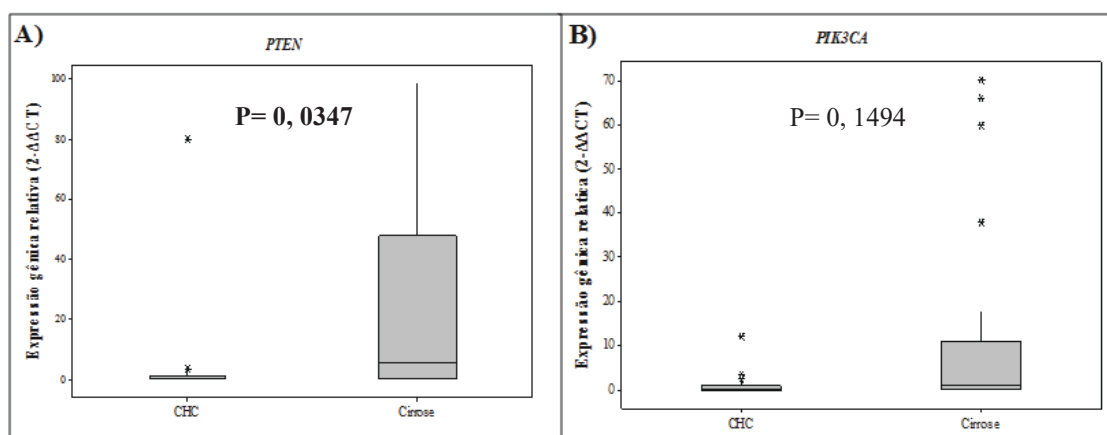
**Tabela 13.** Análise de regressão logística considerando fatores de risco para carcinoma hepatocelular.

<b>Variáveis</b>	<b>Razão de Chance (IC 95%)</b>	<b>Valor P</b>
<b>Sexo Masculino</b>	0,94(0,31-2,80)	0,9193
<b>Tabagismo</b>	6,32(2,45-16,28)	<b>0,0001</b>
<b>Etilismo</b>	12,14(4,25-34,70)	<b>&lt;0,0001</b>
<b>DM</b>	10,92(2,97-40,07)	<b>0,0003</b>
<b>HAS</b>	2,11(0,86-5,20)	0,1016
<b>AST</b>	12,22(4,02-37,12)	<b>&lt;0,0001</b>
<b>ALT</b>	2,47(3,18-44,50)	<b>0,0002</b>

DM=diabetes mellitus; HAS=hipertensão arterial sistêmica; AST= aspartato aminotransferase; ALT= alanina aminotransferase.

### 3.5 Análise de Expressão Gênica

A Figura 11 representa os valores de mediana e quartis dos níveis de expressão de RNAm para *PTEN* e *PIK3CA*, em pacientes com CHC (GEeg) e indivíduos com cirrose sem CHC (GCieg). Observou-se diminuição dos níveis de *PTEN* em GEeg (mediana= 0,908), comparado a GCieg (mediana= 5,93; P= 0,0347). Para *PIK3CA*, houve decréscimo na expressão em GEeg (mediana= 0,108), comparado a GCieg (mediana= 0,493), no entanto, sem diferença significativa entre os grupos (P= 0,1494).



**Figura 11.** Representação esquemática por “box-plot” de valores de mediana e quartis dos níveis de expressão de RNAm em pacientes com carcinoma hepatocelular (CHC) e cirrose para **A)** Fosfatase e homólogo da tensina (*PTEN*): **CHC**- mediana= 0,908; mínimo= 0,032; máximo= 79,9; Q1=0,231; Q3=1,58; IQ Range= 1,35; **Cirrose**- mediana= 5,93; mínimo= 0,196; máximo= 98,4; Q1=0,41; Q3=45,81; IQ Range=47,39. **B)** Fosfatidilinositol-4-5 bifosfato 3-quinase (subunidade catalítica alfa) (*PIK3CA*): **CHC**- mediana= 0,108; mínimo= 0,010; máximo= 12,11; Q1=0,05; Q3=1,04; IQ Range=0,99; **Cirrose**- mediana= 0,493; mínimo= 0,024; máximo= 37,82; Q1: 0,11; Q3=2,23; IQ Range= 2,12; Teste Mann-Whitney.

### 3.6 Expressão Gênica e Estadiamento de CHC e Cirrose

As respectivas expressões gênicas foram relacionadas com o sistema de estadiamento de CHC. A expressão de *PTEN* e *PIK3CA* mostrou-se semelhante em

pacientes no estágio D (mediana= 1,55 e 0,10, respectivamente), comparado àqueles no estágio A (mediana= 0,72 e 0,10, respectivamente) e B/C (mediana= 0,67 e 0,10, respectivamente) (P=0,441 e P=0,946, respectivamente; Tabela 14). O mesmo ocorreu em pacientes com cirrose classificados pelo *Child-Turcotte-Pugh* (P>0,05; Tabela 15).

**Tabela 14.** Níveis de expressão gênica de fosfatase e homólogo da tensina (*PTEN*) e fosfatidilinositol-4-5 bifosfato 3-quinase (*PIK3CA*) em pacientes com carcinoma hepatocelular, classificados de acordo com critérios de *Barcelona ClinicLiver CancerGroup* (BCLC).

<b>Estágio</b>	<b><i>PTEN</i></b>	<b><i>PIK3CA</i></b>
<b>A (N=6)</b>		
Mediana	0,72	0,10
Mínimo	0,03	0,04
Máximo	3,64	2,36
<b>B/C (N=12)</b>		
Mediana	0,67	0,10
Mínimo	0,08	0,01
Máximo	79,90	12,11
<b>D (N=2)</b>		
Mediana	1,55	0,10
Mínimo	0,94	0,09
Máximo	2,15	0,12
<b>*Valor P</b>	0, 441	0, 946

\*Teste Kruskal-Wallis.

**Tabela 15.** Níveis de expressão gênica de fosfatase e homólogo da tensina (*PTEN*) e fosfatidilinositol-4-5 bifosfato 3-quinase (*PIK3CA*) em pacientes com cirrose, classificados de acordo com *Child-Turcotte-Pugh*.

<b>Estágio</b>	<b><i>PTEN</i></b>	<b><i>PIK3CA</i></b>
<b>A (N=3)</b>		
Mediana	5,08	0,62
Mínimo	2,25	0,43
Máximo	65,86	17,96
<b>B (N=7)</b>		
Mediana	0,42	0,21
Mínimo	0,19	0,02
Máximo	11,70	1,84
<b>C (N=3)</b>		
Mediana	9,12	2,37
Mínimo	0,37	0,03
Máximo	59,85	37,82
<b>*Valor P</b>	0,361	0,197

\*Teste Kruskal-Wallis.

### 3.7 Correlação entre Idade, Marcadores de Função Hepática e Expressão Gênica

As correlações entre *PTEN* e idade, AST, ALT, GGT e AFT não apresentaram significância ( $P > 0,05$ ) em pacientes com CHC, o mesmo ocorreu para *PIK3CA* ( $P > 0,05$ ) (Tabela 16).

**Tabela 16.** Correlação entre idade, marcadores de função hepática e expressão gênica de *PTEN* e *PIK3CA* em pacientes com carcinoma hepatocelular.

Gene	Idade		AST		ALT		GGT		AFT	
	(r)	*Valor P	(r)	*Valor P	(r)	*Valor P	(r)	*Valor P	(r)	*Valor P
<i>PTEN</i>	0,23	0,1356	-0,01	0,925	-0,10	0,504	-0,01	0,9058	-0,11	0,5091
<i>PIK3CA</i>	0,21	0,1933	-0,12	0,4607	-0,05	0,759	0,08	0,616	-0,21	0,2046

\*Teste de correlação de Spearman (r); *PTEN*= fosfatase e homólogo da tensina; *PIK3CA*= fosfatidilinositol-4-5 bifosfato 3-quinase (subunidade catalítica alfa); *AST*= aspartato aminotransferase; *ALT*= alanina aminotransferase; *GGT*= Gamaglutamiltransferase; *AFT*= Alfa-fetoproteína.

### 3.8 Haplótipos de *PTEN* e *VEGF-A*

A análise do desequilíbrio de ligação nos grupos CHC e controle revelou associação alélica entre os SNPs de *PTEN* nos pares rs10490920-rs532678 (CHC- P=0,0115; controle- P=0,0272) e rs532678-rs701848 (P=0,0000 para ambos, Tabela 17).

Os haplótipos foram reconstruídos para os SNPs em Desequilíbrio de Ligação (DL), bem como para o conjunto de SNPs (rs10490920, rs532678 e rs701848), relacionando-os com o risco para CHC. A Tabela 18 mostra os haplótipos de *PTEN*, destacando-se TC (rs10490920-rs532678), CC (rs532678-rs701848) e TCC (rs10490920-rs532678-rs701848) em pacientes (54%, 35,5%, 31,3%, respectivamente) e controles (51,4%, 33,5% e 27,9%, respectivamente). Por outro lado, os haplótipos CC (rs10490920-rs532678), TC (rs532678-rs701848) e CTC (rs10490920-rs532678-rs701848) foram os menos frequentes em ambos os grupos. Houve semelhança entre as frequências haplotípicas de pacientes e controles considerando os conjuntos de SNPs rs10490920-rs532678 (P=0,87752), rs532678-rs701848 (P=0,95670) e rs10490920-

rs532678-rs701848 ( $P=0,75203$ ). Este resultado foi confirmado pelo teste de associação do haplótipo individual ao risco de CHC, com semelhança entre grupos para todos os haplótipos ( $P>0,05$ ; Tabela 18).

**Tabela 17.** Análise de desequilíbrio de ligação para SNPs dos genes *PTEN* e *VEGF-A* em pacientes com carcinoma hepatocelular (CHC) e controles.

Par de SNP	CHC (N=102) P	Controle (N=215) P
rs10490920 - rs532678	<b>0,0115</b>	<b>0,0272</b>
rs10490920 - rs701848	0,0725	0,0785
rs532678 - rs701848	<b>0,0000</b>	<b>0,0000</b>
rs3025039 - rs1570360	0,8319	0,2577

SNP= polimorfismo de nucleotídeo único; *PTEN*= fosfatase e homólogo da tensina; *VEGF-A*= fator de crescimento endotelial vascular A.

**Tabela 18.** Análise de haplótipos do gene *PTEN* (fosfatase e homólogo da tensina) em pacientes com o carcinoma hepatocelular (CHC) e controles.

Haplótipo	CHC (N=102) %	Controle (N=215) %	P
<b>rs10490920, rs532678</b>			
TC	54,0	51,4	0,5419
TT	24,4	27,2	0,4604
CT	12,3	11,4	0,7361
CC	9,2	10,0	0,7667
<b>rs532678, rs701848</b>			
CC	35,5	33,5	0,6180
TT	33,0	33,8	0,8421
CT	27,7	28,0	0,9422
TC	3,7	4,7	0,5902
<b>rs10490920, rs532678, rs701848</b>			
TCC	31,3	27,9	0,3777
TCT	22,9	23,9	0,7787
TTT	21,7	22,3	0,8502
CTT	11,4	11,5	0,9644
CCC	4,2	5,6	0,4561
CCT	4,9	4,2	0,6775
TTC	2,6	4,5	0,2493
CTC	1,1	0,1	0,0884



#### 4. DISCUSSÃO

Neste estudo, foram analisadas variantes genéticas e expressão gênica relacionadas a ciclo celular, angiogênese e apoptose, visando avaliar sua associação com CHC, além de outros fatores incluindo idade, sexo, tabagismo, consumo de bebidas alcoólicas e comorbidades como DM e HAS. Referências, particularmente de polimorfismos de *PTEN* associados à CHC são escassas na literatura, tornando este estudo inédito em casuística brasileira.

A incidência de CHC aumenta progressivamente com a idade<sup>89</sup>, o que foi constatado também neste estudo, destacando-se aumento da faixa etária dos pacientes em relação aos controles. Sangiovanni et al. (2004)<sup>90</sup> relataram média de idade de 61 anos em casuística italiana com CHC. De fato, estudos mostram risco aumentado para indivíduos com mais de 50 anos, sendo a idade fator preditivo de mortalidade em pacientes aguardando pelo transplante hepático<sup>91</sup>.

Em relação ao gênero, prevaleceu o sexo masculino no grupo com CHC, concordando com estimativas mundiais (71%)<sup>92</sup>, assim como nacionais. Carrilho et al. (2010)<sup>21</sup> realizaram estudo com 1.405 pacientes brasileiros diagnosticados com CHC, evidenciando prevalência do sexo masculino em 78% dos casos, enquanto Gonçalves et al. (2014)<sup>11</sup> observaram frequência de 85,4% em casuística do Estado do Espírito Santo.

O tabagismo prevaleceu nos pacientes com CHC, cuja associação foi demonstrada também em estudo experimental por meio da exposição a componentes mutagênicos e carcinogênicos<sup>34</sup>. O efeito do tabaco no desenvolvimento do CHC é relacionado ao metabolismo de seus componentes no fígado<sup>30</sup>. Outro estudo identificou aumento de complicações hepáticas como insuficiência hepática, vazamento de bile e ascite após cirurgia em pacientes com CHC fumantes, comparado àqueles não fumantes<sup>93</sup>.



Etilismo destacou-se também em pacientes com CHC comparado ao grupo controle. A ingestão de álcool provoca danos no tecido hepático devido à ação de endotoxinas, assim como estresse oxidativo e inflamação, ocasionando fibrose no tecido hepático, o que contribui para o desenvolvimento de cirrose e CHC<sup>94</sup>. Estudos têm demonstrado o impacto da inflamação no desenvolvimento do câncer, destacando o envolvimento de mecanismos moleculares relacionados à exposição crônica ao álcool. Constata-se em modelos animais, que a ingestão de álcool agrava a inflamação pelo aumento dos níveis de citocinas pró-inflamatórias<sup>34</sup>.

Em relação as comorbidades, DM prevaleceu nos pacientes, corroborando o estudo de Raff et al. (2015)<sup>95</sup> que relacionou a doença como preditor para desenvolvimento de cirrose e CHC. Estudos epidemiológicos mostram aumento do risco para CHC de até três vezes em portadores de DM, sendo que na presença de hepatite, cirrose e etilismo esse risco é ainda maior<sup>96</sup>. Não houve diferença entre os grupos para HAS, corroborando estudo de Raffetti (2015)<sup>97</sup>. No entanto, por ser um componente de síndrome metabólica, HAS merece maior atenção, como possível papel no desenvolvimento de CHC<sup>98</sup>.

### **Perfil Genético**

Neste estudo, assim como em casuística chinesa<sup>57</sup>, não se confirma associação de *PTEN*- rs10490920 (intron) com CHC. O genótipo selvagem (T/T), assim como o alelo (T), prevaleceu em pacientes e controles. Por outro lado, há referência da associação entre esse polimorfismo e câncer retal em população chinesa<sup>99</sup>, no entanto, são escassos os estudos em CHC. *PTEN* antagoniza a atividade de quinase da PI3K, revertendo o PIP3 à PIP2 por desfosforilação, inibindo a proteína-quinase (AKT), a qual é responsável pela transdução de sinais de sobrevivência, proliferação celular e inibição

de apoptose<sup>58-60</sup>. Nesse caso, a função de evitar o crescimento descontrolado de células pode impedir a formação de tumores.

O equilíbrio de HW não se confirmou para *PTEN*- rs10490920 em pacientes e controles. A ausência de equilíbrio de HW sugere, entre outros fenômenos, o impacto de fatores evolutivos que podem alterar frequências genótípicas. Ressaltam-se também os critérios utilizados na randomização dos grupos<sup>100</sup>. Todavia, há um alerta sobre o número reduzido de marcadores genéticos citados sem equilíbrio de HW o que, no entanto, seria esperado para doenças genéticas complexas, mas não considerado por alguns pesquisadores que omitem essas informações valiosas para identificação de polimorfismos causais<sup>101</sup>. Deve ser destacado, ainda, o caráter miscigenado da população brasileira<sup>67</sup>, o qual pode contribuir para divergências em relação ao equilíbrio de HW, utilizado a mais de 100 anos para identificar características genéticas das populações<sup>101,102</sup>.

Neste estudo, também *PTEN*- rs532678 (intron) não mostrou associação com CHC. O genótipo heterozigoto (T/C) prevaleceu em ambos os grupos, seguido pelo genótipo homozigoto mutante (C/C), corroborando estudo em casuística chinesa<sup>57</sup>. Mutações de *PTEN* tem se correlacionado com a progressão do tumor, níveis elevados de alfa-fetoproteína, e prognóstico insatisfatório. No entanto, mutações somáticas raramente foram detectadas em CHC, sugerindo a ação de outros mecanismos<sup>58</sup>. Como nos demais polimorfismos ora estudados, *PTEN*- rs701848 também não se associou com CHC. O genótipo heterozigoto (T/C) prevaleceu em ambos os grupos<sup>57</sup>. Apesar da funcionalidade de cada SPN não ser elucidada, *PTEN*- rs701848 provavelmente altera a expressão e/ou função de *PTEN*<sup>103</sup>. Embora esse SNP esteja na região não codificadora (intron), particularmente na região 3'UTR, pode sofrer influência de microRNAs

(miRNAs), com consequências sobre a regulação de genes alvo, influenciando no risco de câncer<sup>104</sup>.

Em relação à *VEGF*, os polimorfismos ora estudados encontram-se na região promotora (*VEGF-A*- rs3025039) e 3'UTR (*VEGF-A*-rs1570360). Trata-se de importante sinalizador da via da angiogênese, relacionado com desenvolvimento e prognóstico de CHC, tumor sólido, bem vascularizado e com dependência da neovascularização para crescimento<sup>105</sup>. Nesse caso, há referência da relação entre os respectivos alelos mutantes e diminuição de expressão e níveis plasmáticos de *VEGF*, podendo atuar como fator protetor no desenvolvimento de CHC<sup>106,107</sup>.

No entanto, neste estudo ambos os polimorfismos de *VEGF-A* não mostraram associação com CHC. Por outro lado, há referência de *VEGF-A*- rs305039 para suscetibilidade a CHC em casuísticas italiana e chinesa, o que também pode sugerir relação entre etnicidade e variantes de *VEGF*<sup>74,78</sup>. Polimorfismos funcionais de *VEGF* podem influenciar a expressão de RNAm e níveis de proteína. Em relação à *VEGF-A*-rs1570360 há referência de aumento de VEGF-A associado ao alelo selvagem (G) em leucócitos estimulados *in vitro*<sup>74</sup>.

### **Polimorfismos Genéticos, Hábitos de Vida e Comorbidades**

No presente estudo houve maior frequência de tabagistas com genótipo de risco (C/C) para *PTEN*-rs10490920 e *PTEN*-rs701848 em controles comparado a pacientes. Estudo realizado por Jing et al. (2014)<sup>99</sup> encontrou associação desses polimorfismos em câncer colorretal. No grupo com CHC e tabagismo prevaleceram os genótipos de risco para *PTEN*- rs532678 (C/C), *VEGF-A*- rs3025039 (T/T) e *VEGF-A*- rs1570360 (A/A), em relação aos controles. No entanto, isso não ocorreu em relação ao polimorfismo *PTEN*- rs532678 e tabagismo com CHC<sup>57</sup>. Há referência ainda de *VEGF-A*- rs3025039

e hábito tabagista no desenvolvimento de câncer de bexiga<sup>108</sup>. A relação entre SNPs de *VEGF* com tabagismo necessita de esclarecimentos, considerando que o risco conferido a tal hábito pode ser potencializado pelos genótipos de risco, influenciando no desenvolvimento da doença.

Para etilismo, notou-se maior frequência entre pacientes com genótipos de risco para *PTEN*- rs532678, *PTEN*- rs701848, e *VEGF-A*- rs3025039, comparado aos controles. Tendo em vista o abuso de bebidas alcoólicas e seu impacto na supressão de *PTEN*, ou regulação negativa, é esperada alteração da fisiologia hepática<sup>109</sup>. Lu et al. (2014)<sup>110</sup> em estudo de câncer de mama em modelo animal relataram associação entre angiogênese e progressão do tumor relacionado ao álcool, cujo efeito pode atingir diretamente as células endoteliais, ou regular a interação entre células endoteliais e tumorais.

Em relação a DM houve prevalência do alelo de risco (*PTEN* /C; *VEGF-A*-rs3025039 /T; *VEGF-A*- rs1570360 /A) em indivíduos diabéticos do grupo controle, comparado ao grupo com CHC. O número reduzido de indivíduos, nesse caso, dificulta a discussão dos dados ora apresentados. Estudos têm demonstrado que indivíduos com resistência a insulina estão mais suscetíveis a desenvolver CHC, o que foi constatado neste estudo com 30% dos pacientes com CHC com DM, comparado a 3% dos controles. O gene *PTEN* está envolvido com a via da insulina, sendo que mutações, perda da função ou baixa expressão, podem alterar a sensibilidade à insulina e ocasionar esteatose hepática, esteato-hepatite, fibrose e CHC<sup>111</sup>. No entanto, no presente estudo não houve relação entre polimorfismos de *PTEN*, DM e CHC, o que deve ser confirmado em casuísticas mais numerosas.

Os genótipos de risco de *PTEN* e *VEGF-A* mostraram frequências semelhantes entre os grupos em relação a HAS. O mesmo foi observado por Yang et al. (2013)<sup>112</sup>

que também não encontraram relação entre distribuição de SNPs de *PTEN* e componentes da síndrome metabólica (hipertensão, hiperglicemia, etc), mas sim com a glicose e metabolismo de lipídeos. Por outro lado, há referência de níveis plasmáticos aumentados de VEGF em pacientes com HAS<sup>113</sup>. Neste estudo, o polimorfismo *VEGF-A*- rs157036, representado pelo genótipo selvagem (G/G), destacou-se em pacientes com HAS comparado aos controles. No entanto, em casuística coreana demonstrou-se que os genótipos A/G e G/G versus A/G + A/A são protetores contra a suscetibilidade a hipertensão<sup>114</sup>. Em outro estudo, a presença do alelo A (A/A) foi associado com diminuição de VEGF, em comparação ao alelo G (G/G), sugerindo que esse SNP pode influenciar nos níveis de VEGF e consequentemente na pressão arterial, o que deve ser ainda esclarecido<sup>115</sup>.

Neste estudo, a análise de regressão logística incluindo todas as variáveis mostrou maior chance de pertencer ao grupo com CHC na presença de tabagismo, etilismo e DM, além de alteração em marcadores da função hepática como AST e ALT, variáveis consideradas, portanto, possíveis preditores para a doença<sup>34,94,96,116</sup>.

### **Expressão Gênica**

A análise de expressão de genes relacionados a apoptose (*PTEN*) e sobrevivência celular (*PIK3CA*) foi realizada em pacientes com CHC e pacientes cirróticos sem CHC. A expressão de *PTEN* foi significativamente menor em tecido hepático de pacientes com CHC, corroborando outros estudos<sup>117-119</sup>. *PTEN* está associado com o desenvolvimento de várias malignidades humanas, incluindo glioblastoma, melanoma, carcinoma de endométrio, próstata, mama e pulmão<sup>120</sup>. A perda de função de *PTEN* pode estar relacionada a alterações genéticas, que incluem

mutações pontuais, deleções, pequenas inserções, entre outras. Inativação de *PTEN* pode aumentar a chance de desenvolver CHC<sup>118</sup>.

Para *PIK3CA*, houve decréscimo de expressão em pacientes com CHC comparado ao grupo com cirrose, porém, não estatisticamente significativa. Há referência de aumento da expressão desse gene em tecido tumoral<sup>121</sup>, além de baixa taxa de mutação (3-5%)<sup>63</sup>. Por outro lado, estudo de Chen et al. (2009)<sup>120</sup> mostrou menor expressão de *PTEN* em tecido tumoral hepático, com sub-regulação do RNAm de *PTEN* com a fase TNM (tamanho, nódulo e metástase). A perda de *PTEN* está associada com pobre diferenciação, metástase intra-hepática, invasão vascular e estágio avançado do tumor. No entanto, no presente estudo não houve associação da expressão de *PTEN* e *PIK3CA* com estadiamento de CHC (*BCLC*) e cirrose (*Child-Turcotte-Pugh*). Estudos envolvendo a expressão desses genes associada ao estadiamento são escassos na literatura, o que dificulta a discussão dos dados ora apresentados.

Não houve correlação entre idade, marcadores de função hepática e expressão de *PTEN* e *PIK3CA*. Adicionalmente, Yang et al. (2005)<sup>122</sup> não encontraram correlação entre expressão de *PTEN* e níveis séricos de AFP. O mesmo ocorreu para *PIK3CA* em relação à AFP e idade<sup>123</sup>.

### **Haplótipos de *PTEN* e *VEGF***

As interações genéticas são complexas e apenas um polimorfismo isolado pode não influenciar diretamente os produtos gênicos. Desse modo, a análise de uma única variante genética seria insuficiente para predizer proteção ou risco para a doença. Nesse contexto, o conjunto de vários polimorfismos ou haplótipos poderiam desempenhar papel importante no desenvolvimento de CHC<sup>57</sup>. Neste estudo, houve associação dos

pares rs10490920/ rs532678e rs532678/rs701848 com a doença. O par rs10490920/rs701848 obteve valor de ( $P=0,0725$ ,  $P=0,0785$ ; respectivamente), corroborando o estudo de Ding et al. (2011)<sup>57</sup> que reportou índices de associação inferior para esse par de SNPs. Após a reconstrução dos haplótipos não houve relação com risco ou proteção para a doença. Ding et al.<sup>57</sup>, por outro lado, mostraram associação de haplótipos de *PTEN* com CHC, porém, o haplótipo foi baseado nos três SNPs de *PTEN*, ora estudados, além de um polimorfismo inserção-deleção.





## 5. CONCLUSÃO

Este estudo permite concluir que:

- 1- Variantes genéticas, representadas por frequências genotípicas e alélicas, relacionadas a ciclo celular e apoptose (*PTEN*), assim como, a angiogênese (*VEGF-A*) não se associam com CHC.
- 2- Destacam-se como fatores de risco independentes para CHC tabagismo, etilismo, sexo masculino, idade avançada e DM. Alelos mutantes de *PTEN* e *VEGF-A*, particularmente na presença de tabagismo e etilismo podem potencializar o risco para CHC.
- 3- Expressão gênica reduzida de *PTEN* no tecido hepático associa-se com CHC, enquanto *PIK3CA* não diferencia pacientes com CHC daqueles com cirrose.
- 4- Haplótipos de *PTEN* e *VEGF-A* não possibilitam identificar subgrupos de risco ou proteção para CHC.

---

**REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- Mittal S, El-Serag HB. Epidemiology of hepatocellular carcinoma: consider the population. *J Clin Gastroenterol* 2013;47:2-6.
- 2- Estimativa 2014: Incidência de Câncer no Brasil (2014) Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, Coordenação de Prevenção e Vigilância. Rio de Janeiro: INCA. [HTTP://www.inca.gov.br/vigilancia/](http://www.inca.gov.br/vigilancia/). Acessado 10 de setembro de 2015.
- 3- Mastron JK, Siveen KS, Sethi G, Bishayee A. Silymarin and hepatocellular carcinoma: a systematic, comprehensive, and critical review. *Anticancer Drugs* 2015; 26:475-86.
- 4- Byam J, Renz J, Millis M. Liver transplantation for hepatocellular carcinoma. *Hepatobiliary SurgNutr* 2013;2:22-30.
- 5- Lafaro KJ, Demirjian AN, Pawlik TM. Epidemiology of hepatocellular carcinoma. *Surg Oncol Clin N Am* 2015;24:1-17.
- 6- GLOBOCAN 2012: Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012. [http://globocan.iarc.fr/Pages/fact\\_sheets\\_cancer.aspx/](http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx/) Acessado 15 de setembro 2015.
- 7- Li GJ, Harrison TJ, Yang JY, Chen QY, Wang XY, Fang ZL. Combined core promoter mutations and pre-S deletion of HBV may not increase the risk of HCC: a geographical epidemiological study in Guangxi, China. *Liver Int* 2013;33:936-43.
- 8- Altekruse SF, Henley SJ, Cucinelli JE, McGlynn KA. Changing Hepatocellular Carcinoma Incidence and Liver Cancer Mortality Rates in the United States. *Am J Gastroenterol* 2014;109:542-53.
- 9- Kikuchi L, Chagas AL, Alencar RS, Paranaguá-Vezozzo DC, Carrilho FJ. Clinical and epidemiological aspects of hepatocellular carcinoma in Brazil. *Antivir Ther* 2013;18:445-9.
- 10- Gomes MA, Priolli DG, Tralhão JG, Botelho MF. Hepatocellular carcinoma: epidemiology, biology, diagnosis, and therapies. *Rev Assoc Med Bras* 2013;59:514-24.
- 11- Gonçalves PL, Zago-Gomes MdaP, Gonçalves CS, Pereira FE. Hepatitis virus and hepatocellular carcinoma in Brazil: a report from the State of Espírito Santo. *Rev Soc Bras Med Trop* 2014;47:559-63.
- 12- Zhu AX, Rosmorduc O, Evans TR, Ross PJ, Santoro A, Carrilho FJ, et al. Search: A Phase III, Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial of Sorafenib Plus Erlotinib in Patients with Advanced Hepatocellular Carcinoma. *J Clin Oncol* 2015;33:559-66.

- 13- Park JW, Chen M, Colombo M, Roberts LR, Schwartz M, Chen PJ, et al. Global patterns of hepatocellular carcinoma management from diagnosis to death: the BRIDGE Study. *Liver Int* 2015;35:2155-66.
- 14- Mitchell DG, Bruix J, Sherman M, Sirlin CB. LI-RADS (Liver Imaging Reporting and Data System): Summary, discussion, and consensus of the LI-RADS Management Working Group and future directions. *Hepatology* 2015;61:1056-65.
- 15- Eskesen AN, Bjoro K, Aandahl EM, Line PD, Melum E. Low use of surveillance and early diagnosis of hepatocellular carcinoma in Norway--a population-based cohort study. *Cancer Epidemiol* 2014;38:741-7.
- 16- Xiao J, Ding Y, Huang J, Li Q, Liu Y, Ni W, et al. The Association of HMGB1 Gene with the Prognosis of HCC. *PLoS One* 2014.
- 17- Bhat M, Chaiteerakij R, Harmsen WS, Schleck CD, Yang JD, Giama NH, et al. Metformin does not improve survival in patients with hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2014;20:15750-5.
- 18- Duseja A. Staging of hepatocellular carcinoma. *J Clin Exp Hepatol* 2014;4:74-9.
- 19- Tokumitsu Y, Tamesa T, Matsukuma S, Hashimoto N, Maeda Y, Tokuhisa Y, et al. An accurate prognostic staging system for hepatocellular carcinoma patients after curative hepatectomy. *Int J Oncol* 2015;46:944-52.
- 20- Bharadwaj S, Gohel TD. Perspectives of physicians regarding screening patients at risk of hepatocellular carcinoma. *Gastroenterol Rep Oxf* 2015.
- 21- Carrilho FJ, Kikuchi L, Branco F, Gonçalves CS, Mattos AA. Clinical and epidemiological aspects of hepatocellular carcinoma in Brazil. *Clinics (São Paulo)* 2010;65:1285-90.
- 22- Gomes MA, Priolli DG, Tralhão JG, Botelho MF. Hepatocellular carcinoma: epidemiology, biology, diagnosis, and therapies. *Rev Assoc Med Bras* 2013;59:514-24.
- 23- Byam J, Renz J, Millis JM. Liver transplantation for hepatocellular carcinoma. *Hepatobiliary Surg Nutr* 2013;2:22-30.
- 24- Miamen AG, Dong H, Roberts LR. Immunotherapeutic Approaches to hepatocellular Carcinoma Treatment. *Liver Cancer* 2012;1:226-37.
- 25- Felizardo RJ, Câmara NO. Hepatocellular carcinoma and food contamination: aflatoxins and ochratoxin A as a great promoter. *World J Gastroenterol* 2013;19:3723-25.
- 26- Shih WL, Chang HC, Liaw YF, Lin SM, Lee SD, Chen PJ, et al. Influences of tobacco and alcohol use on hepatocellular carcinoma survival. *Int J Cancer* 2012;131:2612-21.

- 27- Vivarelli M, Montalti R, Risaliti A. Multimodal treatment of hepatocellular carcinoma on cirrhosis: an update. *World J Gastroenterol* 2013;19:7316-26.
- 28- Venkitaraman AR. Tumour Suppressor Mechanisms in the Control of Chromosome Stability: Insights from BRCA2. *Mol cells* 2014;32:95-9.
- 29- Nishida N, Goel A. Genetic and Epigenetic Signatures in human hepatocellular carcinoma a systematic. *Curr Genomics* 2011;12:130-7.
- 30- Hamed MA, Ali SA. Non-viral factors contributing to hepatocellular carcinoma. *World J Hepatol* 2013;5:311-22.
- 31- Thompson KJ, Humphries JR, Niemeyer DJ, Sindram D, McKillop IH. The effect of alcohol on Sirt1 expression and function in animal and human models of hepatocellular carcinoma (HCC). *Adv Exp Med Biol* 2015;815:361-73.
- 32- Sidharthan S, Kottilil S. Mechanisms of alcohol-induced hepatocellular carcinoma. *Hepatol Int* 2014;8:452-7.
- 33- Goh GB, Chang PE, Tan CK. Changing epidemiology of hepatocellular carcinoma in Asia. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2015;29:919-28.
- 34- Purohit V, Rapaka R, Kwon OS, Song BJ. Roles of alcohol and tobacco exposure in the development of hepatocellular carcinoma. *Life Sci* 2013;92:3-9.
- 35- Gharib AF, Karam RA, Pasha HF, Radwan MI, Elsayy WH. Polymorphisms of hemochromatosis, and alpha-1 antitrypsin genes in Egyptian HCV patients with and without hepatocellular carcinoma. *Gene* 2011;489:98-102.
- 36- Yu J, Shen J, Sun TT, Zhang X, Wong N. Obesity, insulin resistance, NASH and hepatocellular carcinoma. *Semin Cancer Biol* 2013;6:483-91.
- 37- Malhotra N, Beaton MD. Management of non-alcoholic fatty liver disease in 2015. *World J Hepatol* 2015;7:2962-7.
- 38- Marengo A, Rosso C, Bugianesi E. Liver Cancer: Connections with Obesity, Fatty Liver, and Cirrhosis. *Annu Rev Med* 2016;67:103-17.
- 39- Enguita-Germán M, Fortes P. Targeting the insulin-like growth factor pathway in hepatocellular carcinoma. *World J Hepatol* 2014;6:716-37.
- 40- Weledji EP, Enoworock G, Ngowe MN. Gastric leiomyosarcoma as a rare cause of gastric outlet obstruction and perforation: a case report. *BMC Res Notes* 2014;7:479.
- 41- Venkitaraman AR. Tumour Suppressor Mechanisms in the Control of Chromosome Stability: Insights from BRCA2. *Molecules and cells* 2014;28:95-9.

- 42- Nishida N, Goel A. Genetic and Epigenetic Signatures in human hepatocellular carcinoma: a systematic review. *Current Genomics* 2011;12:130-7.
- 43- Wang Y, Ma W, Zheng W. Deguelin, a novel anti-tumorigenic agent targeting apoptosis, cell cycle arrest and anti-angiogenesis for cancer chemoprevention. *Mol Clin Oncol*. 2013;2:215-9.
- 44- Danielsen SA, Eide PW, Nesbakken A, Guren T, Leithe E, Lothe RA. Portrait of the PI3K/ AKT pathway in colorectal cancer. *Biochim Biophys Acta* 2015;1855:104-121.
- 45- Karar J, Maity A. PI3K/AKT/mTOR Pathway in Angiogenesis. *Front Mol Neurosci* 2011;4:51.
- 46- Layton MJ, Rynkiewicz N, Ivetac I, Horan KA, Mitchell CA, Phillips WA. Assessing the subcellular distribution of oncogenic phosphoinositide 3-kinase using microinjection into live cells. *Biosci Rep* 2014.
- 47- Hou W, Liu J, Chen P, Wang H, Ye BC, Qiang F. Mutation analysis of key genes in RAS/ RAF and PI3K/PTEN pathways in Chinese patients with hepatocellular carcinoma. *Oncol Lett* 2014;8:1249-54.
- 48- Tornesello ML ,Buonaguro L, Tatangelo F, Botti G, Izzo F, Buonaguro FM. Mutations in TP53, CTNNB1 and PIK3CA genes in hepatocellular carcinoma associated with hepatitis B and hepatitis C virus infections. *Genomics* 2013;102:74-83.
- 49- Lai K , Killingsworth MC , Lee CS . Gene of the month: PIK3CA. *J Clin Pathol* 2015;68:253-7.
- 50- Cheng L, Luo S, Jin C, Ma H, Zhou H, Jia L. FUT family mediates the multidrug resistance of human hepatocellular carcinoma via the PI3K/Akt signaling pathway. *Cell Death Dis* 2013;4:923.
- 51- Ou DL, Lee BS, Lin LI, Liou JY, Liao SC, Hsu C, et al. Vertical blockade of the IGFR- PI3K/ Akt/mTOR pathway for the treatment of hepatocellular carcinoma: the role of survivin. *Mol Cancer* 2014;13:2.
- 52- Gabelli SB , Echeverria I , Alexander M , Duong-Ly KC , Chaves-Moreira D, Brower ET, et al. Activation of PI3K by physiological effectors and by oncogenic mutations: structural and dynamic effects. *Biophys Rev* 2014;6:89-95.
- 53- Matsushima-Nishiwaki R , Kumada T, Nagasawa T, Suzuki M, Yasuda E, Okuda S, et al. Direct association of heat shock protein 20 (HSPB6) with phosphoinositide 3-kinase (PI3K) in human hepatocellular carcinoma: regulation of the PI3K activity. *PLoS One* 2013.

- 54- Berg M, Soreide K. EGFR and downstream genetic alterations in KRAS/BRAF and PI3K/AKT pathways in colorectal cancer: implications for targeted therapy. *Discov Med* 2012;14:207-14.
- 55- Worby CA, Dixon JE. PTEN. *Annu Rev Biochem* 2014;83:641-69.
- 56- Minami A, Nakanishi A, Ogura Y, Kitagishi Y, Matsuda S. Connection between Tumor Suppressor BRCA1 and PTEN in Damaged DNA Repair. *Front Oncol* 2014;4:318.
- 57- Ding J, Gao Y, Liu R, Xu F, Liu H. Association of PTEN polymorphisms with susceptibility to hepatocellular carcinoma in a Han Chinese population. *DNA Cell Biol* 2011;30:229-34.
- 58- Bassullu N, Turkmen I, Dayangac M, YagizKorkmaz P, Yasar R, Akyildiz M, et al. The Predictive and Prognostic Significance of c-erb-B2, EGFR, PTEN, mTOR, PI3K, p27, and ERCC1 Expression in Hepatocellular Carcinoma. *Hepat Mon* 2012;12:7492.
- 59- Worby CA, Dixon JE. PTEN. *Annu Rev Biochem* 2014;83:641-69.
- 60- Tian T, Nan KJ, Wang SH, Liang X, Lu CX, Guo H, et al. PTEN regulates angiogenesis and VEGF expression through phosphatase-dependent and -independent mechanisms in HepG2 cells. *Carcinogenesis* 2010;31:1211-9.
- 61- Garcia-Echeverria C, Sellers WR. Drug discovery approaches targeting the PI3K/Akt pathway in cancer. *Oncogene* 2008;18:5511-26.
- 62- Molinari F, Frattini M. Functions and Regulation of the PTEN Gene in Colorectal Cancer. *Front Oncol* 2014;3:326.
- 63- Kim M, Park HJ, Seol JW, Jang JY, Cho YS, Kim KR, et al. VEGF-A regulated by progesterone governs uterine angiogenesis and vascular remodelling during pregnancy. *EMBO Mol Med* 2013;5:1415-30.
- 64- Park YS, Jeon YJ, Kim HS, Chae KY, Oh SH, Han IB, et al. The role of VEGF and KDR polymorphisms in moyamoya disease and collateral revascularization. *PLoS One* 2012;7:47158.
- 65- Wu X, Xin Z, Zhang W, Wu J, Chen K, Wang H, et al. Polymorphisms in the VEGFA promoter are associated with susceptibility to hepatocellular carcinoma by altering promoter activity. *Int J Cancer* 2013;5:1085-93.
- 66- Dvorak HF. Tumor stroma, tumor blood vessels, and antiangiogenesis therapy. *Cancer J* 2015;21:237-43.
- 67- Klettner A, Kaya L, Flach J, Lassen J, Treumer F, Roider J. Basal and apical regulation of VEGF-A and placenta growthfactor in the RPE/choroid and primary RPE. *Mol Vis* 2015;21:736-48.

- 68- Rovenská E. Importance of lymphangiogenesis and ultra structure of lymphatic capillaries in metastasis of malignant melanoma. *VnitrLek* 2014;60:582-5.
- 69- Zhu Y, Zhao K, Prinz A, Keyvani K, Lambertz N, Kreitschmann-Andermahr I, et al. Loss of endothelial programmed cell death 10 activates glioblastoma cells and promotes tumor growth. *Neuro Oncol* 2015.
- 70- Rao PN. Nodule in liver: investigations, differential diagnosis and follow-up. *J Clin Exp Hepatol* 2014;4:57-62.
- 71- Della-Morte D, Riondino S, Ferroni P, Palmirotta R, Pastore D, Lauro D, et al. Impact of VEGF gene polymorphisms in elderly cancer patients: clinical outcome and toxicity. *Pharmacogenomics* 2015;16:61-78.
- 72- Koutras A, Kotoula V, Fountzilias G. Prognostic and predictive role of vascular endothelial growth factor polymorphisms in breast cancer. *Pharmacogenomics* 2015;16:79-94.
- 73- Rizvi S, Gores G. Molecular profiling and research of therapeutic targets. *Digestive Diseases* 2015;33:586-9.
- 74- Wu X, Xin Z, Zhang W, Wu J, Chen K, Wang H, et al. Polymorphisms in the VEGFA promoter are associated with susceptibility to hepatocellular carcinoma by altering promoter activity. *Int J Cancer* 2013;133:1085-93.
- 75- Scartozzi M, Faloppi L, Svegliati Baroni G, Loretelli C, Piscaglia F, Iavarone M, et al. VEGF and VEGFR genotyping in the prediction of clinical outcome for HCC patients receiving sorafenib. *International Journal of Cancer* 2014;135:1247-56.
- 76- Hsieh MC, Hsu HT, Hsiao PC, Yang SF, Yeh CB, Bien MY, et al. Role of VEGF-C gene polymorphisms in susceptibility to hepatocellular carcinoma and its pathological development. *J Clin Lab Anal* 2014;28:237-44.
- 77- Wu LM, Xie HY, Zhou L, Yang Z, Zhang F, Zheng S. A Single Nucleotide Polymorphism in the Vascular Endothelial Growth Factor Gene Is Associated with Recurrence of Hepatocellular Carcinoma after Transplantation. *Archives of Medical Research* 2009;40:565-70.
- 78- Giacalone A, Montalto G, Giannitrapani L, Balasus D, Terranova A, Cervello M, et al. *OMICS: A Journal of Integrative Biology* 2011;15:193-6.
- 79- Rini BI, Small EJ. Biology and clinical development of vascular endothelial growth factor-targeted therapy in renal cell carcinoma. *J Clin Oncol* 2005;23:1028-43.
- 80- Penna SDJ. Dossiê raça, genética, identidades e saúde. 2005;12:321-46.



- 81- Salazar LA, Hirata MH, Cavalli SA, Machado MO, Hirata RDC. Optimized Procedure for DNA Isolation from Fresh and Cryopreserved Clotted Human Blood Useful in Clinical Molecular Testing. *Clinical Chemistry* 1998;44:1748-50.
- 82- Cicinnati VR, Shen Q, Sotiropoulos GC, Radtke A, Gerken G, Beckebaum S. Validation of putative reference genes for gene expression studies in human hepatocellular carcinoma using real-time quantitative RT-PCR. *BMC Cancer* 2008;8:350.
- 83- Gao Q, Wang XY, Fan J, Qiu SJ, Zhou J, Shi YH. Selection of reference genes for real-time PCR in human hepatocellular carcinoma tissues. *J Cancer Res Clin Oncol* 2008;134:979-86.
- 84- Ministério da Saúde. Cadernos de Atenção Básica nº15. Hipertensão arterial sistêmica. Brasília-DF. Normas e Manuais Técnicos. 2006; [http:// dab.saude.gov.br/docs/publicacoes/cadernos\\_ab/abcd](http://dab.saude.gov.br/docs/publicacoes/cadernos_ab/abcd)
- 85- Ministério da Saúde. Cadernos de Atenção Básica, nº16. Diabetes Mellitus. Brasília-DF. Normas e Manuais Técnicos. 2006; [http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/diabetes\\_mellitus](http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/diabetes_mellitus).
- 86- World Health Organization. Guidelines for the conduct of the tobacco smoking surveys of the general population: report of a meeting. 1992.
- 87- Excoffier L, Laval G, Schneider S, Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis, *Evol. Bioinform. Online* 2005:47-50.
- 88- Barrett JC, Fry B, Maller J, Daly MJ. Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics* 2005;21:263-5.
- 89- Mancuso A, Perricone G. Hepatocellular Carcinoma and Liver Transplantation: State of the Art. *J Clin Transl Hepatol* 2014;2:176-81.
- 90- Sangiovanni A, et al. Increased survival of cirrhotic patients with a hepatocellular carcinoma detected during surveillance 2004;126:1005-14.
- 91- Basto ST, Villela Nogueira CA, Tura BR, Coelho HS, Ribeiro J, Fernandes ES et al. Risk factors for long-term mortality in a large cohort of patients wait-listed for liver transplantation in Brazil. *Liver Transpl* 2011;17:1013-20.
- 92- World Health Organization. GLOBOCAN 2012: Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012 [Internet]. França; 2014. [acesso em 2014 Ago 02]. Disponível em: <http://globocan.iarc.fr>.

- 93- Lv Y, Liu C, Wei T, Zhang JF, Liu XM, Zhang XF. Cigarette smoking increases risk of early morbidity after hepatic resection in patients with hepatocellular carcinoma. *Eur J Surg Oncol* 2015;41:513-9.
- 94- Fullwood, D. Alcohol-related liver disease. *Nurs Stand* 2014;28:42-7.
- 95- Raff EJ, Kakati D, Bloomer JR, Shoreibah M, Rasheed K, Singal AK. Diabetes Mellitus Predicts Occurrence of Cirrhosis and Hepatocellular Cancer in Alcoholic Liver and Non-alcoholic Fatty Liver Diseases. *J Clin Transl Hepatol* 2015;3:9-16.
- 96- Kikuchi L, Oliveira CP, Carrilho FJ. Nonalcoholic fatty liver disease and hepatocellular carcinoma. *Biomed Res Int* 2014.
- 97- Raffetti E, et al. Role of a etiology, diabetes, tobacco smoking and hypertension in hepatocellular carcinoma survival. *Dig Liver Dis* 2015;15:416-8.
- 98- Choi KS, Kim DS, Jung SW, Yu YD, Suh SO. Influence of metabolic and other clinicopathologic factors on the prognosis of patients with hepatocellular carcinoma undergoing hepatic resection. *Korean. J Hepatobiliary Pancreat Surg* 2014;18:105-11.
- 99- Jing, F, Mao Y, Zhang Z, Li Y, Cai S, Li Q, et al. The association of phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10 polymorphisms and lifestyle habits with colorectal cancer risk in a Chinese population. *Tumour. Biol* 2014;35:9233-40.
- 100- Aguilar PO, Frías JR. Aplicación de la genética de poblaciones en el ámbito de la medicina. *Biomédica* 2014;34:171-9.
- 101- Xu J, Turner A, Little J, Bleecker ER, Meyers DA. Positive results in association studies are associated with departure from Hardy-Weinberg equilibrium: hint for genotyping error? *Hum Genet* 2002;111:573-4.
- 102- Wittke-Thompson JK, Pluzhnikov A, Cox NJ. Rational inferences about departures from Hardy-Weinberg equilibrium. *Am J Hum Genet* 2005;76:967-86.
- 103- Hosgood HD 3rd, Menashe I, He X, Chanock S, Lan Q. PTEN identified as important risk factor of chronic obstructive pulmonary disease. *Respir Med* 2009;103:1866-70.
- 104- Jang Y, Lu SA, Chen ZP, Ma J, Xu CQ, Zhang CZ, et al. Genetic polymorphisms of CCND1 and PTEN in progression of esophageal squamous carcinoma. *Genet Mol Res* 2013;12:6685-91.
- 105- Kaseb AO, Hanbali A, Cotant M, Hassan MM, Wollner I, Philip PA. Vascular endothelial growth factor in the management of hepatocellular carcinoma. *Cancer* 2009;115:4895-4906.

106- Koukourakis MI, Papazoglou D, Giatromanolaki A, Bougioukas G, Maltezos E, Sivridis E. VEGF gene sequence variation defines VEGF gene expression status and angiogenic activity in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 2004;46:293-8.

107- Zhai R, Gong MN, Zhou W, Thompson TB, Kraft P, Su L, et al. Genotypes and haplotypes of the VEGF gene are associated with higher mortality and lower VEGF plasma levels in patients with ARDS. *Thorax* 2007;62:718-22.

108- Wang YH, Yeh SD, Wu MM, Liu CT, Shen CH, Shen KH, et al. Comparing the joint effect of arsenic exposure, cigarette smoking and risk genotypes of vascular endothelial growth factor on upper urinary tract urothelial carcinoma and bladder cancer. *J Hazard Mater* 2013;262:1139-46

109- Peyrou M, Bourgoin L, Foti M. PTEN in liver diseases and cancer. *World J Gastroenterol* 2010;16:4627-33.

110- Lu Y, et al. Alcohol promotes mammary tumor growth through activation of VEGF-dependent tumor angiogenesis. *Oncol Lett.* 2014;8:673-8.

111- Michelotti GA, Machado MV, Diehl AM. NAFLD, NASH and liver cancer. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2013;10:656-65.

112- Yang Q, et al. Associations of the PTEN -9C>G polymorphism with insulin sensitivity and central obesity in Chinese. *Gene* 2013;527:545-52.

113- Stumpf C, Fan Q, Hintermann C, Raaz D, Kurfürst I, Losert S, et al. Anti-inflammatory effects of danshen on human vascular endothelial cells in culture. *Am J Chin Med* 2013;41:1065-77.

114- Kim YR, Hong SH. The Protective Effects of the VEGF -2578C>A and -1154G>A Polymorphisms Against Hypertension Susceptibility. *Genet Test Mol Biomarkers* 2015; 19:476-80.

115- Shahbazi M, Fryer AA, Pravica V, Brogan IJ, Ramsay HM, Hutchinson IV, et al. Vascular endothelial growth factor gene polymorphisms are associated with acute renal allograft rejection. *J Am Soc Nephrol* 2002;13:260-4.

116- Zheng RD, Chen JN, Zhuang QY, Lu YH, Chen J, Chen BF. Clinical and virological characteristics of chronic hepatitis B patients with hepatic steatosis. *Int J Med Sci* 2013;10:641-6.

- 117- Meng F, Henson R, Wehbe-Janek H, Ghoshal K, Jacob ST, Patel T. MicroRNA-21 regulates expression of the PTEN tumor suppressor gene in human hepatocellular cancer. *Gastroenterology* 2007;133:647-58.
- 118- Zhao B, Zhu Y, Cui K, Gao J, Yu F, Chen L, Li S. Expression and significance of PTEN and miR-92 in hepatocellular carcinoma. *Mol Med Rep* 2013;7:1413-6.
- 119- Zhou X, Zhu H, Lu J. PTEN and hTERT gene expression and the correlation with human hepatocellular carcinoma. *Pathol Res Pract* 2015;211:316-9.
- 120- Chen JS, Wang Q, Fu XH, Huang XH, Chen XL, Cao LQ. Involvement of PI3K/PTEN/AKT/mTOR pathway in invasion and metastasis in hepatocellular carcinoma: Association with MMP-9. *Hepatol Res* 2009;39:177-86.
- 121- Yang DH, Fu ZY, Huang Y, Zeng QY, Zhou J. Expression and mutations of PIK3CA gene in hepatocellular carcinomas. Article in Chinese. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao* 2009;29:2517-22.
- 122- Yang Z, Yi J, Li X, Long W. Correlation between loss of PTEN expression and PKB/AKT phosphorylation in hepatocellular carcinoma. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci* 2005;25:45-7.
- 123- You J, Yang H, Lai Y, Simon L, Au J, Burkart AL. ARID2, p110 $\alpha$ , p53, and  $\beta$ -catenin protein expression in hepatocellular carcinoma and clinicopathologic implications. *Hum Pathol* 2015;46:1068-77.



## ANEXO I - Termo de Consentimento

### TERMO DE ESCLARECIMENTO LIVRE E PÓS-ESCLARECIDO

1) Dados de identificação do paciente

Amostra: \_\_\_\_\_ Prontuário: \_\_\_\_\_  
 Nome: \_\_\_\_\_  
 Sexo: \_\_\_\_\_ Data de Nascimento: \_\_\_\_\_ Telefone: \_\_\_\_\_  
 Endereço: \_\_\_\_\_ Bairro: \_\_\_\_\_  
 Cidade: \_\_\_\_\_ Estado: \_\_\_\_\_ CEP: \_\_\_\_\_

2) Dados sobre a pesquisa científica:

Título do projeto: **“Influência de Fatores Clínicos, Genéticos e Bioquímicos no Carcinoma Hepatocelular”**

Pesquisador: Profa. Dra. Rita de Cássia Martins Alves da Silva

Instituição: Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto

Endereço: Avenida Brigadeiro Faria Lima, 5416

Você está sendo convidado (a) a participar de uma pesquisa intitulada: **“Influência de Fatores Clínicos, Genéticos e Bioquímicos no Carcinoma Hepatocelular”**

Essa pesquisa inclui pacientes com diagnóstico de câncer e também pacientes sem a doença, e é importante para verificar se existem substâncias alteradas nas suas células relacionadas com problemas no fígado. Sua participação consiste doar uma pequena amostra de sangue e/ou autorizar a utilização da amostra de biópsia já realizada (no caso de paciente em tratamento, feita por médico responsável) para fazer exames bioquímicos e genéticos. O material biológico coletado será armazenado para estudos futuros. Os riscos são mínimos e conhecidos, como discreta dor de picada de agulha e, às vezes, uma mancha arroxeadada no local que desaparece em poucos dias. No caso de anormalidades nos exames você será comunicado e orientado para tratamento, se necessário. Queremos deixar claro que o seu nome nunca será divulgado, nem a origem das informações que você fornecer. Este projeto é coordenado pela Profa. Dra. Rita de Cássia Martins Alves da Silva e durante a pesquisa você poderá tirar qualquer dúvida a respeito do trabalho e se necessário, entrar em contato pelo telefone (17) 3201-5864, na Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto – FAMERP. Você não terá nenhuma despesa com a pesquisa. Caso você não aceite ou desista de participar da nossa pesquisa, isto não influenciará em hipótese alguma no seu atendimento e tratamento. Se você tiver alguma dúvida sobre esse acordo ou sobre seus direitos, você poderá ainda entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, pelo telefone (17) 3201-5813.

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

\_\_\_\_\_  
Pesquisador responsável

\_\_\_\_\_  
Assinatura do paciente ou responsável

## Questionário

Caso (CHC)  Controle Amostra: \_\_\_\_\_

### 1. IDENTIFICAÇÃO

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

Prontuário: \_\_\_\_\_ Data de Nascimento e Idade: \_\_\_\_\_

Sexo \_\_\_\_\_ Naturalidade: \_\_\_\_\_

Endereço: \_\_\_\_\_

Telefone: \_\_\_\_\_

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

CEP: \_\_\_\_\_

### 2. HISTÓRICO MÉDICO

#### Fatores de risco:

I.  Cirrótico II.  Vírus B III.  Vírus C IV.  Esteatohepatite V.  Álcool > 20gr/dia VI.  
 Hemocromatose VII.  Doença de Wilson VIII.  Hepatite auto-imune IX.

Viveu no campo: \_\_\_\_\_ por quanto tempo? \_\_\_\_\_

Teve contato com agrotóxicos: \_\_\_\_\_ X. Outra doença hepática:  Sim, qual? \_\_\_\_\_

XI. Hipertensão: \_\_\_\_\_ XII. Diabetes: \_\_\_\_\_ Outras doenças: \_\_\_\_\_

Medicamentos em Uso: \_\_\_\_\_

#### Exame Físico Geral

Peso: \_\_\_\_\_ kg Altura: \_\_\_\_\_ m IMC: \_\_\_\_\_ Qual foi o maior peso? \_\_\_\_\_ kg

Há quanto tempo? \_\_\_\_\_ Por quanto tempo? \_\_\_\_\_

PAS: \_\_\_\_\_ PAD: \_\_\_\_\_

### 3. DADOS DO TUMOR:

#### I) Diagnóstico:

1.  Imagem

2. Wash Out?  sim  **Diagnóstico**

não  3. Dosagem de  $\alpha$ -fetoproteína

Menor que 200  **Diagnóstico**

Menor que 200  **Biópsia**

#### II) Localização e Tipo

Segmentos: \_\_\_\_\_ Invasão Vascular?  Sim  Não

Tipo:  nodular: n°. de nódulos: \_\_\_\_\_ Diâmetro dos nódulos: \_\_\_\_\_  infiltrativo

#### III) Tratamento recebido:

Transplante  Ressecção  Quimioembolização (TACE)  Alcoolização

Sorafenib  RF (Radio Freqüência)  Medidas de suporte  Metástase?

Onde: \_\_\_\_\_

### 4. HISTÓRIA FAMILIAR

Apresenta familiares em 1º grau (pais, irmãos) com CHC: \_\_\_\_\_

Outros tipos de cânceres: \_\_\_\_\_

Pesquisador responsável pela entrevista: \_\_\_\_\_

**ANEXO II – Aprovação do Comitê de Ética****FACULDADE DE MEDICINA DE SÃO JOSÉ DO RIO PRETO**

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

Parecer n.º 435/2011

**COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA**

O Protocolo CEP n.º 6910/2011 sob a responsabilidade de Rita de Cássia Martins Alves da Silva com o título "Influência de fatores clínicos, genéticos e bioquímicos no Carcinoma Hepatocelular" está de acordo com a Resolução do CNS 196/96 e foi aprovado por esse CEP.

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

São José do Rio Preto, 13 de dezembro de 2011.



**Prof. Dr. Fernando Batigália**  
Presidente do CEP/FAMERP





Comitê de Ética em  
Pesquisa em Seres Humanos  
CEP/FAMERP

## COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

O Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto aprova a extensão de projeto intitulada "Expressão gênica e haplótipos de genes envolvidos na sinalização celular e o risco para carcinoma hepatocelular", referente ao protocolo CEP nº 6910/2011 sob a responsabilidade de Rita de Cássia Martins Alves da Silva, com o título "Influência de fatores clínicos, genéticos e bioquímicos no Carcinoma Hepatocelular".

São José do Rio Preto, 14 de fevereiro de 2014.

*Luciano Garcia Lourenção*  
Prof. Dr. Luciano Garcia Lourenção  
Vice-Presidente do CEP/FAMERP



**APÊNDICE I** – Artigo Publicado (*Canadian Journal of Gastrohenterology and Hepatology*)

**VEGF Polymorphisms Related to Higher Serum Levels of Protein Identify Patients with Hepatocellular Carcinoma**

Maria E. Lopes-Baitello<sup>1</sup>, Graciele Domitilia-Tenani<sup>1</sup>, Rafael Fernandes-Ferreira<sup>1</sup>, Victor Nogueira<sup>1</sup>, Marcela A. Souza-Pinhel<sup>1</sup>, Rita C. M. Alves-da Silva<sup>2</sup>, Renato Ferreira-da Silva<sup>3</sup>, Patrícia da Silva-Fucuta<sup>2</sup>, Moacir Fernandes de Godoy<sup>1</sup>, Dorotéia R. Silva-Souza<sup>1</sup>.

1- Research Centre for Biochemistry and Molecular Biology, Medical School of São José do Rio Preto/FAMERP, São José do Rio Preto, Brazil.

2- Hepatology Unit, HB University Medical Centre – FUNFARME/FAMERP, São José do Rio Preto, Brazil.

3- Liver Transplantation Unit - HB University Medical Centre - FUNFARME/FAMERP, São José do Rio Preto, Brazil.

**Keywords:** Cirrhosis, Neoplasia, Liver, Angiogenesis, Genetic Factors.

**List Footnotes:**

**Contact Information:**

Maria Eduarda Lopes Baitello

Medical School of São José do Rio Preto (FAMERP)

Av. Brigadeiro Faria Lima, 5416 – Vila São Pedro

São José do Rio Preto SP/Brazil/ CEP: 15090-000

Phone: +55 (17) 991074497

Email: [duda\\_lps@hotmail.com](mailto:duda_lps@hotmail.com)

**Abbreviations:**

**HCC:** Hepatocellular carcinoma

**HBV:** Hepatitis B virus

**HCV:** Hepatitis C virus

**VEGF:** Vascular endothelial growth factor

**BCLC:** Barcelona Clinic Liver Cancer

**Grants:** 2012/19826-3, Research Support Foundation of the State of São Paulo (FAPESP).

**ABSTRACT:**

Hepatocellular carcinoma (HCC) is the most common primary neoplasia of the liver. Major risk factors for hepatocellular carcinoma include chronic liver diseases, carcinogenic agents and genetic alterations, as well as vascular endothelial growth factor (VEGF) involved in angiogenesis process. The aim of this study was to evaluate the association of *VEGF-A* (C936T and A1154G) with HCC and cirrhosis, in addition to serum levels of VEGF, clinical profile, lifestyle habits and comorbidities. A total of 346 individuals were studied: 102 with HCC (G1), 117 with cirrhosis (G2) and 127 controls (G3). Polymorphisms were analysed by PCR/RFLP and serum levels of VEGF by ELISA. Alpha error was set at 5%. The wild-type genotype of both polymorphisms prevailed ( $P > 0.05$ ). In G1, 23% of the patients died, with no relation with genetic profile ( $P > 0.05$ ). Alcohol consumption prevailed in G1 (56%) and G2 (50%) versus G3 (13%,  $P < 0.0001$  for both), and smoking in G1 (50%) versus G3 (21%;  $P < 0.0001$ ).

Increased VEGF level was observed in G1 and G3, related to the mutant allele of *VEGF-C936T* and *VEGF-A1154G*, respectively, compared with the wild-type genotype ( $P=0.0285$ ;  $P=0.284$ , respectively), as well as G1 vs G2 and G3 for *VEGF-C936T*, and G1 vs G2 for *VEGF-A1154G* ( $P<0.05$  for both). In conclusion, there is a relationship between mutant alleles of *VEGF-C936T* and *VEGF-A1154G* polymorphisms and higher VEGF level, making them a potential marker for HCC.

## INTRODUCTION

Hepatocellular carcinoma (HCC) is the most common primary neoplasia of the liver, with increasing incidence and mortality (1). In this context, emphasis should be given to Africa and especially to Asia, as China accounts for approximately 50% of world's HCC cases (2). On the other hand, there is low incidence of the disease in North America and South America, as well as in Europe (3). High mortality is mainly due to the lack of follow-up of patients with chronic liver disease (4). Imaging techniques, such as ultrasound, computed tomography and magnetic resonance are used for the diagnosis of the disease. In cases where X-ray exams have produced inconclusive results, histology is considered the gold standard (5).

HCC is a solid and well-vascularized malignant tumour, which usually develops from a chronic liver disease, being the cirrhosis responsible for 80-90% of cases. Hepatitis B virus (HBV) and C virus (HCV), alcohol consumption, smoking and exposure to aflatoxins are also associated with an increased risk of developing the disease. Recently, the incidence of HCC has grown up by hepatic steatosis(6, 7, 8, 9).

Hepatocarcinogenesis can also result from the combination of genetic and epigenetic alterations in multiple signalling pathways, which affect cell proliferation, angiogenesis, cell invasion and vascular permeability, leading to metastasis (10).

Neovascularization is an important mechanism in the pathogenesis of HCC because it contributes to the transition from dysplastic liver nodules into malignant phenotype (11). In this context, the vascular endothelial growth factor - A (VEGF-A) has been reported as an important angiogenic factor in developing HCC (12). The VEGF family consists of four *VEGF* genes (A-D) located in the human chromosome 6p21.3, which encode proteins that activate multiple signalling networks and promote endothelial cell growth, migration, differentiation and control of vascular permeability (13,14). Studies show that *VEGF-A* polymorphisms are associated with an alteration in the promoter region of the gene, reflecting changes in plasma levels of the protein (15,16).

This study evaluated the association of *VEGF-A* polymorphisms (C936T and A1154G) with cirrhosis, HCC and respective clinical classification, in addition to serum levels of VEGF and survival in HCC. It also considered risk factors for the disease, including comorbidities and lifestyle habits.

## **METHODS**

### **Materials**

This case-control study included 346 individuals treated at the Hepatology Unit of the Hospital de Base University Medical Centre (HB) at the Medical School of São José do Rio Preto (FAMERP). They were divided into three groups: G1 - 102 patients with HCC; G2 - 117 patients with cirrhosis; G3 - 127 individuals without the disease (controls). The patients were classified according to the staging system set by *Barcelona Clinic Liver Cancer (BCLC)* in G1. Control subjects were selected at the Blood Centre at HB/FAMERP and were tested for blood borne infections (17), including HBV and HCV. All participants were informed of the study and signed an

Informed Consent Document. The project was approved by the Research Ethics Committee - CEP/FAMERP (Protocol number: 6910/2011).

### Genotyping

Genomic DNA was extracted from leukocytes of the total peripheral blood with EDTA using salting-out method (18). The genotyping was performed by PCR / RFLP (polymerase chain reaction/restriction fragments length polymorphism) with a final volume of 25 $\mu$ L for the reactions, as follows: 12.55 $\mu$ L of sterile MilliQ water, 2.5 $\mu$ L of DMSO (dimethyl sulfoxide), 2.5 $\mu$ L of 10x PCR buffer, 1.25 $\mu$ L of DNTP mix (10mM) (deoxy ribonucleotide triphosphate mix), 1.25 $\mu$ L of P1 primer (10 pmol/ $\mu$ L), 1.25 $\mu$ L of P2 primer (10 pmol/ $\mu$ L), 1.5  $\mu$ L of MgCl<sub>2</sub> (25mM), 1U of Taq DNA polymerase (Thermo Scientific, Thermo Fisher Scientific, Inc., Massachusetts, USA) and 100ng of DNA. PCR was performed under the following conditions: 5 minutes at 95°C, followed by 35 cycles at 95°C for 45 seconds, 61°C for 45 seconds, 72°C for 45 seconds and finally at 72°C for 7 minutes. The primers used for genotyping were F5'-TAAATGTATGTATGTGGGTGGGTGTGTCACAGG-3' and R5'-AAGGAAGAGGAGACTCTGCGCAGAGC-3' for *VEGF-C936T* and F5'-TCCTGCTCCCTCCTCGCCAATG-3' and R5'-GGCGGGGACAGGCGAGCATC-3' for *VEGF-A1154G*. The amplification product was subjected to enzyme restriction with *Nla*III(*VEGF-C936T*) and *Mn*II (*VEGF-A1154G*), followed by staining with GelRed (Uniscience, São Paulo, Brasil) and agarose gel electrophoresis of 2.5% and 4%, respectively. C-alleles(208 base pairs–bp) and T-alleles (122bp and 86bp) were identified for *VEGF-C936T*, and A-alleles (184bp and 22bp) and G-alleles (150bp, 34bp and 22bp) were identified for *VEGF-A1154G*. Serum VEGF levels were obtained using ELISA (Enzyme-linked immunosorbent

assays, R & D System, Inc., Minneapolis, USA), in compliance with the manufacturer's instructions. For qualitative analysis, the reference value was set at 186.7pg/mL, obtained by the cut-off value of the Receiver Operating Characteristic curve (ROC). The clinical classification of the patients was made based on the BCLC (A, B, C or D) and Child-Pugh staging system (A, B or C), according to the clinical practice guidelines of the American Association for the Study of Liver Diseases (5). Patients classified as B and C of BCLC have been grouped due to the lack of portal invasion and/or metastasis of data from medical records of patients.

### **Statistical analysis**

The comparative analyses of allele frequencies and genotype distributions among the groups, as well as of further qualitative variables, were performed using the Chi-Square test with Yates correction or Fisher's exact test. Statistical models used for genetic profile analysis were dominant, recessive and heterozygous. For the analysis of the Hardy-Weinberg equilibrium (HW), Chi-Square test was applied. Survival was analysed by Kaplan-Meier method and the results were compared by the Log Rank test. Quantitative variables were analysed using the Mann-Whitney test (within groups) and Kruskal Wallis (between groups). For sensitivity evaluation, specificity, positive predictive value and negative predictive value, the ROC curve was used, considering areas under the curve  $\geq 0.7$  as clinical relevant. A box-plot graphical representation was used, including minimum, interquartile range, median and maximum values, as well as possible outliers. Alpha error was set at 5%. The programs used in the analyses were Minitab, Stats Direct and GraphPad.

## **RESULTS**



Demographic profiles, lifestyle habits, comorbidities and clinical classification of patients are shown in Table 1. Men accounted for 75% of subjects in all groups ( $P < 0.05$ ). There was a higher frequency of alcohol in G1 (56%) and G2 (50%), compared with controls (13%;  $P < 0.0001$  for both). Yet, smoking prevailed in G1 (50%), compared with G3 (21%;  $P < 0.0001$ ). G1 showed higher frequency of cirrhosis (84%), followed by HCV (50%) and HVB (21%), the same occurred for G2 (49% and 10%;  $P = 0.957$ ,  $P = 0.052$ , respectively). The clinical classification of BCLC was performed in 89 patients in G1, with 31% belonging to the A classification, 59% to B or C and 10% to D.

Table 2 shows the *VEGF-A* polymorphisms. The wild-type homozygous genotype for C936T (C/C) prevailed in G1 (71%), G2 (72%) and G3 (71%), as well as the wild-type allele ( $C = 0.85$ ) in all groups. For the A1154G polymorphism, the wild-type genotype (G/G) also prevailed in all groups (60%, 51%, 57%, respectively), as well as the wild-type allele ( $G = 0.77$ ; 0.74; 0.76, respectively), with no significant difference between the groups ( $P > 0.05$ ). HW equilibrium for both polymorphisms was observed in all groups ( $P > 0.05$ ).

Figure 1 shows the association between *VEGF-A* polymorphisms and survival of patients with HCC after 36 months of diagnosis. For *VEGF-C936T*, this study considered the heterozygous genotype (C/T) versus wild-type homozygous genotype (C/C), since homozygous mutant genotypes could not be found in the sample. Among patients, 72 (71%) had genotype C/C, of whom 14 (19%) died, with survival of  $56.2 \pm 10.9\%$  in 36 months. For the C/T genotype, 9 of 30 patients (30%) died, with survival of  $49.5 \pm 13.8\%$  in 36 months ( $P = 0.582$ ). For *VEGF-A1154G*, the dominant statistical model ( $\_ / A \times G/G$ ) was considered. Among 61 (60%) patients with G/G genotype, 11 (18%) died, corresponding to survival of  $60.8 \pm 11.3\%$  in 36 months of follow-up. As

for the genotype  $\_ / A$ , 12 (29%) of 41 patients died, with survival rate of  $48.3 \pm 12.1\%$  in 36 months ( $P = 0.186$ ).

Table 3 shows the relationship between polymorphisms with BCLC clinical classifications in G1. The wild-type alleles and genotypes for both polymorphisms prevailed in all classifications, with no statistical difference ( $P > 0.05$ ). Increased serum levels of VEGF (Figure 2) were observed in G1 (264.8pg/mL), compared with G2 and G3 (182.8pg/ mL; 182.2pg/mL;  $P = 0.0007$  and  $P = 0.0026$ , respectively). Serum VEGF levels were also analysed according to the genetic profile (Table 4). In HCC patients, the elevated serum levels were related to the mutant allele of *VEGF-C936T* (430.0pg/mL), compared with the wild-type genotype (250.5pg/mL;  $P=0.0285$ ), and also with G2 (173.5pg/mL) and G3 (113.9pg/mL) ( $P=0.0038$ ). In relation to *VEGF-A1154G* the serum levels of VEGF were increased in controls with the mutant allele ( $\_ / A = 185.2$ pg/mL) compared with genotype G/G (182.2pg/mL;  $P=0.0284$ ). The comparative analysis also showed a significant increase in serum levels of VEGF in the presence of the mutant allele in G1 (297.8pg/mL) compared to G2 (183.3pg/mL;  $P=0.0069$ ).

Predictive analysis of serum VEGF levels in the presence of the mutant allele was performed for both polymorphisms (Figure 3). For the *VEGF-C936T*, comparison between G1 and G2 showed area under the curve of 0.80 (0.60 - 1.0), with 63% of sensitivity and 93% of specificity for cut-off of 311.8 pg/mL. The comparison between G1 and G3 for the same polymorphism showed an area under the curve 0.89 (0.61 - 1.0), with 75% of sensitivity and 100% of specificity for the cut-off of 225.5 pg/mL. *VEGF-A1154G* analysis between G1 and G2 showed an area under the curve of 0.76

(0.60 - 0.92), with sensitivity of 76% and specificity of 65% for the cut-off of 222.1 pg/mL.

## DISCUSSION

This study evaluated demographic profile, lifestyle, comorbidities and clinical classification of patients with HCC and their association with *VEGF-A* polymorphisms, a key angiogenic factor in the development of HCC (12). Men prevailed among patients, in agreement with global estimates (71%) (3). Alcohol consumption prevailed among patients with HCC and those with cirrhosis, compared with controls. The association between chronic liver diseases and alcohol consumption is well established (19,20). Alcohol intake causes damage to the liver tissue, due to the action of endotoxins, oxidative stress and inflammation, causing fibrosis in the hepatic tissue, which contributes to the development of cirrhosis and HCC (21). There was a higher frequency of smoking among patients with HCC, in agreement with another study that compared such association with the exposure to mutagenic and carcinogenic components (22).

Prevalence of cirrhosis in HCC patients was also observed in this study, followed by HCV and HBV, consistent with an epidemiological study, whose frequencies varied between 80-90% for cirrhosis and 44-66% for HCV in HCC cases, but indicated the presence of HBV in 50% of patients (23). The lowest HBV index in this study can be explained by increased access of this population to immunizations, compared with the world population, especially in Asia and Africa, where HBV infection is highly endemic (24).

The studied polymorphisms are located in the promoter region of *VEGF-A* (A1154G) and 3'UTR (C936T). They are important angiogenesis signalling pathways related to the development and prognosis of HCC, a well-vascularized solid tumour which depends on neovascularization for its growth (25). In this case, the relationship between the respective mutant alleles and decreased expression and plasma levels of VEGF has been reported, which may be a protective factor against the development of HCC (26,27). However, this study did not find an association of *VEGF-C936T* as well as *VEGF-A1154G* with cirrhosis or HCC. There are reports of these polymorphisms in susceptibility to HCC in Italian and Chinese populations, which may also suggest relationship between ethnicity and *VEGF* variants (28,16).

Analysis of the survival curve considering *VEGF-A1154G* and *VEGF-C936T* polymorphisms was performed, showing decreased survival, although without significance, in the presence of the mutant allele for both polymorphisms. These findings agreed with other study that showed an association of the homozygous mutant genotype *VEGF-A1154G* with increased risk of death for HCC (29). However, the small sample size may have been a limiting factor in the present study.

Although studies about the association between *VEGF* polymorphisms and survival in HCC are scarce, its influence on other types of cancer, such as colorectal and oesophagus, is recognised (30,31). Furthermore, the wild-type allele of *VEGF-A1154G* polymorphism was associated with poor survival in a Caucasian population with oral squamous cell carcinoma (32). But the results are still diverging (33,34,35,36). Increased serum levels of VEGF could only be observed in the HCC group, compared with the group with cirrhosis and controls, in agreement with a study by Mukozu et al. (2013)(37). In this case, emphasis should be given to the relationship between VEGF and neovascularization and cell proliferation, both related to carcinogenesis,

demonstrating the predictive value of VEGF for HCC. Analysis of serum VEGF levels according to the studied polymorphisms showed significant association between mutant alleles of both polymorphisms and increased serum VEGF levels, in agreement with a study, which showed the relationship between the mutant genotype of A1154G with poor prognosis in patients with HCC (38). On the other hand, there are studies in which the mutant allele of *VEGF-C936T* was associated with decreased serum VEGF levels (15, 39).

Additionally, increased serum level of VEGF was observed in patients with HCC, particularly in the presence of the mutant alleles, compared with patients with cirrhosis and controls. This association highlights the action of the gene to promote vascularization and cell proliferation (40,41) and strengthens the relationship between *VEGF* mutation and its serum level, contributing to the development of the disease. Serum levels of VEGF have been studied as potential markers for HCC. El-Sherif et al. (2012) reported a sensitivity of 60% and specificity of 92% for cut-off of 268.0 pg / mL (42). El-Houseini et al. (2005) found 86.4% of sensitivity and 60% of specificity for the cut-off of 355.2 pg / mL (43). In this study, the association of serum VEGF levels with the mutant alleles of *VEGF-A* (C936T and A1154G) showed cut-off value of 225.5pg/ mL, with specificity of 100% and sensitivity of 75% (C936T) comparing G1 and G3, conferring potential to serum VEGF levels in the diagnosis of HCC, which should be confirmed in numerous patient samples.

In conclusion, this study showed that *VEGF-A* polymorphisms (C936T and A1154G) are not associated with cirrhosis, HCC and survival. However, the relationship between increased serum levels of VEGF and the presence of mutant alleles of both polymorphisms should be emphasized, which may contribute to the diagnosis and prognosis of HCC.

## ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to thank Helen Catharine Camarero Felicio and Sabrina Mayara Cesario Gimenez for their technical support, which strongly facilitated the implementation of this study. They also thank the team at the Gastroenterology Clinic of HB University Medical Centre in São José do Rio Preto for their collaboration during selection and care of patients.

## REFERÊNCIAS

- (1) Gomes MA, Priolli DN, Tralhão JG, Botelho MF. Carcinoma hepatocelular: epidemiologia, biologia, diagnóstico e terapias. *Rev Assoc Med Bras*. 2013; 59(5): 514-524.
- (2) World Health Organization. GLOBOCAN 2012: Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012 [Internet]. França; 2014. [cited in 2015 Ago 02]. Available in: <http://globocan.iarc.fr>.
- (3) Lafaro KJ, Demirjian AN, Pawlik TM . Epidemiology of hepatocellular carcinoma. *Surg Oncol Clin N Am*. 2015; 24: 1-17.
- (4) Asghar U, Meyer T. Are there opportunities for chemotherapy in the treatment of hepatocellular cancer? *J Hepatol*. 2012; 56(3): 686-95.
- (5) Bruix J, Sherman M. Management of hepatocellular carcinoma: an update. *Hepatology*. 2011; 53(3): 1020-2.
- (6) Crissien AM, Frenette C. Current Management of Hepatocellular Carcinoma. *Gastroenterol Hepatol*. 2014; 10(3): 153-161.
- (7) Flores A, Marrero JA. Emerging Trends in Hepatocellular Carcinoma: Focus on Diagnosis and Therapeutics. *Clin Med Insights Oncol* .2014; 8: 71-76.

- (8) Shih WL, Chang HC, Liaws YF, Lin SM, Lee SD, Chen PJ, et al. Influences of tobacco and alcohol use on hepatocellular carcinoma survival. *Int J Cancer*. 2012; 131: 2612-2621.
- (9) Felizardo RJF, Câmara NOS. Hepatocellular carcinoma and food contamination: Aflatoxins and ochratoxin A as great prompter. *World J Gastroenterol*. 2013; 19(24): 3723-3725.
- (10) Moeini A, Cornellà H, Villanueva A. Emerging Signaling Pathways in Hepatocellular Carcinoma. *Liver Cancer*. 2012; 1: 83-93.
- (11) Fernandez M, Semela D, Bruix J, Colle I, Pinzani M, Bosch J. Angiogenesis in liver disease. *J Hepatol*. 2009; 50(3): 604-620.
- (12) Coulon S, Heindryckx F, Geerts A, Steenkiste CV, Colle I, Vlierberghe HV. Angiogenesis in chronic liver disease and its complications. *Liver Int*. 2011; 31(2): 146-162.
- (13) antiangiogenesis. *Curr Med Chem*. 2014; 21(7): 894-910.
- (14) Shibuya Liang X, Xu F, Li X, Ma C, Zhang Y, Xu W. VEGF signal system: the application of M. VEGF-VEGFR Signals in Health and Disease. *Biomol Ther (Seoul)*. 2014; 22(1): 1-9.
- (15) Jain L, Vargo CA, Danesi R, Sissung TM, Price DK, Venzon D, Venitz J, et al. The role of vascular endothelial growth factor SNPs as predictive and prognostic markers for major solid tumors. *Mol Cancer Ther*. 2013; 8(9): 2496-2508.
- (16) Wu X, Xin Z, Chang W, Wu J, Chen K, Wang H, et al. Polymorphisms in the VEGFA promoter are associated with susceptibility to hepatocellular carcinoma by altering promoter activity. *Int J Cancer*. 2013; 133: 1085-1093.

- (17) Ministério da Saúde (BR). Ordinance nº. 2.712, of 2013 November 12. Redefine o regulamento técnico de procedimentos hemoterápicos. *Diário Oficial da União*. 2013 Nov 13; Seção 1.
- (18) Salazar LA, Hirata MH, Cavalli AS, Machado MO, Hirata RDC. Optimized Procedure for DNA Isolation from Fresh and Cryopreserved Clotted Human Blood Useful in Clinical Molecular Testing. *Clin Chem*. 1998; 44(8): 1748-1998.
- (19) Testino G, Leone S, Borro P. Alcohol and hepatocellular carcinoma: A review and a point of view. *World J Gastroenterol*. 2014; 20(43): 15943-15954
- (20) Crawford JM. Histologic findings in alcoholic liver disease. *Clin Liver Dis*. 2012; 16(4): 699-716.
- (21) Fullwood D. Alcohol-related liver disease. *Nurs Stand*. 2014; 28(46): 42-47.
- (22) Purohit V, Rapaka R, Kwon OS, Song BJ. Roles of alcohol and tobacco exposure in the development of hepatocellular carcinoma. *Life Sci*. 2013; 92(1): 3-9.
- (23) Mittal S, El-Serag HB. Epidemiology of HCC: Consider the Population. *J Clin Gastroenterol*. 2013; 47(0): S2-S6.
- (24) World Health Organization. Hepatitis B: Fact sheet nº 2014 [Internet]. França; 2014. [cited in 2014 Dez 15]. Available in: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs204/en/>.
- (25) Kaseb AO, Hanbali A, Cotant M, Hassan MM, Wollner I, Philip PA. Vascular endothelial growth factor in the management of hepatocellular carcinoma. *Cancer*. 2009; 115(21): 4895-4906.



- (26) Zhai R, Gong MN, Zhou W, Thompson TB, Kraft P, Su L, Christiani DC. Genotypes and haplotypes of the VEGF gene are associated with higher mortality and lower VEGF plasma levels in patients with ARDS. *Thorax*. 2007; 62(8): 718-722.
- (27) Koukourakis MI, Papazoglou D, Giatromanolaki A, Bougioukas G, Maltezos E, Sivridis E. VEGF gene sequence variation defines VEGF gene expression status and angiogenic activity in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer*. 2004; 46(3): 293-298.
- (29) Giacalone A, Montalto G, Giannitrapani L, Balasus D, Terranova A, Cervello M, Soresi M, et al. Association Between Single Nucleotide Polymorphisms in the Cyclooxygenase-2, Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ , and Vascular Endothelial Growth Factor-A Genes, and Susceptibility to Hepatocellular Carcinoma. *OMICS*. 2011; 15(3): 193-196.
- (30) Song A, Wang LZ, Li X, Jiang TP, An TZ, Xu M, Wuang XP, et al. Polymorphisms of vascular endothelial growth factor on prognosis in hepatocellular carcinoma patients receiving transcatheter arterial chemoembolization treatment. *Genet Mol Res*. 2014; 13(4): 8946-8953.
- (31) Bradbury PA, Zhai R, Ma C, Xu W, Hopkins J, Kulke MJ, Asomaning K, et al. Vascular endothelial growth factor polymorphism and esophageal cancer prognosis. *Clin Cancer Res*. 2009; 15(14): 4680-4685.
- (32) Vidaurreta M, Sanchez-Muñoz R, Veganzones S, Rafael S, Gutiérrez M, de-la-Orden V, Fernández C, et al. Vascular endothelial growth factor gene polymorphism in patients with colorectal cancer. *Rev Esp Enferm Dig*. 2010; 102(1): 20-31.
- (33) Supic G, Jovic N, Zeljic K, Kozomara R, Magic Z. Association of VEGF-A genetic polymorphism with cancer risk and survival in advanced-stage oral squamous cell carcinoma patients. *Oral Oncol*. 2012; 48(11): 1171-1177.

- (34) Hong TT, Chang RX, Wu XH, Hua D. Polymorphism of vascular endothelial growth factor -1154G>A (rs1570360) with cancer risk: a meta-analysis of 16 case-control studies. *Mol Biol Rep.* 2012; 39(5): 5283-5289.
- (35) Lau TP, Roslani AC, Lian LH, Lee PC, Hilmi I, Goh KL, Chua KH. Association between EGF and VEGF functional polymorphisms and sporadic colorectal cancer in the Malaysian population. *Genet Mol Res.* 2014; 13(3): 5555-5561.
- (36) Rinck-Junior JA, Oliveira C, Lourenço GJ, Sagarra RA, Derchain SF, Segalla JG, Lima CS. Vascular endothelial growth factor (VEGF) polymorphism and increased risk of epithelial ovarian cancer. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2015; 141(1): 69-73.
- (37) Yang Y, Zhang X, Song D, Wei J. Association between vascular endothelial growth factor gene polymorphism and bladder cancer risk. *Mol Clin Oncol.* 2014; 2(4): 501-505.
- (38) Mukozu T, Nagai H, Matsui D, Kanekawa T, Sumino Y. Serum VEGF as a tumor marker in patients with HCV-related liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma. *Anticancer Res.* 2013; 33(3): 1013-1021.
- (28) Kong SY, Park JW, Lee JA, Park JE, Park KW, Hong EK. Association between vascular endothelial growth factor gene polymorphism and survival in hepatocellular carcinoma patients. *Hepatology.* 2007; 45(2): 446-455.
- (39) Renner W, Kotschan S, Hoffmann C, Obermayer-Pietsch B, Pilger E. A common 936 C/T mutation in the gene for vascular endothelial growth factor is associated with vascular endothelial growth factor plasma levels. *J Vasc Res.* 2000; 37: 443-8.
- (40) Yegin EG, Siykhymbayev A, Eren F, Bekiroglu N, Ozdogan OC. Prognostic implication of serum vascular endothelial growth factor in advanced hepatocellular carcinoma staging. *Ann Hepatol.* 2013; 12: 915-925.

(41) Zhan P, Qian Q, Yu LK. Serum VEGF level is associated with the outcome of patients with hepatocellular carcinoma: a meta-analysis. *Hepatobiliary Surg Nutr.* 2013; 2: 209-215.

(42) El-Sherif WT1, Makhlouf NA, El-Gendi SS, Hassan HI, Herdan OM. Evaluation of transforming growth factor alpha and vascular endothelial growth factor in diagnosis of hepatocellular carcinoma. *Egypt J Immunol.* 2012; 19(2): 53-65.

(43) el-Houseini ME, Mohammed MS, Elshemey WM, Hussein TD, Desouky OS, Elsayed AA. Enhanced detection of hepatocellular carcinoma. *Cancer Control.* 2005; 12(4): 248-53.

**Table 1.** Demographic profile, lifestyle, risk factors and clinical classification in patients with hepatocellular carcinoma (G1), cirrhosis (G2) and individuals without the disease (G3).

Variable	G1 (N=102)		G2 (N=117)		G3 (N=127)		P* Value		
	N	(%)	N	(%)	N	(%)	G1 x G3	G2 x G3	G1 x G2
<b>Gender</b>									
Female	25	(25)	29	(25)	32	(25)	0.904	0.941	0.962
Male	77	(75)	88	(75)	95	(75)			
<b>Lifestyle</b>									
Alcohol consumption	57	(56)	58	(50)	18	(13)	<0.0001	<0.0001	0.425
Smoking	51	(50)	40	(34)	30	(21)	<0.0001	0.0927	<b>0.0257</b>
<b>Comorbidity</b>									
HBV	21	(21)	12	(10)					0.0521
HCV	51	(50)	57	(49)					0.957
Cirrhosis	86	(84)	117	(100)					
<b>Clinical Classification</b>	<b>G1 (N=89)</b>								
<b>BCLC</b>	<b>N</b>	<b>(%)</b>							
A	28	(31)							
B/C	52	(59)							
D	9	(10)							

\* Fisher's exact test or Chi-Square test; N = number of subjects; HBV= hepatitis B virus; HCV = hepatitis C virus; BCLC - Barcelona Clinic Liver Cancer.

**Table 2.** Allelic and genotypic frequencies of *VEGF-C936T* and *VEGF-A1154G* polymorphisms in patients with hepatocellular carcinoma (G1), cirrhosis (G2) and individuals without the disease (G3).

		G1 (N=102)		G2 (N=117)		G3 (N=217)		P* Value		
								G1xG3	G2xG3	G1xG2
<b>C936T</b>										
<b>Allele</b>		<b>n</b>	<b>AF</b>	<b>n</b>	<b>AF</b>	<b>n</b>	<b>AF</b>			
	C	174	0.85	199	0.85	217	0.85	0.966	0.903	0.941
	T	30	0.15	35	0.15	37	0.15			
<b>Genotype</b>		<b>N</b>	<b>(%)</b>	<b>N</b>	<b>(%)</b>	<b>N</b>	<b>(%)</b>			
<b>Dominant</b>	C/C	72	(71)	84	(72)	90	(71)	0.963	0.985	0.962
	C/T+T/T	30	(29)	33	(28)	37	(29)			
<b>Heterozygote</b>	C/T	30	(29)	31	(26)	37	(29)	0.963	0.751	0.742
	C/C + T/T	72	(71)	86	(74)	90	(71)			
<b>Recessive</b>	T/T	-	(0)	2	(2)	-	(0)	-	-	-
	C/T+C/C	102	100	115	(98)	127	100			
<b>HW (x<sup>2</sup>)</b>		3.03		0.20		3.69		>0.05		
<b>A1154G</b>										
<b>Allele</b>		<b>n</b>	<b>AF</b>	<b>n</b>	<b>AF</b>	<b>n</b>	<b>AF</b>			
	G	157	0.77	172	0.74	193	0.76	0.893	0.598	0.469
	A	47	0.23	62	0.26	61	0.24			
<b>Genotype</b>		<b>N</b>	<b>(%)</b>	<b>N</b>	<b>(%)</b>	<b>N</b>	<b>(%)</b>			
<b>Dominant</b>	G/G	61	(60)	60	(51)	73	(57)	0.826	0.399	0.258
	G/A+A/A	41	(40)	57	(49)	54	(43)			
<b>Heterozygote</b>	G/A	35	(34)	52	(44)	47	(37)	0.776	0.293	0.164
	A/A+G/G	67	(66)	65	(56)	80	(63)			
<b>Recessive</b>	A/A	6	(6)	5	(4)	7	(6)	0.904	0.880	0.815
	G/A+G/G	96	(94)	112	(96)	120	(94)			
<b>HW (x<sup>2</sup>)</b>		0.74		2.32		0.02		> 0.05		

\* Fisher's exact test or Chi-Square Test (x<sup>2</sup>); N = number of subjects; n= number of alleles; AF= absolute frequency; HW = Hardy-Weinberg.

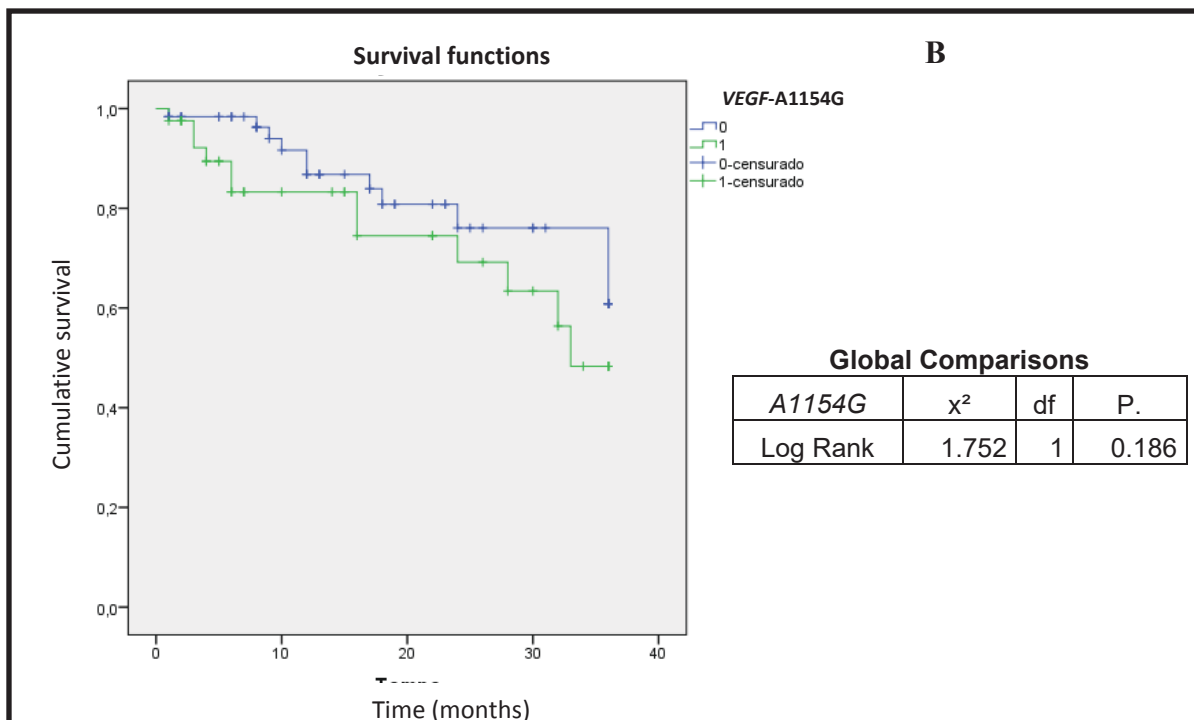
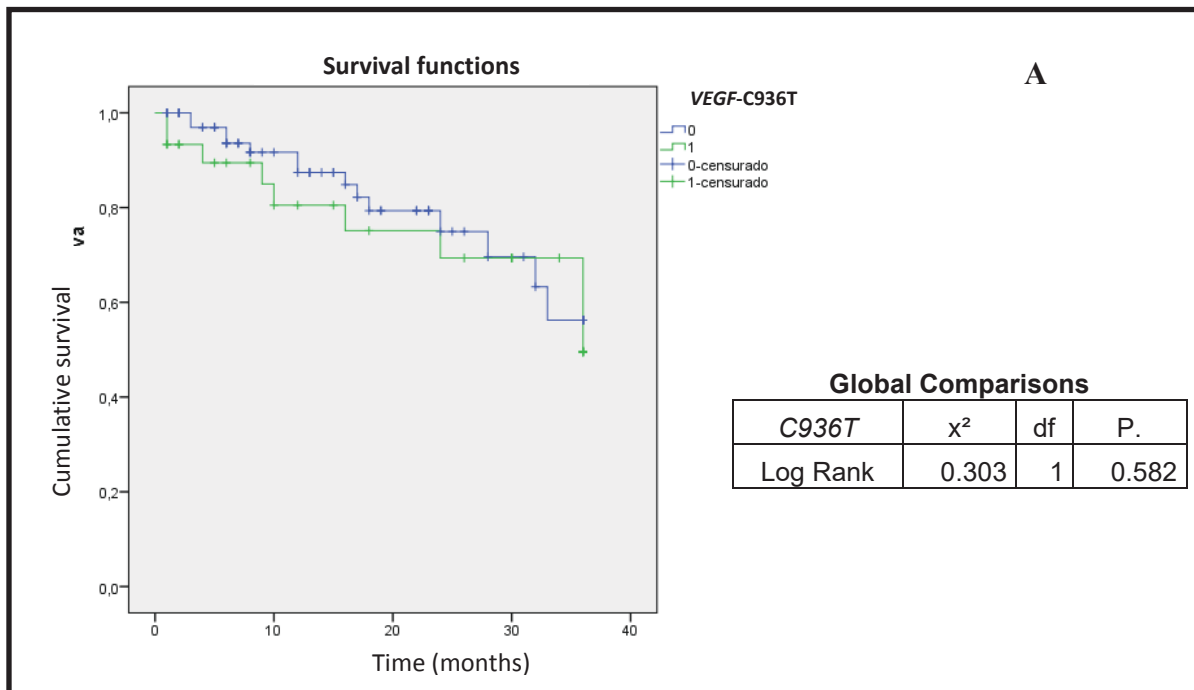


Figure 1. Kaplan-Meier curve for overall survival analysis of patients with hepatocellular carcinoma after 36 months of diagnosis. A) *VEGF-C936T*: 1= genotype C/T; 0= genotype C/C; B) *VEGF-A1154G*: 1= genotypes  $\_A$ ; 0= genotype G/G; df = degree of freedom.

Table 3. Allelic and genotypic frequencies of *VEGF*-C936T and *VEGF*-A1154G polymorphisms in patients with hepatocellular carcinoma (G1), considering the BCLC clinical classification.

<i>VEGF</i>	BCLC - 89 patients						P* Value		
	A (N=28)		B/C (N=52)		D (N=9)		A x B/C	A x D	B/C x D
<b>C936T</b>									
<b>Allele</b>	<b>n</b>	<b>AF</b>	<b>n</b>	<b>AF</b>	<b>n</b>	<b>AF</b>			
C	48	0.86	88	0.85	16	0.89	1.000	1.000	1.000
T	8	0.14	16	0.15	2	0.11			
<b>Genotype</b>	<b>N</b>	<b>(%)</b>	<b>N</b>	<b>(%)</b>	<b>N</b>	<b>(%)</b>			
C/C	20	(71)	36	(69)	7	(78)	1.000	1.000	0.7131
C/T	8	(29)	16	(31)	2	(22)			
T/T	0	(0)	0	(0)	0	(0)	-	-	-
<b>A1154</b>									
<b>Allele</b>	<b>n</b>	<b>AF</b>	<b>n</b>	<b>AF</b>	<b>n</b>	<b>AF</b>			
G	41	0.73	83	0.80	14	0.78	0.4508	1.000	0.7623
A	15	0.27	21	0.20	4	0.22			
<b>Genotype</b>									
G/G	14	(50)	35	(67)	5	(56)	0.2023	1.000	0.7056
A/G	13	(46)	13	(25)	4	(44)	0.0888	1.000	0.2489
A/A	1	(4)	4	(8)	0	(0)	0.6525	-	-

\* Fisher's exact test or Chi-Square test with Yates correction; BCLC= Barcelona Clinic Liver Cancer; VEGF= vascular endothelial growth factor; N= number of subjects; n= number of alleles; AF= absolute frequency.

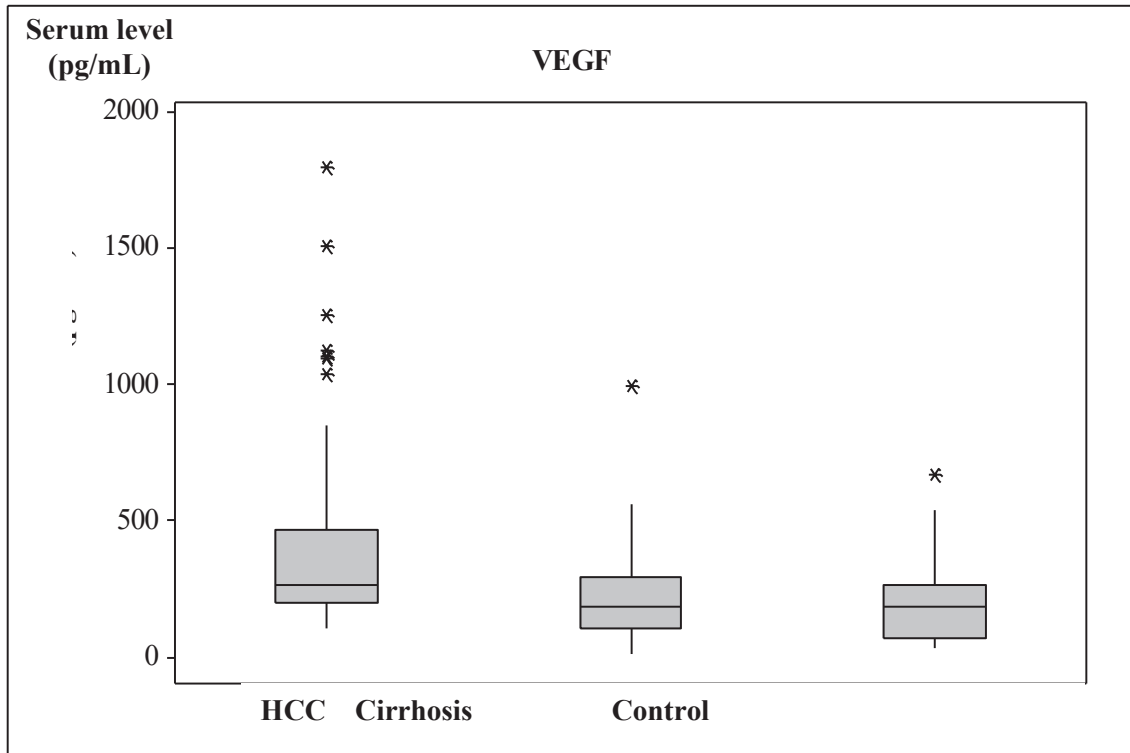


Figure 2. Box-plot representation of median and quartile values of serum vascular endothelial growth factor (VEGF) levels: **HCC** – median= 264.8, minimum= 102.0, maximum= 1795.1, Q1= 199.4, Q3= 467.7, IQRRange= 268.3; **Cirrhosis** – median= 182.8, minimum= 7.2, maximum= 993.0, Q1= 103.9, Q3= 287.4, IQRRange= 183.5; **Control** – median= 182.2, minimum= 31.6, maximum= 666.1, Q1= 66.14, Q3= 265.5, IQRRange= 199.4.



Table 4 - Quantitative analysis of allelic and genotypic frequencies of *VEGF*-C936T and *VEGF*-A1154G polymorphisms in patients with hepatocellular carcinoma (G1), cirrhosis (G2), controls (G3), considering serum levels of VEGF.

VEGF serum levels x Polymorphisms				Inter-groups P* Value G1 x G2 x G3
	G1 (N=54)	G2 (N=51)	G3 (N=27)	
<b><i>VEGF</i>- C936T</b>	<b>Median (pg/mL) (Minimum – Maximum)</b>			
C/C	250.5 (N=38) (101.9 – 1120.2)	191.7 (N=36) (7.23 – 992.95)	185.7 (N=23) (41.4 – 666.1)	0.0700
_/T	430.0 (N=16)▲■ (133.35 – 1795.1)	173.5 (N=15) ▲ (50.1 – 556.2)	113.9 (N=4) ■ (31.56 – 225.45)	<b>0.0038</b>
<b>Intra-group P* Value</b>	<b>0.0285</b>	0.2868	0.0955	
<b><i>VEGF</i>- A1154G</b>				
G/G	238.2 (N=29) (101.9 – 1795.1)	182.8 (N=31) (50.1 – 992.95)	182.2 (N=17) (31.56 – 666.1)	0.0644
_/A	297.75 (N=25) ● (104.25 – 1256.3)	183.3 (N=20) ● (7.23 – 556.17)	185.2 (N=10) (41.4 – 534.0)	<b>0.0069</b>
<b>Intra-group P* Value</b>	0.18	0.1602	<b>0.0284</b>	

\* Mann Whitney and Kruskal Wallis tests for intra-group and inter-group analyses, respectively; VEGF = vascular endothelial growth factor; N = number of subjects; ▲ and ■: P < 0.05; ●: P < 0.01.

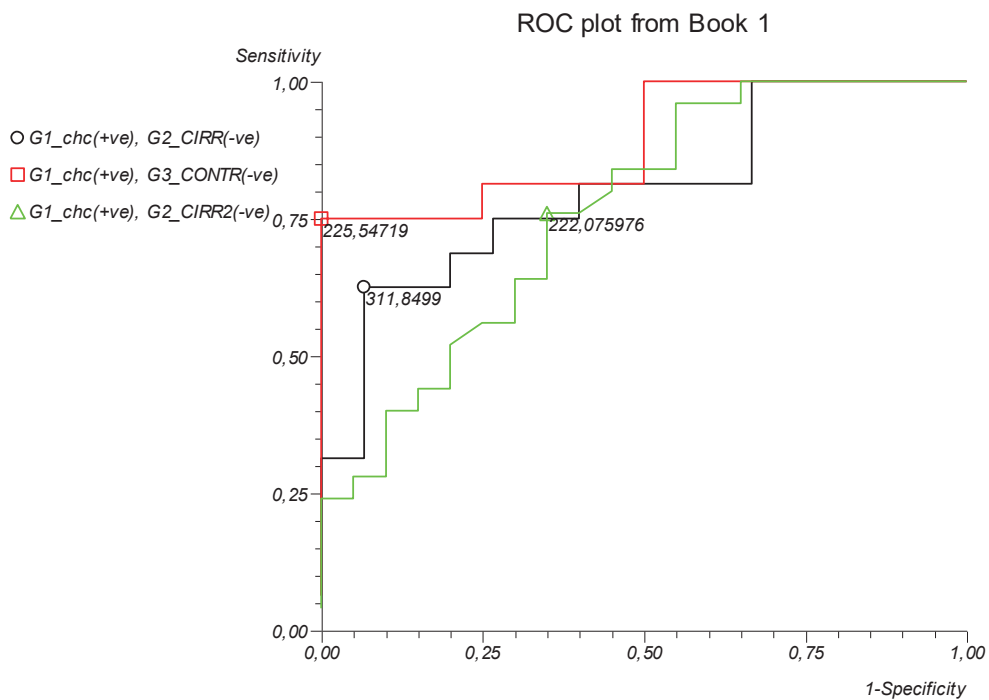


Figure 3. Receiver operator characteristic curve (ROC) of serum vascular endothelial growth factor (VEGF) levels in patients with: (○) mutant allele of *VEGF-C936T* in the group with hepatocellular carcinoma (G1) and cirrhosis (G2) (area under the curve = 0.80 [0.60 – 1.0]), with sensitivity of 63% and specificity of 93%, to the cut-off value of 311.8 pg/mL; (□) mutant allele of *VEGF-C936T* in G1 and controls (G3) (area under the curve = 0.89 [0.61 – 1.0]), with sensitivity of 75% and specificity of 100%, to the cut-off value of 225.5 pg/mL; (△) mutant allele of *VEGF-A1154G* in G1 and G2 (area under the curve = 0.76 [0.60 – 0.92]), with sensitivity of 76% and specificity of 65%, to the cut-off value of 222.1 pg/mL.