



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

---

**Rafael Fernandes Ferreira**

**Marcadores Genéticos e Bioquímicos no  
Diagnóstico e Prognóstico do Carcinoma  
Hepatocelular**

**São José do Rio Preto**  
**2016**

**Rafael Fernandes Ferreira**

**Marcadores Genéticos e Bioquímicos no  
Diagnóstico e Prognóstico do 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.**

**Orientador: Prof. Dr. Renato Ferreira da Silva**

**São José do Rio Preto  
2016**

Ferreira, Rafael Fernandes  
Marcadores Genéticos e Bioquímicos para Diagnóstico e Prognóstico no  
Carcinoma Hepatocelular  
São José do Rio Preto, 2016  
76p

Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de São José do Rio  
Preto – FAMERP  
Eixo Temático: Medicina e Ciências Correlatas

Orientador: Prof. Dr. Renato Ferreira da Silva

1. Neoplasia Maligna; 2. Fígado; 3. Expressão Gênica; 4. Polimorfismos;  
5. Nível Sérico.

**Rafael Fernandes Ferreira**

**Marcadores Genéticos e Bioquímicos no  
Diagnóstico e Prognóstico do Carcinoma  
Hepatocelular**

**BANCA EXAMINADORA**

**DISSERTAÇÃO PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE**

**Presidente e Orientador: Prof. Dr. Renato Ferreira da Silva**

**2º Examinador:** \_\_\_\_\_

**3º Examinador:** \_\_\_\_\_

**Suplentes:** \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

**São José do Rio Preto, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 2016.**

## SUMÁRIO

Dedicatória.....	i
Agradecimentos.....	iii
Epígrafe .....	ix
Lista de Figuras .....	xi
Lista de Abreviaturas e Símbolos.....	xiii
Resumo .....	xvii
Abstract.....	xx
1. INTRODUÇÃO.....	2
1.1 Aspectos Clínico-Epidemiológicos do Carcinoma Hepatocelular .....	2
1.2 Hepatocarcinogênese e Fatores Genéticos .....	4
1.3 Objetivo Geral .....	10
1.3.1 Objetivos específicos.....	10
2. RESULTADOS.....	13
Artigo 1.....	14
Artigo 2.....	38
3. CONCLUSÃO .....	64
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	66

## *Dedicatória*

**Com muito amor,** dedico este trabalho à minha mãe, **Roseli**, minha eterna fonte de inspiração e força, que sempre recarrega-me de esperança e amor. Ao meu “paidrasto”, **Wagner**, um exemplo de caráter e honestidade. Aos meus irmãos, **Regiane, Rafaela e Renato**, por todos os ensinamentos e companheirismo.

*Agradecimientos*



Chegou o momento de expressar sincera gratidão a tantos e adorados familiares e amigos, aos de longa data e queridos, quanto aos que surgiram durante esse percurso. Corro risco de não dar conta desse “muitíssimo obrigado” como é merecido, porque será difícil demonstrar a beleza que foi esse movimento de energias verdadeiramente positivas. Se o desafio era grande, as motivações e companheirismo eram grandiosos e permitiram a transformação de momentos de ansiedade e angústia em uma estrada larga, margeada de flores, frutos e frondosas árvores!

Com infinito amor e eterna gratidão, agradeço à minha amada mãe, meu porto-seguro, por tudo que fez e continua a fazer para a idealização dos meus sonhos e construção do meu caráter. Você me ensinou a ser forte, a não abaixar a cabeça e ir à luta. Aprendi tantas coisas importantes com você, mas a mais importante delas foi agradecer a vida por tudo aquilo que ela coloca em nosso caminho e seguir em frente sem deixar que nenhum obstáculo nos bloqueie. Suas palavras, seus conselhos, seus gestos de compreensão, carinho, amor e afeto são essenciais para continuar em frente com foco, força e fé. O amor que sinto por você é inexplicável e não há palavras para expressá-lo de forma real, mas como sempre te digo: “Te amo do tamanho do universo!”.

Aos meus familiares, em especial aos meus irmãos Regiane, Rafaela e Renato, meus amados sobrinhos Laura e Pietro, meu padrasto Wagner, minha tia-madrinha Cleonice, tios Zéca e Claudinei, avó Servita e avô José, primos Héctor, Larissa, Iago e Alana, por toda necessária e essencial compreensão da minha ausência e pelo carinho e amor de sempre. Obrigado por tudo, amo vocês!

Ao meu orientador, Prof. Dr. Renato Ferreira da Silva, pelo incentivo e credibilidade. Agradeço pelo apoio em todos os âmbitos, por acreditar no meu trabalho e contribuir para meu desenvolvimento científico. Ainda farei um estudo, cujo único

indivíduo da casuística será você, para demonstrar que seu coração é tão gigante quanto sua estatura. Muito obrigado pela oportunidade de aprender contigo!!!

À Profa. Dra. Dorotéia Rossi Silva Souza, a minha gigantesca gratidão, carinho e admiração. Obrigado pelo acolhimento (maternal), pelos ensinamentos científicos a mim transmitidos por meio de horas e horas de discussão de estudos e/ou cafés filosófico-científicos, que me permitiram conhecer e apaixonar pelo mundo da pesquisa. Sinto-me extremamente lisonjeado em conviver com alguém com tamanha evolução espiritual como você. Espero tê-la por perto sempre, nem que eu tenha que ir até sua casa te incomodar, após sua (tão esperada) aposentadoria! MUITÍSSIMO obrigado!!!

À Profa. Dra. Rita de Cássia Martins Alves da Silva, por tamanha paciência, dedicação e inteligência. Agradeço, ainda, por ter-me brindado com sua importante colaboração na discussão durante as etapas deste trabalho com críticas extremamente construtivas e comentários de incentivo.

À Dra. Marcela Augusta de Souza Pinhel, pelo grande auxílio que nos deu em todas as fases deste estudo e por tudo que me ensina mesmo à distância. Obrigado pelo muito que acrescentou à minha vida científica e pessoal. Jamais me esquecerei do carinho que você cuida dos seus “filhotes”!

À minha segunda família, àqueles com quem convivo maior parte do meu dia, a equipe de trabalho do NPBIM, Sâmia Frahia, Denise Poltronieri, Graciele Tenani, Sabrina Gimenez, Days Oliveira, Maria Clara Calastri, Michele Gregório, Tayanne Carmo, Elisa Takinaga, Camila Brancati, Milton Pires, Maria Eduarda Baitello, Beatriz Brait, Angélica Lopes, Isabela Fancicani, Simone Lima, Vítor Lima, Thiago Baitello, Érika Yvamoto, Ana Luiza Bonini, Jéssyca Farto, João Andrade e Victor Nogueira, vocês alegam meus dias. Muito obrigado pela parceria de bancada e momentos de descontração!

Aos meus velhos e eternos amigos, Douglas Andreazzi, Gabriela Peluso, Manoela Ramos, Rafaela Silva e Ramon Corrêa, que apesar da distância e diferentes destinos de vida, sempre estiveram comigo ao longo dessa caminhada, tornando-a mais suave com boas doses de risadas e pães de queijo com Nutella.

Ao Prof. Dr. Moacir Fernandes de Godoy, pelo auxílio na análise dos dados. Obrigado por todos os ensinamentos, pela alegria e pela energia positiva que transmite sempre.

Àqueles que se doaram para o progresso da ciência, os pacientes que contribuíram para a realização deste trabalho. Obrigado por compreenderem a importância deste estudo e colaborarem conosco!

Aos cirurgiões, anestesistas, residentes, enfermeiros, técnicos, auxiliares de enfermagem e secretárias da Equipe de Transplante de Fígado, em especial à enfermeira MsC. Helen Felício e Prof. Dr. Willian Duca, pelo suporte técnico fundamental.

À toda equipe do Laboratório de Imunologia Experimental (LITEX/FAMERP), especialmente a Dra. Heloísa Caldas, Dra. Camila Mazeti, MsC. Cinthia Dias, MsC. Greiciane Florim, Dra. Glória Mendes, por toda paciência, ensinamento e apoio nas análises de expressão gênica.

À Profa. Dra. Ilka Boin, sempre tão solícita e acessível, pela parceria e colaboração para os estudos dos tumores hepáticos.

À Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto e ao Hospital de Base de São José do Rio Preto e seus dirigentes, pela cooperação e apoio institucional.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da FAMERP e todos seus colaboradores, pela oportunidade oferecida, atenção, eficiência e por todo auxílio necessário.

À todos professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da FAMERP e do Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Animal da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” pelos ensinamentos essenciais para minha formação teórica neste período.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Fundação de Apoio à Pesquisa e Extensão de São José do Rio Preto (FAPERP), pelo apoio financeiro na execução deste trabalho.

À Fundação do Desenvolvimento Administrativo (FUNDAPE), pela oportunidade de bolsa de estágio durante a graduação que me permitiu conhecer os caminhos da pesquisa.

À equipe do Instituto de Biofísica e Biomatemática da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, especialmente a Profa. Dra. Maria Filomena Botelho, Prof. Dr. José Guilherme Tralhão e Profa. Dra. Margarida Abrantes, pela parceria (que a cada dia mais se solidifica) e pelo acolhimento quando lá estive. Aos colegas de laboratório da mesma unidade, Ana Brito, Mafalda Laranjo, Salomé Pires, Ana Caridade, Ricardo Teixo, Inês Marques, Nuno Almeida, Beatriz Serambeque, Gonçalo Brites, Rita Neves, muito obrigado por tornarem minha estadia em Portugal mais rica em conhecimento e comida (risos). Voltarei logo para revê-los e trabalharmos mais!

Às “raparigas” do Laboratório de Biologia Molecular aplicada e Hematologia, Dra. Ana Cristina Pereira Gonçalves, MsC. Raquel Alves, MsC. Ana Pires, MsC. Joana Jorge, MsC. Cátia Domingues e MsC. Patrícia Correadeira por toda atenção e auxílio no processamento das amostras em solo português.

À agência de fomento europeia *Coimbra Group* por conceder a bolsa de estágio na Universidade de Coimbra que possibilitou-me ampliar os horizontes no que concerne à investigação ao conhecer uma nova linha de pesquisa, técnicas e pessoas inesquecíveis.

Aos colegas da residência universitária e do mundo todo que conheci nesses três meses em Coimbra, em especial a Carla Krupczak, Matheus Machado, Pâmela Braz, Celestino Mutunda, Paloma Guimarães, Luciana Carmo, Thais Teixeira, Matik, Leonardo Dias, Bohan Jiang, Daniel Zhang, Nuno San, obrigado pelo compartilhamento dos seus saberes que me enriqueceu culturalmente de forma grandiosa.

Ao Professor (quase Doutor) Emanuel Oliveira por ter-me acolhido como membro de sua família em Portugal e proporcionado momentos memoráveis e à sua filha, Maria Emanuel, que mesmo na sua pequenez, me renovava com seu sorriso revigorante após cada dia de trabalho.

Aos meus alunos dos cursos de Biomedicina, Técnicos em Farmácia e Radiologia, por me ensinarem na prática como ser um Mestre/Professor.

Agradeço a todas as pessoas que estiveram ao meu lado durante meu mestrado, 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.

*Epigrafe*

*“Um dia, quando olhares para trás, verás que os dias mais belos  
foram aqueles em que lutastes”  
(Sigmund Freud)*

## *Lista de Figuras*



**LISTA DE FIGURAS**

Figura 1. (a) Na ausência de WNT,  $\beta$ -catenina é degradada, e genes alvo potenciais são reprimidos. (b) Se sinalização WNT está ativa, a degradação de  $\beta$ -catenina é reduzida, desse modo, há acúmulo desta proteína no citoplasma e posterior translocação para o núcleo, ligando a fatores de transcrição como TCF e LEF assim ativando a expressão de genes alvos. APC, polipose adenomatosa coli;  $\beta$ -cat,  $\beta$ -catenina; CBP, proteína de ligação a CREB; CK, caseína-quinase; DKK, Dickkopf; DSH, Dishevelled; GBP, proteína GSK3 de ligação; GSK, glicogênio sintase-quinase; LRP, LDL-receptor relacionado com a proteína; P, fosforilação; SFRP, Secreted frizzled-related proteins; TCF, transcription factors.

06

Figura 2. Esquema mostrando a participação de Glipican-3 na via WNT, o qual facilita e/ou estabiliza a interação de WNT e Frizzled com o consequente incremento da sinalização.

09

## *Lista de Abreviaturas e Símbolos*

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

<b><math>\alpha</math></b>	Alfa
<b><math>\beta</math></b>	Beta
<b><math>\Delta</math></b>	Delta
<b>X</b>	Qui
/	Por
%	Porcentagem
<	Menor
>	Maior
$\geq$	Maior ou igual
®	Marca registrada
<b><math>\mu\text{L}</math></b>	Microlitro
<b>AASLD</b>	Associação Americana para o Estudo de Doenças do Fígado
<b>ACTB</b>	Beta actina
<b>AFP</b>	Alfa-fetoproteína
<b>ANOVA</b>	Análise de Variância
<b>APC</b>	<i>Adenomatous Polyposis Coli</i>
<b>AUC</b>	<i>Area under curve</i>
<b>B1</b>	Tipo de Aflatoxina
<b>BP</b>	Pares de Base
<b>BCLC</b>	Clínica de Câncer Hepático de Barcelona
<b><math>\text{Ca}^{+2}</math></b>	Cálcio
<b>CBP</b>	Proteína de Ligação à CREB.
<b>cDNA</b>	DNA complementar
<b>CEP</b>	Comitê de Ética em Pesquisa
<b>CHC</b>	Carcinoma Hepatocelular
<b>CK</b>	Caseína-Quinase
<b>CLIP</b>	Programa Italiano de Câncer Hepático
<b>cm</b>	Centímetro
<b>CPs</b>	Cisteíno-proteases
<b>CREB</b>	Proteína Ligante ao Elemento de Resposta da Adenosina Monofosfato Cíclico

<b>CSTB</b>	Cistatina-B
<b>CTNNB1</b>	Catenina Beta-1
<b>DEPC</b>	Água ultrapura
<b>DKK</b>	<i>Dickkopf</i>
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido ou Sulfóxido de Dimetilo
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>DNTPs</b>	Desoxirribonucléotídeos fosforados (A, G, T e C)
<b>DSH</b>	<i>Dishevelled</i>
<b>EDTA</b>	Ácido etilenodiamino tetra-acético
<b>ELISA</b>	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
<b>FAMERP</b>	Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto
<b>FAPESP</b>	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
<b>FMUSP</b>	Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
<b>FUNFARME</b>	Fundação Faculdade Regional de Medicina
<b>g</b>	Gramas
<b>GAPDH</b>	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
<b>GPC3</b>	Glipican-3
<b>GSK-3</b>	Glicogênio Sintase Quinase-3
<b>HAS</b>	Hipertensão arterial sistêmica
<b>HB/FAMERP</b>	Hospital de Base da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto
<b>HBV</b>	Hepatite por Vírus B
<b>HCC</b>	Carcinoma Hepatocelular
<b>HH</b>	Hedgehog
<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>Kb</b>	Kilo Base
<b>KDa</b>	Kilo Dalton
<b>LRP</b>	LDL-receptor relacionado com a proteína
<b>Mg/mL</b>	Miligrama por mililitro
<b>mL</b>	Mililitro

<b>N</b>	Números de indivíduos
<b>NASH</b>	Esteato-hepatite não alcoólica
<b>ng</b>	Nanograma
<b>°C</b>	Grau Celsius
<b>P</b>	Fosforilação
<b>P</b>	Valor P
<b>P1</b>	<i>Primer sense</i>
<b>P2</b>	<i>Primer antisense</i>
<b>PCR</b>	<i>Polymerase chain reaction</i>
<b>pg</b>	Picogramas
<b>qPCR</b>	<i>Quantitative Polymerase chain reaction</i>
<b>r</b>	Coefficiente de correlação
<b>RM</b>	Ressonância Magnética
<b>RNA</b>	Ácido ribonucleico
<b>ROC</b>	<i>Receiver Operating Characteristic</i>
<b>rpm</b>	Rotação por minuto
<b>SNPs</b>	Polimorfismos de nucleotídeo único
<b>TA</b>	Temperatura ambiente
<b>TCF</b>	<i>Transcription Factor</i>
<b>U/μL</b>	Unidade por microlitro
<b>v</b>	Volts
<b>VEGF-A</b>	Fator de crescimento endotelial vascular A
<b>VHB</b>	Vírus da Hepatite B
<b>VHC</b>	Vírus da Hepatite C

*Resumo*

## RESUMO

**Introdução** – Carcinoma hepatocelular (CHC) destaca-se como o mais agressivo tumor maligno do fígado. A identificação de marcadores genéticos e bioquímicos pode contribuir no esclarecimento da fisiopatologia do CHC e auxiliar no diagnóstico precoce da doença com novas intervenções terapêuticas. **Objetivos** – Avaliar a associação de variantes genéticas (*VEGF-C936T* e *VEGF-A1154G*), níveis séricos e expressão gênica envolvidos no processo de angiogênese, proteção, comunicação e sinalização celular com CHC.

**Casuística e Métodos** – Foram estudados 393 indivíduos, distribuídos em Grupo 1 (G1) – 102 pacientes com CHC; Grupo 2 (G2) – 117 pacientes com cirrose por qualquer etiologia; Grupo 3 (G3) – 33 pacientes com hepatite por vírus C (VHC); Grupo 4 (G4) – 141 indivíduos sem sinal clínico ou bioquímico de qualquer hepatopatia (controle). Para análise de expressão gênica de fator de crescimento endotelial vascular (*VEGF*),  $\beta$ -catenina, alfa-fetoproteína (*AFP*), cistatina-b (*CSTB*) e glipican-3 (*GPC3*), destes foram selecionados 26 pacientes com CHC, 16 com cirrose, 9 com VHC e 14 controles submetidos a cirurgias bíleo-digestivas. Os polimorfismos foram analisados por PCR/RFLP (*polymerase chain reaction/restriction fragments length polymorphism*), expressão gênica (tecido hepático) por qPCR (*quantitative/polymerase chain reaction*) e níveis séricos por ELISA (*Enzyme Linked ImmunonoSorbent Assay*). Admitiu-se erro  $\alpha$  de 5%.

**Resultados** – Genótipo selvagem de ambos os polimorfismos de *VEGF* prevaleceu em todos os grupos ( $P>0,05$ ). *VEGF* sérico aumentado foi observado em G1 e G3, relacionado com o alelo mutante de *VEGF-C936T* e *VEGF-A1154G*, respectivamente, comparado com o genótipo selvagem ( $P=0,02$ ;  $P=0,02$ ), bem como em G1 versus G2 e G3 para *VEGF-C936T*, e G1 comparado a G2 para *VEGF-A1154G* ( $P<0,05$ , para ambos). Observou-se superexpressão de *VEGF* em G1 (3,85), comparado a G2 (0,76) e G3 (1,95);

$P=0,02$ , para ambos), assim como de *VEGF* e *AFP* em pacientes classificados no estágio D (19,97 e 8,86), comparado àqueles no estágio B (1,96 e 0,03;  $P = 0,008$  e  $P = 0,001$ , respectivamente). Pacientes no estágio C apresentaram maior expressão de *CTNNB1*, comparado ao estágio B (18,40 versus 0,90;  $P = 0,008$ ). Houve aumento de níveis séricos de GPC3 (2,8ng/mL), CSTB (0,99ng/mL), VEGF (264,8pg/mL) e AFP (20,3ng/mL) em pacientes com CHC comparado aos controles (2,9ng/mL, 0,6ng/mL, 185,2pg/mL, 2,6ng/mL;  $P<0,05$  para todos). GPC3 e VEGF mostraram-se relevantes na discriminação entre G1 e G4 (área sob a curva = 0,82; 0,71, respectivamente). CSTB apresentou poder discriminatório na comparação entre os grupos com VHC e controle (área sob a curva = 0,74). Notou-se correlação positiva para expressão entre todos os genes, exceto de *CSTB* correlacionado apenas com *CTNNB1* ( $r=0,43$ ;  $P=0,01$ ), e *GPC3* com *VEGF* ( $r=0,49$ ;  $P=0,008$ ). **Conclusão** – Polimorfismos de *VEGF-A* (C936T e A1154G) não se associam com cirrose, CHC e sobrevida, entretanto, a presença dos alelos mutantes influencia níveis séricos de VEGF. Ressalta-se a sensibilidade de CSTB (proteção celular) sérico para diagnóstico de VHC, VEGF (angiogênese) e GPC3 (proliferação celular) séricos demonstram sensibilidade e especificidade para diagnóstico de CHC. Expressão aumentada, particularmente, de VEGF em pacientes com CHC em estágio terminal (BCLC-D) confirma *VEGF* como indicador de prognóstico na carcinogênese hepática. A correlação da expressão de *VEGF* com *AFP*, *GPC3* e *CTNNB1* sugere a integração entre marcadores de angiogênese, sinalização e proliferação celular em CHC e hepatite C.

**Palavras-Chave:** Neoplasia Maligna, Fígado, Expressão Gênica, Polimorfismos, Nível Sérico.



*Abstract*

## ABSTRACT

**Introduction** - Hepatocellular carcinoma (HCC) stands out as the most aggressive malignant liver tumor. The identification of genetic and biochemical markers may help to understand the physiopathology of HCC and to make an early diagnosis of the disease with new therapeutic interventions. **Objectives** - To evaluate the association of genetic variants (*VEGF-C936T* e *VEGF-A1154G*), serum levels and gene expression involved in the angiogenesis process, protection, communication and cell signaling with HCC. **Patients and Methods** - A total of 393 subjects were studied, distributed into Group 1 (G1) - 102 patients with HCC; Group 2 (G2) - 117 patients with cirrhosis of any etiology; Group 3 (G3) - 33 patients with hepatitis C virus (HCV); Group 4 (G4) - 141 individuals without clinical or biochemical signs of any liver disease (controls). For gene expression analysis of vascular endothelial growth factor (VEGF),  $\beta$ -catenina (CTNNB1), Alpha-fetoprotein (AFP), Cystatin-B (CSTB) and Glypican-3 (GPC3), 26 patients with HCC, 16 with cirrhosis, 9 with HCV and 14 controls undergoing bileoenteric surgery were selected. The polymorphisms were analyzed by PCR/RFLP (polymerase chain reaction/ restriction fragments length polymorphism), gene expression (liver tissue) by qPCR (quantitative / polymerase chain reaction), and serum levels by ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay).  $\alpha$  -error was set at 5%. **Results** - Wild genotype both VEGF polymorphisms prevailed in all the groups ( $P > 0.05$ ). Increased levels of VEGF were observed in G1 and G3, related to the mutant allele of *VEGF-C936T* and *VEGF-A1154G*, respectively, compared to the wild-type genotype ( $P=0.028$ ;  $P=0.028$ ), in G1 vs. G2 and G3 for *VEGF-C936T*, and in G1 compared to G2 for *VEGF-A1154G* ( $P < 0.05$  for both). Overexpression of *VEGF* in G1 (3.85) was observed, compared to G2 (0.76) and G3 (1.95;  $P=0.02$  for both). Higher levels of expression of *VEGF* and *AFP* could be observed in patients classified into stage D (19.97 and 8.86), compared to those in stage B (1.96 and 0.03;

P=0.008 and P=0.001, respectively). Patients in stage C showed higher expression of *CTNNB1*, compared to those in stage B (18.40 vs. 0.90; P=0.008). There was an increase of GPC3 (2.8ng/mL), CSTB (0.99ng/mL), VEGF (264.8pg/mL) and AFP (20.3ng/mL) in patients with HCC, compared to controls (2.9ng/mL, 0.6ng/mL, 185.2pg/mL, 2.6ng/mL; P<0.05 for all comparisons). GPC3 was relevant when discriminating G1 and G4 (area under the curve = 0.82). For VEGF, discriminatory power between HCC patients and controls (area under the curve = 0.71) was observed. CSTB showed discriminatory power when comparing groups with HCV and controls (area under the curve = 0.74). A positive correlation was observed for expression among all genes, except *CSTB*, which correlated only with *CTNNB1* (r=0.43; P=0.01), and *GPC3*, which correlated only with VEGF (r=0.49; P=0.008). **Conclusion** – *VEGF-A* polymorphisms (C936T and A1154G) are not associated with cirrhosis, HCC and survival, however, the presence of the mutant alleles may influence serum levels of VEGF. Emphasis should be given to the sensitivity of serum CSTB (cell protection) for the diagnosis of HCV, VEGF (angiogenesis) and serum GPC3 (cell proliferation) demonstrate sensitivity and specificity for the diagnosis of HCC. Increased expression, particularly of *VEGF* in patients with end-stage HCC (BCLC-D) confirms *VEGF* as a prognostic indicator in liver carcinogenesis. The correlation between *VEGF* expression with *AFP* and *GPC3 CTNNB1* suggests integration of markers of angiogenesis, signaling and cell proliferation in HCC and hepatitis C.

**Keywords:** Malignant neoplasm, Liver, Gene Expression, Polymorphism, Serum Level.

# *Introdução*

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 Aspectos Clínico-Epidemiológicos do Carcinoma Hepatocelular

Os tumores primários do fígado correspondem ao quinto câncer mais comum no mundo e a segunda causa de morte por neoplasia maligna <sup>1</sup>. O carcinoma hepatocelular (CHC) é a câncer hepático primário mais frequente, observado entre 85-90% dos tumores primários do fígado, com cerca de 782.000 novos casos diagnosticados <sup>2</sup>. Globalmente, apresenta-se como a segunda principal causa de óbito por câncer, com aproximadamente 746.000 mortes/ano <sup>1</sup>. A incidência do CHC varia de acordo com a região geográfica, devido às diferenças de distribuição dos principais fatores etiológicos <sup>3</sup>.

A maioria dos casos de CHC ocorre na África subsaariana e Ásia Oriental (>80%), sendo a China responsável por aproximadamente 50% dos casos em todo o mundo. Por outro lado, na América do Norte e do Sul, assim como na Europa, há baixa incidência da doença <sup>3</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>4,5</sup>.

Em geral, são escassos os dados sobre a epidemiologia do CHC em regiões não endêmicas. De acordo com estudos epidemiológicos retrospectivos, o Brasil foi anteriormente considerado um país de baixa prevalência deste tumor, sendo mais frequente nos estados do Espírito Santo, Bahia e Amazonas, e corresponde à oitava causa de morte por câncer no país <sup>6</sup>. Entretanto, dados recentes demonstram taxa de incidência mais elevada em São Paulo, apresentando 2,4 e 0,6 casos/100 mil habitantes, para homens e mulheres, respectivamente, taxas semelhantes às observadas em outros países da América do Sul e Central (entre 0,6 e 2,1/100.000 em homens). A distribuição desigual por todo o mundo pode ser atribuída à exposição pessoal a fatores de risco distintos <sup>7</sup>.

Incluem-se entre os fatores de risco para CHC hepatites crônicas pela infecção por vírus B e C (VHB e VHC) <sup>8</sup>, etilismo crônico <sup>9</sup>, ingestão de alimentos contaminados com aflatoxina-B1 <sup>10</sup>, hepatite autoimune, hemocromatose hereditária, deficiência da alfa1-antitripsina, esteato-hepatite não alcoólica e doença de Wilson <sup>11</sup>. Além disso, hábito tabagista, fatores dietéticos como sobrepeso/obesidade, diabetes e sexo masculino também têm papel relevante no aumento do risco para a doença <sup>3, 12-14</sup>.

Em geral, a maioria dos fatores de risco ocasiona formação e progressão de cirrose, com incidência de 80-90%, cuja associação com CHC está bem estabelecida <sup>15</sup>. Ressalta-se, ainda, risco aumentado de CHC de 5 a 15 vezes em portadores crônicos do VHB <sup>16</sup>, e de 11,5 a 17 vezes em pacientes infectados com VHC <sup>17</sup>. No Brasil, há variação geográfica na distribuição dos fatores de risco desta neoplasia. Nesse caso, VHC é a principal etiologia de cirrose e CHC <sup>18</sup>, com exceção da região centro-oeste e estado do Espírito Santo, que tem a infecção por VHB como fator desencadeador de cirrose, evoluindo para CHC <sup>7,19</sup>.

A alta mortalidade associada a esse tipo de câncer é atribuída principalmente à dificuldade em diagnosticar pacientes em estágio inicial <sup>20</sup>. O diagnóstico de CHC é obtido em exames de imagem, tais como tomografia computadorizada, ressonância magnética e ultrassom <sup>22</sup> e, ainda, com auxílio de marcadores bioquímicos, como a alfa-fetoproteína <sup>23</sup>. Nos casos em que os exames radiológicos apresentam-se inconclusivos, a histologia permanece como padrão ouro <sup>24</sup>.

Ao realizar o diagnóstico, existem algumas modalidades terapêuticas disponíveis, incluindo ressecção e transplante, ablação percutânea por radiofrequência ou alcoolização e quimioterapia, sistêmica ou regional <sup>24</sup>. No entanto, a recidiva ou metástase é comum em pacientes que realizaram ressecção, com taxa de sobrevida de 30% a 40% em cinco anos após a operação <sup>25</sup>. Ressalta-se, ainda, a administração de sorafenibe, um inibidor

multiquinase que bloqueia a proliferação celular, com benefício médio de sobrevivência de três meses<sup>26</sup>.

A avaliação do prognóstico é um passo crucial na conduta dos pacientes com CHC. Vários sistemas de estadiamento têm sido utilizados na classificação clínica desses pacientes, cuja estratificação poderá refletir no tratamento eficaz e, conseqüentemente, também no prognóstico. Nesse caso, considera-se a fase do tumor, além do comprometimento da função hepática devido à cirrose subjacente<sup>27-29</sup>.

Diversos parâmetros têm sido avaliados como ferramenta prognóstica em pacientes com CHC, dentre eles, os dados pessoais do paciente, como idade, sexo e estado geral de saúde. Incluem-se, ainda, exames clínicos para avaliar a função hepática, definida por classificação do *Child-Pugh* ou individualmente pelos níveis de bilirrubina e albumina, presença de ascite, hipertensão portal e encefalopatia<sup>30</sup>. As características tumorais também são determinantes, incluindo estágio, número, taxa de crescimento, agressividade e disseminação extra-hepática do tumor, além de invasão vascular, presença de marcadores tumorais e receptores alterados e tratamento<sup>27</sup>.

## **1.2 Hepatocarcinogênese e Fatores Genéticos**

Reconhecidamente, o acúmulo gradual de mutações em oncogenes e as alterações cromossômicas estão envolvidos na carcinogênese humana<sup>31</sup>. O CHC resulta de um processo de malignização complexo e heterogêneo caracterizado por diferenciação progressiva de lesões nodulares fenotipicamente anormais no fígado. A inflamação contínua e crônica ocasiona danos às células hepáticas e regeneração do tecido afetado. Esses eventos, considerados causas subjacentes do CHC, promovem acúmulo de alterações genéticas e epigenéticas e desregulação de diversas vias de sinalização, incluindo Hedgehog (Hh), angiogênese e WNT/ $\beta$ -catenina<sup>32</sup>.

WNTs são glicoproteínas sinalizadoras que influenciam múltiplos processos no desenvolvimento fisiológico e fisiopatológico animal. Mantém a homeostase tecidual modulando a proliferação, diferenciação, morfologia e migração celular e remodelamento do citoesqueleto para definição da polaridade, promovendo respostas dependentes e independentes da catenina. Essas glicoproteínas desempenham funções sinalizadoras por mecanismos autócrinos e parácrinos <sup>33</sup>.

As proteínas WNTs podem ativar a via por três tipos de sinalização intracelular. Uma destas vias, denominada via de polaridade celular planar, coordena a polarização das células durante o desenvolvimento do epitélio <sup>34</sup>. Uma outra, a via Wnt/Ca<sup>2+</sup>, tem papel importante no desenvolvimento e na manutenção da homeostase do organismo e está envolvida na ativação de proteínas heterotriméricas G, as quais ativam a fosfolipase C, que por sua vez, estimula o aumento intracelular de Ca<sup>2+</sup> <sup>35, 36</sup>. E, finalmente, a via Wnt canônica ou Wnt/ $\beta$ -catenina que é regulada pela quantidade de um co-ativador transcricional, a  $\beta$ -catenina que, por sua vez, controla a expressão de genes envolvidos no desenvolvimento embrionário, dentre outros processos celulares <sup>37</sup>.

A  $\beta$ -catenina, glicoproteína codificada pelo gene *CTNBI* (Catenina Beta 1), localizado no cromossomo 3p21 humano, é um componente central na via de transdução de sinal WNT, assim como elemento integral das junções de adesão celulares <sup>37</sup>. Na ausência da sinalização WNT, a  $\beta$ -catenina é fosforilada por enzima serina-treonina quinases, caseína quinases e glicogênio sintase quinase 3 (GSK-3, do inglês, *glycogen synthase kinase 3*). A interação entre estas quinases e a  $\beta$ -catenina é facilitada pelas proteínas axina e APC (do inglês, *adenomatous polyposis coli*) que formam um complexo de destruição, promovendo a degradação da  $\beta$ -catenina pelo proteossoma (Figura 1a).



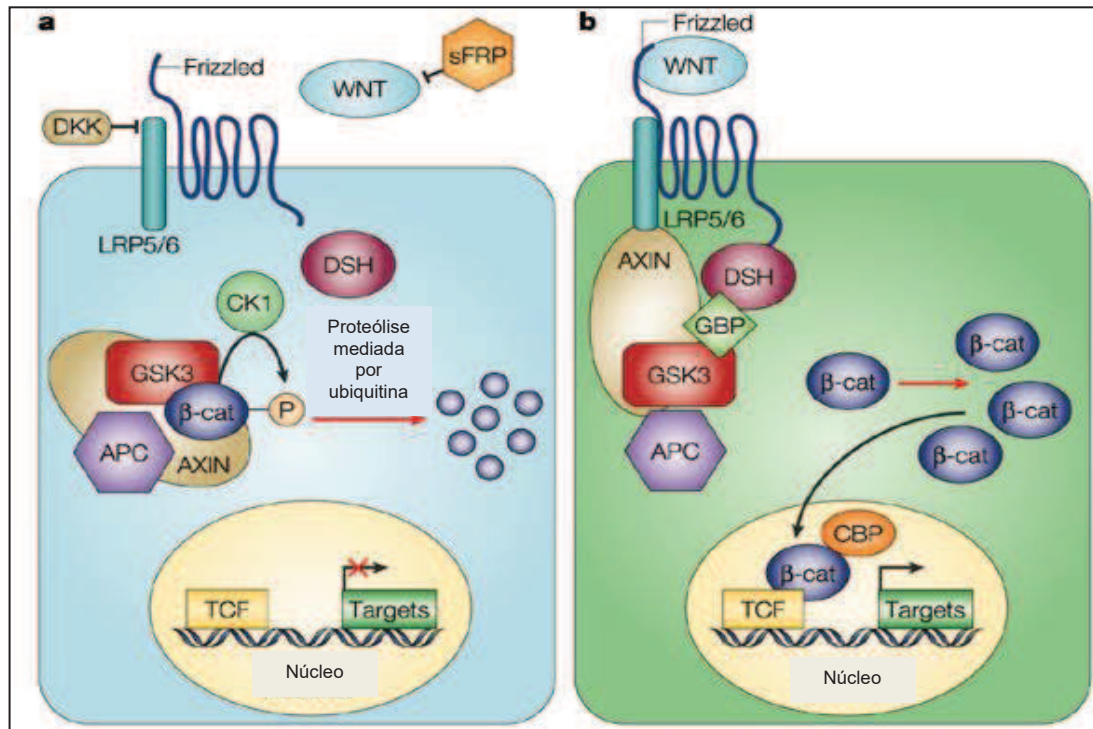


Figura 1: (a) Na ausência de WNT,  $\beta$ -catenina é degradada, e genes alvo potenciais são reprimidos. (b) Se sinalização WNT está ativa, a degradação de  $\beta$ -catenina é reduzida, desse modo, há acúmulo desta proteína no citoplasma e posterior translocação para o núcleo, ligando a fatores de transcrição como TCF e LEF ativando, assim, a expressão de genes alvos. APC, polipose adenomatosa coli;  $\beta$ -cat,  $\beta$ -catenina; CBP, proteína de ligação a CREB; CK, caseína-quinase; DKK, Dickkopf; DSH, Dishevelled; GBP, proteína GSK3 de ligação; GSK, glicogênio sintase-quinase; LRP, LDL-receptor relacionado com a proteína; P, fosforilação; SFRP, *Secreted frizzled-related proteins*; TCF, *transcription factors*.

Entretanto, quando a WNT se liga ao receptor *Frizzled* e ao co-receptor LRP5/6 (do inglês, *low-density lipoprotein receptor related proteins 5 and 6*), a GSK3 é recrutada para a membrana celular inibindo, dessa maneira, sua atividade e aumentando, consequentemente, a atividade de  $\beta$ -catenina (Figura 1b). Posteriormente, a  $\beta$ -catenina migra para o núcleo das células para executar uma variedade de funções, tais como o crescimento anormal de células e eventual carcinogênese<sup>37</sup>.

Mutações que ativam a  $\beta$ -catenina são encontradas em 20% a 34% de CHC, sugerindo ser o oncogene mais frequentemente acionado em CHC. Além disso, esta via tem papel fundamental em fenômenos fisiológicos do fígado, tais como renovação das células-tronco, transição epitelial-mesenquimal, proliferação e adesão celular<sup>38</sup>.

Por outro lado, a tumorigênese é acompanhada de baixa oxigenação, caracterizada como hipóxia, e pode ocorrer devido à proliferação descontrolada das células e rápido crescimento do tumor, com perfusão inadequada do tecido<sup>39,40</sup>. De acordo com a intensidade, a hipóxia pode resultar em apoptose, ou induzir respostas adaptativas de sobrevivência celular<sup>41,42</sup>, como a indução de fatores envolvidos no processo de angiogênese<sup>43</sup>. Nesse caso, destacam-se também entre os fatores genéticos para carcinogênese aqueles envolvidos no processo de formação de novos vasos sanguíneos no tecido tumoral, essencial para seu crescimento e disseminação metastática<sup>44,45</sup>, bem como o controle da sobrevivência e morte celular<sup>46,47</sup>.

O fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), cujo gene está mapeado no cromossomo 6p21.3 humano<sup>48</sup>, é uma glicoproteína de ligação à heparina que atua como fator de permeabilidade vascular<sup>49</sup>. Foi identificado pela primeira vez por Ferrara & Henzel (1989)<sup>50</sup> como um fator de crescimento específico do endotélio, sendo produzido por vários tipos celulares como fibroblastos, células musculares lisas, condrócitos hipertróficos e osteoblastos<sup>51</sup>. O VEGF tem importante papel como fator promotor da angiogênese, que constitui um passo importante no desenvolvimento do câncer, sendo necessário para o crescimento do tumor primário, invasão e metástases<sup>51,52</sup>.

Em diversos tipos de tumor, assim como em CHC, a super expressão de *VEGF*, bem como a presença de níveis séricos elevados de VEGF foram associados com pior prognóstico da doença<sup>53</sup>. O tecido tumoral necessita do suprimento de sangue no transporte de nutrientes, oxigênio e remoção de resíduos para a viabilidade e proliferação

celular <sup>54</sup>. Desse modo, para gerar o seu próprio fornecimento de sangue, diversas neoplasias malignas, incluindo câncer de mama, gástrico, intestinal, entre outros, aumentam a expressão de *VEGF* e seus receptores, tornando-se mais invasivos e metastáticos <sup>51</sup>.

Destaca-se também a  $\alpha$ -fetoproteína (AFP), uma  $\alpha$ 1-gamaglobulina produzida nos hepatócitos fetais, de regeneração e malignos, cujo gene localiza-se no cromossomo 4q11-q22 humano <sup>55</sup>. Várias afecções podem alterar o valor da AFP, como tumores de células germinativas e muitas condições não neoplásicas, incluindo cirrose, necrose hepática maciça, hepatite crônica, gravidez, sofrimento ou morte fetal, e defeitos do tubo neural fetal, como anencefalia e espinha bífida <sup>55</sup>. Ressalta-se elevação dessa proteína em pacientes com tumores hepáticos, sendo que cerca de 60% a 95% dos casos de CHC apresentam níveis >20ng/mL, no entanto, apenas valores >500ng/mL são considerados específicos dessa doença <sup>56</sup>. Desse modo, AFP parece desempenhar papel importante na promoção do desenvolvimento do tumor <sup>57</sup>.

Destaca-se também o glipican-3 (GPC3), membro da família de glipicans (GPCS), cujo gene está localizado no cromossomo Xq26.1 humano <sup>58</sup>. Regulam a atividade de sinalização de diversos fatores de crescimento, incluindo fatores de crescimento dos fibroblastos, proteínas Hedgehog (Hh) e WNT e proteoglicanos ligados à superfície celular por uma âncora de glicosil fosfatidil inositol <sup>59</sup>.

Diversos estudos evidenciam maior expressão do gene em tecidos tumorais, sugerindo a utilização deste marcador, juntamente com testes laboratoriais de rotina, no diagnóstico de CHC <sup>60-62</sup>. GPC3 está ausente em hepatócitos de indivíduos saudáveis e pacientes com hepatopatia não maligna, no entanto, podem ser detectados em cerca de 50% de pacientes com CHC e 33% dos daqueles com a doença, mas com valores normais de AFP <sup>63</sup>. Nesse contexto, há sugestão de GPC3 como marcador sérico para diagnóstico

de neoplasia maligna, tendo em vista seu efeito no crescimento de células de CHC pela super regulação autócrina/parácrina da sinalização de WNT (Figura 2)<sup>65</sup>, tornando-se alvo atraente para terapia molecular.

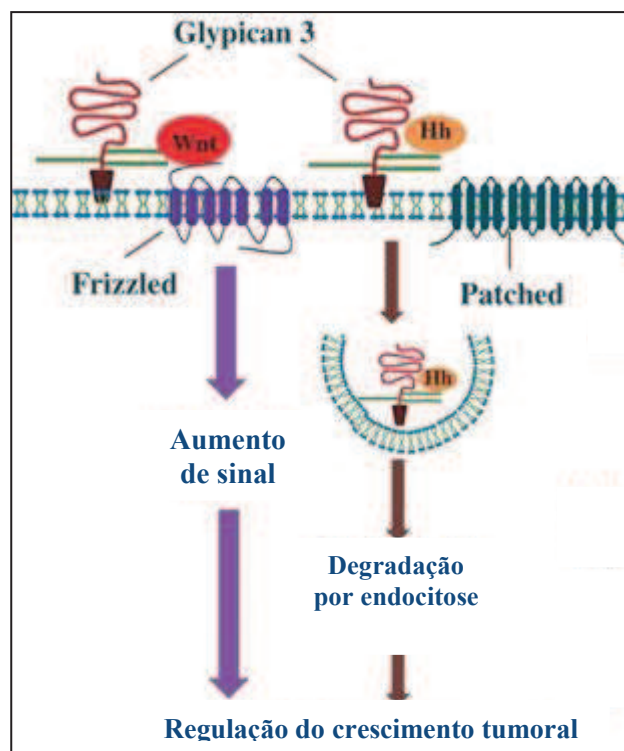


Figura 2: Esquema mostrando a participação de Glipican-3 na via WNT, o qual facilita e/ou estabiliza a interação de WNT e Frizzled com o conseqüente incremento da sinalização.

As cistatinas, inibidores endógenos de cisteíno-proteases (CPs), tais como as catpsinas L, H e S<sup>66</sup>, regulam a reabsorção óssea, quimiotaxia de neutrófilos, e inflamação de tecidos, processo de apresentação de hormônio e antígeno, e resistência às infecções bacterianas e virais. Também têm sido estudadas como potenciais marcadores na carcinogênese<sup>67,68</sup>.

A cistatina B (CSTB), cujo gene localiza-se no cromossomo 21q22.3 humano, apresenta superexpressão proteica em vários tipos de carcinoma humano, incluindo

colorretal e gástrico. Todavia, baixos níveis de expressão de *CSTB* foram observados em carcinoma de esôfago e adenocarcinoma de próstata <sup>67</sup>. Por outro lado, há super expressão na maioria dos casos de CHC, além disso, são detectados também nesses pacientes níveis séricos elevados de *CSTB*. Valores de especificidade (85,5%) e sensibilidade (53,1%) ressaltam a importância de *CSTB* em pacientes com CHC, comparado àqueles com doenças hepáticas crônicas não-malígnas <sup>67,69</sup>.

O estudo de fatores genéticos poderá esclarecer mecanismos envolvidos no CHC, identificar biomarcadores e, desse modo, contribuir para diagnóstico precoce da doença, assim como propor novas intervenções terapêuticas <sup>70</sup>. Ressalta-se que a combinação de terapias direcionadas de acordo com as assinaturas genômicas dos tumores será objetivo-chave em oncologia translacional, o que poderá otimizar o tratamento e prognóstico dos pacientes <sup>71-73</sup>.

### **1.3 Objetivo Geral**

Avaliar a associação da expressão de genes relacionados à angiogênese (*VEGF*), promoção e desenvolvimento de tumores (*AFP*), além de proteção (*CSTB*), comunicação (*CTNNB1*) e sinalização celular (*GPC3*) 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 comparativamente a expressão de *VEGF*, *AFP*, *CSTB*, *CTNNB1* e *GPC3*, assim como suas correlações, em tecido hepático de pacientes com CHC, cirrose ou VHC e controles e sua associação com estadiamento clínico nos grupos com CHC e cirrose.

(Artigo 1)

2. Avaliar a associação dos níveis séricos de VEGF, AFP, CSTB e GPC3 em pacientes com CHC, cirrose ou VHC, e suas respectivas correlações. (Artigo 1)
3. Determinar valores de sensibilidade e especificidade das referidas proteínas séricas como potenciais marcadores de diagnóstico, considerando CHC, cirrose e VHC. (Artigo 1)
4. Avaliar a relação dos polimorfismos *VEGF-C936T* e *VEGF-A1154G* com VEGF circulante, assim como a correlação entre nível de AFP e VEGF sérico, além de classificações clínicas (BCLC e Child-Pugh), sobrevida e comorbidades em pacientes com CHC, cirrose e VHC. (Artigo 2)

*Resultados*

## 2. RESULTADOS

Os objetivos 1 a 3 resultaram no artigo 1, que será submetido a publicação no *Journal of Gastroenterology and Hepatology*. O objetivo 4 resultou no artigo “*VEGF Polymorphisms Related to Higher Serum Levels of Protein Identify Patients with Hepatocellular Carcinoma*” aceito para publicação no *Canadian Journal of Gastroenterology and Hepatology*.



**Artigo 1****Biomarcadores Genéticos e Séricos para Diagnóstico e Prognóstico de Carcinoma Hepatocelular, Cirrose e Hepatite C**

Rafael Fernandes-Ferreira<sup>1</sup>, Graciele Domitila Tenani<sup>1</sup>, Marcela Augusta de Souza Pinhel<sup>2</sup>, Ana Luiza Bonini<sup>3</sup>, Jéssika Lima Farto<sup>3</sup>, Ilka de Fátima Santana Boin<sup>4</sup>, Ana Margarida Abrantes<sup>5</sup>, Maria Filomena Botelho<sup>5</sup>, José Guilherme Lopes Tralhão<sup>5</sup>, Moarcir Fernandes de Godoy<sup>6</sup>, Rita de Cássia Martins Alves da Silva<sup>6</sup>, Dorotéia Rossi Silva Souza<sup>7</sup>, Renato Ferreira da Silva<sup>6</sup>.

1. Aluno do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto – FAMERP.
2. Pós-Doutoranda na Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP).
3. Aluna de Graduação em Medicina da FAMERP.
4. Professora Titular da Faculdade de Medicina da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP).
5. Professores da Universidade de Coimbra, Portugal.
6. MD, PhD – Hospital de Base de São José do Rio Preto – HB.
7. Professor, PhD – Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto – FAMERP.

Informações de contato:

Rafael Fernandes-Ferreira

Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto – FAMERP

Avenida Brigadeiro Faria Lima, 5416 – Vila São Pedro

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

Telefone: +55 (17) 3201-5864

E-mail: rafael91\_fernandes@hotmail.com

## RESUMO

**Introdução e Objetivos** - Carcinoma hepatocelular (CHC) é o tipo mais comum de câncer de fígado. Os fatores de risco para CHC incluem hepatites C (HCV) e B (HCB), cirrose alcoólica, exposição prolongada à aflatoxina, doenças metabólicas hereditárias, além de alterações genéticas que podem afetar diversas vias celulares. Os objetivos foram analisar comparativamente a expressão de *VEGF*, *AFP*, *CSTB*,  *$\beta$ -catenina* e *GPC3* em CHC, cirrose ou VHC e controles e sua relação com estadiamento clínico nos grupos com CHC e cirrose, avaliar a associação dos níveis séricos de VEGF, AFP e CSTB nos referidos grupos e avaliar valores de sensibilidade e especificidade das referidas proteínas séricas como potenciais marcadores de diagnóstico, considerando os grupos estudados. **Casuística e Métodos** - Foram selecionados 230 indivíduos, distribuídos em Grupo 1 (G1) – 80 pacientes com CHC; Grupo 2 (G2) – 76 pacientes com cirrose por qualquer etiologia; Grupo 3 (G3) – 33 pacientes com VHC; Grupo 4 (G4) – 41 indivíduos sem sinal clínico ou bioquímico de qualquer hepatopatia (controle). A expressão gênica foi analisada por qRT-PCR. As dosagens bioquímicas foram realizadas pelo método de ELISA. As variáveis foram submetidas à análise de variância (ANOVA), teste Kruskal Wallis, Mann Whitney, correlação de Pearson e curva ROC. Foi admitido erro alfa de 5% considerando-se significantes valores de  $P < 0,05$ . **Resultados:** Observou-se superexpressão de *VEGF* em G1 (3,85), comparado a G2 (0,76) e G3 (1,95;  $P = 0,024$ ). Notou-se níveis de expressão elevada de *VEGF* e *AFP* em pacientes classificados no estágio D (19,97 e 8,86), comparado àqueles no estágio B (1,96 e 0,03;  $P = 0,008$  e  $P = 0,001$ ), e pacientes no estágio C apresentaram maior expressão de *CTNBI*, comparado àqueles do estágio B (18,40 versus 0,90;  $P = 0,008$ ). Níveis séricos proteicos, houve aumento de GPC3 (2,8ng/mL), CSTB (0,99ng/mL), VEGF (264,8pg/mL) e AFP (20,3ng/mL) nos pacientes com CHC comparado ao grupo

controle (2,9ng/mL, 0,6ng/mL, 185,2pg/mL, 2,6ng/mL;  $P < 0,05$  para todas as comparações). GPC3 mostrou-se relevante na discriminação entre pacientes de G1 e G4 (área sob a curva = 0,82). Para VEGF, notou-se poder discriminatório entre pacientes com CHC e controles (com área sob a curva = 0,71). CSTB apresentou poder discriminatório na comparação entre os grupos VHC e controle (área sob a curva = 0,74). A análise de correlação mostrou para níveis de expressão gênica em G1 correlação positiva entre todos os genes, exceto a expressão de *CSTB*, correlacionado apenas com *CTNNB1* ( $r=0,43$ ;  $P=0,01$ ), e *GPC3* com *VEGF* ( $r=0,49$ ;  $P=0,008$ ).

**Conclusão:** O presente estudo confirma a sensibilidade de CSTB (proteção celular) sérico no diagnóstico da hepatite C, enquanto angiogênese e proliferação celular, representadas respectivamente pela superexpressão gênica e proteica de VEGF e GPC3 sérico conferem, ambos, sensibilidade e especificidade para diagnóstico de CHC.

**Palavras-chave:** Carcinoma Hepatocelular; Angiogênese; Proliferação celular; Vias de Sinalização.

## INTRODUÇÃO

Tumores primários do fígado correspondem ao quinto câncer mais comum no mundo e a segunda causa de morte por neoplasia maligna <sup>1</sup>. O carcinoma hepatocelular (CHC) é a neoplasia hepática primária mais frequente, observada em 85-90% dos tumores primários do fígado e o sexto tipo de tumor mais comum, com cerca de 782.000 novos casos diagnosticados anualmente <sup>2</sup>. No mundo, apresenta-se como a segunda principal causa de óbito por câncer, com aproximadamente 746.000 mortes/ano<sup>1</sup>. Incluem-se entre os fatores de risco hepatites crônicas pela infecção por vírus B e C (VHB e VHC) <sup>3</sup>, etilismo crônico <sup>4</sup>, ingestão de alimentos contaminados com aflatoxina-B1 <sup>5</sup>, hepatite autoimune, hemocromatose hereditária, deficiência da alfa1-antitripsina, esteato-hepatite não alcoólica e doença de Wilson <sup>6</sup>.

A hepatocarcinogênese resulta de um processo de malignização complexo e heterogêneo, tanto do ponto de vista molecular como clínico, e surge no contexto de disfunção hepática subjacente. Assim como em outros tipos de câncer, resulta de alterações que ocorrem no DNA genômico, com a combinação de fatores virais e ambientais <sup>7</sup>. Estudos moleculares mostram o envolvimento de um processo de múltiplas vias e acúmulo de eventos genéticos e epigenéticos, ocasionando ativação anormal ou inativação de diversas vias de sinalização, incluindo proliferação, sobrevivência, diferenciação celular e angiogênese <sup>8</sup>.

Entre os fatores genéticos destacam-se fator de crescimento endotelial vascular (*VEGF*) envolvido na angiogênese, alfa fetoproteína (*AFP*) relacionada à promoção e desenvolvimento de tumores, assim como cistatina B (*CSTB*),  $\beta$ -catenina (*CTNNB1*) e glipican-3 (*GPC3*) relacionados à proteção, comunicação e sinalização celular, respectivamente. A identificação de biomarcadores envolvidos no CHC poderá contribuir para diagnóstico precoce da doença, assim como propor novas intervenções

terapêuticas. Ressalta-se que a combinação de terapias direcionadas de acordo com as assinaturas genômicas dos tumores, predicado da oncologia translacional, poderá otimizar o tratamento e prognóstico dos pacientes <sup>8</sup>.

Desse modo, os objetivos deste estudo foram analisar a expressão gênica de *VEGF*, *AFP*, *CSTB*, *CTNNB1* e *GPC3* em tecido tumoral, assim como níveis séricos proteicos (*VEGF*, *AFP* e *CSTB*) em associação com CHC e cirrose, e determinar os valores de sensibilidade e especificidade das referidas proteínas séricas como potenciais marcadores de diagnóstico.

## CASUÍSTICA E MÉTODOS

### Casuística

Foram selecionados 230 indivíduos, distribuídos em quatro grupos: Grupo 1 (G1) – 80 pacientes com CHC; Grupo 2 (G2) – 76 pacientes com cirrose por qualquer etiologia; Grupo 3 (G3) – 33 pacientes com VHC; Grupo 4 (G4) – 41 indivíduos sem sinais clínicos ou bioquímicos de qualquer hepatopatia (controle). Os pacientes 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 no Serviço de Gastreenterologia do Centro Hospitalar da Universidade de Coimbra, no período de 2013 a 2016. O diagnóstico de CHC foi realizado de acordo com as diretrizes da Associação Americana para o Estudo das Doenças do Fígado (AASLD) (Bruix, Sherman, 2011). O grupo controle foi selecionado no Hemocentro do HB/FAMERP e entre pacientes submetidos à cirurgia no Serviço de Gastroenterologia desta instituição, sem as referidas hepatopatias. Foram excluídos indivíduos com outras neoplasias, doenças psiquiátricas ou gestantes. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da instituição (CEP/FAMERP - Parecer nº. 435/2011).

## Métodos

Fragmentos de tecido hepático foram obtidos por biópsia percutânea por agulha de *tru-cut* ou após cirurgia (transplante de fígado) e armazenados em tubos criogênicos com solução de estabilização (RNA later<sup>®</sup> - Life Technologies). O RNA total foi extraído com o reagente TRIzol<sup>®</sup> (Ambion<sup>®</sup>) e quantificado em fluorômetro QUBIT 2.0, de acordo com os manuais dos fabricantes. A fita de cDNA foi sintetizada utilizando o Kit *High Capacity cDNA* (Applied Biosystems<sup>®</sup>, Foster City, CA, EUA). Os níveis de transcrição foram normalizados pelos genes *GAPDH* e *β-actina* e a reação de qPCR foi conduzida pelo sistema *StepOne Plus Real Time PCR* (Applied Biosystems<sup>®</sup>). A expressão gênica relativa de *VEGF*, *CTNNB1*, *CSTB*, *GPC3* e *AFP* foi determinada pelo método comparativo  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ , 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<sup>9</sup>. 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.

As dosagens séricas de VEGF, CSTB e GPC3 foram realizadas pelo método ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* - Kit *Cloud-Clone Corp*<sup>®</sup>). A concentração das proteínas foi determinada por comparação da densidade óptica das amostras com a curva padrão. Os valores de níveis séricos de AFP foram obtidos em prontuário informatizado dos pacientes. Aqueles com CHC e cirrose, submetidos às análises de expressão gênica (N=47), também foram classificados clinicamente de acordo com a evolução da doença, utilizando os Critérios de Barcelona ou *Child-Pugh*.

As variáveis quantitativas com distribuição gaussiana foram submetidas à análise de variância (ANOVA) para comparação entre três ou mais grupos, e teste t para dois grupos. Para as variáveis quantitativas não paramétricas aplicou-se teste Kruskal

Wallis na comparação entre três ou mais grupos e Mann Whitney para dois grupos. A análise de correlação de Spearman foi realizada entre os níveis de expressão de *VEGF*, *CSTB*, *AFP*, *GPC3* e *CTNNB1*, e ainda, para os níveis séricos de VEGF, CSTB, AFP e GPC3. Para determinar valores de sensibilidade, especificidade, preditivo positivo e preditivo negativo utilizou-se curva ROC (*receiver operating characteristic*), admitindo como relevância clínica, áreas sob a curva  $\geq 0,7$ . Empregou-se representação gráfica de *box-plot* incluindo valor mínimo, intervalo interquartil, mediana e valor máximo, além de *outliers*. Foi admitido erro alfa de 5%. Os programas *MiniTab*, *Stats Direct* e *GraphPad* foram utilizados nas análises.

## RESULTADOS

Observou-se superexpressão de *VEGF* em G1 (mediana=3,85), comparado a G2 (0,76) e G3 (1,95;  $P=0,024$ ) (Figura 1A). Houve semelhança nos níveis de expressão de *CTNNB1* entre os grupos (CHC: 1,97; Cirrose: 1,86 e VHC: 1,21;  $P=0,775$ ; Figura 1B). Para *GPC3* e *AFP*, destacaram-se valores aumentados em pacientes com CHC (4,47 e 3,60, respectivamente), comparado àqueles com cirrose (3,50 e 2,65, respectivamente) e hepatite C (2,65 e 0,62, respectivamente), no entanto, sem diferença significativa ( $P>0,05$ ; Figura 1C-D). G3 apresentou também acréscimo na expressão de *CSTB*, ao comparado com G1 e G2, embora, sem diferença significativa entre eles (7,49 versus 4,14 e 4,89;  $P>0,05$ , para ambos; Figura 1E).

As respectivas expressões gênicas foram relacionadas com o sistema de estadiamento de CHC, com níveis de expressão elevada de *VEGF* e *AFP* em pacientes classificados no estágio D (19,97 e 8,86, respectivamente; Tabela 1), comparado àqueles no estágio B (1,96 e 0,03;  $P = 0,008$  e  $P = 0,001$ ). Pacientes classificados no estágio C apresentaram maior expressão de *CTNNB1*, comparado àqueles do estágio B

(18,40 versus 0,90;  $P = 0,008$ ). Houve semelhança entre os valores de expressão dos demais genes para a classificação clínica de pacientes com CHC ( $P > 0,05$ ). O mesmo ocorreu para pacientes com cirrose classificados pelo Child-Turcotte-Pugh ( $P > 0,05$ ).

Em relação aos níveis séricos proteicos, representados por valores de mediana e quartis, houve aumento de GPC3 nos grupos com CHC e cirrose (2,8ng/mL e 2,9ng/mL, respectivamente), comparado ao grupo controle (0,84ng/mL;  $P = 0,001$ , para ambos), enquanto os valores no grupo com VHC (2,0ng/mL) foram semelhantes ao grupo controle ( $P > 0,05$ ; Figura 2C). Notou-se para CSTB, aumento nos níveis séricos em pacientes com CHC (0,99ng/mL) e VHC (1,0ng/mL), comparado a controles (0,6ng/mL;  $P = 0,002$ ;  $P = 0,008$ , respectivamente; Figura 2D). Pacientes com CHC também mostraram níveis aumentados de VEGF (264,8pg/mL), comparado ao grupo com cirrose (185,2pg/mL;  $P = 0,0007$ ), VHC (188,8pg/mL;  $P = 0,03$ ) e controles (182,2pg/mL;  $P = 0,009$ ; Figura 2A). Para AFP foram observados valores aumentados no grupo com CHC (20,3ng/mL), comparado a cirrose (2,6ng/mL) e VHC (3,0ng/mL;  $P < 0,001$ , para ambos; Figura. 2B).

A curva ROC, considerando níveis séricos proteicos, foi utilizada para avaliar o poder discriminativo de cada variável (Figura 3). GPC3 mostrou-se relevante na discriminação entre pacientes com CHC (G1) e controles (G4), com sensibilidade de 82% e especificidade de 72,5% (área sob a curva = 0,82), valor preditivo positivo e negativo de 0,80 e 0,74, respectivamente, e *cut-off* de 1,56ng/mL. O mesmo ocorreu em pacientes com cirrose *versus* controles, com especificidade de 87% e sensibilidade de 55% (área sob a curva = 0,75), valor preditivo positivo e negativo de 0,83 e 0,62, respectivamente, e *cut-off* de 2,72ng/mL, assim como entre VHC e controles, com sensibilidade de 78% e especificidade de 65% (área sob a curva = 0,72), valor preditivo positivo e negativo de 0,56 e 0,83, respectivamente, e *cut-off* de 1,20ng/mL.



Em relação aos níveis séricos de VEGF, notou-se poder discriminatório entre pacientes com CHC e controles, com sensibilidade de 79% e especificidade de 57% (área sob a curva= 0,71), valor preditivo positivo e negativo de 0,781 e 0,56 respectivamente, e *cut-off* de 186,7pg/mL. Ainda, observou-se também poder discriminatório para CSTB na comparação entre os grupos VHC e controle, com sensibilidade de 82% e especificidade de 60% (área sob a curva = 0,74), valor preditivo positivo e negativo de 0,54 e 0,85, respectivamente, e *cut-off* de 0,679 ng/mL).

A análise de correlação (Tabela 2) mostrou para níveis de expressão gênica em G1 correlação positiva entre todos os genes, exceto a expressão de *CSTB*, correlacionado apenas com *CTNNB1* ( $r=0,43$ ;  $P=0,01$ ), e *GPC3* com *VEGF* ( $r=0,49$ ;  $P=0,008$ ). Para os demais, destacou-se a correlação entre *CTNNB1* e *GPC3* ( $r=0,52$ ;  $P=0,004$ ). Em G2, notou-se correlação positiva entre níveis de expressão de todos os genes, com destaque para *GPC3* e *VEGF* ( $r=0,94$ ;  $P<0,0001$ ), seguido de *CTNNB1* com *VEGF* e *GPC3* ( $r=0,88$ ;  $r=0,87$ ;  $P<0,0001$ , para ambos). Para G3, houve forte correlação positiva entre todos os genes, exceto para *CSTB* relacionado apenas com *AFP* ( $r=0,85$ ;  $P=0,01$ ), e com *CTNNB1* ( $r=0,85$ ;  $P=0,01$ ). Para os demais, destacou-se a correlação entre *GPC3* e *VEGF* ( $r=1,00$ ;  $P=0,0004$ ), seguido de *VEGF* com *AFP* e *CTNNB1* ( $r=0,91$ ;  $r=0,90$ ;  $P=0,001$ ;  $P=0,004$ , respectivamente). Para os níveis séricos de proteínas, houve correlação apenas entre *CSTB* e *GPC3* em pacientes com CHC e cirrose ( $r=0,39$ ;  $P=0,006$ , para ambos; Tabela3).

## DISCUSSÃO

Neste estudo, a análise de expressão de genes relacionados à angiogênese (*VEGF*), promoção e desenvolvimento de tumores (*AFP*), além de proteção (*CSTB*), comunicação ( $\beta$ -*catenina*) e sinalização celular (*GPC3*) mostrou valores elevados

apenas de *VEGF* em tecido hepático tumoral de pacientes com CHC, corroborando outros estudos <sup>10,11</sup>. Superexpressão de *VEGF* nestes pacientes é decorrente da hipervascularização tumoral, pois, tumores sólidos necessitam do suprimento de sangue no transporte de nutrientes, oxigênio e remoção de resíduos para a viabilidade e proliferação celular <sup>12</sup>. Nesse contexto, para gerar o próprio fornecimento de sangue, diversas neoplasias malignas aumentam a expressão de *VEGF* e seus receptores, tornando-se hipervascularizados, e conseqüentemente, mais invasivos e metastáticos <sup>13</sup>. Associação da superexpressão de *VEGF* com CHC fornece subsídio para produção de fármacos anti-angiogênicos utilizados no tratamento de câncer. *VEGF* e a respectiva proteína tem-se destacado como principais alvos terapêuticos no tratamento de neoplasias <sup>14</sup>.

Nível sérico elevado de VEGF mostrou-se relevante na discriminação de pacientes com CHC em relação a controles, com valores de 79% de sensibilidade e 57% de especificidade, sugerindo seu potencial papel no diagnóstico de CHC, assim como já demonstrado para câncer de bexiga<sup>25</sup> e próstata <sup>16</sup>. Em estudo prévio, foi constatado por nosso grupo relação entre aumento de VEGF e o polimorfismo *VEGF-C936T* em pacientes com CHC <sup>17</sup>.

GPC3, embora com expressão gênica semelhante entre os grupos, observou-se aumento dos níveis séricos da proteína em pacientes com CHC, conferindo alta sensibilidade e especificidade (82% e 72,5%, respectivamente), com potencial diagnóstico para a doença. Esses dados corroboram outros estudos <sup>18-20</sup>. Ressalta-se que GPC3, proteína ancorada na membrana plasmática, está envolvida no crescimento, diferenciação e migração celular pela regulação de sinalização de diversos fatores de crescimento, incluindo fatores de crescimento dos fibroblastos, proteínas Hedgehog (Hh) e via WNT <sup>21</sup>.

Nesse contexto, alterações séricas de GPC3 em CHC podem influenciar na tumorigênese<sup>22</sup>. GPC3, embora ausente em hepatócitos de indivíduos saudáveis e pacientes com hepatopatia não maligna, pode ser detectados em cerca de 50% de pacientes com CHC e 33% daqueles com a doença, mas com valores normais de AFP<sup>23</sup>. Lee et al. (2014)<sup>24</sup> notaram, também, níveis séricos aumentados de GPC3, todavia, com valores menos expressivos de sensibilidade e especificidade (53,8% e 65%, respectivamente). Há referência, ainda, de superexpressão de GPC3 em pacientes com CHC<sup>18</sup>, e semelhança entre os níveis séricos de indivíduos com ou sem CHC<sup>22</sup>. Nesse caso, o grupo controle foi representado por indivíduos com doenças hepáticas crônicas, o que provavelmente impediu diferenciar o grupo de pacientes dos controles.

No presente estudo, ao contrário de Hass et al. (2015)<sup>25</sup>, houve semelhança entre os grupos em relação a expressão gênica de *AFP*. Entretanto, pacientes com CHC classificados no estágio D mostraram superexpressão de *AFP*, em relação àqueles no estágio B, considerado de melhor prognóstico<sup>26</sup>. O sistema de estadiamento considera número e tamanho dos tumores, bem como *performance status* e escore *Child-Pugh*<sup>27</sup>. Pacientes com BCLC-D, aqueles em estágio final da doença, apresentam lesões hepáticas graves, cujas características clínicas associam-se a elevação de AFP, incluindo, maior quantidade de tumores ou diâmetros maiores e deficiência na função hepática decorrente de danos histológicos crônicos. Adicionalmente, pacientes com CHC em estágio inicial da doença (BCLC-A) apresentaram acréscimo nos níveis de mRNA de *AFP*. Ressalta-se que níveis séricos de AFP podem aumentar nos primeiros estágios de CHC e, em seguida, decair ou normalizar na progressão da doença, o que torna AFP o marcador tumoral mais utilizado para CHC<sup>28</sup>. Entretanto, estudo recente questiona o poder diagnóstico de AFP<sup>29</sup>.

Embora, a expressão gênica de *CSTB* tenha apresentado semelhança entre os grupos, há referência de superregulação em tecido tumoral de pacientes com CHC<sup>30</sup>. Vale ressaltar que, no referido estudo, o grupo de pacientes com VHC apresentou acréscimo na expressão de *CSTB* comparado à CHC e cirrose. Por outro lado, em nosso estudo, ao utilizar *cut-off* de 0,68ng/mL, a quantificação de *CSTB* sérica apresentou-se como potencial ferramenta discriminatória de pacientes com VHC e indivíduos saudáveis, com sensibilidade de 82% e especificidade de 60%.

Nesse contexto, cistatinas, inibidores endógenos de cisteíno-proteases (CPs), tais como as catepsinas L, H e S (Oliveira et al., 2003), regulam a quimiotaxia de neutrófilos, e inflamação de tecidos e resistência às infecções bacterianas e virais (Lee et al., 2008; Takaya et al., 2015). Desse modo, esses resultados reforçam a função do gene em codificar proteínas de proteção à infecção viral, como o vírus da hepatite C. Em contrapartida, no presente estudo, o acréscimo nos níveis séricos de *CSTB* em pacientes com CHC mostrou sensibilidade de 53% e especificidade de 80% na distinção entre pacientes e controles, corroborando outro estudo<sup>40</sup>. A propósito, níveis séricos elevados de *CSTB* também têm sido relatados em câncer de ovário<sup>41,42</sup>.

Estudos envolvendo expressão gênica de *CTNNT1* e CHC são escassos na literatura, o que dificulta a discussão dos dados ora apresentados, mostrando semelhança entre os grupos de pacientes e controles. Por outro lado, há referência de elevada expressão proteica em tecido tumoral de pacientes com CHC<sup>43,44</sup>. De fato, quando a WNT se liga ao receptor *Frizzled* e ao co-receptor LPR5/6, a glicogênio sintase quinase 3 (GSK3) é recrutada para a membrana celular inibindo, dessa maneira, sua atividade e aumentando, conseqüentemente, a atividade de  $\beta$ -catenina. Posteriormente, a  $\beta$ -catenina migra para o núcleo das células para executar várias funções, tais como o crescimento anormal de células e eventual carcinogênese<sup>37</sup>.

Neste estudo, expressão gênica de *VEGF* correlacionou-se positivamente com todos os genes estudados, indicando a relação do processo de angiogênese com genes envolvidos em vias de proliferação, comunicação e sinalização celular. A via WNT regula a transcrição de genes responsáveis por esses processos <sup>36</sup>. Na ausência deste ligante, a  $\beta$ -catenina é degradada e não se acumula no citoplasma. Entretanto, quando a WNT se liga ao receptor Frizzled e ao co-receptor LPR5/6, a GSK3 é recrutada para a membrana celular inibindo, dessa maneira, sua atividade e aumentando, conseqüentemente, a atividade de  $\beta$ -catenina <sup>37</sup>. Posteriormente, a  $\beta$ -catenina migra para o núcleo das células para executar uma variedade de funções, tais como o crescimento anormal de células e eventual carcinogênese. Por outro lado, para o gene *GPC3*, que regula a atividade de sinalização de diversos fatores de crescimento, há super regulação autócrina/parácrina da sinalização WNT tendo em vista seu efeito no crescimento de células de CHC.

Ressalta-se que o advento da biologia molecular tem permitido rastrear genes e proteínas envolvidos na hepatocarcinogênese <sup>38,39</sup> influenciando, conseqüentemente, no diagnóstico e prognóstico da doença. Nesse contexto, o presente estudo confirma a sensibilidade de CSTB (proteção celular) sérico no diagnóstico de VHC, enquanto angiogênese e proliferação celular, representadas respectivamente pela superexpressão gênica e proteica de VEGF e GPC3 sérico conferem, ambos, sensibilidade e especificidade para diagnóstico de CHC.

## **AGRADECIMENTOS**

Às agências de fomento Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Processo n° 2012/19826-3), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior e Coimbra Group, pelo apoio financeiro.

**REFERÊNCIAS**

- 1 Crawley AC, Brook DA, Muller VJ, Petersen BA, Isaas EL, Biekicki J, et al. Enzyme replacement therapy in feline model of the Matroteaux-Lamysyndrome. *J Clin Invest* 1996; 97: 1864-1873.
- 2 Ladep NG , Lesi OA , Mark P, et al. Problem of hepatocellular carcinoma in West Africa. *World J Hepatol* 2014;6:783-92.
- 3 Laursen L. A preventable cancer. *Nature* 2014;516:S2-S3.
- 4 Kanwal F , Hoang T , Kramer JR , et al. Increasing prevalence of HCC and cirrhosis in patients with chronic hepatitis C virus infection. *Gastroenterology* 2011;140:1182-8.
- 5 Miamen AG, Dong H, Roberts LR. Immunotherapeutic Approaches to hepatocellular Carcinoma Treatment. *Liver Cancer* 2012;1:226-37.
- 6 Felizardo RJ, Câmara NO. Hepatocellular carcinoma and food contamination: aflatoxins and ochratoxin A as a great prompter. *World J Gastroenterol* 2013;24:3723-5.
- 7 Vivarelli M, Montalti R, Risaliti A. Multimodal treatment of hepatocellular carcinoma on cirrhosis: an update. *World J Gastroenterol* 2013;19:7316-26.
- 8 Shiraha H , Yamamoto K, Namba M. Human hepatocyte carcinogenesis (review). *Int J Oncol* 2013;42: 1133-8.
- 9 Nishida N, Goel A. Genetic and Epigenetic Signatures in human hepatocellular carcinoma a systematic. review. *Current Genomics* 2011;12:130-37.
- 10 Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat Protoc.* 2008;3(6):1101-8.
- 11 Zhao J, Hu J, Cai J, Yang X, Yang Z. Vascular endothelial growth factor expression in serum of patients with hepatocellular carcinoma. *Chin Med J (Engl)* 2003;116:772-6.

12 Shim JH, Park JW, Kim JH, An M, Kong SY, Nam BH, et al. Association between increment of serum VEGF level and prognosis after transcatheter arterialchemoembolization in hepatocellular carcinoma patients. *Cancer Sci* 2008;99:2037-44.

13 Ratnasari N, Nurdjanah S, Sadewa AH, Hakimi M. The role of vascular endothelial growth factor 634 G/C and its soluble receptor on chronic liver disease and hepatocellular carcinoma. *Arab J Gastroenterol*. 2016 Jun;17(2):61-6.

14 Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med* 2003;9:669-76.

15 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.

16. Urquidi V, Goodison S, Kim J, Chang M, Dai Y, Rosser CJ. Vascular endothelial growth factor, carbonic anhydrase 9, and angiogenin as urinary biomarkers for bladder cancer detection. *Urology*. 2012 May;79(5):1185.e1-6.

17 Kervancioglu E, Kosan M, Erinanc H, et al. *Kaohsiung J Med Sci*. 2016 Feb;32(2):74-9.

18 Yvamoto EY, Ferreira RF, Nogueira V. *Genet Mol Res*. 2015 Dec 21;14(4):17453-62.

19 Akutsu N, Yamamoto H, Sasaki S, Taniguchi H, Arimura Y, Imai K, et al. Association of glypican-3 expression with growth signaling molecules in hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2010;16:3521-8.

20 Hass HG, Jobst J, Scheurlen M, Vogel U. Gene expression analysis for evaluation of potential biomarkers in hepatocellular carcinoma. *Nehls O.Anticancer Res* 2015;35:2021-8.

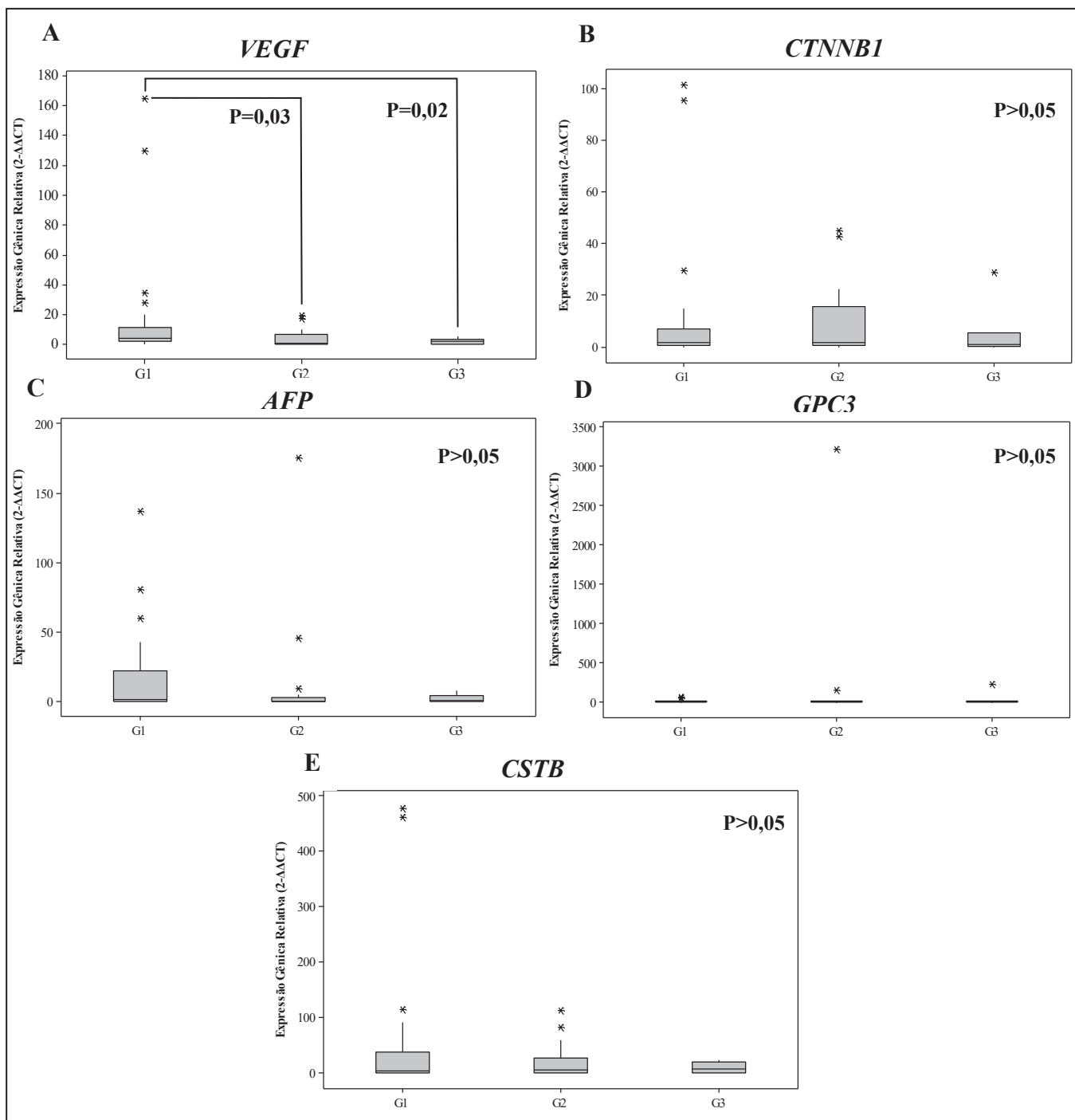
- 21 Wang YL, Zhu ZJ, Teng DH, Yao Z, Gao W, Shen ZY. Glypican-3 expression and its relationship with recurrence of HCC after liver transplantation. *World J Gastroenterol* 2012;18: 2408-14.
- 22 Chen IP, Ariizumi SI, Nakano M, Yamamoto M. Positive glypican-3 expression in early hepatocellular carcinoma predicts recurrence after hepatectomy. *J Gastroenterol*. 2013.
- 23 Yang SL, Fang X, Huang ZZ, et al. Can serum glypican-3 be a biomarker for effective diagnosis of hepatocellular carcinoma? A meta-analysis of the literature. *Dis Markers* 2014;127831.
- 24 Haruyama Y, Kataoka H. Glypican-3 is a prognostic factor and an immunotherapeutic target in hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol*. 2016 Jan 7; 22(1): 275–283.
- 25 Lee HJ, Yeon JE, Suh SJ, Lee SJ, et al. Clinical utility of plasma glypican-3 and osteopontin as biomarkers of hepatocellular carcinoma. *Gut Liver* 2014;8:177-85.
- 26 Hass HG, Jobst J, Scheurlen M, Vogel U. Gene expression analysis for evaluation of potential biomarkers in hepatocellular carcinoma. *Nehls O. Anticancer Res* 2015;35:2021-8.
- 27 Gomaa AI, Al-Khatib A, Abdel-Razek W, Hashim MS, Waked I. Ascites and alpha-fetoprotein improve prognostic performance of Barcelona Clinic Liver Cancer staging. *World J Gastroenterol*. 2015 May 14;21(18):5654-62.
- 28 Hsu CY, Lee YH, Hsia CY, et al. Performance status in patients with hepatocellular carcinoma: determinants, prognostic impact, and ability to improve the Barcelona Clinic Liver Cancer system. *Hepatology*. 2013 Jan;57(1):112-9.
- 29 Bialecki ES, Bisceglie AMD. Diagnosis of hepatocellular carcinoma. *HPB (Oxford)*. 2005; 7(1): 26–34. doi: 10.1080/13651820410024049.



- 30 Baig JA, Alam JM, Mahmood SR, Baig M, Shaheen R, Sultana I, Waheed A. J Ayub Hepatocellular carcinoma (HCC) and diagnostic significance of A-fetoprotein (AFP). *Med Coll Abbottabad*. 2009 Jan-Mar;21(1):72-5.
- 31 Lee MJ, Yu GR, Park SH, et al. Identification of Cystatin B as a Potential Serum Marker in Hepatocellular Carcinoma. *Clin Cancer Res* 2008;14:1080-9.
- 32 Oliveira AS, Xavier-Filho, Sales MP. Cysteine proteinases and cystatins. *Braz. Arch. Biol. Techn.* 46: 91-104
- 33 Lee MJ, Yu GR, Park SH, et al. Identification of Cystatin B as a Potential Serum Marker in Hepatocellular Carcinoma. *Clin Cancer Res* 2008;14:1080-9.
- 34 Gashenko EA, Lebedeva VA, Brak IV, Tsykalenko EA, Vinokurova GV, Korolenko TA. Evaluation of serum procathepsin B, cystatin B and cystatin C as possible biomarkers of ovarian cancer. *Int J Circumpolar Health* 2013;72.
- 35 Takaya A, Peng WX, Ishino K, Kudo M, Yamamoto T, Wada R, Cystatin B as a potential diagnostic biomarker in ovarian clear cell carcinoma. *Int J Oncol* 2015;46: 1573-81.
- 36 Li YP, Wu CC, Chen WT, Huang YC, Chai CY. The Expression and Significance of WWOX and  $\beta$ -catenin in Hepatocellular Carcinoma. *APMIS* 2012.
- 37 Seto ES, Bellen HJ. The ins and outs of Wingless signaling. *Trends Cell Biol.* 2004 Jan;14(1):45-53.
- 38 Li P, Cao Y, Li Y, Zhou L, Liu X, Geng M. Expression of Wnt-5a and  $\beta$ -catenin in primary hepatocellular carcinoma. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology* 2014;7:3190-5.

39 Zheng JF, Lu J, Wang XZ, Guo WH, Zhang JX. Comparative Metabolomic Profiling of Hepatocellular Carcinoma Cells Treated with Sorafenib Monotherapy vs. Sorafenib-Everolimus Combination Therapy. *Med Sci Monit.* 2015 Jun 20;21:1781-91.

40 Shangguan H1, Tan SY, Zhang JR. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2015 Jun;19(11):2054-61. Bioinformatics analysis of gene expression profiles in hepatocellular carcinoma.



**Figura 1.** Representação esquemática por “*box-plot*” de valores de mediana e quartis de expressão gênica de: A) fator de crescimento endotelial vascular; B)  $\beta$ -catenina; C) alfa-fetoproteína; D) glipican-3 e E) cistatina-B.

**Tabela 1.** Níveis de expressão gênica para fator de crescimento endotelial vascular (*VEGF*), alfa-fetoproteína (*AFP*),  $\beta$ -catenina (*CTNNB1*), glipican-3 (*GPC3*) e cistatina-B (*CSTB*) em pacientes com carcinoma hepatocelular, classificados de acordo com critérios de *Barcelona Clinic Liver Cancer Group* (BCLC).

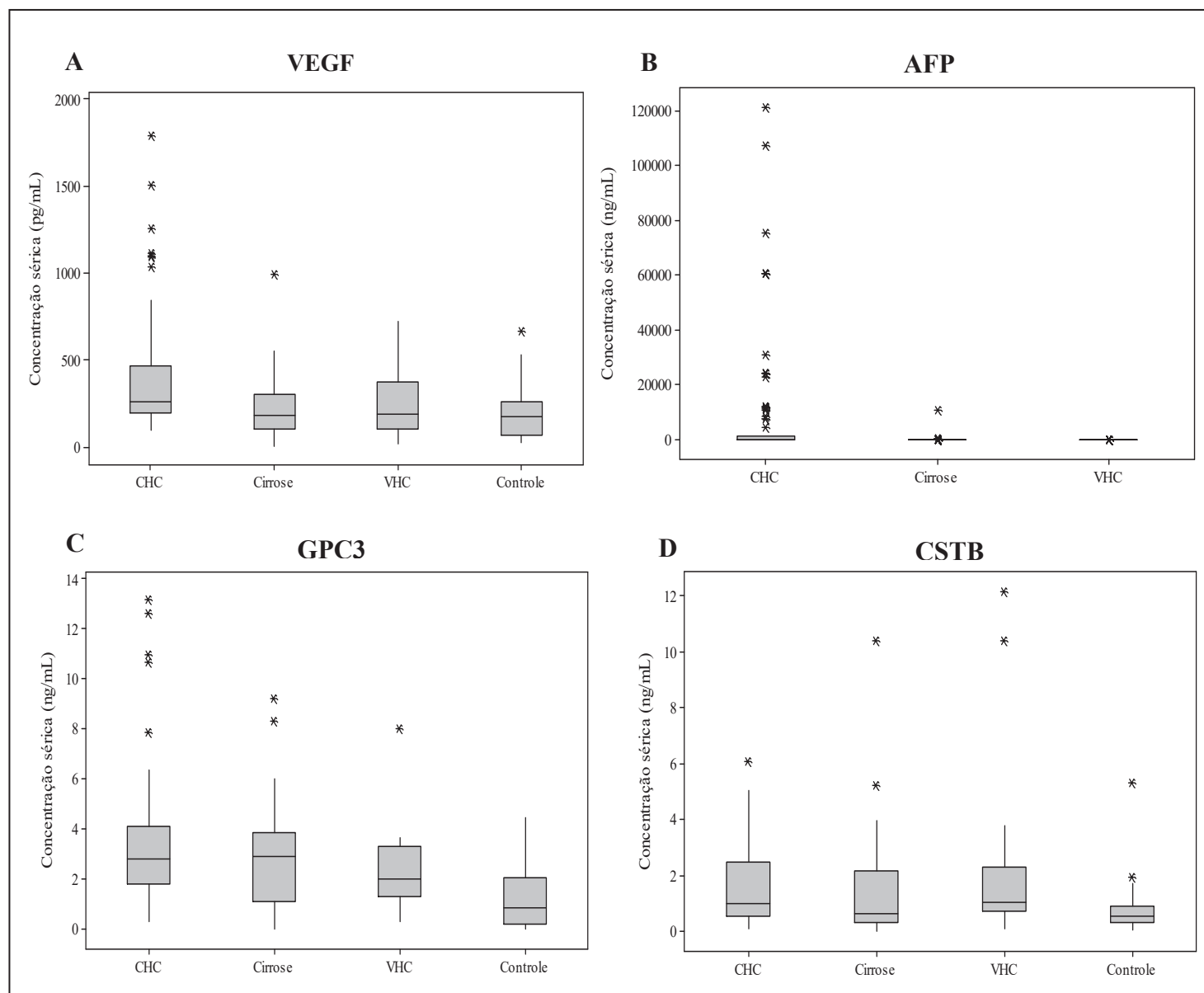
<b>Estágio</b>	<b><i>VEGF</i></b>	<b><i>AFP</i></b>	<b><i>CTNNB1</i></b>	<b><i>GPC3</i></b>	<b><i>CSTB</i></b>
<b>A (N=7)</b>					
Mediana	2,58	1,82	0,54	5,00	0,39
Mínimo	0,03	0,0001	0,0003	0,19	0,0001
Máximo	10,73	137,40	6,97	56,25	48,05
<b>B (N=6)</b>					
Mediana	1,96*	0,03*	0,90*	0,58	9,53
Mínimo	0,15	0,0001	0,01	0,0007	0,25
Máximo	164,60	0,26	1,30	7,11	51,90
<b>C (N=6)</b>					
Mediana	4,89	4,10	18,40*	12,27	16,49
Mínimo	2,01	0,03	1,20	0,40	0,35
Máximo	164,60	43,01	101,25	38,95	460,49
<b>D (N=7)</b>					
Mediana	19,97*	8,86*	3,96	25,06	11,20
Mínimo	1,40	0,38	0,54	0,66	0,16
Máximo	130,01	80,64	14,98	68,59	477,15
<b>*Valor P</b>	<b>0,008</b>	<b>0,001</b>	<b>0,008</b>	0,074	0,363

\*Teste Mann-Whitney. Para as demais comparações, empregou-se o teste Kruskal-Wallis com valores de  $P > 0,05$ .

**Tabela 2.** Correlação entre expressão gênica de fator de crescimento endotelial vascular (*VEGF*), alfa-fetoproteína (*AFP*),  $\beta$ -catenina (*CTNNB1*), glipican-3 (*GPC3*) e cistatina-B (*CSTB*) em pacientes com carcinoma hepatocelular (CHC), cirrose e hepatite C.

GENE	Grupo	<i>AFP</i>		<i>GPC3</i>		<i>CTNNB1</i>		<i>CSTB</i>	
		(r)	Valor P	(r)	Valor P	(r)	Valor P	(r)	Valor P
<i>VEGF</i>	CHC	0,38	<b>0,04</b>	0,48	<b>0,008</b>	0,47	<b>0,01</b>	0,21	0,26
	Cirrose	0,53	<b>0,03</b>	0,94	<b>0,0001</b>	0,88	<b>0,0001</b>	0,70	<b>0,002</b>
	Hepatite C	0,91	0,001	1,00	<b>0,0004</b>	0,90	0,004	0,69	0,06
<i>AFP</i>	CHC	-		0,14	0,94	0,39	0,03	0,01	0,94
	Cirrose	-		0,52	0,04	0,57	0,02	0,52	0,03
	Hepatite C	-		0,89	0,01	1,00	0,0001	0,85	0,01
<i>GPC3</i>	CHC	-		-		0,52	0,004	0,12	0,51
	Cirrose	-		-		0,87	0,0001	0,61	0,01
	Hepatite C	-		-		0,82	0,05	0,60	0,24
<i>CTNNB1</i>	CHC	-		-		-		0,43	0,01
	Cirrose	-		-		-		0,86	0,0001
	Hepatite C	-		-		-		0,85	0,01

\*Teste de correlação de Spearman (r).



**Figura 2.** Representação esquemática por “*box-plot*” de valores de mediana e quartis de níveis séricos de A) Fator de crescimento endotelial vascular (VEGF); B) alfa-fetoproteína (AFP); C) glipican-3 (GPC3) e D) cistatina-B (CSTB) em pacientes com carcinoma hepatocelular (CHC), cirrose, hepatite C (VHC) e controles.



com hepatite C (G3) e controles (G4); glipican-3 (GPC3) entre pacientes: C) com CHC e controles; D) cirrose e controles; E) hepatite C e controles.



**Artigo 2****VEGF Polymorphisms Related to Higher Serum Levels of Protein Identify****Patients with Hepatocellular Carcinoma**

Maria Eduarda Lopes Baitello<sup>1</sup>, Graciele Domitila Tenani<sup>1</sup>, Rafael Fernandes Ferreira<sup>1</sup>, Victor Nogueira<sup>1</sup>, Marcela Augusta de Souza Pinhel<sup>1</sup>, Rita de Cássia Martins 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 Rossi 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.

**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) 99107.4497 / +55 (17) 99654.9356

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

**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 ( $P>0.05$ ). 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 ( $P=0.0285$ ;  $P=0.0284$ , 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 potential marker for HCC.

**Keywords:** Liver, Hepatocellular carcinoma, Cirrhosis, Angiogenesis, VEGF.

## 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 and 3'-UTR region of the gene, reflecting changes in plasma levels of the protein [15,16]. *VEGF-C936T* and *VEGF-A114G* were related to changes in plasma levels of the protein in several studies on solid tumors, but the results are controversial [17,18,19]. However, studies that correlate polymorphisms of *VEGF* and HCC are rare, usually with small numbers of patients, as well as a few polymorphisms [20,16].

Moreover, within the limits of our knowledge, there are no studies in the literature involving polymorphisms of VEGF and HCC in Brazilian casuistic of interbred character, which contributed to the choice of these polymorphisms in this study.

Therefore, 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 [21], 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 [22]. 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 *Mnl*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 both groups of patients, G1 (56%) and G2 (50%), compared with controls (13%) ( $P < 0.0001$  for G1 versus G3 and G2 versus G3) while G1 versus G2 did not show significance ( $P = 0.425$ ). Yet, smoking prevailed in G1 (50%), compared with G2 (34%;  $P = 0.0257$ ) and G3 (21%;  $P < 0.0001$ ), while G2 versus G3 did not show significance ( $P = 0.0927$ ). G1 showed higher frequency of cirrhosis (84%), followed by HCV (50%) and HBV (21%), the same occurred for G2 (49% and 10%) with no significant difference between the groups ( $P = 0.957$  and  $P = 0.052$ , 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) ( $P = 0.0007$  for G1 versus G2 and  $P = 0.0026$  for G1 versus G3). Yet, serum levels of G2 versus G3 showed no significant differences. Serum VEGF levels were also analysed according to the genetic profile (Table 4). In HCC patients (G1), the elevated serum levels were related to the mutant allele (T) of *VEGF*-C936T (430.0pg/mL), compared with the wild-type genotype (C/C) (250.5pg/mL;  $P=0.0285$ ). G1 also showed elevated serum levels when compared to G2 (173.5pg/mL) and G3 (113.9pg/mL) ( $P=0.0038$ ) in an inter-group analysis with Kruskal Wallis test. In relation to *VEGF*-A1154G, the serum levels of VEGF were increased in controls with the mutant allele ( $\_ / A = 185.2\text{pg/mL}$ ) 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;  $P=0.0069$ ), while G1 versus G3 and G2 versus G3 did not represent statistical differences.



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 versus 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 versus 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 versus 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 [23,24]. 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 [25]. 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 [26].

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 [27]. 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 [28].

The studied polymorphisms are located in the promoter region of *VEGF-A* (A1154G) and 3'-UTR (C936T). The 3'-UTR region of the gene contains key regulatory elements which are sensitive to hypoxia (condition that stimulates the expression of VEGF), and contributes to high variability in VEGF production among tissues [29]. Related to the promoter region of the gene, in vitro study showed that mutations in this region regulates the expression of the gene in peripheral blood mononuclear cells, suggesting that the regulation of VEGF expression occurs primarily at transcriptional level [30].

*VEGF-C936T* and *VEGF-A1154G* are polymorphisms located in a important angiogenesis signalling pathway related to the development and prognosis of HCC, a well-vascularized solid tumour which depends on neovascularization for its growth [31]. In this case, the relationship between the respective mutant alleles and decreased expression and plasma levels of VEGF has been reported [17,18], which may be a protective factor against the development of HCC. 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 [20,16].

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 [32]. 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 [33,34]. Furthermore, the wild-type allele of *VEGF*-A1154G polymorphism was associated with poor survival in a Caucasian population with oral squamous cell carcinoma [35]. But the results are still diverging [36,37,38,39]. 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)[40]. 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 [41]. On the other hand, there are studies in which the mutant allele of *VEGF*-C936T was associated with decreased serum VEGF levels [15, 19].

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 [42,43] 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 [44]. El-Houseini et al. (2005) found 86.4% of sensitivity and 60% of specificity for the cut-off of 355.2 pg / mL [45]. 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.

## **CONCLUSION**

This study showed that *VEGF-A* polymorphisms (C936T and A1154G) are not associated with cirrhosis, HCC and survival. However, there is a relationship between increased serum levels of VEGF and the presence of mutant alleles of both polymorphisms, 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, and to Research Support Foundation of the State of São Paulo (FAPESP) for the supporting grants (2012/19826-3).

## **DISCLOSURE POLICY**

The authors declare that there is no conflict of interest regarding the publication of this paper

## REFERENCES

- (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 promoter. *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) Liang X, Xu F, Li X, Ma C, Zhang Y, Xu W. VEGF signal system: the application of antiangiogenesis. *Curr Med Chem*. 2014; 21(7): 894-910.
- (14) Shibuya 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) 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.
- (18) 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.
- (19) 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.
- (20) 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.
- (21) 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.
- (22) 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.
- (23) 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

- (24) Crawford JM. Histologic findings in alcoholic liver disease. *Clin Liver Dis.* 2012; 16(4): 699-716.
- (25) Fullwood D. Alcohol-related liver disease. *Nurs Stand.* 2014; 28(46): 42-47.
- (26) 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.
- (27) Mittal S, El-Serag HB. Epidemiology of HCC: Consider the Population. *J Clin Gastroenterol.* 2013; 47(0): S2-S6.
- (28) World Health Organization. Hepatitis B: Fact sheet n° 2014 [Internet]. França; 2014. [cited in 2014 Dez 15]. Available in: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs204/en/>.
- (29) Michenko A, Salceda S, Bauer T, Caro J. Hypoxia regulatory elements of the human vascular endothelial growth factor gene. *Cell Mol Biol Res.* 1994; 40(1): 35-9.
- (30) Mohammadi M, Ollier WE, Hutchinson IV. A functional association study of VEGF gene promoter polymorphisms with VEGF expression by stimulated pbm cells. *Hum Immunol.* 2003; 64: S125.
- (31) 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.
- (32) 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.



- (33) 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.
- (34) 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.
- (35) 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.
- (36) 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.
- (37) 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.
- (38) 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.
- (39) 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.

- (40) 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.
- (41) 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.
- (42) 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.
- (43) 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.
- (44) El-Sherif WT1, Makhlof 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.
- (45) 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		G2		G3		P* Value		
	(N=102)		(N=117)		(N=127)				
<b>Gender</b>	N	(%)	N	(%)	N	(%)	<b>G1 x</b>	<b>G2 x</b>	<b>G1 x</b>
							<b>G3</b>	<b>G3</b>	<b>G2</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</b>								
	<b>(N=89)</b>								
<b>BCLC</b>	N	(%)							
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)	11	(98)	12	(100)			
			)	5		7				
<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	17	0.74	19	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)	11	(96)	12	(94)			
				2		0				
<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.

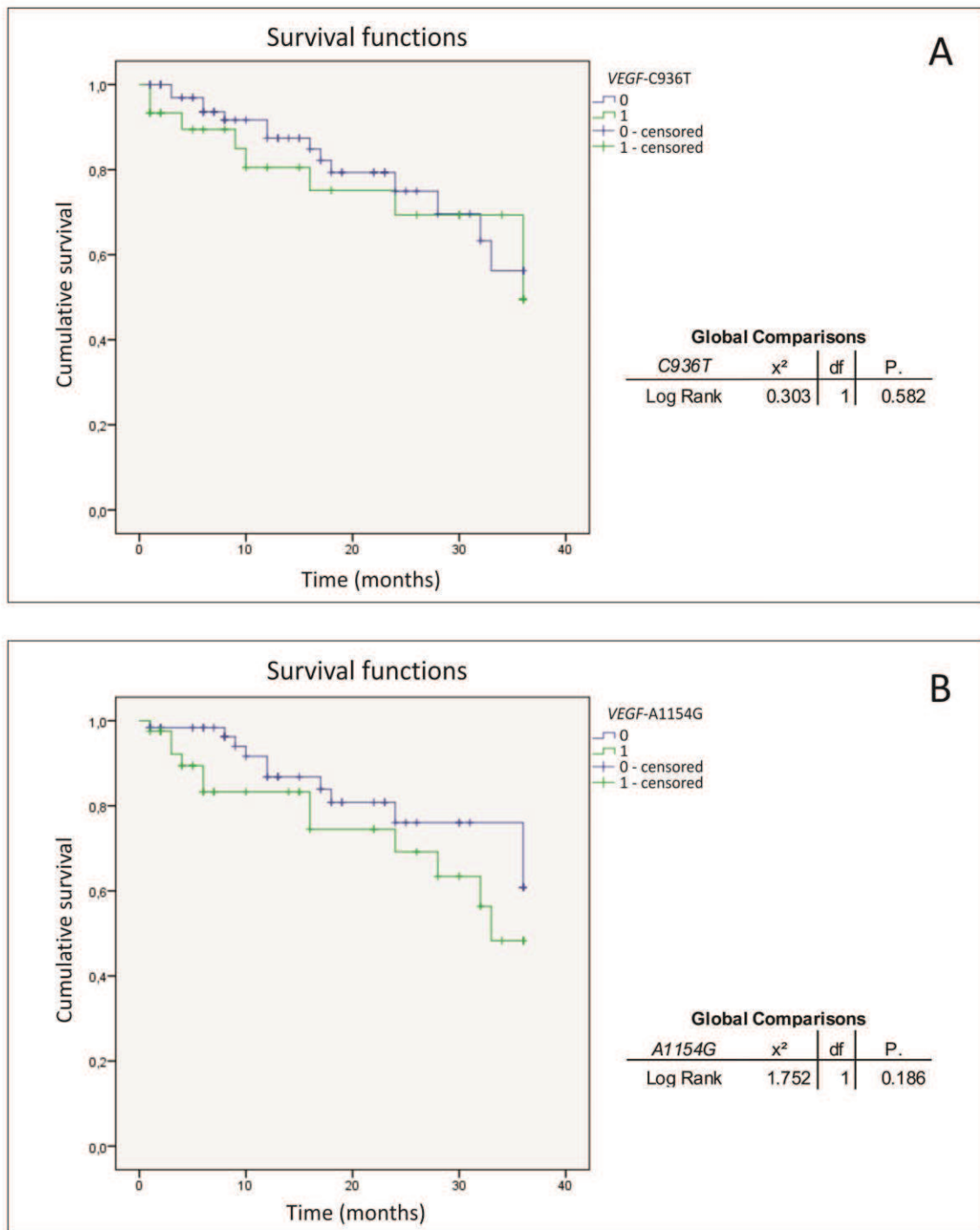


Figure 1. Kaplan-Meier curve for overall survival analysis of patients with hepatocellular carcinoma after 36 months of diagnosis. A) *VEGF*-C936T: 1= genotype C/T; 0= genotype C/C; B) *VEGF*-A1154G: 1= genotypes  $\_ /A$ ; 0= genotype G/G; df = degree of freedom.

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.

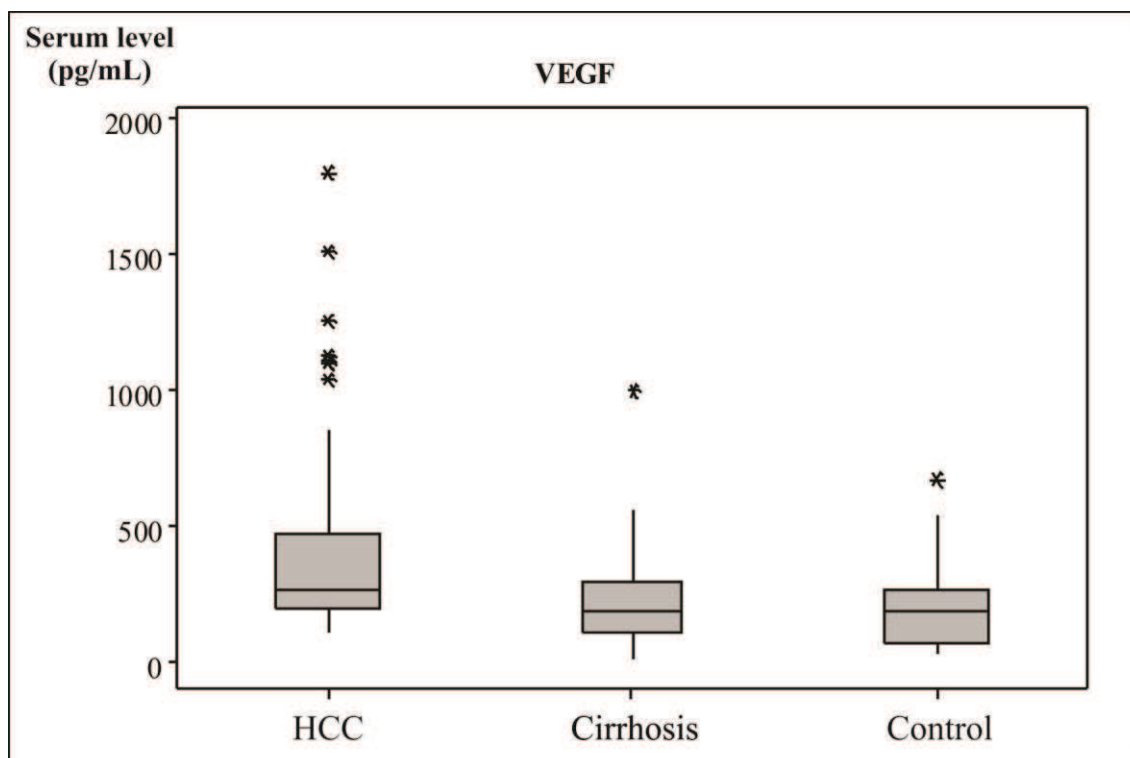


Figure 2. Box-plot representation of median and quartile values of serum vascular endothelial growth factor (VEGF) levels: **HCC** – median= 264.8, minimum= 102.0, maximum= 1795.1, Q1= 199.4, Q3= 467.7, IQRRange= 268.3; **Cirrhosis** – median= 182.8, minimum= 7.2, maximum= 993.0, Q1= 103.9, Q3= 287.4,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

<i>VEGF</i> - C936T	VEGF serum levels x Polymorphisms			Inter-groups P* Value G1 x G2 x G3
	G1 (N=54)	G2 (N=51)	G3 (N=27)	
	Median (pg/mL) (Minimum – Maximum)			
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.



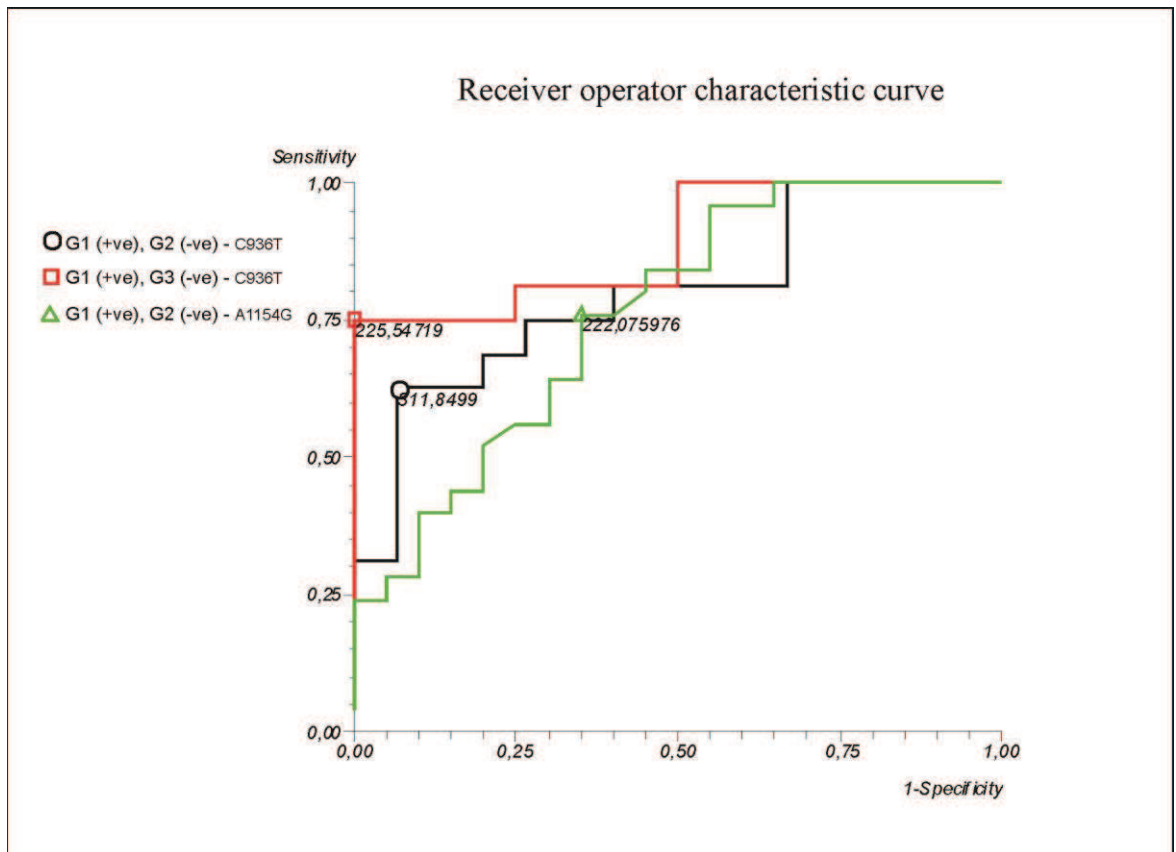


Figure 3. Receiver operator characteristic curve (ROC) of serum vascular endothelial growth factor (VEGF) levels in patients with: (○) mutant allele of *VEGF*-C936T in the group with hepatocellular carcinoma (G1) and cirrhosis (G2) (area under the curve = 0.80 [0.60 – 1.0]), with sensitivity of 63% and 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.

*Conclusão*

### 3. CONCLUSÃO

1. Expressão aumentada, particularmente, de *VEGF* em pacientes com CHC em estágio terminal (BCLC-D), ressalta a associação de angiogênese com a gravidade da doença, o que confirma *VEGF* como indicador de prognóstico na carcinogênese hepática. A correlação da expressão de *VEGF* com *AFP*, *GPC3* e *CTNNB1* sugere a integração entre marcadores de angiogênese, sinalização e proliferação celular em CHC e hepatite C, enquanto para cirrose destaca-se também a correlação de *CSTB*, marcador de inflamação, com os demais genes.

2. Níveis séricos elevados de *VEGF*, *AFP*, *CSTB* e *GPC3* confirmam a complexidade da hepatocarcinogênese, com o envolvimento de angiogênese, proliferação celular e inflamação, sendo que a correlação de *CSTB* com *GPC3* sugere integração entre processo inflamatório e proliferação celular no CHC, assim como para cirrose e hepatite C.

3. Nível sérico de *VEGF* diferencia pacientes com CHC de controles, apresentando valor expressivo de sensibilidade, enquanto *CSTB*, marcador de inflamação, destaca-se na hepatite C. Por outro lado, *GPC3*, marcador de proliferação celular, embora inespecífico na distinção de CHC, cirrose e hepatite C, diferencia os referidos grupos de controles, sugerindo sua associação com o desenvolvimento e progressão dessas hepatopatias.

4. Polimorfismos *VEGF-C936T* e *VEGF-A1154G* não se associam com CHC, cirrose, e hepatite C, e são indiferentes para estadiamento, sobrevida e comorbidades. No entanto, ambos os polimorfismos influenciam o aumento do nível de *VEGF*, embora com valores séricos sem correlação com *AFP* circulante, confirmando a participação independente dos mecanismos de angiogênese e proliferação celular na hepatocarcinogênese.

## *Referências Bibliográficas*

#### 4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- Ladep NG, Lesi OA, Mark P, Lemoine M, Onyekwere C, Afihene M, et al. Problem of hepatocellular carcinoma in West Africa. *World J Hepatol* 2014;6:783-92.
- 2- Laursen L. A preventable cancer. *Nature* 2014;516:S2-S3.
- 3- Lafaro KJ, Demirjian AN, Pawlik TM. Epidemiology of hepatocellular carcinoma. *Surg Oncol Clin N Am* 2015;24:1-17.
- 4- 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.
- 5- 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.
- 6- Santos CER. Tumores Primários do Fígado, In: Castro LS, Corrêa JHS. *Tratamento Cirúrgico do Câncer Gastrintestinal*. Rio de Janeiro, Revinter, 2005;417-429.
- 7- Gonçalves PL, Zago-Gomes Mda P, 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.
- 8- Kanwal F, Hoang T, Kramer JR, Asch SM, Goetz MB, Zeringue A, et al. Increasing prevalence of HCC and cirrhosis in patients with chronic hepatitis C virus infection. *Gastroenterology* 2011;140:1182-8.
- 9- Miamen AG, Dong H, Roberts LR. Immunotherapeutic Approaches to hepatocellular Carcinoma Treatment. *Liver Cancer* 2012;1:226-37.
- 10- Felizardo RJ, Câmara NO. Hepatocellular carcinoma and food contamination: aflatoxins and ochratoxin A as a great prompter. *World J Gastroenterol* 2013;24:3723-5.

- 11- Vivarelli M, Montalti R, Risaliti A. Multimodal treatment of hepatocellular carcinoma on cirrhosis: an update. *World J Gastroenterol* 2013;19:7316-26.
- 12- 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.
- 13- Zamora-Ros, Fedirko V, Trichopoulou A, González CA, Bamia C, Trepo E, et al. Dietary flavonoid, lignan and antioxidant capacity and risk of hepatocellular carcinoma in the European prospective investigation into cancer and nutrition study. *Int J Cancer*. 2013 Nov 15;133(10):2429-43.
- 14- Bosetti C, Turati F, La Vecchia C. Hepatocellular carcinoma epidemiology. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 2014 Oct;28(5):753-70.
- 15- Gomes MA, Priolli DG, Tralhão JG, Botelho MF. Hepatocellular carcinoma: epidemiology, biology, diagnosis, and therapies. *Rev Assoc Med Bras* 2013;59:514-24.
- 16- El-Serag HB, Rudolph KL. Hepatocellular carcinoma: epidemiology and molecular carcinogenesis. *Gastroenterology*. 2007 Jun;132(7):2557-76.
- 17- Donato F, Tagger A, Gelatti U, Parrinello G, Boffetta P, Albertini A. Alcohol and hepatocellular carcinoma: the effect of lifetime intake and hepatitis virus infections in men and women. *Am J Epidemiol*. 2002 Feb 15;155(4):323-31.
- 18- Paranaguá-Vezozzo DC, Ono SK, Alvarado-Mora MV, Farias AQ, Cunha-Silva M, França JI, et al. Epidemiology of HCC in Brazil: incidence and risk factors in a ten-year cohort. *Ann Hepatol*. 2014 Jul-Aug;13(4):386-93
- 19- 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.

- 20- Asghar U, Meyer T. Are there opportunities for chemotherapy in the treatment of hepatocellular cancer? *J Hepatol*. 2012 Mar;56(3):686-95.
- 21- Ronot M, Vilgrain V. Hepatocellular carcinoma: diagnostic criteria by imaging techniques. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 2014 Oct;28(5):795-812.
- 22- Mattos AA, Branco F, Schraiber LS, Leite, AB, Lionço LC, Costabeber AM. *Revista da AMRIGS, Porto Alegre*, 55 (3): 250-254.
- 23- Bruix J, Sherman M. Management of hepatocellular carcinoma: an update. *Hepatology* 2011;53:1020-2.
- 24- Blum HE. Hepatocellular carcinoma: therapy and prevention. *World J Gastroenterol*. 2005 Dec 21;11(47):7391-400. Review.
- 25- Llovet JM, Bruix J. Molecular targeted therapies in hepatocellular carcinoma. *Hepatology*. 2008 Oct;48(4):1312-27. Review.
- 26- Duseja A. Staging of hepatocellular carcinoma. *J Clin Exp Hepatol* 2014;4:74-9.
- 27- 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.
- 28- Forner A, Gilabert M, Bruix J, Raoul JL. Treatment of intermediate-stage hepatocellular carcinoma. *Nat Rev Clin Oncol*. 2014 Sep;11(9):525-35.
- 29- Llovet JM, Fuster J, Bruix J. Prognosis of hepatocellular carcinoma. *Hepatogastroenterology*. 2002 Jan-Feb;49(43):7-11.
- 30- Nishida N, Nishimura T, Ito T, Komeda T, Fukuda Y, Nakao K. Chromosomal instability and human hepatocarcinogenesis. *Histol Histopathol*. 2003 Jul;18(3):897-909. Review.

- 31- Kudo M, Hatanaka K, Inoue T, Maekawa K. Depiction of portal supply in early hepatocellular carcinoma and dysplastic nodule: value of pure arterial ultrasound imaging in hepatocellular carcinoma. *Oncology*. 2010 Jul;78 Suppl 1:60-7.
- 32- Acebron SP, Niehrs C.  $\beta$ -Catenin-Independent Roles of Wnt/LRP6 Signaling. *Trends Cell Biol* 2016.
- 33- Alberts, B, Bray D, Johnson A, Lewis J, Raff M; Roberts, K. *Fundamentos de Biologia Celular - Uma Introdução a Biologia Molecular da Célula*. Porto Alegre, Artmed, 1999.
- 34- Kühl M. The WNT/calcium pathway: biochemical mediators, tools and future requirements. *Front Biosci*. 2004 Jan 1;9:967-74.
- 35- Langenbacher A, Chen JN. Calcium signaling: a common thread in vertebrate left-right axis development. *Dev Dyn*. 2008 Dec;237(12):3491-6.
- 36- Seto ES, Bellen HJ. The ins and outs of Wingless signaling. *Trends Cell Biol*. 2004 Jan;14(1):45-53.
- 37- Micsenyi A, Tan X, Sneddon T, Luo JH, Michalopoulos GK, Monga SP. Beta-catenin is temporally regulated during normal liver development. *Gastroenterology*. 2004 Apr;126(4):1134-46.
- 38- Carmeliet P, Collen D. *Ann N Y Acad Sci*. 2000 May;902:249-62; discussion 262-4. Molecular basis of angiogenesis. Role of VEGF and VE-cadherin.
- 39- Patel P, Schutzer SE, Pyrsopoulos N. Immunobiology of hepatocarcinogenesis: Ways to go or almost there? *World J Gastrointest Pathophysiol*. 2016 Aug 15;7(3):242-55.
- 40- Zhang R, Zhang F, Wang C, Wang S, Shiao YH, Guo Z. Identification of sequence polymorphism in the D-Loop region of mitochondrial DNA as a risk factor for hepatocellular carcinoma with distinct etiology. *J Exp Clin Cancer Res*. 2010 Sep 18;29:130.



- 41- Sadri N, Zhang PJ. Hypoxia-inducible factors: mediators of cancer progression; prognostic and therapeutic targets in soft tissue sarcomas. *Cancers (Basel)*. 2013 Apr 2;5(2):320-33.
- 42- Kallergi G, Markomanolaki H, Giannoukaraki V, Papadaki MA, Strati A, Lianidou ES, et al. Hypoxia-inducible factor-1alpha and vascular endothelial growth factor expression in circulating tumor cells of breast cancer patients. *Breast Cancer Res*. 2009;11(6):R84.
- 43- Takahashi H, Numasaki M, Lotze MT, Sasaki H. Interleukin-17 enhances bFGF-, HGF- and VEGF-induced growth of vascular endothelial cells. *Immunol Lett*. 2005 May 15;98(2):189-93.
- 44- Cheng G, Zielonka J, McAllister DM, Mackinnon AC Jr, Joseph J, Dwinell MB, et al. Mitochondria-targeted vitamin E analogs inhibit breast cancer cell energy metabolism and promote cell death. *BMC Cancer*. 2013 Jun 13;13:285.
- 45- Out C, Kuipers F, Groen AK. Bile acids and cholestasis. *Gastroenterology*. 2013 Feb;144(2):e17-8.
- 46- Dias LT, Rodrigues GC, Barbosa DS, Lacerda DC, Ruas MF. Primary nodular hepatic tuberculosis mimicking hepatic neoplasia in an immunocompetent host. *Braz J Infect Dis*. 2009 Apr;13(2):153-4.
- 47- Dvorak HF, Brown LF, Detmar M, Dvorak AM. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability, and angiogenesis. *Am J Pathol*. 1995 May;146(5):1029-39.
- 48- Ferrara N, Henzel WJ. Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 1989 Jun 15;161(2):851-8.
- 49- Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med*. 2003 Jun;9(6):669-76.

- 50- Dehghanian F, Hojati Z, Kay M. New Insights into VEGF-A Alternative Splicing: Key Regulatory Switching in the Pathological Process. *Avicenna J Med Biotechnol.* 2014 Oct;6(4):192-9. Review.
- 51- Poon RT, Lau C, Pang R, Ng KK, Yuen J, Fan ST. High serum vascular endothelial growth factor levels predict poor prognosis after radiofrequency ablation of hepatocellular carcinoma: importance of tumor biomarker in ablative therapies. *Ann Surg Oncol.* 2007;14:1835–1845.
- 52- Guerrieri F, Belloni L, Pediconi N, Levrero M. *Semin Liver Dis.* Molecular mechanisms of HBV-associated hepatocarcinogenesis. 2013 May;33(2):147-56.
- 53- Pimenta JR, Massabki PS. Carcinoma hepatoelular: um panorama clínico. *Rev Bras*
- 54- *Clin Med.* 2010; 8: 59-67.
- 55- Zhu PP, Yuan SG, Liao Y, Qin LL, Liao WJ. High level of intercellular adhesion molecule-1 affects prognosis of patients with hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2015;21:7254-63.
- 56- Zhou XD, Tang ZY, Yang BH, Lin ZY, Ma ZC, Ye SL, et al. Experience of 1000 patients who underwent hepatectomy for small hepatocellular carcinoma. *Cancer* 2001;91:1479-86.
- 57- Wang R, Chen S, Li C, Ng KT, Kong CW, Cheng J, et al. Fusion with stem cell makes the hepatocellular carcinoma cells similar to liver tumor-initiating cells. *BMC Cancer.* 2016 Feb 4;16:56.
- 58- Chen IP, Ariizumi SI, Nakano M, Yamamoto M. Positive glypican-3 expression in early hepatocellular carcinoma predicts recurrence after hepatectomy. *J Gastroenterol* 2013.

- 59- Attallah AM , El-Far M , Omran MM , Abdelrazek MA , Attallah AA , Saeed AM , et al. GPC-HCC model: a combination of glypican-3 with other routine parameters improves the diagnostic efficacy in hepatocellular carcinoma. *Tumour Biol* 2016.
- 60- Montalbano M , Curcurù G , Shirafkan A , Vento R , Rastellini C, Cicalese L. Modeling of Hepatocytes Proliferation Isolated from Proximal and Distal Zones from Human Hepatocellular Carcinoma Lesion. *PLoS One* 2016;11:e0153613.
- 61- Wang Q, Lin L, Yoo S, Wang W, Blank S, Fiel MI, et al. *Br J Cancer*. 2016 Aug 18. doi: 10.1038/bjc.2016.239. Impact of non-neoplastic vs intratumoural hepatitis B viral DNA and replication on hepatocellular carcinoma recurrence.
- 62- Vibert E, Azoulay D, Hoti E, Iacopinelli S, Samuel D, Salloum C, et al. Progression of alphafetoprotein before liver transplantation for hepatocellular carcinoma in cirrhotic patients: a critical factor. *Am J Transplant*. 2010;10:129–137.
- 63- Akatsu H , Ogawa N, Kanesaka T, Hori A, Yamamoto T, Matsukawa N, et al. Higher activity of peripheral blood angiotensin-converting enzyme is associated with later-onset of Alzheimer's disease. *J Neurol Sci* 2011;300:67-73. doi: 10.1016/j.jns.2010.09.030.
- 64- Capurro M, Filmus J. Glypican-3 as a serum marker for hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* 2005;65:372.
- 65- Distinct Claudin Expression Profiles of Hepatocellular Carcinoma and Metastatic Colorectal and Pancreatic Carcinomas Lee MJ, Yu GR, Park SH. Identification of Cystatin B as a Potential Serum Marker in Hepatocellular Carcinoma. *Clin Cancer Res* 2008;14:1080-9.
- 66- Takaya A, Peng WX, Ishino K, Kudo M, Yamamoto T, Wada R, et al. Cystatin B as a potential diagnostic biomarker in ovarian clear cell carcinoma. *Int J Oncol* 2015;46: 1573-81.

- 67- Maass T, Sfakianakis I, Staib F, Krupp M, Galle PR, Teufel A. Microarray-based gene expression analysis of hepatocellular carcinoma. *Curr Genomics* 2010;11:261-8. doi: 10.2174/138920210791233063. Midorikawa et al., 2003
- 68- Llovet JM, Paradis V, Kudo M, Zucman-Rossi J. Tissue biomarkers as predictors of outcome and selection of transplant candidates with hepatocellular carcinoma. *Liver Transpl.* 2011 Oct;17 Suppl 2:S67-71.
- 69- Marquardt JU, Galle PR, Teufel A. Molecular diagnosis and therapy of hepatocellular carcinoma (HCC): an emerging field for advanced technologies. *J Hepatol.* 2012 Jan;56(1):267-75.
- 70- Nault JC, Nkontchou G, Nahon P, Grando V, Bourcier V, Barge S, et al. Percutaneous Treatment of Localized Infiltrative Hepatocellular Carcinoma Developing on Cirrhosis. *Ann Surg Oncol.* 2016 Jun;23(6):1906-15.