



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

---

**Camila Agren**

**Avaliação de polimorfismos dos genes *CYP1A1* e  
*CYP2E1* no risco para cirrose hepática e  
carcinoma hepatocelular**

**São José do Rio Preto**  
**2017**

Camila Agren

**Avaliação de polimorfismos dos genes *CYP1A1* e  
*CYP2E1* no risco para cirrose hepática e  
carcinoma hepatocelular**

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

**Orientadora:** Prof. Dra. Eny Maria Goloni Bertollo

São José do Rio Preto, 2017.

Agren, Camila

Avaliação de risco entre polimorfismo dos genes CYP1A1 E CYP2E1 e a ocorrência de cirrose hepática e carcinoma hepatocelular/ Camila Agren

São José do Rio Preto, 2017

86 p.

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

Eixo Temático: Medicina e Ciências Correlatas

Orientadora: Prof. Dra. Eny Maria Goloni Bertollo

1. Polimorfismo; 2. Xenobióticos; 3. Cirrose hepática; 4. Carcinoma hepatocelular; 5. CYP1A1; 6. CYP2E1.

Camila Agren

**Avaliação de risco entre polimorfismo dos genes  
*CYP1A1* e *CYP2E1* e a ocorrência de cirrose  
hepática e carcinoma hepatocelular**

BANCA EXAMINADORA  
DISSERTAÇÃO PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO  
DE MESTRE

Presidente e Orientadora: Eny Maria Goloni Bertollo

1º Examinador: \_\_\_\_\_

2º Examinador: \_\_\_\_\_

1º Suplente: \_\_\_\_\_

2º Suplente: \_\_\_\_\_

São José do Rio Preto, 2017.

## Sumário

Dedicatória .....	i
Agradecimentos.....	ii
Lista de figuras.....	v
Lista de tabelas e quadros.....	vi
Lista de abreviaturas e símbolos.....	viii
Resumo.....	x
Abstract.....	xi
1.Introdução.....	1
1.1 Introdução.....	2
1.2 Objetivos.....	11
2.Casuística e métodos.....	12
2.1 Casuística.....	13
2.2 Métodos.....	13
2.2.1 Análise dos dados clínicos.....	13
2.2.2 Extração de DNA a partir de sangue total.....	14
2.2.3 PCR- RFLP [Reação em cadeia da polimerase (Polimorfismo de comprimento de fragmento de restrição)].....	15
2.2.4 PCR em tempo real.....	19
2.2.5 Análises estatísticas.....	21
3.Resultados.....	23
4.Discussão.....	35
5.Conclusões.....	43
6.Referências Bibliográficas.....	44

7.Apêndices.....	53
Apêndice 1 – Termo de consentimento livre e esclarecido.....	54
Apêndice 2 – Questionário padronizado.....	55
8.Anexos.....	56
Anexo 1 – Parecer consubstancial do CEP.....	57
Anexo 2 – Artigo Científico.....	59

## **DEDICATÓRIA**

A **Deus**, o que seria de mim, sem a fé que eu tenho nele.

Aos meus **pais, irmãs, tia e avô** (*in memoriam*), que com muito carinho e apoio não mediram esforços para que eu chegasse até esta etapa da minha vida.



## AGRADECIMENTOS

*Agradeço* em primeiro lugar a **Deus** que iluminou os meus passos até aqui.

Aos meus pais **Isilda** e **José Carlos**, minha imensa gratidão, pois minha formação como profissional não poderia ter sido concretizada sem a ajuda de vocês, que, no decorrer da minha vida, proporcionaram-me, além de extenso carinho e amor, os conhecimentos da integridade, da perseverança e de procurar sempre em Deus à força maior para o meu desenvolvimento como ser humano.

À minhas irmãs **Larissa** e **Caroline**, por todo companheirismo, amor e carinho, me apoiando nos momentos de dificuldade.

À minha Tia **Teresa** que sempre se fez presente e contribuiu para todas as conquistas em minha vida.

À minha orientadora, prof. Dra. **Eny Maria Goloni Bertollo**, por compartilhar comigo suas ideias, conhecimentos e experiências. Quero expressar o meu reconhecimento e admiração pela sua competência profissional e minha gratidão pela sua amizade, por ser uma profissional extremamente qualificada e pela forma humana que conduziu minha orientação.

À prof. Dra. **Patrícia Matos Biselli Chicote**, por dividir todo seu conhecimento comigo, e por contribuir tão efetivamente para a conclusão desse trabalho, abdicando do seu tempo e tirando minhas dúvidas com toda paciência e competência.

À prof. Dra. **Érika Cristina Pavarino**, pelo incentivo e amizade e por sempre externar sua paixão pela pesquisa científica.

À **Anelise Russo**, **Gláucia Maria Fernandes** e **André Rodrigueiro**, pela amizade e ajuda nas práticas laboratoriais e por estarem sempre dispostos a sanar minhas dúvidas com muita paciência e carinho, meu muito obrigada a vocês.

À **Analice Andreoli**, por todas as contribuições e ajuda, mesmo em momentos de correria, sempre esteve ao meu lado disposta a me ajudar, que nossa amizade perdure por longos anos.

Ao **Thiago Davanso** e à **Andrea Mourão** pelo incentivo em ingressar na pesquisa científica, pelo companheirismo e convivência durante esses mais de dez anos de amizade.

Ao **Serviço Unidade de Transplante de Fígado e Intestino** do Hospital de Base, hospital de ensino, da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto-SP- FAMERP, ao **Grupo de Estudos dos Tumores do Fígado (GETF)** sob a responsabilidade do Prof<sup>o</sup> Dr<sup>o</sup> **Renato Ferreira da Silva** de onde obtivemos as amostras de pacientes com carcinoma hepatocelular e cirrose e ao **Hemocentro do Hospital de Base**, hospital de ensino, da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto-SP, de onde obtivemos as amostras de pacientes controle.

Aos **Pacientes** com Carcinoma hepatocelular, Cirrose e também aos pacientes do hemocentro que colaboraram prontamente com essa pesquisa, sem vocês esse trabalho não seria possível.

Ao **Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da FAMERP** e seus funcionários.

À **coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes)** pela bolsa de mestrado.

Ao **conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e tecnológico (CNPq)** pelo auxílio financeiro.

À **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)** pelo suporte financeiro.

Aos **membros da banca examinadora** pela disponibilidade, sugestões e colaboração na correção desta dissertação.

## Lista de Figuras

- Figura 1.** Estadiamento BCLC (Barcelona Clinical Liver Cancer).....5
- Figura 2.** Metabolismo dos xenobióticos.....7
- Figura 3.** Análise molecular dos polimorfismos CYP1A1\*2A (**I**), CYP2E1\*5B (**II**) e CYP2E1\*6 (**III**). Imagens **I**, **II**, **III** correspondem aos géis de agarose 2,0% dos polimorfismos analisados pela técnica de PCR-RFLP. Coluna M: marcador de peso molecular 100 pb. **I.** Coluna 1: genótipo homozigoto selvagem TT. Coluna 2: genótipo heterozigoto TC. Coluna 3: genótipo homozigoto polimórfico CC. **II.** Colunas 1 e 2: genótipos homozigotos selvagens C1C1. Coluna 3: genótipo heterozigoto C1C2. **III.** Colunas 1, 2 e 3: genótipos homozigotos selvagens DD. Coluna 4: genótipo heterozigoto DC. Coluna 5: genótipo homozigoto polimórfico CC.....19
- Figura 4.** Análise molecular do polimorfismo CYP1A1\*2C -A2455G -Curvas da análise de discriminação alélica produzidas pelo software Step One Plus v. 2.0 pela técnica de PCR em tempo real. O eixo X representa o número de ciclos de amplificação e o eixo y, o valor da fluorescência. (A) Exemplo de um homozigoto selvagem (TT); (B) Exemplo de um heterozigoto (TC); (C) Exemplo de um homozigoto polimórfico (CC). O fluoróforo FAM (azul) representa o alelo T e o fluoróforo VIC (verde) representa o alelo C.....20
- Figura 5.** Sobrevida global para pacientes com CHC portadores de alelo polimórfico 5B (linha vermelha) e pacientes com CHC portadores de alelo de tipo selvagem (linha preta) para o polimorfismo CYP2E1 \* 5B.....33
- Figura 6.** Sobrevida global para pacientes com CHC portadores de alelo polimórfico 6 (linha vermelha) e pacientes com CHC portadores de alelo de tipo selvagem (linha preta) para o polimorfismo CYP2E1 \* 6.....34

## Lista de Tabelas e Quadros

<b>Quadro 1.</b> Protocolo de amplificação do polimorfismo <i>CYP1A1*2A (rs4646903)</i> .....	15
<b>Quadro 2.</b> Protocolo de amplificação do polimorfismo <i>CYP2E1*5B (rs3813867)</i> .....	16
<b>Quadro 3.</b> Protocolo de amplificação do polimorfismo <i>CYP2E1*6 (rs 6413432)</i> .....	16
<b>Quadro 4.</b> Protocolo de digestão do polimorfismo <i>CYP1A1*2A</i> .....	17
<b>Quadro 5.</b> Protocolo de digestão do polimorfismo <i>CYP2E1*5B</i> .....	18
<b>Quadro 6.</b> Protocolo de digestão do polimorfismo <i>CYP2E1*6</i> .....	18
<b>Tabela 1.</b> Relação entre fatores de risco e o carcinoma hepatocelular.....	25
<b>Tabela 2.</b> Relação entre fatores de risco e cirrose hepática.....	26
<b>Tabela 3</b> Associação dos polimorfismos <i>CYP1A1 * 2A, CYP1A1 * 2C, CYP2E1 * 5B e CYP2E1 * 6</i> com carcinoma hepatocelular.....	27
<b>Tabela 4.</b> Associação dos polimorfismos <i>CYP1A1*2A, CYP1A1 * 2C, CYP2E1 * 5B e CYP2E1 * 6</i> com cirrose hepática.....	28
<b>Tabela 5.</b> Interação entre os polimorfismos <i>CYP1A1 *2A, CYP1A1 *2C, CYP2E1 *5B e CYP2E1 *6</i> e o consumo de tabaco ou álcool no risco para CHC.....	30
<b>Tabela 6.</b> Interação entre os polimorfismos <i>CYP1A1 *2A, CYP1A1 *2C, CYP2E1 *5B e CYP2E1 *6</i> e o consumo de tabaco ou álcool no risco para cirrose hepática.....	31

**Tabela 7.** Associação dos polimorfismos *CYP1A1* \* 2A, *CYP1A1* \* 2C, *CYP2E1* \* 5B e *CYP2E1* \* 6 com o estadiamento tumoral, de acordo com os critérios BCLC.....32

## Lista de abreviaturas e símbolos

μL	Microlitro
A	Adenina ( <i>Adenine</i> )
C	Citosina ( <i>Cytosine</i> )
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CCR	Carcinoma colorretal
CECP	Carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CHC	Carcinoma Hepatocelular
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
CYP	Citocromo P450
D'	D de Lewontin
DHA	Doença hepática alcoólica
DNA	Ácido desoxirribonucléico ( <i>Desoxirribonucleic acid</i> )
dNTPs	Desoxirribonucleotídeos trifosfatados
DOPM	Doenças orais potencialmente malignas
Dra I	Enzima de restrição extraída de <i>Deinococcus radiophilus</i>
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
Et al.	<i>Et alia</i>
FAMERP	Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto
FAPESP	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
FUNFARME	Fundação Faculdade Regional de Medicina de São José do Rio Preto
G	Guanina ( <i>Guanine</i> )
GST	Glutathione S-transferase
H <sub>2</sub> O	Água
HBx	Proteína codificada por VHB ( <i>HBV-encoded X protein</i> )
IC	Intervalo de confiança
LOD	Logaritmo de probabilidades
M	Molar

MDR	<i>Multiple Drug Resistance</i>
MgCL <sub>2</sub>	Cloreto de magnésio
mL	Mililitro
Msp I	Enzima de restrição extraída de <i>Moraxella species</i>
NaCl	Cloreto de sódio
NAT	N-acetiltransferase
Ng	Nanograma
ng/mL	Nanograma por microlitro
Nm	Nanômetro
OMS	Organização mundial de saúde
OR	<i>Odds ratio</i>
Pb	Pares de base
PBS	Tampão fosfato salino
PCR	Reação em cadeia da polimerase ( <i>Polymerase chain reaction</i> )
Pst I	Enzima de restrição extraída de <i>Providencia stuartii</i>
RFLP	Polimorfismo de tamanho de fragmento de restrição ( <i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i> )
RPM	Rotações por minuto
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SLT	Sulfotransferase
SNP	Polimorfismo de nucleotídeo único
T	Timina ( <i>Thymine</i> )
TACE	Quimioembolização transarterial
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TE	Tampão de eluição
TNM	Tamanho do tumor; Comprometimento de linfonodos; Metástase á distância
TPMT	Thio-purina-S-metiltransferase
UGT	UDP-glucoroniltransferase
UPGEM	Unidade de Pesquisa em Genética e Biologia Molecular
VHB	Vírus hepatite B



VHC	Vírus hepatite C
$\chi^2$	Qui-quadrado ( <i>Chi-square</i> )

## Resumo

**Introdução:** O câncer de fígado ocupa o quinto lugar em incidência e o terceiro em mortalidade em todo o mundo. A maioria dos novos casos e mortes ocorre em países em desenvolvimento. A cirrose é um dos principais fatores de risco para o desenvolvimento de carcinoma hepatocelular (CHC). Vários estudos demonstram que polimorfismos nos genes *Citocromo P450 (CYPs)* podem contribuir para a etiologia de doenças complexas, assim como o câncer de fígado. Os polimorfismos nos genes desta família podem alterar a expressão ou a função da proteína e influenciar os níveis individuais de detoxificação que contribuem para o desenvolvimento de doenças hepáticas. **Objetivo:** Investigar a associação dos polimorfismos *CYP1A1\*2A* (rs4646903), *CYP1A1\*2C* (rs1048943), *CYP2E1\*5B* (rs2031920) e *CYP1E1\*6* (rs6413432) e o risco para cirrose e CHC. **Casuística e métodos:** Foram avaliados 745 indivíduos (160 pacientes com cirrose, 97 com CHC e 488 controles). Os polimorfismos foram investigados por Reação em Cadeia da Polimerase / Polimorfismo de Comprimento de Fragmento de Restrição (PCR-RFLP) e PCR em Tempo Real. As análises estatísticas foram realizadas por Qui-quadrado, Regressão logística binária. A análise de sobrevida foi realizada utilizando a Curva de Kaplan Meier e o teste Log-rank. **Resultados:** Os resultados mostraram que a idade  $\geq 60$  anos foi associada com CHC (OR = 12,22; IC 95%: 7,17-20,82;  $p < 0,001$ ) e idade  $\geq 57$  anos foi um fator de risco para cirrose (OR = 7,12 IC 95% 4,68-10,84;  $p < 0,001$ ). Hepatite B (OR = 7,84; IC 95%: 1,86-33,08;  $p = 0,005$ ) e alfa fetoproteína  $> 500$  ng / mL (OR = 3,73; IC 95%: 1,25-11,13;  $p = 0,018$ ) foram associadas com CHC. Os polimorfismos *CYP1A1 \*2A*, *CYP1A1 \*2C*, *CYP2E1 \*5B* e *CYP2E1 \*6* não foram associados ao risco de CHC e cirrose ( $p > 0,05$ ), assim como os haplótipos *CYP1A1* e *CYP2E1* ( $P > 0,05$ ). Não houve

interação entre os polimorfismos e o consumo de tabaco ou álcool no risco para CHC e cirrose ( $p > 0,05$ ). Não foi observada associação entre os polimorfismos e parâmetros clínicos em pacientes com CHC ( $p > 0,05$ ). Os polimorfismos *CYP2E1* \*5B e *CYP2E1* \*6 foram associados com redução da sobrevida em pacientes com CHC ( $p = 0,0234$  e  $p = 0,0424$ , respectivamente). **Conclusão:** Este estudo conclui que a idade está associada ao risco de desenvolver CHC e cirrose e os polimorfismos *CYP2E1* \*5B e *CYP2E1* \*6 contribuem para a redução da sobrevida em pacientes com CHC.

**Palavras-chave:** Polimorfismo; Xenobióticos; Cirrose hepática; Carcinoma hepatocelular; CYP1A1; CYP2E1.

## Abstract

**Introduction:** Liver cancer ranks fifth in incidence and third in mortality worldwide. Most new cases and deaths occur in developing countries. Cirrhosis is a major risk factor for hepatocellular carcinoma (HCC). Several studies have shown that polymorphisms in *cytochrome P450 (CYPs)* genes can contribute to the etiology of complex diseases, as well as liver cancer. Polymorphisms in the genes of this family can alter the expression or function of the protein and influence the individual levels of detoxification, which contribute to the development of liver diseases. **Objective:** To investigate the association between the genetic polymorphisms *CYP1A1\*2A* (rs4646903), *CYP1A1\*2C* (rs1048943), *CYP2E1\*5B* (rs2031920), *CYP1E1\*6* (rs6413432) and the risk of hepatic cirrhosis and HCC. **Casuistic and Methods:** Seven hundred and forty-five subjects (160 cirrhosis patients, 97 HCC patients and 488 controls) were evaluated. Polymorphisms were investigated by polymerase chain reaction / restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) and Real-Time PCR. Statistical analyses were performed by chi-square and binary logistic regression. Survival analysis was performed using Kaplan Meier curve and Log rank test. **Results:** The results showed that age  $\geq 60$  years was associated with HCC (OR = 12.22, 95% CI: 7.17-20.82,  $p < 0.001$ ) and age  $\geq 57$  years was a risk factor for cirrhosis (OR = 7.12 CI 95% 4.68-10.84,  $p < 0.001$ ). Hepatitis B (OR = 7.84, 95% CI: 1.86-33.08,  $p = 0.005$ ) and alpha fetoprotein  $> 500$  ng / mL (OR = 3.73, 95% CI: 1.25-11, 13;  $p = 0.018$ ) were associated with HCC. The polymorphisms *CYP1A1 \*2A*, *CYP1A1 \*2C*, *CYP2E1 \*5B* and *CYP2E1 \*6* were not associated with risk of HCC and cirrhosis ( $p > 0.05$ ), as well as *CYP1A1* and *CYP2E1* haplotypes ( $p > 0.05$ ). There was no interaction between polymorphisms and smoking or alcohol consumption in the risk for HCC and cirrhosis

( $p > 0.05$ ). No association was found between the polymorphisms and clinical parameters in HCC patients ( $p > 0.05$ ). *CYP2E1* \*5B and *CYP2E1* \*6 polymorphisms were associated with a reduction in survival in HCC patients ( $p = 0.0234$  and  $p = 0.0424$ , respectively). **Conclusion:** This study concludes that age is associated with the risk of developing HCC and cirrhosis, and *CYP2E1* \*5B and *CYP2E1* \*6 polymorphisms contribute for the reduced survival in HCC patients.

**Keywords:** Polymorphism; Xenobiotics; Hepatical cirrhosis; Hepatocellular carcinoma; CYP1A1; CYP2E1.

## **1.INTRODUÇÃO**

## 1.1.Introdução

O câncer é um grupo de doenças caracterizado pelo crescimento descontrolado de células que possuem capacidade de invadir tecidos e órgãos, e pode ser causado por fatores externos (tabaco, produtos químicos, radiação e organismos infecciosos) e fatores internos (mutações herdadas, alterações hormonais, condições imunes e mutações). Esses fatores podem agir em conjunto ou em sequência para promover a carcinogênese. <sup>(1)</sup>

O carcinoma hepatocelular (CHC) é o tipo de câncer primário de fígado mais comum, que se desenvolve a partir das principais células do fígado chamadas hepatócitos. É mais comum em pessoas com fígado comprometido por cirrose e em homens. <sup>(2)</sup> O risco de desenvolver CHC pode ser multifatorial, sendo a idade do paciente, a gravidade da doença hepática no início do tratamento, persistência pós-tratamento de fibrose excessiva no fígado, coexistência de diabetes, abuso de álcool e excesso de peso, alguns dos fatores relacionados ao aumento do risco para CHC. <sup>(3)</sup>

A carcinogênese é decorrente de vários fatores, dentre os principais estão a cirrose hepática e as hepatites virais para os vírus B (VHB) e C (VHC). Porém existem outros fatores importantes, como os fatores hormonais e genéticos, carcinógenos químicos, a exposição à aflatoxina, o consumo excessivo de álcool, xenobióticos e algumas condições heredofamiliares. Além de todos esses fatores, alguns estudos revelam que o consumo de tabaco, uma dieta pobre em alimentos que contém antioxidantes, a exposição ambiental ao arsênico, obesidade e esteatose hepática são também fatores de risco para o desenvolvimento do CHC. <sup>(4)</sup> Uma outra causa comum da doença hepática tem sido a Doença Hepática Gordurosa não alcóolica (DHGNA), que atualmente é a terceira causa de indicação de transplante de fígado nos Estados Unidos,

sendo a VHC e Doença Hepática Alcoólica (DHA) os primeiros lugares, respectivamente. <sup>(5)</sup>

A cirrose é o fator de risco mais importante para o desenvolvimento de CHC <sup>(6)</sup> e está presente em 90% dos pacientes com CHC. <sup>(7)</sup> A triagem e o diagnóstico precoce de cirrose são de extrema importância, pois permitem o acompanhamento da doença e detecção de complicações relacionadas, especialmente hipertensão portal e o CHC. <sup>(8)</sup>

A doença hepática alcoólica (DHA) é uma das principais causas de doenças avançadas do fígado em todo o mundo. <sup>(9)</sup> O impacto sistêmico do abuso de álcool se reflete na maior incidência de condições significativamente comórbidas relacionadas à doenças que abrangem todas as idades. O álcool está relacionado à incidência de diabetes mellitus, hipertensão, doença cardíaca isquêmica, disritmias, acidente vascular cerebral e pneumonia, fatores que contribuem para o risco de doença hepática <sup>(10)</sup>. Enquanto que a DHGNA é conhecida por ser a manifestação hepática da síndrome metabólica, sendo definida quando há três ou mais fatores relacionados ao IMC, triglicerídeos, baixos níveis de colesterol HDL, hipertensão arterial e diabetes. <sup>(11, 12)</sup>

As hepatites virais B (VHB) e C (VHC) são um dos principais problemas de saúde em todo o mundo que resultam em fibrose hepática ou cirrose crônica após uma infecção prolongada. Evidências sugerem que as terapias antivirais atuais podem efetivamente controlar ou mesmo erradicar o VHB e VHC, e subsequentemente melhorar ou mesmo reverter a cirrose, complicações cirróticas e evitar o CHC. <sup>(13)</sup>

VHC é um vírus que utiliza o metabolismo da lipoproteína do hospedeiro para a persistência da infecção. VHC e lipídeos interagem nas etapas críticas do ciclo de vida do vírus C (replicação, montagem, secreção e entrada nos hepatócitos) e este é fortemente associado à atividade inflamatória, a progressão da fibrose hepática e ao



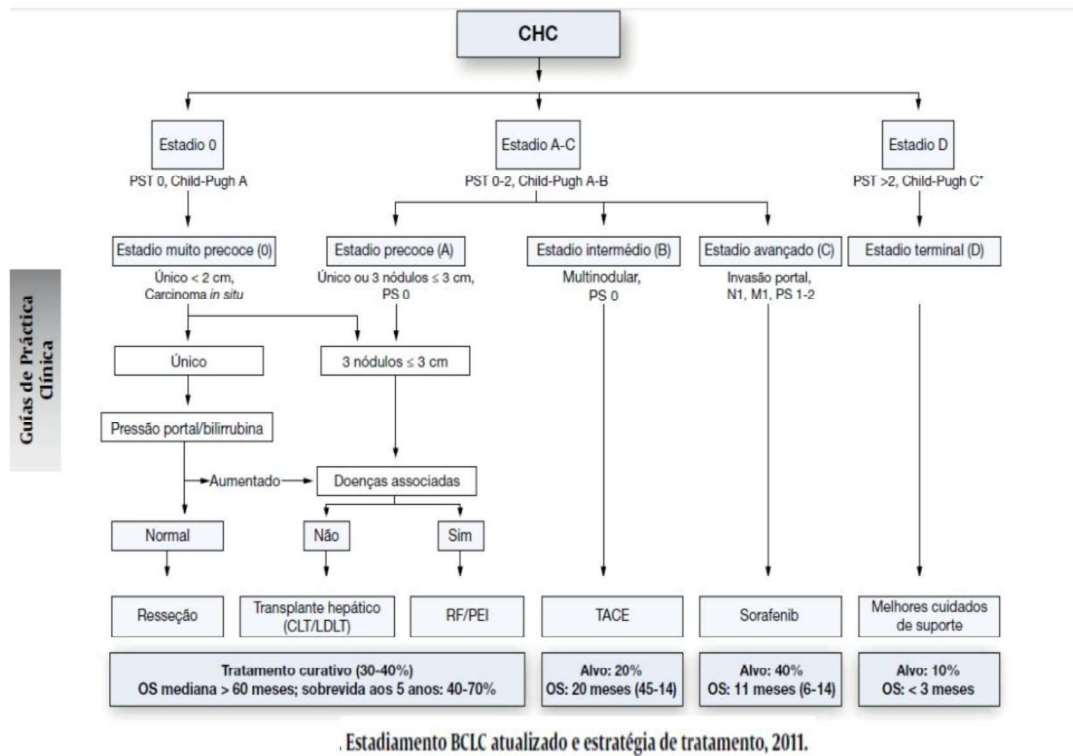
desenvolvimento do CHC.<sup>(14)</sup> A infecção crônica pelo vírus VHC é um fator patogênico primário para o desenvolvimento do câncer de fígado.<sup>(3)</sup>

A infecção crônica pelo VHB é um importante fator de risco o desenvolvimento e progressão do CHC e está associada a um prognóstico desfavorável. Muitos estudos demonstraram que o início do tratamento antiviral no tempo adequado não é apenas essencial para prevenir a incidência de CHC em pacientes crônicos com hepatite B, mas também importante para reduzir a reativação do VHB, melhorar a função hepática, reduzir ou retardar a recorrência do CHC e prolongar a sobrevida global de pacientes com CHC após terapias curativas e paliativas.<sup>(15)</sup>

O desenvolvimento de vários estágios do câncer de fígado está associado com o acúmulo de alterações genéticas e epigenéticas. A longa latência do desenvolvimento do CHC após a infecção primária pelo VHB reflete uma via de desenvolvimento indireta, onde a integração de VHB tem o efeito principal de alterar a regulação de genes. As variações de sequência e as alterações estruturais do genoma do VHB que modificam a estrutura da proteína viral, geram novas proteínas quiméricas HBx humanas que podem exercer um efeito alterado facilitando a evasão da vigilância imune do hospedeiro e / ou contribuindo para a tumorigênese.<sup>(16)</sup>

Atualmente, existem vários tratamentos e cuidados paliativos para o CHC. A classificação Barcelona Clinic Liver Cancer (BCLC) (Figura 1) é uma das mais recomendadas para a indicação do melhor tratamento do doente. Os estadios considerados são precoce, inicial, intermediário, avançado e terminal. Sendo que os procedimentos como ressecção, ablação e transplante são os mais indicados nos estadios iniciais da doença. Enquanto que a quimioembolização é indicada no estadio intermediário e a utilização de sorafenib nos estadios avançados do câncer. O cuidado

paliativo é indicado para os pacientes em estadiamento terminal, com a intenção de melhorar a qualidade de vida. (4)



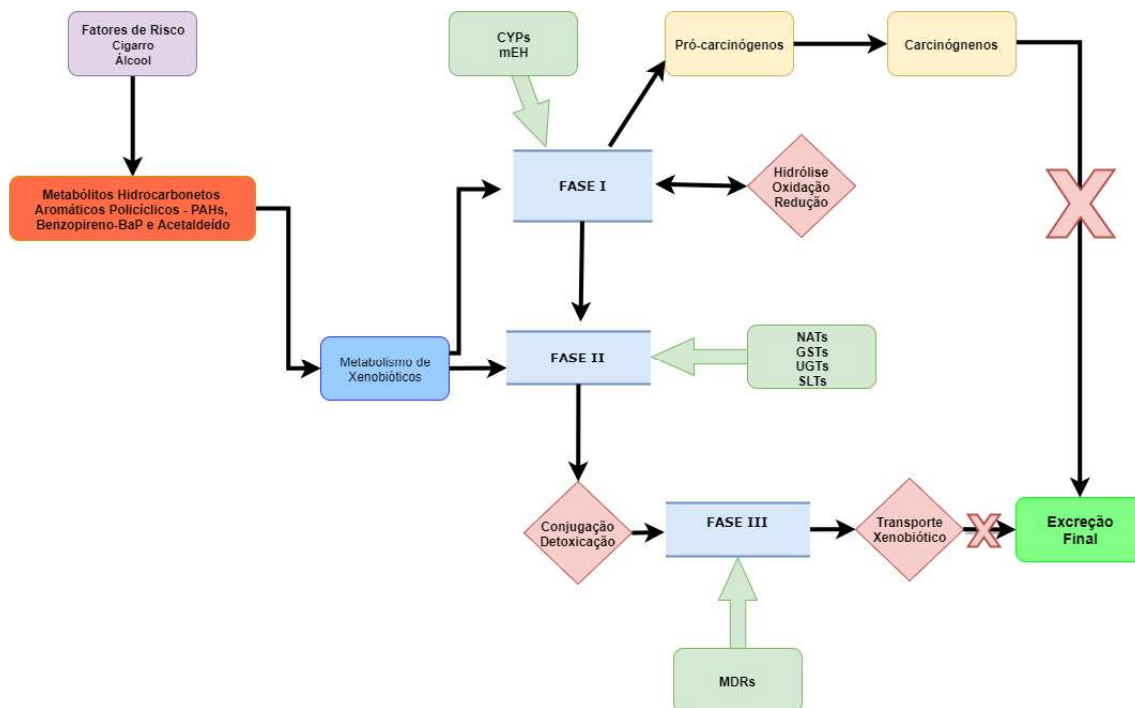
**Figura 1.** Estadiamento *BCLC* (*Barcelona Clinic Liver Cancer*) Abbreviations: *CLT*, *cadaveric liver transplantation*; *DLT*, *living donor liver transplantation*; *M*, classificação metástase; *N*, classificação de nódulos; *OS*, *overall survival*; *PEI*, *percutaneous ethanol injection*; *PST*, *performance status test*; *RF*, *radiofrequency*; *TACE*, *transarterial chemoembolization*. (17)

Além disso, as interações entre fatores genéticos e ambientais levam a um conjunto quase ilimitado de fenótipos que afetam a degradação de xenobióticos no fígado. No entanto, deve ser salientado que outros fatores e, em particular, os estados patológicos, também têm impacto no metabolismo e / ou na excreção de xenobióticos e também nas condições específicas do fígado, onde a doença pode causar mudanças

adaptativas globais na regulação de genes / proteínas. Por sua vez, essas mudanças adaptativas podem causar respostas diferenciais coordenadas que podem, em última instância, afetar a toxicidade xenobiótica.<sup>(18)</sup>

O fígado é o principal órgão de metabolismo e excreção de drogas e xenobióticos, realizado por um sistema altamente integrado que consiste em: hidrólise, oxidação ou redução, conjugação e excreção.<sup>(19)</sup> Participam do metabolismo de xenobióticos as enzimas do metabolismo oxidativo mediado ou de Fase I e as enzimas conjugadas ou de Fase II (Figura 2). O metabolismo oxidativo é mediado pelas enzimas da família Citocromo P450 (CYP) e pelas enzimas epóxido hidrolase microsossomais (mEHs), as quais convertem os metabólitos altamente reativos em compostos carcinogênicos.<sup>(20)</sup> O metabolismo de Fase II envolve as Glutathionas S-transferases (GSTs) e outras famílias de enzimas, tais como UDP-glucoroniltransferases (UGTs), N-acetiltransferases (NATs), Sulfotransferases (SLTs) e Thio-purina-S-metiltransferases

Além disso, na Fase III de biotransformação ocorre ativação de transportadores de membrana para transportar drogas e outros xenobióticos através das membranas celulares.<sup>(21)</sup>



**Figura 2.** Metabolismo dos xenobióticos. CYPs: Citocromos P450; mEH: Epóxide hidrolase microssomal; NATs: N-acetiltransferases; GSTs: Glutathione-S-Transferases; UGTs: UDP-Glucuroniltransferases; SLTs: Sulfotransferases; “MDRs: *Multiple Drug Resistences*”.

Os genes que codificam enzimas da família Citocromo P450 (CYP 450) são fundamentais em muitos processos biológicos. Assim, alterações nestes genes podem levar ao desenvolvimento de várias doenças. Existe um gradiente de respostas fenotípicas que ocorrem quando ambas as cópias de um gene CYP carregam mutações missense ou estão completamente ausentes.<sup>(22)</sup>

A via de transformação oxidativa de fármacos e outros xenobióticos mediada por CYP é crítica para a eliminação da toxicidade do organismo hospedeiro. O bom funcionamento desta via depende da formação eficaz de complexos proteína-proteína entre as CYP, os seus parceiros de transferência de elétrons e outras proteínas que podem influenciar a sua função. As alterações nas enzimas CYP ou em uma proteína interativa podem levar a deficiências ou vias alternativas de biotransformação, que por

sua vez podem produzir metabolitos tóxicos. Portanto, uma compreensão abrangente dos diferentes tipos e funções das interações proteína-proteína é necessária para prevenir e tratar tais toxicidades. <sup>(23)</sup>

O metabolismo hepático da maioria dos agentes neuropsicofarmacológicos pode ser alterado em várias situações, como quando os pacientes também recebem medicamentos que influenciam as enzimas CYP responsáveis pelo metabolismo do fármaco ou quando fumam ou têm doença hepática. As consequências do metabolismo alterado dos fármacos incluem a eficácia da medicação comprometida ou o aumento dos efeitos adversos da medicação. As medidas corretivas incluem adequação de dose ou o uso de medicamentos que não são metabolizados ou são minimamente metabolizados pelas enzimas CYP no fígado. <sup>(24)</sup>

As variações nas enzimas metabólicas há muito tempo foram postuladas como fatores de risco para a suscetibilidade genética de desenvolvimento do câncer, ou toxicidade de fármacos quimioterapêuticos e resistência a fármacos. O gene *CYP1A1* pelo seu papel-chave no metabolismo xenobiótico, têm sido extensivamente estudado como um marcador para o câncer. <sup>(25)</sup> Estudo de meta-análise indicou que o polimorfismo *CYP1A1\*2A* pode estar associado a um risco aumentado de CHC em asiáticos. <sup>(26)</sup>

O etanol contribui para a doença hepática alcoólica (DHA), mas também é fator de comorbidade para outras doenças hepáticas crônicas. <sup>(27)</sup> O etanol e certas drogas competem pelo metabolismo mediado por CYP2E1. A enzima CYP2E1 é induzida após o consumo crônico de álcool e o metabolismo de fármacos, os quais também são substratos para a CYP2E1, também é aumentado. Além do etanol, a CYP2E1 pode

oxidar outros compostos incluindo acetona, benzeno e outros álcoois e pode representar cerca de 10% da capacidade total de oxidação do fígado. <sup>(28)</sup>

CYP2E1 pode estar envolvida no estresse oxidativo induzido pelo etanol causando lesão hepática. <sup>(28, 29)</sup> O estresse oxidativo regula os processos fisiológicos e fisiopatológicos no sangue e contribui para uma variedade de doenças hepáticas. A geração de espécies reativas de oxigênio por CYP2E1 está envolvida na doença hepática alcoólica por meio da regulação da esteatose hepática, morte hepatocelular e sensibilidade à insulina. <sup>(30)</sup> Os polimorfismos *CYP2E1* \*5B e *CYP2E1* \*6 mostraram um efeito favorável no câncer hepatocelular. <sup>(31)</sup>

As doenças autoimunes que envolvem CYP2E1 desempenham papel importante na lesão hepática induzida por hidrocarbonetos halogenados e ionizados, e são detectáveis em cerca de um terço dos doentes com DAH ou CHC avançados. Nestes últimos, a presença de autoanticorpos anti-CYP2E1 é um preditor independente para a necroinflamação extensiva e fibrose. <sup>(32)</sup>

O dano hepático que leva à cirrose é o resultado de um mecanismo complexo envolvendo efeitos tóxicos diretos para um processo inflamatório contribuindo para morte dos hepatócitos e fibrose hepática mediada por secreção de várias citocinas. A reação inflamatória é o processo pelo qual o fígado responde às agressões, tentando restaurar sua estrutura original e a função hepática; no entanto, se o dano local é persistente e / ou intenso, a manutenção da resposta inflamatória dá origem a uma substituição gradual do tecido hepático normal por cicatriz fibrótica não funcional. O desequilíbrio entre a regeneração tecidual e a fibrose determinarão o resultado para a recuperação da saúde do fígado ou cirrose hepática. <sup>(33)</sup>

O estudo de polimorfismos em genes relacionados à metabolização de substâncias tóxicas ou carcinogênicas pode auxiliar na compreensão dos mecanismos que levam ao desenvolvimento de doenças como a cirrose e o CHC. Esses conhecimentos podem contribuir para o desenvolvimento de terapias eficazes no tratamento dessas doenças. Assim, esse trabalho objetiva identificar variantes em genes que participam do metabolismo de xenobióticos em pacientes cirróticos e com CHC.

## 1. 2. Objetivos

O objetivo geral foi o estudo molecular do carcinoma hepatocelular e cirrose por meio da identificação de variantes genéticas e fatores de risco. Os objetivos específicos compreendem:

1. Avaliar as características sócio-demográficas e fatores de risco em pacientes com cirrose e CHC e indivíduos sem história de neoplasia (controles).

2. Investigar a associação dos polimorfismos *CYP1A1\*2A* (rs 4646903), *CYP1A1\*2C* (rs1048943), *CYP2E1\*5B* (rs 2031920), *CYP1E1\*6* (rs 6413432) e o risco para cirrose e CHC.

3. Avaliar a associação dos polimorfismos genéticos e parâmetros clínicos dos tumores de fígado.

4. Verificar a interação entre os polimorfismos genéticos e fatores de risco no desenvolvimento de cirrose e CHC.

5. Investigar a influência dos polimorfismos na sobrevida de pacientes com CHC.



## **2. CASUÍSTICA E MÉTODOS**

## **2.Casuística e Métodos**

### **2.1.Casuística**

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (parecer nº 342.964) (Anexo 1) Os pacientes com CHC e cirrose (grupo caso) receberam todas as informações a respeito do projeto e, após assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (Apêndice 1), foram analisadas 257 amostras de sangue periférico obtidas no Serviço Unidade de Transplante de Fígado e Intestino do Hospital de Base, hospital de ensino da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (FAMERP). Do total de amostras, 160 foram provenientes de pacientes com cirrose e 97 de pacientes com CHC. Também foram avaliadas as amostras de sangue de 488 indivíduos brasileiros, doadores de sangue sem histórico de câncer, provenientes do Hemocentro do Hospital de Base, os quais foram incluídos como grupo controle de indivíduos saudáveis. O protocolo para doadores de sangue exclui a presença de 20 doenças crônicas (disponível em [http://bvsm.s.saude.gov.br/bvs/publicacoes/qualidade\\_sangue.pdf](http://bvsm.s.saude.gov.br/bvs/publicacoes/qualidade_sangue.pdf)). Os dados dos pacientes foram coletados por meio de questionário padronizado (Apêndice 2) e prontuário médico. Além disso, o critério de inclusão para a ausência de tumores foi realizada com base nas informações obtidas por meio do histórico genealógico dos pacientes. Foi utilizado um número maior de indivíduos controles para aumentar o poder estatístico.

### **2.2. Métodos**

#### **2.2.1. Análise dos dados clínicos**

Foram analisados os parâmetros clínicos (Diabetes, hepatite B, C e autoimune, alfa-feto proteína e BCLC) como fatores de risco relacionados, o tempo de sobrevida

dos pacientes e o tempo de recidiva tumoral. Foi feita a correlação dos dados clínicos com os achados moleculares.

Com base nos dados da Organização Mundial de Saúde (OMS), consideramos indivíduos fumantes aqueles que consumiram mais de 100 cigarros durante a vida e consideramos consumidores de álcool aqueles pacientes que consumiram mais de um drink de bebida alcoólica por semana (um drink foi definido como aproximadamente 44mL de licor ou 118mL de vinho ou 350mL de cerveja).<sup>(34)</sup>

### **2.2.2 . Extração de DNA a partir de sangue total**

O DNA de leucócitos de sangue periférico foi extraído segundo a técnica proposta por Miller *et al.* (1988)<sup>(35)</sup>, com modificações, e armazenado em freezer -20°C para a posterior genotipagem.

Foram coletados aproximadamente 7,0 mL de sangue periférico e transferidos para um tubo de 15 mL estéreis já contendo 7mL de Ficoll (proporção 1:1). O tubo foi centrifugado a 1500 rotações por minuto (rpm) por 30 minutos. Após a formação de três fases (plasma, linfócitos e hemáceas), os linfócitos foram transferidos para um novo tubo com a utilização de uma pipeta Pasteur estéril descartável. Em seguida, foi adicionada solução salina (PBS 1x) até completar o volume de 15 ml. O tubo foi centrifugado novamente a 1200 rpm por 15 minutos. O sobrenadante foi descartado e adicionado novamente PBS 1x até completar o volume de 15 mL. Após centrifugação, o sobrenadante foi descartado, e adicionado 3mL de tampão de lise, 200 uL de SDS 10% e 50 uL de proteinase K (20 mg/mL). A solução foi incubada *overnight* a 37°C. Após a digestão protéica, foi adicionado 1mL de NaCl 6M, agitada a solução e em seguida colocada no gelo por 15 minutos. Após este período, a solução foi homogeneizada e centrifugada a 2000 rpm por 15 minutos. O sobrenadante foi transferido para um tubo

novo de 15 mL, descartando-se o *pellet*. Após a adição de etanol 100% gelado, o tubo foi fechado e misturado por inversão. O DNA precipitado foi removido para um tubo contendo 500uL de etanol 70%. Este foi centrifugado a 12000 rpm por cinco minutos. O DNA foi seco em temperatura ambiente e ressuspendido em 200 uL de tampão de eluição (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA).

### 2.2.3. PCR-RFLP [Reação em cadeia da polimerase – (Polimorfismo de comprimento de fragmento de restrição)]

Para avaliação dos polimorfismos *CYP1A1\*2A*, *CYP2E1\*5B* e *CYP2E1\*6* foram utilizados os seguintes protocolos de reações de PCR apresentados nos quadros 1, 2 e 3.

**Quadro 1.** Protocolo de amplificação do polimorfismo *CYP1A1\*2A*.

<i>Reação PCR</i>	<i>Ciclagem</i>
H <sub>2</sub> O ----- 15,2µL	95°C ----- 3 minutos
Tampão 10x (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> [20 mM]----- 2,5µL	94°C ----- 30 segundos
dNTPs [0,8 mM/ µL]-----2,0 µL	60°C ----- 45 segundos
CYP (Sense) [0,2 pM/ µL]-----0,5 µL	72°C ----- 1 minuto
CYP (Anti sense) [0,2 pM/ µL]----- 0,5 µL	72°C 10 minutos
Magnésio (MgCl <sub>2</sub> ) [2,0 mM/ µL]-----2,0 µL	<b><i>Gel de Agarose</i></b>
<i>Taq</i> DNA polimerase [1,5 U/ µL]-----0,3 µL	1,5%
DNA [100nM/µL]-----2,0µL	

} 30 Ciclos

**Quadro 2.** Protocolo de amplificação e análise do polimorfismo *CYP2E1\*5B*.

<i>Reação PCR</i>	<i>Ciclagem</i>	
H <sub>2</sub> O ----- 12,2µL		
Glicerol-----1,5 µL	94°C ----- 10 minutos	
Tampão 10X KCL [15mM] ----- 2,5µL	94°C-----1 minuto	
dNTPs [0,8 mM/ µL]-----2,0 µL	72°C ----- 1 minuto	
CYP (Sense) [0,4pM/ µL]-----1,0 µL	54°C -----1 minuto	
CYP (Anti sense) [0,4pM/ µL]-----1,0 µL	} 35 Ciclos	
Magnésio [1,5mM/µL]-----1,5 µL		
<i>Taq</i> DNA polimerase [1,5 U/µL]-----0,3 µL		
DNA [150 nM/µL]-----3,0 µL		
	<b><i>Gel de Agarose</i></b>	
	1,5%	

**Quadro 3.** Protocolo de amplificação e análise do polimorfismo *CYP2E1\*6*.

<i>Reação PCR</i>	<i>Ciclagem</i>	
H <sub>2</sub> O ----- 15,9µL	94°C ----- 10 minutos	
10x (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> [20 mM]----- 2,5µL	94°C -----1 minuto	
dNTPs [2,0mM/µL]-----2,0 µL	54°C -----1 minuto	
CYP (Sense) [0,2pmM/µL]-----0,5 µL	72°C -----4 minutos	
CYP (Anti sense) [0,2pM/µL]-----0,5 µL	72°C-----10minutos	
Magnésio[1,25mM/µL]-----1,25 µL	} 35 Ciclos	
<i>Taq</i> DNA polimerase [1,5U/µL]-----0,3 µL		
DNA [100 nM/µL]-----2,0 µL		
	<b><i>Gel de Agarose</i></b>	
	1,5%	

Os fragmentos correspondentes dos genes *CYP1A1* e *CYP2E1* foram visualizados em gel de agarose, corados com *gel red* na presença de um marcador molecular de 100 pb

- **Polimorfismo *CYP1A1\*2A* (rs 4646903) do gene *CYP1A1***: a investigação do alelo polimórfico (m1) do gene *CYP1A1*, na região 3' não codificante do gene, foi realizada pela técnica de PCR-RFLP, apresentada no quadro 4, com a enzima de restrição (*Msp I*). *Primers*: sense: 5'-CGA TGA AGA GGT GTA GCC GCT-3' e anti-sense: 5'-TAG GAG TCT TGT CTC ATG CCT-3' . Fragmentos: T (alelo selvagem): 340pb e C (alelo polimórfico): 200 e 140 pb<sup>(36)</sup>

**Quadro 4.** Protocolo de Digestão e análise do polimorfismo *CYP1A1\*2A*.

<b><i>Reação PCR- RFLP</i></b>	<b><i>Ciclagem</i></b>
H <sub>2</sub> O ----- 7,3µL	37°C ----- 3 horas
Tampão 1X (33 mM Tris-acetato (pH 7.9), 10 mM magnésio acetato, 66 mM potássio acetato, 0.1 mg/mL BSA)----- 2,0µL	<b><i>Gel de Agarose</i></b>
Enzima <i>Msp I</i> [10U/µL]-----0,7 µL	2,0%
DNA amplificado-----10µL	

- **Polimorfismo *CYP2E1\*5B* (rs 2031920) do gene *CYP2E1***: Foi utilizada a técnica de PCR-RFLP, apresentada no quadro 5, com a enzima de restrição *Pst I* para o polimorfismo da região promotora da posição -1019. Os *primers* utilizados para determinação do polimorfismo foram: sense: 5'-TCG TCA GTT CCT GAA AGC AGG-3'; anti-sense: 5'-GAG CTC TGA TGC AAG TAT CGC-3'. <sup>(37, 38)</sup>

**Quadro 5.** Protocolo de Digestão e análise do polimorfismo *CYP2E1\*5B*.

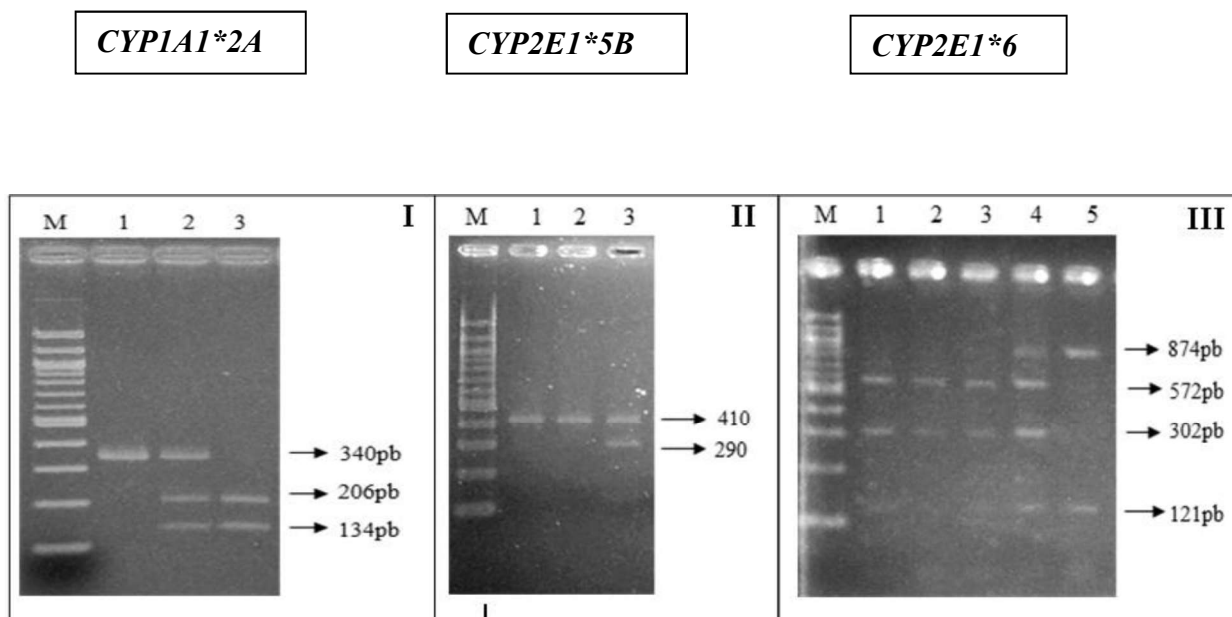
<i>Reação PCR- RFLP</i>	<i>Ciclagem</i>
H <sub>2</sub> O ----- 3,0μL	37°C ----- 3 horas
Tampão 1X (50mM Tris-HCL, 10mM MgCL <sub>2</sub> , 100mM NaCL, 0,1mg/mL BSA) ----- 1,5μL	<b><i>Gel de Agarose</i></b>
Enzima <i>Pst I</i> [10U/ μL]----- 0,5μL	2,0%
DNA amplificado -----10,0μL	

- **Polimorfismo *CYP2E1\*6* (rs 6413432) do gene *CYP2E1*:** foi utilizada a enzima *Dra I* para a detecção do polimorfismo na posição 7766, apresentada no quadro 6 . Os *primers* utilizados foram: sense: 5' TCG TCA GTT CCT GAA AGG TCA-3'; anti-sense: 5' GAG CTC TGA TGC AAG TAT CGC-3'. [\(37, 38\)](#).

**Quadro 6.** Protocolo de Digestão e análise do polimorfismos *CYP2E1\*6*.

<i>Reação PCR- RFLP</i>	<i>Ciclagem</i>
H <sub>2</sub> O ----- 3,0μL	37°C ----- 3 horas
Tampão1X (33mM Tris- acetato, 10mM magnésio acetato, 66mM potássio acetato, 0,1mg/mL BSA)-----1,5μL	<b><i>Gel de Agarose</i></b>
Enzima <i>Dra I</i> [10U/μL]-----0,5μL	2,0%
DNA amplificado -----10,0μL	

Os produtos da reação de digestão enzimática foram separados em gel de agarose 2.0%, corados com *gel red* na presença de um marcador molecular de 100pb. A separação das bases pode ser visualizada na **Figura 3**.



**Figura 3. Análise molecular dos polimorfismos *CYP1A1\*2A* (I), *CYP2E1\*5B* (II) e *CYP2E1\*6* (III).** Imagens I, II, III correspondem aos géis de agarose 2,0% dos polimorfismos analisados pela técnica de PCR-RFLP. Coluna M: marcador de peso molecular 100 pb. **I.** Coluna 1: genótipo homocigoto selvagem TT. Coluna 2: genótipo heterocigoto TC. Coluna 3: genótipo homocigoto polimórfico CC. **II.** Colunas 1 e 2: genótipos homocigotos selvagens C1C1. Coluna 3: genótipo heterocigoto C1C2. **III.** Colunas 1, 2 e 3: genótipos homocigotos selvagens DD. Coluna 4: genótipo heterocigoto DC. Coluna 5: genótipo homocigoto polimórfico CC.

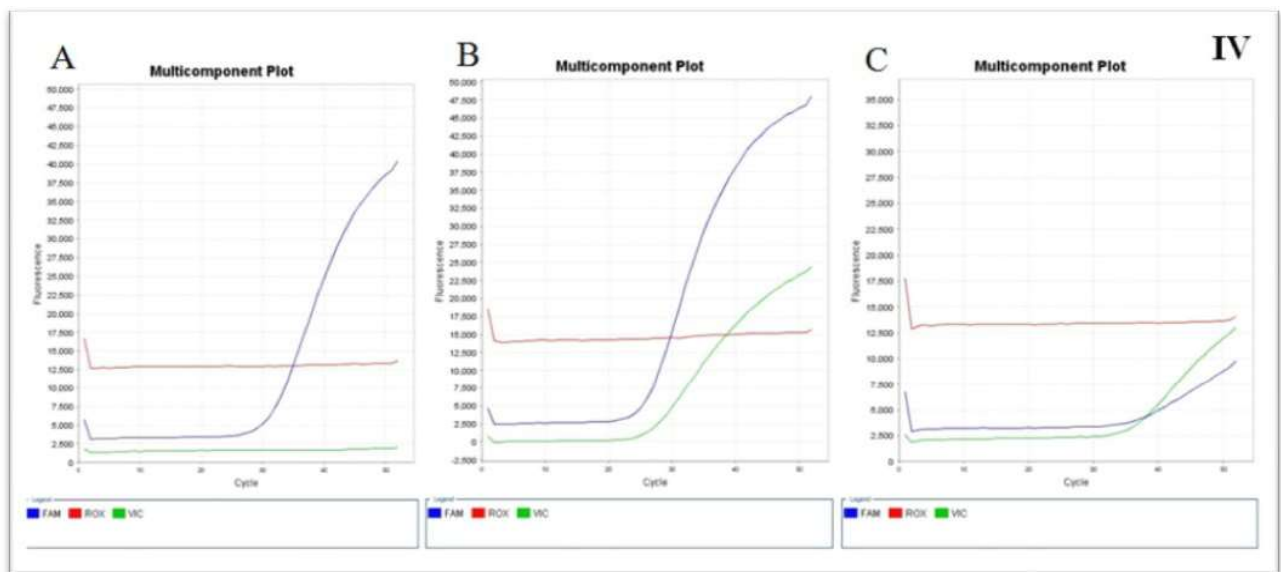
#### 2.2.4. PCR em Tempo Real

A análise do polimorfismo *CYP1A1\*2C* foi realizada por meio da reação de PCR em Tempo Real em volume final de 5  $\mu$ L contendo 10 ng de DNA genômico, 2,5  $\mu$ L de *Taqman* Universal PCR Master Mix (*AppliedBiosystems*), 0,9  $\mu$ M dos *primers* sense e anti-sense e 0,2  $\mu$ M das sondas específicas para cada alelo investigado, marcadas com fluoróforos (sondas *TaqMan*, *Applied Biosystems*). As reações foram



realizadas em placas de 96 poços, no equipamento *Step One Plus<sup>TM</sup> Real-Time PCR System* (*Applied Biosystems*). Primers e sondas específicos para esta variante foram disponibilizados pelo fabricante.

- **Polimorfismo *CYP1A1\*2C* (rs1048943) do gene *CYP1A1***: para investigação do polimorfismo no gene *CYP1A1*, na posição 2455 que resulta na substituição de isoleucina por valina, foi utilizado ensaio *TaqMan* (*Applied Biosystems*) Assay ID: C\_\_25624888\_50.<sup>(39)</sup> Na Figura 2 estão representados os genótipos a partir das curvas de discriminação alélica.



**Figura 4. Análise molecular do polimorfismo *CYP1A1\*2C* (rs1048943).** Curvas da análise de discriminação alélica produzidas pelo software *Step One Plus* v. 2.0 pela técnica de PCR em tempo real. O eixo X representa o número de ciclos de amplificação e o eixo y, o valor da fluorescência. (A) Exemplo de um homocigoto selvagem (TT); (B) Exemplo de um heterocigoto (TC); (C) Exemplo de um homocigoto polimórfico (CC). O fluoróforo FAM (azul) representa o alelo T e o

fluoróforo VIC (verde) representa o alelo C.

### **2.2.5. Análises Estatísticas**

As estatísticas descritivas incluíram média e desvio padrão para dados contínuos e porcentagens para dados categóricos. O programa BioEstat versão 5.0, foi utilizado para avaliar o Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) nos grupos CHC, cirrose e controle. Os efeitos das variáveis sobre CHC e risco de cirrose foram avaliados por regressão logística binária utilizando o programa Minitab - versão 16.0 em modelo ajustado para idade (referência: <60 anos para CHC, <57 anos para cirrose, mediana), consumo de álcool e tabaco (referência: não consumo), sexo (referência: feminino) e os polimorfismos no modelo dominante (referência: genótipo selvagem). A associação entre polimorfismos e parâmetros clínicos de CHC também foi analisada por regressão logística binária. O modelo incluiu a classificação BCLC (referência: 0, A), alfafetoproteína (referência: <500 ng / mL), hepatite B (referência: ausência), vírus da hepatite C (referência: ausência), diabetes (referência: ausência) e os polimorfismos (referência: genótipo selvagem).

O modelo de regressão logística binária ajustado para idade, sexo, tabaco e consumo de álcool também foi utilizado para avaliar a associação entre os polimorfismos e o risco de cirrose e CHC usando o programa SNPStats (disponível em: [http://bioinfo.iconcologia.net/SNPstats\\_web](http://bioinfo.iconcologia.net/SNPstats_web)). O efeito dos polimorfismos foi investigado utilizando os seguintes modelos: (1) codominante (heterozigoto *versus* homozigoto selvagem e homozigoto polimórfico *versus* homozigoto selvagem), (2) dominante (heterozigoto e homozigoto polimórfico *versus* homozigoto selvagem), (3) recessivo (homozigoto polimórfico *versus* homozigoto selvagem mais heterozigoto), (4) overdominante (heterozigoto *versus* homozigoto selvagem e homozigoto polimórfico) e

(5) log-aditivo (homozigoto polimórfico com peso 2 e heterozigoto *versus* homozigotos selvagem). A análise de haplótipos foi realizada utilizando o programa Haploview, versão 5.0, por meio do teste Qui-quadrado. A sobrevida foi analisada utilizando a curva de Kaplan Meier e o teste Log-rank. Os resultados foram apresentados como *odds ratios* (ORs) e intervalo de confiança de 95% (IC95%). Os resultados com valor de P <0,05 foram considerados estatisticamente significantes.

### **3. RESULTADOS**

### 3. Resultados

Os resultados estão apresentados abaixo e no artigo científico a ser submetido à revista *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention* (Anexo 2).

O efeito de variáveis clínicas no risco para CHC e cirrose foi analisado por regressão logística binária (Tabela 1 e 2). A idade  $\geq 60$  anos (mediana da idade de pacientes com CHC) foi associada à doença (OR = 12,22; IC95%: 7,17-20,82;  $p < 0,001$ ). A análise dos pacientes com cirrose mostrou que a idade  $\geq 57$  anos (mediana da idade de pacientes com cirrose) está associada ao risco para a doença (OR = 7,12; IC95%: 4,68-10,84;  $p < 0,001$ ). Hepatite B (OR = 7,84; IC 95%: 1,86-33,08;  $p = 0,005$ ) e alfa fetoproteína  $> 500$  ng / mL (OR = 3,73; IC 95%: 1,25-11,13;  $p = 0,018$ ) foram associadas com risco para CHC.

No grupo CHC a análise do equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) mostrou que as frequências dos genótipos dos polimorfismos *CYP1A1* \*2A, *CYP2E1* \*5B e *CYP2E1* \*6 foram semelhantes às esperadas ( $\chi^2 = 0,6314$ ,  $p = 0,4268$ ;  $\chi^2 = 0,2296$ ,  $p = 0,6318$ ;  $\chi^2 = 2,3233$ ,  $p = 0,1275$ , respectivamente). O polimorfismo *CYP1A1* \*2C apresentou desequilíbrio em pacientes com CHC ( $\chi^2 = 4,0849$ ,  $p = 0,0433$ ). Em pacientes com cirrose, todos os polimorfismos se apresentaram em EHW (*CYP1A1* \* 2A:  $\chi^2 = 0,0032$   $p = 0,9549$ ; *CYP1A1* \* 2C:  $\chi^2 = 0,0049$ ,  $p = 0,9444$ ; *CYP2E1* \* 5B:  $\chi^2 = 0,50377$ ,  $p = 0,4779$ ; *CYP2E1* \*6:  $\chi^2 = 1,3251$ ,  $p = 0,2497$ ).

No grupo controle, os polimorfismos *CYP1A1* \*2A e *CYP1A1* \*2C apresentaram desequilíbrio ( $\chi^2 = 6,0324$ ,  $p = 0,0140$ ;  $\chi^2 = 8,5536$ ,  $p = 0,0034$ , respectivamente). As frequências dos genótipos *CYP2E1* \*5B e *CYP2E1* \*6 apresentaram-se em equilíbrio nos indivíduos controles ( $\chi^2 = 2,3236$ ,  $p = 0,1274$ ;  $\chi^2 = 0,1250$ ,  $p = 0,7237$ , respectivamente).

As tabelas 3 e 4 mostram a análise da associação dos polimorfismos *CYP1A1* \*2A, *CYP1A1* \*2C e *CYP2E1* \*6 e CHC ou cirrose, ajustados para gênero, idade, tabagismo e consumo de álcool, de acordo com os modelos de herança. Não foi detectado genótipo homozigoto polimórfico para o polimorfismo *CYP2E1*\*5B, portanto não foi possível fazer análise estatística de acordo com os modelos genéticos. Neste caso, portanto, a regressão logística foi realizada entre os genótipos homozigoto selvagem (referência) e heterozigoto (CHC: OR 0,63 IC 0,28–1,43, P=0,26; Cirrose: OR 0,80 IC 0,43-1,47, P=0,46). Os polimorfismos *CYP1A1* \* 2A, *CYP1A1* \* 2C, *CYP2E1* \* 5B e *CYP2E1* \* 6 não foram associados com aumento do risco de desenvolvimento de CHC (p> 0,05). Os polimorfismos também não foram associados com risco para cirrose (p> 0,05).

**Tabela 1.** Relação entre fatores de risco e o carcinoma hepatocelular.

<b>Variáveis</b>	<b>Controles n (%)</b>	<b>CHC n (%)</b>	<b>OR+ (95% IC)</b>	<b>P</b>
<b>Idade</b>				
<60 anos	432 (89)	41 (42)	12,22(7,17-20,82)	<b>&lt;0,001</b>
≥60 anos	56 (11)	56( 58)		
<b>Gênero</b>				
Feminino	137 (28)	27 (28)	1,01(0,54-1,89)	0,98
Masculino	351 (72)	70 (72)		
<b>Álcool</b>				
Não	239 (49)	38 (39)	1,68(0,95-2,98)	0,08
Sim	249 (51)	59 (61)		
<b>Tabaco</b>				
Não	293 (60)	43 (44)	1,65(0,98-2,79)	0,06
Sim	195 (40)	54 (56)		

+ Odds Ratio (OR) ajustado para idade, gênero, consumo de álcool e tabaco e polimorfismos. CHC: carcinoma hepatocelular. IC: intervalo de confiança.

**Tabela 2.** Relação entre fatores de risco e cirrose hepática.

<b>Variáveis</b>	<b>Controles n (%)</b>	<b>Cirrose n (%)</b>	<b>OR+ (95% IC)</b>	<b>P</b>
<b>Idade</b>				
<57 anos	420 (86)	79 (49)	7,12(4,68-10,84)	<b>&lt; 0,001</b>
≥57 anos	68 (14)	81 (51)		
<b>Gênero</b>				
Feminino	137 (28)	41 (26)	1,43(0,88-2,33)	0,15
Masculino	351 (72)	119 (74)		
<b>Álcool</b>				
Não	239 (49)	72 (45)	1,27(0,82-1,96)	0,28
Sim	249 (51)	88 (55)		
<b>Tabaco</b>				
Não	293 (60)	98 (61)	0,71(0,47-1,09)	0,12
Sim	195 (40)	62 (39)		

+ Odds Ratio (OR) ajustado para idade, gênero, consumo de álcool e tabaco e polimorfismos. IC: intervalo de confiança.

**Tabela 3.** Associação dos polimorfismos *CYP1A1* \* 2A, *CYP1A1* \*2C e *CYP2E1* \* 6 com carcinoma hepatocelular.

	Genótipo	Controle n(%)	CHC n (%)	OR(95%IC)	P
<b><i>CYP1A1</i>*2C</b>					
Codominante	T/T	384(78,7)	84(86,6)	1,00	0,16
	T/C	90(18,4)	11(11,3)	0,52(0,25-1,10)	
	C/C	14 (2,9)	2(2,1)	0,50(0,10-2,64)	
Dominante	T/T	384(78,7)	84(86,6)	1,00	0,54
	T/C- C/C	104(21,3)	13(13,4)	0,52(0,26-1,04)	
Recessivo	T/T-T/C	474(97,1)	95(97,9)	1,00	0,46
	C/C	14(2,9)	2(2,1)	0,55(0,11-2,89)	
Overdominante	T/T-C/C	398(81,6)	86(88,7)	1,00	0,08
	T/C	90(18,4)	11(11,3)	0,53(0,25-1,12)	
Log-aditivo	-----	-----	-----	0,59 (0,33-1,06)	0,59
<b><i>CYP1A1</i>*2A</b>					
Codominante	T/T	306(62,7)	64(66)	1,00	0,25
	T/C	149(30,5)	31(32)	1,24(0,73-2,13)	
	C/C	33 (6,8)	2(2)	0,38(0,08-1,84)	
Dominante	T/T	306(62,7)	64(66)	1,00	0,72
	T/C- C/C	182(37,3)	33(34)	1,10(0,65-1,85)	
Recessivo	T/T-T/C	455(93,2)	95(97,9)	1,00	0,15
	C/C	33(6,8)	2(2,1)	0,36(0,08-1,69)	
Overdominante	T/T-C/C	339(69,5)	66(68)	1,00	0,32
	T/C	149(30,5)	31(32)	1,33(0,77-2,24)	
Log-aditivo	-----	-----	-----	0,95 (0,62-1,47)	0,83
<b><i>CYP2E1</i>*6</b>					
Codominante	T/T	387 (79,3)	71 (73,2)	1,00	0,66
	T/A	96 (19,7)	26 (26,8)	1,07 (0,60-1,92)	
	A/A	5 (1)	0 (0)	---	
Dominante	T/T	387 (79,3)	71 (73,2)	1,00	0,88
	T/A-A/A	101 (20,7)	26 (26,8)	1,05 (0,59-1,86)	
Recessivo	T/T-T/A	483 (99)	97 (100)	1,00	0,38
	A/A	5 (1)	0 (0)	----	
Overdominante	T/T-A/A	392 (80,3)	71 (73,2)	1,00	0,79
	T/A	96 (19,7)	26 (26,8)	1,08 (0,60-1,93)	
Log-aditivo	-----	-----	-----	1,01 (0,58-1,77)	0,97

+ Odds Ratio (OR) ajustado para idade, gênero, consumo de álcool e hábito tabagista. CHC: carcinoma hepatocelular. IC: intervalo de confiança.



**Tabela 4.** Associação dos polimorfismos *CYP1A1\*2A*, *CYP1A1 \* 2C* e *CYP2E1 \* 6* com cirrose hepática.

	Genótipo	Controle n(%)	Cirrose n(%)	OR (95%IC)	P
<b><i>CYP1A1*2C</i></b>					
Codominante	T/T	384(78,7)	127(79,4)	1,00	0,51
	T/C	90(18,4)	31(19,4)	0,98(0,60-1,62)	
	C/C	14 (2,9)	2(1,2)	0,43(0,09-2,03)	
Dominante	T/T	384(78,7)	127(79,4)	1,00	0,69
	T/C- C/C	104(21,3)	33(20,6)	0,91(0,56-1,47)	
Recessivo	T/T-T/C	474(97,1)	158(98)	1,00	0,24
	C/C	14(2,9)	2(2)	0,43(0,09-2,03)	
Overdominante	T/T-C/C	398(81,6)	129(80,6)	1,00	0,98
	T/C	90(18,4)	31(19,4)	1,01(0,61-1,66)	
Log-aditivo	-----	-----	-----	0,86 (0,57-1,31)	0,49
<b><i>CYP1A1*2A</i></b>					
Codominante	T/T	306(62,7)	97(60,6)	1,00	0,5
	T/C	149(30,5)	55(34,4)	1,25(0,82-1,90)	
	C/C	33 (6,8)	8(5)	0,85(0,36-2,01)	
Dominante	T/T	306(62,7)	97(60,6)	1,00	0,43
	T/C- C/C	182(37,3)	63(39,4)	1,18(0,79-1,75)	
Recessivo	T/T-T/C	455(93,2)	152(95)	1,00	0,57
	C/C	33(6,8)	8(5)	0,79(0,34-1,84)	
Overdominante	T/T-C/C	339(69,5)	105(65,6)	1,00	0,26
	T/C	149(30,5)	55(34,4)	1,27(0,84-1,91)	
Log-aditivo	-----	-----	-----	1,07 (0,78-1,47)	0,68
<b><i>CYP2E1*6</i></b>					
Codominante	T/T	387 (79,3)	120 (75)	1,00	0,59
	T/A	96 (19,7)	39 (24,4)	1,28 (0,80-2,03)	
	A/A	5 (1)	1 (0,6)	1,16 (0,13-10,13)	
Dominante	T/T	387 (79,3)	120 (75)	1,00	0,31
	T/A-A/A	101 (20,7)	40 (25)	1,27 (0,80-2,01)	
Recessivo	T/T-T/A	483 (99)	159 (99,4)	1,00	0,93
	A/A	5 (1)	1 (0,6)	1,10 (0,13-9,58)	
Overdominante	T/T-A/A	392 (80,3)	121 (75,6)	1,00	0,31
	T/A	96 (19,7)	39 (24,4)	1,27 (0,80-2,02)	
Log-aditivo	-----	-----	-----	1,24 (0,81-1,91)	0,33

+ Odds Ratio (OR) ajustado para idade, gênero, consumo de álcool e hábito tabagista. IC: intervalo de confiança.

As análises de haplótipos foram realizadas para avaliar o efeito combinado dos polimorfismos sobre o desenvolvimento de CHC e cirrose. No grupo CHC os polimorfismos *CYP1A1 \*2A* e *CYP1A1 \*2C* apresentam-se em forte desequilíbrio de ligação (logaritmo de probabilidades (LOD) = 42,27, D de Lewontin (D') = 0,788). Os

haplótipos *CYP1A1* não foram associados com CHC ( $P > 0,05$ ). No grupo de cirrose, os polimorfismos *CYP1A1* também se encontram em desequilíbrio de ligação (logaritmo de probabilidades (LOD) = 27,23, D de Lewontin ( $D' = 0,503$ )). Os haplótipos *CYP1A1* também não foram associados com cirrose ( $P > 0,05$ ).

Os polimorfismos *CYP2E1* \*5B e *CYP2E1* \*6 também apresentam-se em forte desequilíbrio de ligação no grupo de pacientes com CHC (logaritmo de probabilidades (LOD) = 10,11, D de Lewontin ( $D' = 0,45$ )) e com cirrose (logaritmo de probabilidades (LOD) = 13,43, D de Lewontin ( $D' = 0,491$ )). Os haplótipos *CYP2E1* não foram associados com CHC ou cirrose ( $P > 0,05$ ).

A interação entre os polimorfismos e variáveis de risco para CHC e cirrose foi avaliada por regressão logística binária. Não houve interação entre os polimorfismos *CYP1A1* \*2A, *CYP1A1* \*2C, *CYP2E1* \*5B e *CYP2E1* \*6 e o consumo de tabaco ou álcool para o risco de CHC e cirrose (Tabelas 5 e 6).

**Tabela 5.** Interação entre os polimorfismos *CYP1A1* \*2A, *CYP1A1* \*2C, *CYP2E1* \*5B e *CYP2E1* \*6 e o consumo de tabaco ou álcool no risco para CHC.

	Consumo de Tabaco						<i>P</i>
	Não			Sim			
	CHC	Controle	OR <sup>+</sup> (95% IC)	CHC	Controle	OR <sup>+</sup> (95% IC)	
<b><i>CYP1A1</i>*2<sup>a</sup></b>							
T/T	29	189	1,00	35	117	1,78 (0,94-3,39)	0,63
T/C-C/C	14	104	1,26 (0,59-2,67)	19	78	1,74 (0,84-3,62)	
<b><i>CYP1A1</i>*2C</b>							
T/T	38	231	1,00	46	153	1,64(0,94-2,87)	0,85
T/C-C/C	5	62	0,48 (0,17-1,37)	8	42	0,90 (0,35-2,32)	
<b><i>CYP2E1</i>*5B</b>							
G/G	38	258	1,00	50	167	1,77 (1,03-3,06)	0,34
G/C	5	35	0,94 (0,31-2,84)	4	28	0,75 (0,22-2,56)	
<b><i>CYP2E1</i>*6</b>							
T/T	30	232	1,00	41	155	1,88 (1,04-3,40)	0,34
T/A-A/A	13	61	1,38 (0,62-3,05)	13	40	1,47 (0,63-3,48)	
	Consumo de Álcool						
	Não			Sim			<i>P</i>
	CHC	Controle	OR <sup>+</sup> (95% IC)	CHC	Controle	OR <sup>+</sup> (95% IC)	
<b><i>CYP1A1</i>*2<sup>a</sup></b>							
T/T	25	153	1,00	51	202	1,57 (0,86-2,89)	0,63
T/C-C/C	13	86	0,43 (0,15-1,24)	8	47	0,95 (0,36-2,52)	
<b><i>CYP1A1</i>*2C</b>							
T/T	153	25	1,00	39	153	1,78 (0,89-3,54)	0,80
T/C-C/C	86	13	1,19 (0,53-2,68)	20	96	1,78 (0,89-3,54)	
<b><i>CYP2E1</i>*5B</b>							
G/G	35	210	1,00	53	215	1,71 (0,95-3,07)	0,98
G/C	3	29	0,64 (0,17-2,48)	6	34	1,07 (0,36-3,17)	
<b><i>CYP2E1</i>*6</b>							
T/T	29	189	1,00	42	198	1,68 (0,89-3,15)	0,97
T/A-A/A	9	50	1,03 (0,42-2,56)	17	51	1,77 (0,78-3,98)	

+ Odds Ratio (OR) ajustado para idade, gênero e consumo de álcool e hábito tabagista. CHC: carcinoma hepatocelular. IC: intervalo de confiança.

**Tabela 6.** Interação entre os polimorfismos *CYP1A1* \*2A, *CYP1A1* \*2C, *CYP2E1* \*5B e *CYP2E1* \*6 e o consumo de tabaco ou álcool no risco para cirrose hepática.

	<b>Consumo de Tabaco</b>						<i>P</i>
	Não			Sim			
	Cirrose	Controle	OR <sup>+</sup> (95% IC)	Cirrose	Controle	OR <sup>+</sup> (95% IC)	
<b>CYP1A1*2A</b>							
T/T	57	189	1,00	40	117	0,82 (0,49-1,39)	0,41
T/C-C/C	41	104	1,34 (0,81-2,22)	22	78	0,78 (0,42-1,45)	
<b>CYP1A1*2C</b>							
T/T	72	231	1,00	55	153	0,83 (0,53-1,32)	0,12
T/C-C/C	26	62	1,18 (0,66-2,09)	7	42	0,42 (0,17-1,05)	
<b>CYP2E1*5B</b>							
G/G	86	258	1,00	57	167	0,77 (0,50-1,20)	0,31
G/C	12	35	1,01 (0,48-2,16)	5	28	0,40 (0,14-1,17)	
<b>CYP2E1*6</b>							
T/T	74	232	1,00	46	155	0,72 (0,45-1,15)	0,95
T/A-A/A	24	61	1,26 (0,70-2,26)	16	40	0,92 (0,45-1,89)	
	<b>Consumo de Álcool</b>						<i>P</i>
	Não			Sim			
	Cirrose	Controle	OR+ (95% IC)	Cirrose	Controle	OR+ (95% IC)	
<b>CYP1A1*2A</b>							
T/T	43	153	1,00	54	153	1,41 (0,82-2,42)	0,57
T/C-C/C	29	86	1,33 (0,74-2,41)	34	96	1,49 (0,82-2,71)	
<b>CYP1A1*2C</b>							
T/T	55	182	1,00	72	202	1,23 (0,76-1,98)	0,70
T/C-C/C	17	57	0,83 (0,42-1,63)	16	47	1,23 (0,60-2,52)	
<b>CYP2E1*5B</b>							
G/G	65	210	1,00	78	215	1,26 (0,80-1,98)	0,77
G/C	7	29	0,72 (0,28-1,84)	10	34	1,09 (0,47-2,54)	
<b>CYP2E1*6</b>							
T/T	59	189	1,00	61	198	1,06 (0,66-1,72)	0,083
T/A-A/A	13	50	0,79 (0,38-1,64)	27	51	1,91 (1,01-3,58)	

+ Odds Ratio (OR) ajustado para idade, gênero, consumo de álcool e hábito tabagista. IC: intervalo de confiança.

Nenhuma associação foi evidenciada na análise dos polimorfismos e parâmetros clínicos de CHC, de acordo com os critérios BCLC (Tabela 7).

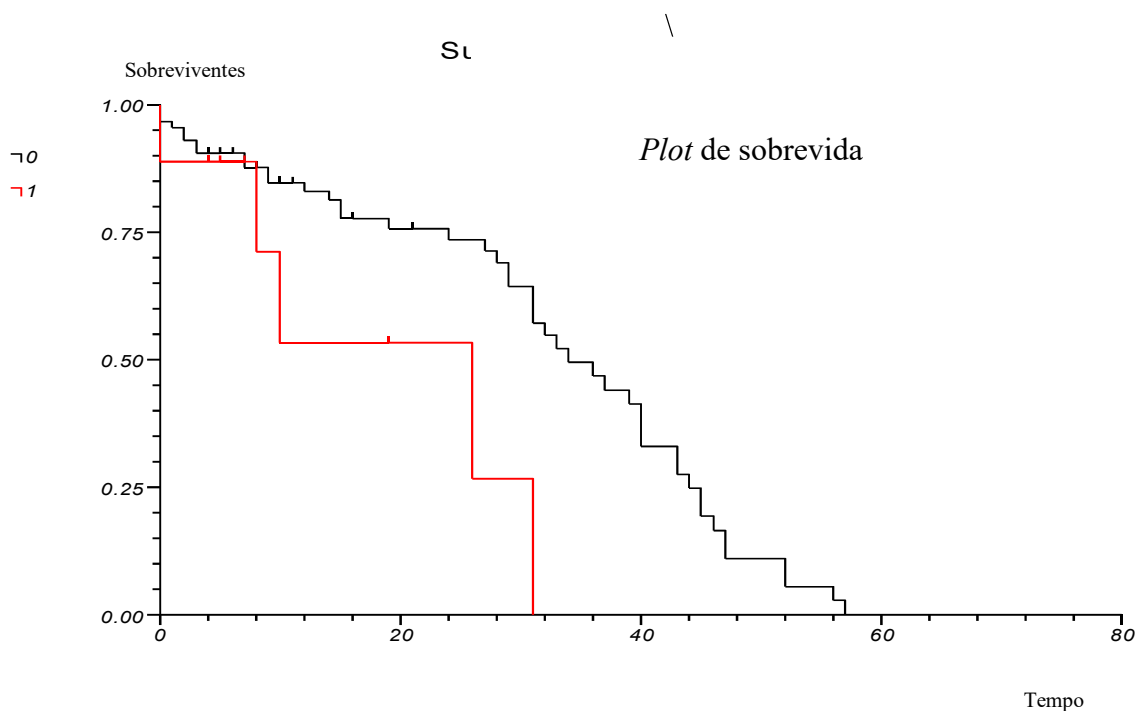
**Tabela 7.** Associação dos polimorfismos *CYP1A1 \* 2A*, *CYP1A1 \* 2C*, *CYP2E1 \* 5B* e *CYP2E1 \* 6* com o estadiamento tumoral, de acordo com os critérios BCLC.

<b>Polimorfismos</b>	<b>Estádios 0 e A Pacientes N (%)</b>	<b>Estádios B, C e D Pacientes N (%)</b>	<b>OR (95% IC) +</b>	<b>P</b>
<b><i>CYP1A1*2C</i></b>				
TT	44 (83)	40 (90,9)	Referência	0,38
TC/CC	09 (17)	4 (9)	0,45 (0,08-2,67)	
<b><i>CYP1A1*2A</i></b>				
TT	33 (62,2)	31 (70,4)	Referência	0,56
TC/CC	20 (37,8)	13 (29,5)	0,70 (0,21-2,35)	
<b><i>CYP2E1*5B</i></b>				
GG	48 (90,5)	40(90,9)	Referência	0,52
GC/CC	5 (9,5)	4 (9)	1,86 (0,29-12,19)	
<b><i>CYP2E1*6</i></b>				
T/T	35 (66)	36 (82)	Referência	0,09
TA/AA	18 (34)	8 (18)	0,30 (0,07-1,20)	

+ Odds Ratio (OR) ajustado para alfa-fetoproteína, hepatite B e C, diabetes e óbitos. IC: intervalo de confiança.

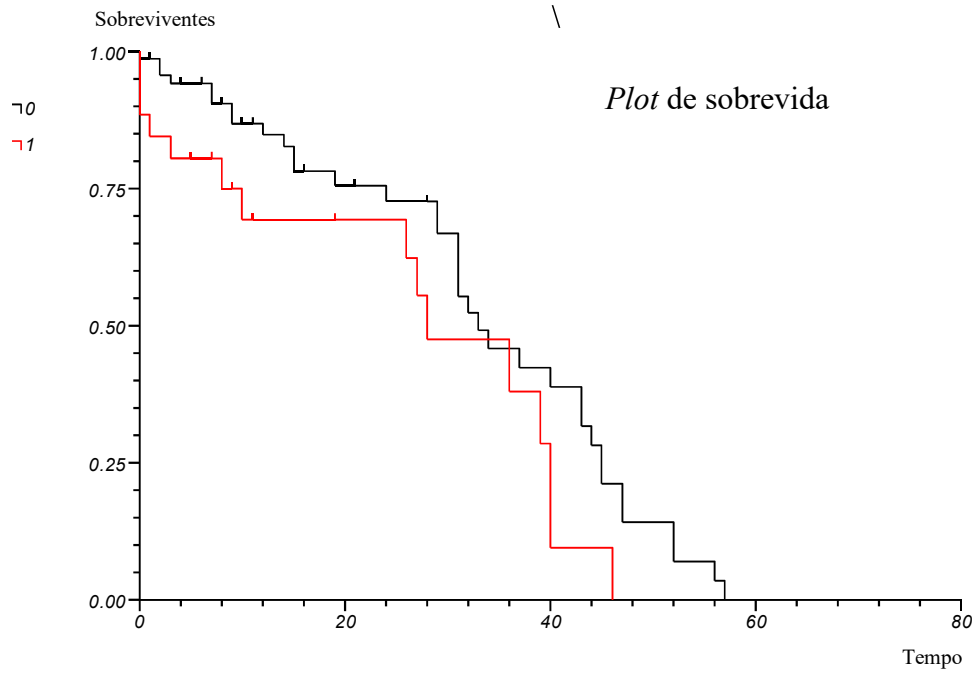
A curva de sobrevida de Kaplan-Meier mostrou que os polimorfismos *CYP2E1* \*5B e *CYP2E1* \*6 estão associados com redução da sobrevida global em pacientes com CHC. Em 12 meses, 47% dos pacientes com CHC portadores de alelo polimórfico *CYP2E1* \*5B morreram, em comparação a 16% dos pacientes com CHC portadores de alelo de tipo selvagem (Log-rank  $p = 0,02$ ) (Figura 5). Em relação ao polimorfismo *CYP2E1* \*6, a sobrevida global foi de 69% para pacientes com CHC portadores de alelo polimórfico e 84% para portadores de alelo do tipo selvagem (Log-rank  $p = 0,04$ ) (Figura 5).

### Estimativa de Sobrevida



**Figura 5.** Sobrevida global para pacientes com CHC portadores de alelo polimórfico 5B (linha vermelha) e pacientes com CHC portadores de alelo de tipo selvagem (linha preta) para o polimorfismo *CYP2E1* \*5B. Alelo polimórfico associado com redução da sobrevida global. Log-rank  $p = 0,02$ .

## Estimativa de Sobrevida



**Figura 6.** Sobrevida global para pacientes com CHC portadores de alelo polimórfico 6 (linha vermelha) e pacientes com CHC portadores de alelo de tipo selvagem (linha preta) para o polimorfismo *CYP2E1* \*6. Alelo polimórfico associado com redução da sobrevida global. Log-rank  $p = 0.04$ .

## **4. DISCUSSÃO**



#### 4. Discussão

O presente estudo mostrou que a idade  $\geq 57$  anos é um fator de risco para o desenvolvimento de cirrose e que indivíduos com  $\geq 60$  anos são mais suscetíveis ao desenvolvimento de CHC. A idade avançada tem sido frequentemente associada com cirrose e o desenvolvimento de CHC <sup>(40)</sup>, corroborando com os estudos de Thiele e colaboradores, no qual mostrou que a média de idade de 50 anos é um fator de risco associado ao CHC. Nossos dados também corroboraram com o estudo de Laura Silvestri e colaboradores com pacientes italianos. <sup>(41, 42)</sup> Este fato pode ser atribuído a outros fatores relacionados à idade mais avançada e que são fatores de risco para o câncer, como a obesidade e diabetes tipo 2, e pelo fato de que em idades mais tardias há alterações do fígado, como a cirrose, principal fator de risco para o CHC. <sup>(4)</sup>

O tabaco não foi associado ao desenvolvimento de CHC de acordo com os resultados na presente casuística. Outros estudos em CHC observaram associação do tabaco com o desenvolvimento da doença. <sup>(43)</sup> Além do câncer de fígado, Zhao e colaboradores observaram associação entre o consumo de tabaco e o desenvolvimento de câncer de pulmão, esôfago e estômago. <sup>(44, 45)</sup>

Apesar de ser comprovado por vários estudos que o consumo de álcool pode levar ao desenvolvimento de cirrose e conseqüentemente CHC, este estudo não confirmou esta associação. Isso pode ser resultado do elevado número de consumidores de álcool no grupo controle, que representaram 53% dos indivíduos incluídos neste estudo. Por outro lado, Li e colaboradores encontraram associação do álcool com o CHC. <sup>(42)</sup> Silvestri e colaboradores também afirmam que o abuso de consumo de álcool pode levar ao CHC. <sup>(40)</sup>

Setenta e dois por cento dos pacientes deste estudo são do gênero masculino. O fato dos homens apresentarem mais chance de desenvolver cirrose e CHC tem sido

descrito na literatura. Entretanto, o presente estudo não associou o gênero ao desenvolvimento de CHC ou cirrose. Corroborando com nosso resultado, Abo-Hashem e colaboradores não encontraram associação entre o gênero masculino e o risco de CHC em população egípcia.<sup>(46)</sup> Sameer e colaboradores também não associaram o gênero masculino ao desenvolvimento de CHC.<sup>(47)</sup> Lukanova e colaboradores não observaram associação entre os níveis de testosterona totais e o desenvolvimento de CHC em pacientes de países como Dinamarca, França, Alemanha, Grécia, Itália, Países Baixos, Noruega, Espanha, Suécia e Reino Unido.<sup>(48)</sup> Esse resultado também foi observado no estudo de Korah e colaboradores na população egípcia.<sup>(49)</sup> Estes dados sugerem que outros fatores, como dieta, estilo de vida, uso de substâncias tóxicas e hepatite podem estar relacionados ao aumento do risco de CHC em homens.

Nossos resultados mostraram associação entre hepatite B e alfa fetoproteína > 500 ng / mL com CHC. O vírus da hepatite B crônica (VHB) afeta centenas de milhões de pessoas em todo o mundo e suas complicações incluem o CHC e morte por insuficiência hepática, sendo assim alvo de estudos de vários pesquisadores.<sup>(40)</sup> A infecção pelo VHB é um fator de risco estabelecido para CHC.<sup>(50, 51)</sup> A presença de VHB leva à fibrose e formação de nódulos ao longo do tempo devido à lesão crônica.<sup>(52)</sup> Em relação à alfa fetoproteína, este resultado foi esperado, pois níveis elevados deste marcador são indicativos de câncer de fígado. Os níveis de alfa fetoproteína são usados para classificar pacientes em estádios avançados de acordo com o BCLC, relacionados com pior prognóstico e menor sobrevida.<sup>(52)</sup> Portanto, a concentração de alfa fetoproteína foi incluída nas variáveis avaliadas neste estudo para o ajuste da análise de regressão logística.

Estudos recentes demonstraram que polimorfismos dos genes *CYP450* causam alterações na atividade enzimas responsáveis pela desintoxicação de compostos xenobióticos no fígado.<sup>(46, 47)</sup> O citocromo P-450 (CYP) é uma superfamília de monoxigenase responsável por reações enzimáticas de fase I, preparando substratos para reações de conjugação de fase II, mas também podem levar à ativação metabólica de compostos tóxicos ou cancerígenos. As glutathione S-transferases (GSTs) são enzimas de fase II que eliminam os radicais livres presentes no tabaco, produtos de estresse oxidativo e hidrocarbonetos aromáticos policíclicos. A sulfotransferase (SULT) catalisa a conjugação de sulfonato para transformar os pro carcinógenos em metabolitos, que são facilmente eliminados do organismo. Os polimorfismos nesses genes, sua combinação e interação com fatores ambientais têm potencial para levar a uma maior susceptibilidade ao CHC.<sup>(31)</sup>

Os polimorfismos *CYP1A1* \*2A, *CYP1A1* \*2C, *CYP2E1* \*5B e *CYP2E1* \*6 não foram associados com o aumento do risco para CHC ou cirrose neste estudo. Abo-Hashem e colaboradores em seu estudo também não associaram *CYP1A1* com o desenvolvimento de CHC.<sup>(46)</sup> Segundo estudo de Boccia e colaboradores também não foi encontrada associação do polimorfismo *CYP1A1* com a influência significativa na susceptibilidade ao CHC.<sup>(31)</sup> Em um estudo de Saeed e colaboradores em população Saudita, a frequência do alelo *CYP1A1* \* 2A foi de 22,3% e 6,05% nos controles, e a distribuição do genótipo *CYP1A1*\*2A refletiu um aumento estatisticamente significativo do risco de câncer colorretal (CCR).<sup>(53)</sup>

Neste estudo não foi encontrada associação do polimorfismo *CYP1A1* \*2C com o risco de CHC e interação entre tabaco e álcool também não foi observada. Por outro lado, Li e colaboradores mostram as interações entre os polimorfismos de genes

metabolizadores xenobióticos e tabagismo e seus efeitos no risco de doenças orais potencialmente malignas (DOPM) e leucoplasia. <sup>(45)</sup>

Em nosso estudo, as análises de haplótipos mostraram que os polimorfismos *CYP1A1* \* 2A e *CYP1A1* \* 2C apresentam-se em forte desequilíbrio de ligação. Entretanto, os haplótipos *CYP1A1* não foram associados ao CHC e cirrose. No estudo de Maurya e colaboradores, a análise de haplótipos foi utilizada para explorar o efeito da interação entre dois SNPs dos genes *CYP1A1* e *CYP2E1* e o risco de desenvolver carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço (CECP). Observou-se um aumento significativo no risco quando a frequência do haplótipo C-A constituído de alelos polimórficos de *CYP1A1* \* 2A e alelos de tipo selvagem de *CYP1A1* \* 2C nos casos comparado com os controles. A frequência do haplótipo T-G, com alelos de tipo selvagem de *CYP1A1* \* 2A e alelos polimórficos de *CYP1A1* \* 2C foi maior no grupo caso, embora a diferença não tenha sido estatisticamente significativa. Observou-se diferença significativa na distribuição dos haplótipos C-G de ambos os polimorfismos *CYP1A1* \* 2A e *CYP1A1* \* 2C entre controles (3,8%) e casos (7,2%), resultando em aumento estatisticamente significativo no risco. Nesse mesmo estudo foi observado que portadores de haplótipos com alelos polimórficos de *CYP1A1* \*2A e \*2C ou *CYP2E1* \*5B e \* 6 apresentam risco significativo de desenvolver câncer de cabeça e pescoço. <sup>(54)</sup>

Nosso estudo também não associou as variantes do gene *CYP2E1* com o risco de desenvolver cirrose e CHC. No estudo de Boccia e colaboradores, o polimorfismo *CYP2E1* \* 5B foi menos frequente nos casos em relação aos controles. Da mesma forma, a frequência do alelo variante do polimorfismo *CYP2E1* \* 6 também foi menos frequente nos casos em relação aos controles. O estudo concluiu que os polimorfismos *CYP2E1* \* 5B e *CYP2E1* \* 6 estão associados com redução do risco para o

desenvolvimento de CHC.<sup>(31)</sup> Sameer e colaboradores em um estudo de pacientes com câncer colorretal (CCR) confirmaram a associação entre o polimorfismo *CYP2E1* e o risco para esse tipo tumoral.<sup>(47)</sup> Em estudo de Wideroff e colaboradores, também com pacientes com CCR, a frequência do alelo *CYP2E1* \* 6 foi de 24,46% em pacientes com CCR e 35,44 % nos controles saudáveis. Os resultados não foram estatisticamente significativos para o risco de desenvolvimento de CCR.<sup>(55)</sup>

A expressão elevada de *CYP2E1* foi descrita no fígado de pacientes com hepatite C crônica com fibrose leve.<sup>(51)</sup> Assim, estes dados apresentam evidências de que o VHC pode induzir diretamente a expressão de *CYP2E1*, que por sua vez contribui para o estresse oxidativo, implicando no desenvolvimento de inflamação e fibrose hepática, enquanto os inibidores farmacológicos destas enzimas têm sido associados à morte de hepatócitos e diminuição da progressão da fibrose.<sup>(56)</sup> O gene *CYP2E1* também pode contribuir para a progressão da doença hepática em pacientes com VHC com consumo intenso de álcool.<sup>(51)</sup> O mesmo resultado foi observado no estudo de Noh e colaboradores em estudo com modelos animais.<sup>(56)</sup>

Neste estudo, apesar de não haver associação entre o polimorfismo do gene *CYP2E1* e o risco de CHC, a análise de Kaplan-Meier mostrou que os polimorfismos *CYP2E1* \*5B e *CYP2E1* \*6 estão associados com sobrevida global reduzida em pacientes com CHC. Em 12 meses, a taxa de sobrevida dos pacientes com CHC portadores do alelo polimórfico *CYP2E1* \*5B foi de 53%, em comparação a 84% dos pacientes com CHC portadores do alelo do tipo selvagem. Em relação ao polimorfismo *CYP2E1* \*6, a sobrevida global foi de 69% para pacientes com CHC portadores do alelo

polimórfico e 84% para portadores do alelo do tipo selvagem. Segundo nosso conhecimento este foi o primeiro estudo que avaliou a influência de *CYP2E1* \*5B e *CYP2E1* \*6 na sobrevida de pacientes com CHC.

Estudos de associação de polimorfismos em genes candidatos que estão relacionados ao desenvolvimento tumoral são importantes para identificar variações genéticas que podem exercer um efeito no risco para a doença. Os resultados desse estudo contribui para o aumento da compreensão dos fatores envolvidos da tumorigênese do fígado e fornece dados importantes que podem ser utilizados em estudos funcionais para o entendimento da influência desses polimorfismos na sobrevida dos pacientes com CHC.

## **5. CONCLUSÕES**

## 5. Conclusões

1. Idade igual ou superior a 60 anos é um fator de risco para o desenvolvimento de CHC. Indivíduos com idade igual ou superior a 57 anos são mais suscetíveis ao desenvolvimento de cirrose.
2. Os polimorfismos *CYP1A1\*2A* (rs 4646903), *CYP1A1\*2C* (rs1048943), *CYP2E1\*5B* (rs 2031920), *CYP2E1\*6* (rs 6413432) não estão associados com o risco para o desenvolvimento de cirrose ou CHC.
3. Os polimorfismos estudados não estão associados com os parâmetros clínicos dos tumores de fígado.
4. Não há interação dos polimorfismos analisados com tabagismo e etilismo no risco para cirrose e CHC.
5. A presença dos alelos polimórficos *CYP2E1\*5B* (rs 2031920) e *CYP2E1\*6* estão associados com redução da sobrevida de pacientes com CHC.



## **6.REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFIAS**

## **6. Referências Bibliográficas**

1. Garcia M, Jemal A, Ward E, Center M, Hao Y, Siegel R, et al. Global Cancer Facts & Figures 2007. American Cancer Society. 2007:59.
2. ORGANIZATION WH. WORLD CANCER REPORT. IARC Press, International Agency for Research on Cancer, 150 cours Albert Thomas, F-69372 Lyon, France. 2003.
3. D'Ambrosio R, Della Corte C, Colombo M. Hepatocellular Carcinoma in Patients with a Sustained Response to Anti-Hepatitis C Therapy. International journal of molecular sciences. 2015;16(8):19698-712.
4. Tunissiolli NM, Castanhole-Nunes MMU, Biselli-Chicote PM, Pavarino EC, da Silva RF, da Silva RC, et al. Hepatocellular Carcinoma: a Comprehensive Review of Biomarkers, Clinical Aspects, and Therapy. Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP. 2017;18(4):863-72.
5. Charlton MR, Burns JM, Pedersen RA, Watt KD, Heimbach JK, Dierkhising RA. Frequency and outcomes of liver transplantation for nonalcoholic steatohepatitis in the United States. Gastroenterology. 2011;141(4):1249-53.
6. Carrilho FJ, Kikuchi L, Branco F, Goncalves CS, Mattos AA, Brazilian HCCSG. Clinical and epidemiological aspects of hepatocellular carcinoma in Brazil. Clinics. 2010;65(12):1285-90.
7. Mittal S, El-Serag HB. Epidemiology of hepatocellular carcinoma: consider the population. Journal of clinical gastroenterology. 2013;47 Suppl:S2-6.
8. Aube C, Bazeries P, Lebigot J, Cartier V, Boursier J. Liver fibrosis, cirrhosis, and cirrhosis-related nodules: Imaging diagnosis and surveillance. Diagnostic and interventional imaging. 2017;98(6):455-68.

9. Gao B, Bataller R. Alcoholic liver disease: pathogenesis and new therapeutic targets. *Gastroenterology*. 2011;141(5):1572-85.
10. Molina PE, Gardner JD, Souza-Smith FM, Whitaker AM. Alcohol abuse: critical pathophysiological processes and contribution to disease burden. *Physiology*. 2014;29(3):203-15.
11. Torres DM, Williams CD, Harrison SA. Features, diagnosis, and treatment of nonalcoholic fatty liver disease. *Clinical gastroenterology and hepatology : the official clinical practice journal of the American Gastroenterological Association*. 2012;10(8):837-58.
12. Hassan K, Bhalla V, El Regal ME, HH AK. Nonalcoholic fatty liver disease: a comprehensive review of a growing epidemic. *World journal of gastroenterology*. 2014;20(34):12082-101.
13. Su TH, Kao JH, Liu CJ. Molecular mechanism and treatment of viral hepatitis-related liver fibrosis. *International journal of molecular sciences*. 2014;15(6):10578-604.
14. Aizawa Y, Seki N, Nagano T, Abe H. Chronic hepatitis C virus infection and lipoprotein metabolism. *World journal of gastroenterology*. 2015;21(36):10299-313.
15. Zhang YQ, Guo JS. Antiviral therapies for hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma. *World journal of gastroenterology*. 2015;21(13):3860-6.
16. Hai H, Tamori A, Kawada N. Role of hepatitis B virus DNA integration in human hepatocarcinogenesis. *World journal of gastroenterology*. 2014;20(20):6236-43.

17. European Association For The Study Of The L, European Organisation For R, Treatment Of C. EASL-EORTC clinical practice guidelines: management of hepatocellular carcinoma. *Journal of hepatology*. 2012;56(4):908-43.
18. Canet MJ, Cherrington NJ. Drug disposition alterations in liver disease: extrahepatic effects in cholestasis and nonalcoholic steatohepatitis. *Expert opinion on drug metabolism & toxicology*. 2014;10(9):1209-19.
19. Amacher DE. The regulation of human hepatic drug transporter expression by activation of xenobiotic-sensing nuclear receptors. *Expert opinion on drug metabolism & toxicology*. 2016;12(12):1463-77.
20. Lacko M, Oude Ophuis MB, Peters WH, Manni JJ. Genetic polymorphisms of smoking-related carcinogen detoxifying enzymes and head and neck cancer susceptibility. *Anticancer research*. 2009;29(2):753-61.
21. Omiecinski CJ, Vanden Heuvel JP, Perdew GH, Peters JM. Xenobiotic metabolism, disposition, and regulation by receptors: from biochemical phenomenon to predictors of major toxicities. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology*. 2011;120 Suppl 1:S49-75.
22. Nebert DW, Wikvall K, Miller WL. Human cytochromes P450 in health and disease. *Philosophical transactions of the Royal Society of London Series B, Biological sciences*. 2013;368(1612):20120431.
23. Kandel SE, Lampe JN. Role of protein-protein interactions in cytochrome P450-mediated drug metabolism and toxicity. *Chemical research in toxicology*. 2014;27(9):1474-86.
24. Bag A, Jyala NS, Bag N. Cytochrome P450 1A1 genetic polymorphisms as cancer biomarkers. *Indian journal of cancer*. 2015;52(4):479-89.

25. Andrade C. Drugs that escape hepatic metabolism. *The Journal of clinical psychiatry*. 2012;73(7):e889-90.
26. Yu BW, Zhang LQ, Teng XL, Zhang Y, Zou LB, Ying HY. Association between the CYP1A1 polymorphisms and hepatocellular carcinoma: a meta-analysis. *Genetics and molecular research : GMR*. 2015;14(1):1076-84.
27. Page A, Paoli PP, Hill SJ, Howarth R, Wu R, Kweon SM, et al. Alcohol directly stimulates epigenetic modifications in hepatic stellate cells. *Journal of hepatology*. 2015;62(2):388-97.
28. Cederbaum AI. Alcohol metabolism. *Clinics in liver disease*. 2012;16(4):667-85.
29. Lu Y, Cederbaum AI. CYP2E1 potentiation of LPS and TNFalpha-induced hepatotoxicity by mechanisms involving enhanced oxidative and nitrosative stress, activation of MAP kinases, and mitochondrial dysfunction. *Genes & nutrition*. 2010;5(2):149-67.
30. Schattenberg JM, Czaja MJ. Regulation of the effects of CYP2E1-induced oxidative stress by JNK signaling. *Redox biology*. 2014;3:7-15.
31. Boccia S, Miele L, Panic N. The effect of CYP, GST, and SULT polymorphisms and their interaction with smoking on the risk of hepatocellular carcinoma. 2015;2015:179867.
32. Sutti S, Rigamonti C, Vidali M, Albano E. CYP2E1 autoantibodies in liver diseases. *Redox biology*. 2014;3:72-8.
33. Martinez-Esparza M, Tristan-Manzano M, Ruiz-Alcaraz AJ, Garcia-Penarrubia P. Inflammatory status in human hepatic cirrhosis. *World journal of gastroenterology*. 2015;21(41):11522-41.

34. Carpenter CL, Morgenstern H, London SJ. Alcoholic beverage consumption and lung cancer risk among residents of Los Angeles County. *The Journal of nutrition*. 1998;128(4):694-700.
35. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic acids research*. 1988;16(3):1215.
36. Demetrios A. Arvanitis BS, Anastasia G. Goumenou, M.D., Ioannis M. Matalliotakis, Ph.D., Eugenios E. Koumantakis, Ph.D., and Demetrios, A. Spandidos DSa. Low-penetrance genes are associated with increased susceptibility to endometriosis. *Elsevier Science Inc. DECEMBER 2001;VOL. 76 ( Inglês):1202–6*.
37. Ari Hirvonen KH-P, Sisko Anttila, Antti Karjalainen and Hani Vainio. The human CYP2E1 gene and lung cancer: DraI and RsaI restriction fragment length polymorphisms in a Finnish study population. *Carcinogenesis*. 1993;vol.14:85-8.
38. Shunji Kato PGS, Neil E. Caporaso, Robert N. Hoover, Benjamin F. Trump, Haruhiko Sugimura,, Ainsley Weston aCCH. Cytochrome P450IIE1 genetic polymorphisms, racial variation, and lung cancer risk. *Cancer research*. December 1, 1992.
39. Sam SS, Thomas V, Reddy SK, Surianarayanan G, Chandrasekaran A. CYP1A1 polymorphisms and the risk of upper aerodigestive tract cancers in an Indian population. *Head & neck*. 2008;30(12):1566-74.
40. Silvestri L, Sonzogni L, De Silvestri A, Gritti C, Foti L, Zavaglia C, et al. CYP enzyme polymorphisms and susceptibility to HCV-related chronic liver disease and liver cancer. *International journal of cancer*. 2003;104(3):310-7.

41. Thiele M, Gluud LL, Fialla AD, Dahl EK, Krag A. Large variations in risk of hepatocellular carcinoma and mortality in treatment naive hepatitis B patients: systematic review with meta-analyses. *PloS one*. 2014;9(9):e107177.
42. Li DK, Chung RT. Impact of hepatitis C virus eradication on hepatocellular carcinogenesis. *Cancer*. 2015;121(17):2874-82.
43. Shih WL, Chang HC, Liaw YF, Lin SM, Lee SD, Chen PJ, et al. Influences of tobacco and alcohol use on hepatocellular carcinoma survival. *International journal of cancer*. 2012;131(11):2612-21.
44. Zhao JK, Wu M, Kim CH, Jin ZY, Zhou JY, Han RQ, et al. Jiangsu Four Cancers Study: a large case-control study of lung, liver, stomach, and esophageal cancers in Jiangsu Province, China. *European journal of cancer prevention : the official journal of the European Cancer Prevention Organisation*. 2017;26(4):357-64.
45. Yu-Fen Li F-CS, Ming-Hsui Tsai, Chun-Hung Hua, Chiu-Shong Liu, Yao-TeHuange and Chih-Ching Yeh. Interactions between cigarette smoking and polymorphisms of xenobiotic-metabolizing genes: The risk of oral leukoplakia. *Disease Markers*. 2013;34:247–55.
46. Abo-Hashem EM, El-Emshaty WM, Farag Rel S, Zakaria S, Abd El-Aziz M, Ghonaim A. Genetic Polymorphisms of Cytochrome P4501A1 (CYP1A1) and Glutathione S-Transferase P1 (GSTP1) and Risk of Hepatocellular Carcinoma Among Chronic Hepatitis C Patients in Egypt. *Biochemical genetics*. 2016;54(5):696-713.
47. Sameer AS, Nissar S, Qadri Q, Alam S, Baba SM, Siddiqi MA. Role of CYP2E1 genotypes in susceptibility to colorectal cancer in the Kashmiri population. *Human genomics*. 2011;5(6):530-7.

48. Lukanova A, Becker S, Husing A, Schock H, Fedirko V, Trepo E, et al. Prediagnostic plasma testosterone, sex hormone-binding globulin, IGF-I and hepatocellular carcinoma: etiological factors or risk markers? *International journal of cancer*. 2014;134(1):164-73.
49. El Mahdy Korah T, Abd Elfatah Badr E, Mohamed Emara M, Ahmed Samy Kohla M, Gamal Saad Michael G. Relation between sex hormones and hepatocellular carcinoma. *Andrologia*. 2016;48(9):948-55.
50. Dongiovanni P, Romeo S, Valenti L. Hepatocellular carcinoma in nonalcoholic fatty liver: role of environmental and genetic factors. *World journal of gastroenterology*. 2014;20(36):12945-55.
51. Smirnova OA, Ivanova ON, Bartosch B, Valuev-Elliston VT, Mukhtarov F, Kochetkov SN, et al. Hepatitis C Virus NS5A Protein Triggers Oxidative Stress by Inducing NADPH Oxidases 1 and 4 and Cytochrome P450 2E1. *Oxidative medicine and cellular longevity*. 2016;2016:8341937.
52. Cabibbo G, Maida M, Genco C, Parisi P, Peralta M, Antonucci M, et al. Natural history of untreatable hepatocellular carcinoma: A retrospective cohort study. *World journal of hepatology*. 2012;4(9):256-61.
53. Saeed HM, Alanazi MS, Nounou HA, Salaby MA, Semlali A, Azzam N, et al. Cytochrome P450 1A1, 2E1 and GSTM1 gene polymorphisms and susceptibility to colorectal cancer in the Saudi population. *Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP*. 2013;14(6):3761-8.
54. Maurya SS, Anand G, Dhawan A, Khan AJ, Jain SK, Pant MC, et al. Polymorphisms in drug-metabolizing enzymes and risk to head and neck cancer:



evidence for gene-gene and gene-environment interaction. *Environmental and molecular mutagenesis*. 2014;55(2):134-44.

55. Wideroff L, Gridley G, Møller L, Chow WH, Linet M, Keehn S, et al. Cancer incidence in a population-based cohort of patients hospitalized with diabetes mellitus in Denmark. *Journal of the National Cancer Institute*. 1997;89(18):1360-5.

56. Noh DH, Lee EJ, Kim AY, Lee EM, Min CW, Kang KK, et al. Alcohol induced hepatic degeneration in a hepatitis C virus core protein transgenic mouse model. *International journal of molecular sciences*. 2014;15(3):4126-41.

## **Apêndices**

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

*(Conselho Nacional de Saúde, resolução 196/96)*

**Título da Pesquisa: Avaliação dos polimorfismos de genes metabolizadores de xenobióticos (*GSTM1*, *GSTT1*, *GSTP1* e *mEH*) em pacientes com cirrose e carcinoma hepatocelular.**

**Pesquisadora Responsável:** Profa. Dra. Eny Maria Goloni-Bertollo - UPGEM: Unidade de Pesquisa em Genética e Biologia Molecular da FAMERP;

**A)** para obter maior conhecimento dos mecanismos envolvidos no desenvolvimento do carcinoma hepatocelular, os pesquisadores da FAMERP de São José do Rio Preto, SP, estão desenvolvendo uma

pesquisa científica que poderá melhorar o nosso conhecimento sobre esse tumor e, portanto oferecer novas possibilidades de diagnóstico e de melhora na qualidade de vida;

**B)** este estudo tem como objetivos: 1) Coletar informações da história e obter dados clínicos dos prontuários médicos dos pacientes com cirrose hepática e carcinoma hepatocelular atendidos no Serviço de Atendimento Ambulatorial vinculado à Unidade Cirurgia e Transplante de Fígado e Intestino do Hospital de Base / Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto – FAMERP. 2) Analisar alterações em genes (material hereditário) com a finalidade de esclarecer o papel de fatores genéticos no desenvolvimento do tumor;

**C)** para este estudo serão utilizados dois grupos de pessoas: 1) pacientes com cirrose ou carcinoma hepatocelular; 2) indivíduos do grupo controle, não portadores do tumor;

**D)** o estudo será feito utilizando-se sangue, que será colhido com seringa descartável por enfermeira e o risco da colheita pode incluir inchaço e vermelhidão no local, sem qualquer outro risco para minha saúde;

**E)** o material genético (DNA), ou seja hereditário, extraído do sangue será utilizado para esta pesquisa e armazenado na UPGEM e, para novos projetos, haverá nova submissão para avaliação do Comitê de Ética e Pesquisa (CEP).

**F)** todas as informações por mim fornecidas por meio do questionário e os resultados serão mantidos em sigilo e que, estes últimos só serão utilizados para divulgação em reuniões e revistas científicas;

**G)** se eu concordar em participar desta pesquisa e se eu concordar com a retirada e uso do meu sangue, do modo descrito acima, não terei quaisquer benefícios ou direitos financeiros sobre os eventuais resultados decorrentes da pesquisa. Se eu não concordar, em doar o sangue para a pesquisa ou decidir retirar meu consentimento em qualquer momento, minha decisão não influenciará, de nenhum modo, o meu tratamento;

**H)** esse estudo é importante porque pode colaborar para conhecimento científico dos mecanismos envolvidos no desenvolvimento do tumor.

Declaro que, após ter convenientemente esclarecido pelo pesquisador, consinto em participar livre e espontaneamente deste estudo sem que tenha sido submetido a qualquer tipo de pressão.

Assim, consinto em participar do projeto de pesquisa em questão.

Nome do(a) participante:

Representante legal:

RG do prontuário médico:

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

Declaração de responsabilidade: Expliquei a natureza, objetivos, riscos e benefícios deste estudo. Coloquei-me a disposição para perguntas e respondi a todas. Obtive o consentimento de maneira livre e me coloquei à disposição para esclarecimento de qualquer dúvida sobre o estudo pelos endereços abaixo indicados.

Nome do(a) pesquisador:

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

Inscrição no Conselho Regional: .....

## QUESTIONÁRIO

Dados Gerais e demográficos:

Nome.....sexo.....  
Prontuário.....  
Local e data de nascimento.....  
Endereço: Rua.....Nº.....fone.....  
Bairro.....Cidade.....CEP.....  
Etnia.....Ocupação.....Escolaridade.....  
Data da coleta:.....

### HISTÓRICO MÉDICO

Fatores de risco:

- Cirrótico  Vírus B  Vírus C  Esteatohepatite  Álcool > 20gr/dia  
 Hemocromatose  Doença de Wilson  Hepatite auto-imune  
 Viveu no campo, se sim, por quanto tempo.....  
 Outra doença hepática, qual.....  
 Diabetes mellitus há \_\_ anos;

Dados do Tumor:

- Diagnostico:  Imagem  Imagem + alfa feto  Biopsia  
 Dosagem de alfa feto:.....  
 Localização – segmentos:.....  
Tipo:  nodular: nº. de nódulos..... Diâmetro dos nódulos.....  
 infiltrativo  
 Invasão vascular

Tratamento recebido:

- Transplante ( ), Ressecção ( ), Quimioembolização (TACE) ( ), Alcoolização ( ),  
Sorafenib ( ) - ( ) RF (Radio Freqüência) - Medidas de suporte ( )  
 Metástase, onde.....

Responsável pela entrevista:.....

**Anexos**



FACULDADE DE MEDICINA DE  
SÃO JOSE DO RIO PRETO-  
FAMERP - SP



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** Avaliação dos polimorfismos de genes metabolizadores de xenobióticos (GSTM1, GSTT1, GSTP1 e MEH) em pacientes com cirrose e carcinoma hepatocelular.

**Pesquisador:** Ery Maria Goloni-Bertollo

**Área Temática:**

**Versão:** 4

**CAAE:** 03227312.3.0000.5415

**Instituição Proponente:** Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto- FAMERP - SP

**Patrocinador Principal:** FUNDAÇÃO DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DE SÃO PAULO

#### DADOS DA NOTIFICAÇÃO

**Tipo de Notificação:** Outros

**Detalhe:** Pedido de Extensão de Projeto

**Justificativa:** O Carcinoma Hepatocelular (CHC) é um tumor primário do fígado e ocorre em mais

**Data do Envio:** 22/07/2013

**Situação da Notificação:** Aguardando revisão do parecer do colegiado

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 342.964

**Data da Relatoria:** 24/07/2013

#### Apresentação da Notificação:

Trata-se de um relatório parcial, com informações do estudo CAAE: 03227312.3.0000.5415, de título "Avaliação dos polimorfismos de genes metabolizadores de xenobióticos (GSTM1, GSTT1, GSTP1 e MEH) em pacientes com cirrose e carcinoma hepatocelular".

#### Objetivo da Notificação:

Notificar o andamento do estudo em questão.

#### Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos - relacionados a coleta de sangue que pode causar um hematoma e ficar dolorido.

Benefícios - descoberta de marcadores moleculares em carcinoma hepatocelular e cirrose que

Endereço: BRIGADEIRO FARIA LIMA, 5416  
Bairro: VILA SÃO JOÃO CEP: 15.090-000  
UF: SP Município: SÃO JOSE DO RIO PRETO  
Telefone: (17)3201-5813 Fax: (17)3201-5813 E-mail: cepfamerp@famerp.br



FACULDADE DE MEDICINA DE  
SÃO JOSE DO RIO PRETO-  
FAMERP - SP



Continuação do Parecer: 342.964

podem contribuir com o diagnóstico, prognóstico e possíveis tratamentos individualizados.

**Comentários e Considerações sobre a Notificação:**

Notificação clara, apresentando todos os resultados obtidos até o momento no estudo e o novo cronograma a ser seguido.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

De acordo.

**Recomendações:**

Não há.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Sem pendências ou inadequações.

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

**Considerações Finais a critério do CEP:**

O Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da FAMERP está ciente do Relatório Parcial encaminhado a Plataforma Brasil em 22/07/2013.

SAO JOSE DO RIO PRETO, 29 de Julho de 2013

---

**Assinador por:**  
**Fernando Batigália**  
**(Coordenador)**

Endereço: BRIGADEIRO FARIA LIMA, 5416  
Bairro: VILA SAO JOAO CEP: 15.090-000  
UF: SP Município: SAO JOSE DO RIO PRETO  
Telefone: (17)3201-5813 Fax: (17)3201-5813 E-mail: cepfamerp@famerp.br