

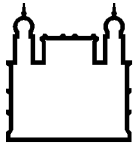
MINISTÉRIO DA SAÚDE  
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Doutorado em Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

**ESTUDO DA RELAÇÃO ENTRE POLIMORFISMOS GENÉTICOS E  
HIPERMETILAÇÃO DE PROMOTORES GÊNICOS E A PROGRESSÃO DA  
HEPATITE CRÔNICA E DESENVOLVIMENTO DO CARCINOMA  
HEPATOCELULAR**

**OSCAR RAFAEL CARMO ARAÚJO**

Rio de Janeiro  
Março de 2018



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**

**Fundação Oswaldo Cruz**

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**  
**Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária**

***OSCAR RAFAEL CARMO ARAÚJO***

Estudo da relação entre polimorfismos genéticos e hipermetilação de promotores gênicos e a progressão da hepatite crônica e desenvolvimento de carcinoma hepatocelular

Tese apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz  
como parte dos requisitos para obtenção do título  
de Doutor em Ciências.

**Orientador:** Dra. Natalia Motta de Araujo.

**RIO DE JANEIRO**  
Março de 2018

Araújo, Oscar Rafael Carmo .

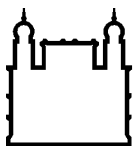
Estudo da relação entre polimorfismos genéticos e hipermetilação de promotores gênicos e a progressão da hepatite crônica e desenvolvimento de carcinoma hepatocelular / Oscar Rafael Carmo Araújo. - Rio de Janeiro, 2018.  
158 f.; il.

Tese (Doutorado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Parasitária, 2018.

Orientadora: Natalia Motta de Araujo.

Bibliografia: f. 113-131

1. carcinoma hepatocelular. 2. cirrose. 3. polimorfismo. 4. metilação de DNA. I. Título.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## **INSTITUTO OSWALDO CRUZ**

**Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária**

**AUTOR: Oscar Rafael Carmo Araújo**

### **ESTUDO DA RELAÇÃO ENTRE POLIMORFISMOS GENÉTICOS E HIPERMETILAÇÃO DE PROMOTORES GÊNICOS E A PROGRESSÃO DA HEPATITE CRÔNICA E DESENVOLVIMENTO DE CARCINOMA HEPATOCELULAR**

**ORIENTADOR: Dra. Natalia Motta de Araujo.**

**Aprovada em: 22 / 03 / 2018.**

#### **EXAMINADORES:**

**Prof. Dra. Livia Melo Villar - Presidente** (Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ)

**Prof. Dra. Luciane Almeida Amado Leon** (Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ)

**Prof. Dra. Renata de Mello Perez** (Departamento de Clínica Médica, UFRJ)

**Prof. Dr. Eduardo de Mello Volotão** (Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ)

**Prof. Dra. Claudia Lamarca Vitral** (Departamento de Microbiologia e Parasitologia, UFF)

Rio de Janeiro, 22 de março de 2018

**Aos meus pais Rogério e Maria José,  
por toda dedicação e apoio incondicional.  
Por serem minha referência na vida e exemplo de força de vontade.  
À minha querida irmã, pelo carinho e apoio de sempre.  
À minha querida avó Maria Augusta (*in memoriam*), pelo exemplo de vida.**

## **AGRADECIMENTOS**

Um ciclo se fecha após uma longa jornada extremamente enriquecedora tanto profissionalmente quanto pessoalmente. Muitas pessoas contribuíram e influenciaram durante esse período. Atualmente, para atuar profissionalmente como cientista o primeiro grande passo é tornar-se doutor. Um sonho antigo, iniciado na infância, quando, inocente, não imaginava que levaria mais de 10 anos de estudo e trabalho.

Me sinto grato por tudo e feliz por experienciar tantos momentos desafiadores, de difícil decisão e perceber que nada é impossível. Nesse contexto, agradeço:

À Dra. Natalia Motta de Araujo, minha orientadora, por sua imensa dedicação na minha formação que ultrapassa as barreiras do necessário, contribuindo não só no aspecto profissional, mas também no aspecto pessoal. Obrigado pelas contribuições valiosas para meu amadurecimento científico. Me sinto em débito eternamente por sua dedicação e ajuda durante todos esses anos. Toda minha admiração pelo seu profissionalismo e pelo exemplo de cientista, que tomarei como referência por toda a minha vida.

À Dra. Selma Gomes pelo constante suporte durante o período de chefia do Laboratório de Virologia Molecular.

Ao Dr. Christian Niel pelo apoio científico, auxílio para participação em eventos científicos e pelas prazerosas conversas depois do almoço. Obrigado por todo conhecimento compartilhado.

À Dra. Vanessa Salete, atual chefe do Laboratório de Virologia Molecular, pelos diversos momentos de convivência e pela solicitude de sempre. Obrigado pelos conselhos e essenciais contribuições científicas durante esses anos.

Aos membros da banca Dra. Luciane Leon, Dra. Renata Perez, Dr. Eduardo Volotão e Dr. Claudia Vitral pelas contribuições certamente valiosas nesse momento final do trabalho e em especial a Dra. Lívia Villar, pela enorme dedicação e contribuição como revisora da tese e presidente da banca.

À colaboradora Dra. Cristiane Alves Villela Nogueira, pela confiança de sempre e essencial contribuição científica durante todos esses anos para esse e

outros trabalhos. Obrigado pela especial dedicação para que tudo ocorra da melhor maneira.

À colaboradora Dra. Kycia Maria do Ó pela amizade e por me acompanhar durante todo o trabalho de coleta das amostras. Agradeço pelo essencial auxílio, pelas conversas e conselhos.

À toda equipe do Ambulatório e secretaria da Hepatologia do HUCFF, em especial à Dra. Roberta Celles e Dra. Maurem que tanto contribuíram na seleção dos pacientes e pela importante ajuda neste trabalho.

Ao Dr. Henrique Sérgio Moraes Coelho, chefe do Serviço de Hepatologia do HUCFF, pela oportunidade de conduzir o estudo.

À colaboradora Dra. Vera Pannain, pela confiança e fornecimento de amostras de tecido hepático em parafina.

À Plataforma de Sequenciamento PDTIS/FIOCRUZ, pela realização do sequenciamento de amostras analisadas neste trabalho.

À Pós-Graduação em Biologia Parasitária, ao coordenador Rafael Maciel e membros da Comissão de Pós-Graduação pela contribuição para minha formação acadêmica, além do apoio financeiro para participação em eventos científicos nacionais e internacionais.

À FIOCRUZ pela excelente infraestrutura e a CAPES pelo auxílio financeiro por meio da bolsa de doutorado e pela valiosa oportunidade de realizar um sonho de fazer Doutorado Sanduíche no exterior na incrível cidade de Lyon, França.

À Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (IARC) da OMS, uma das instituições de pesquisa mais importantes do mundo, e ao Dr. Zdenko Herceg pela ótima recepção e pela oportunidade de vivenciar o dia a dia no laboratório e de discutir ideias no Jornal Club semanal com excelentes cientistas de diferentes linhas de pesquisa. Aos meus queridos amigos de laboratório Anne Claire e Jesus pelas eternas lembranças fora do laboratório. Aos meus amigos brasileiros Monique, Jessica, Isabele, Zeca, Gabriela, Whyara, Raquel, Allan, Adalberto e Renata pela oportunidade de falar um pouco de português e descobrir os mais diversos cantos de Lyon e outras cidades incríveis.

À equipe do Institut Pasteur de Paris pela oportunidade de realizar meu primeiro curso internacional longo e aprender mais sobre o conceito One Health. Foi

extremamente proveitoso participar durante um mês de trabalhos de campo e de bancada, utilizando técnicas como sequenciamento de alta vazão e ver a integração de cientistas de diversas áreas com um único objetivo.

Aos meus amigos do Laboratório de Virologia Molecular de hoje e sempre, em especial a Caroline, José Junior, Flávia Savassi, Barbara, Francisco, Carlos Augusto, Monique, Leonardo, Natália Spitz, Agatha, Lívia, Maryrose, Waldir, Evorah, Camilla, Andreza, Amanda Lopes, Amanda Persi, Jéssica, Lyana, Nathália Alves e Elizangela pelo agradável convívio em momentos sérios e de descontração.

À equipe do Laboratório de Referência em Hepatites Virais da FIOCRUZ por todo auxílio prestado nesses anos de trabalho.

À Giselle Andrade pelo incentivo e compreensão de sempre, principalmente minha ausência no momento final desse trabalho. Obrigado pelos momentos maravilhosos que vivemos e por me mostrar que ainda existem pessoas incríveis nesse mundo.

À todos os meus grandes amigos, em especial à Tatiane Araujo, Isaac, Laís, Carol Aleixo, Clei, Priscila, Rafael, Roberto, Isabela e Ana Luísa pelos momentos de descontração e incentivo de sempre a perseverar na carreira científica.

À Andrea Saavedra por compartilhar comigo momentos importantes no meu desenvolvimento pessoal e profissional e pelo incentivo na realização desse trabalho.

Aos meus amigos da FIOCRUZ Diogo, Maria, Leticia, Alan, Moyra, Carol Sacramento, Kate, Mayara, Tatiana por tornarem meus dias mais divertidos.

Aos meus coordenadores de tutoria do CEDERJ Prof. Dr. Maulori Cabral e Prof. Dra. Isabel Liberto pelas enriquecedoras discussões sobre microbiologia e virologia, além da possibilitarem minha valiosa experiência em docência no ensino superior a distância. E aos meus amigos tutores a distância Bianca, Miguel, Gustavo e Ana Pantoja por tornarem as noites de tutoria tão agradáveis.

Aos meus pais Maria José e Rogério meu profundo agradecimento pelo apoio incondicional em todos os momentos da minha vida, pelos ensinamentos e também pela inestimável dedicação e confiança em meu futuro. Obrigado pelo suporte, essencial em todos os momentos. Todo o meu mais profundo agradecimento por tudo que vocês representam na minha vida.

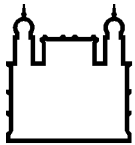


À minha irmã Rayanne pela paciência, confiança e disponibilidade em ajudar sempre que preciso. Agradeço imensamente pelo carinho e pelas maravilhosas lembranças que levarei sempre comigo.

À todos os meus familiares em especial os meus padrinhos Maria Lúcia e William por sempre estarem presentes me apoiando em todos os momentos da minha vida.

E em especial à minha querida avó Maria Augusta (*in memoriam*) que falecida recentemente, infelizmente não pôde participar do fechamento desse ciclo. Fica a eterna lembrança e ensinamento com o exemplo de vida, que com perseverança e coragem pode-se chegar a qualquer lugar e a humildade é o componente básico de todas as virtudes humanas.

**“A humildade é o sólido fundamento de todas as virtudes.”**  
**Confúcio**



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## INSTITUTO OSWALDO CRUZ

### ESTUDO DA RELAÇÃO ENTRE POLIMORFISMOS GENÉTICOS E HIPERMETILAÇÃO DE PROMOTORES GÊNICOS E A PROGRESSÃO DA HEPATITE CRÔNICA E DESENVOLVIMENTO DE CARCINOMA HEPATOCELULAR

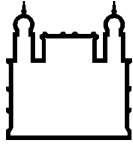
#### RESUMO

#### TESE DE DOUTORADO EM BIOLOGIA PARASITÁRIA

Oscar Rafael Carmo Araújo

O carcinoma hepatocelular (CHC) é o segundo tipo de câncer mais letal no mundo. Os principais agentes etiológicos para o CHC são os vírus da hepatite B (HBV) e da hepatite C (HCV). A hepatocarcinogênese é um processo de múltiplas etapas afetado por fatores genéticos e epigenéticos. O papel de diferentes genes, como GSTT1, GSTM1, TP53, MDM2, RASSF1A e DOK1, tem sido avaliado nesse processo. Estudos tem observado a associação de polimorfismos genéticos e da hipermetilação de regiões promotoras de genes com o desenvolvimento do CHC. Entretanto, poucos estudos analisaram pacientes brasileiros até o momento. Os objetivos deste estudo foram avaliar se a ocorrência de polimorfismos genéticos e da hipermetilação de DNA estão associados à progressão da doença hepática e o desenvolvimento de cirrose e carcinoma hepatocelular (CHC) em pacientes brasileiros com hepatite crônica. Os polimorfismos GSTT1 nulo (deleção), GSTM1 nulo (deleção), TP53 R72P (rs1042522) e MDM2 T309G (rs2279744) foram genotipados por PCR multiplex ou PCR seguida por análise do polimorfismo dos fragmentos de restrição (PCR-RFLP) em 190 pacientes (60 com CHC, 83 com cirrose e 47 com apenas hepatite crônica). Os níveis de metilação dos promotores dos genes RASSF1A e DOK1 foram medidos por pirosequenciamento de DNA extraído de 41 amostras de tecidos de fígado conservadas em parafina (20 de CHC, 9 de cirrose e 12 de hepatite crônica), após tratamento com bisulfato de sódio e amplificação das regiões específicas por PCR. Nossos resultados demonstraram que a ocorrência do genótipo polimórfico nulo para o gene GSTT1, em pacientes crônicos para a hepatite C, está associado à progressão da doença hepática para cirrose e indiretamente ao desenvolvimento de CHC ( $p = 0,032$ ). Observamos também que a ocorrência do perfil genotípico simultâneo GSTT1 nulo e TP53 Pro/Pro, o perfil genotípico simultâneo GSTM1 nulo e TP53 Arg/Arg, além do perfil genotípico simultâneo GSTM1 nulo, MDM2 T/T e TP53 Arg/Arg, em pacientes crônicos para a hepatite C, estão associados ao desenvolvimento de CHC ( $p < 0,050$ ). Além disso, os níveis de metilação de DNA nos promotores dos genes DOK1 e RASSF1A, em tecido hepático, foram associados a progressão da doença hepática, sendo encontrados níveis baixos em tecidos não cirróticos, intermediários em tecidos cirróticos e elevados em tecidos de CHC. Este é um estudo pioneiro no Brasil e contribui para a identificação de fatores genéticos e epigenéticos que poderão ser utilizados futuramente para a seleção de pacientes com hepatite crônica em alto risco para o desenvolvimento do CHC.

Palavras-chave: carcinoma hepatocelular; cirrose; polimorfismo; metilação de DNA.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## INSTITUTO OSWALDO CRUZ

### STUDY OF THE RELATION BETWEEN GENETIC POLYMORPHISMS AND GENE PROMOTERS HYPERMETHYLATION AND CHRONIC HEPATITIS PROGRESSION AND HEPATOCELLULAR CARCINOMA DEVELOPMENT

#### ABSTRACT

#### PHD THESIS IN PARASITE BIOLOGY

Oscar Rafael Carmo Araújo

Hepatocellular carcinoma (HCC) is the second most lethal type of cancer worldwide. The main etiological agents for CHC are hepatitis B virus (HBV) and hepatitis C virus (HCV). The hepatocarcinogenesis is a multistep process affected by both genetic and epigenetic factors. The role of different genes, such as GSTT1, GSTM1, TP53 and MDM2, has been evaluated in this process. Studies have observed the association of genetic polymorphisms and gene promoter hypermethylation with the HCC development. However, few studies have analyzed Brazilian patients so far. The aims of this study were to evaluate whether the occurrence of genetic polymorphisms and DNA hypermethylation are associated with the progression of hepatic disease and the development of cirrhosis and hepatocellular carcinoma (HCC) in Brazilian patients with chronic hepatitis. The polymorphisms GSTT1 null (deletion), GSTM1 null (deletion), TP53 R72P (rs1042522) and MDM2 T309G (rs2279744) were genotyped by multiplex PCR or PCR followed by restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) analysis in 190 patients (60 with HCC, 83 with cirrhosis and 47 with only chronic hepatitis). Methylation levels of RASSF1A and DOK1 gene promoters were measured by bisulfite pyrosequencing of DNA extracted from 41 paraffin-embedded liver tissues samples (20 of HCC, 9 of cirrhosis and 12 of chronic hepatitis), after treatment with sodium bisulfite and PCR amplification of specific regions. Our results showed that the occurrence of GSTT1 null genotype in hepatitis C chronic patients is associated with the progression of liver disease to cirrhosis and indirectly to HCC development ( $p = 0.032$ ). We also observed that the occurrence of the simultaneous genotypic profile GSTT1 null and TP53 Pro/Pro, the simultaneous genotypic profile GSTM1 null and TP53 Arg/Arg, and the simultaneous genotypic profile GSTM1 null, MDM2 T/T and TP53 Arg/Arg in hepatitis C chronic patients, are associated with HCC development ( $p < 0,050$ ). In addition, the DNA methylation levels in DOK1 and RASSF1A gene promoters in liver tissue were associated with liver disease progression, with low levels found in non-cirrhotic tissues, intermediate levels in cirrhotic tissues and elevated levels in HCC tissues. This is a pioneering study in Brazil and it contributes to the identification of genetic and epigenetic factors that may be used in the future as a selection tool of chronic hepatitis patients at high risk of HCC development.

Keywords: hepatocellular carcinoma; cirrhosis; polymorphism; DNA methylation.

## ÍNDICE

<b>RESUMO</b>	<b>X</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>XI</b>
<b>1 INTRODUÇÃO</b>	<b>21</b>
<b>1.1 O carcinoma hepatocelular</b> .....	<b>21</b>
1.1.1 Epidemiologia do carcinoma hepatocelular .....	21
1.1.2 Diagnóstico do carcinoma hepatocelular .....	23
1.1.3 Fatores de risco para o carcinoma hepatocelular .....	25
<b>1.2 O vírus da hepatite B</b> .....	<b>28</b>
1.2.1 Classificação e morfologia do vírus da hepatite B .....	28
1.2.2 Organização genômica do vírus da hepatite B .....	30
1.2.3 Variabilidade do vírus da hepatite B .....	32
1.2.4 Epidemiologia da infecção pelo vírus da hepatite B .....	36
1.2.5 Aspectos clínicos e laboratoriais da infecção pelo vírus da hepatite B.....	38
<b>1.3 O vírus da hepatite C</b> .....	<b>41</b>
1.3.1 Classificação e morfologia do vírus da hepatite C .....	41
1.3.2 Organização genômica do vírus da hepatite C .....	42
1.3.3 Variabilidade do vírus da hepatite C .....	46
1.3.4 Epidemiologia da infecção pelo vírus da hepatite C .....	48
1.3.5 Aspectos clínicos e laboratoriais da infecção pelo vírus da hepatite C .....	49
<b>1.4 Fatores genéticos e epigenéticos na Hepatocarcinogênese</b> .....	<b>51</b>
1.4.1 Fatores genéticos associados ao desenvolvimento carcinoma hepatocelular.....	51
1.4.2 Fatores epigenéticos associados ao desenvolvimento carcinoma hepatocelular.....	56
<b>1.5 Justificativa</b> .....	<b>60</b>
<b>2 OBJETIVOS</b>	<b>63</b>
<b>2.1 Objetivo Geral</b> .....	<b>63</b>
<b>2.2 Objetivos Específicos</b> .....	<b>63</b>
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>64</b>

<b>3.1</b>	<b>Polimorfismos genéticos</b> .....	<b>64</b>
3.1.1	Amostragem .....	64
3.1.2	Isolamento de ácido nucléico.....	65
3.1.3	Genotipagem do vírus da hepatite C .....	65
3.1.4	Genotipagem dos polimorfismos .....	66
<b>3.2</b>	<b>Hipermetilação de DNA em tecido hepático</b> .....	<b>68</b>
3.2.1	Amostragem .....	68
3.2.2	Isolamento de ácido nucléico de tecido hepático.....	68
3.2.3	Tratamento de DNA com bissulfito de sódio.....	68
3.2.4	Amplificação do DNA extraído do tecido.....	69
3.2.5	Análise da metilação de DNA .....	70
<b>3.3</b>	<b>Hipermetilação em DNA livre circulante em soro</b> .....	<b>70</b>
3.3.1	Amostragem .....	70
3.3.2	Extração de DNA .....	71
3.3.3	Seleção do cfDNA livre circulante.....	72
3.3.4	Tratamento com bissulfito de sódio .....	73
3.3.5	Construção da biblioteca de cfDNA .....	73
<b>3.4</b>	<b>Análise estatística</b> .....	<b>74</b>
<b>3.5</b>	<b>Aspectos éticos</b> .....	<b>74</b>
<b>4</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>75</b>
<b>4.1</b>	<b>Polimorfismos genéticos</b> .....	<b>75</b>
4.1.1	Análise do perfil demográfico e clinico-patológico dos pacientes analisados de acordo com a presença de cirrose e CHC .....	75
4.1.2	Análise do perfil genotípico de polimorfismos e presença de CHC em pacientes com HCV .....	77
4.1.3	Análise do perfil genotípico de polimorfismos simultâneos e presença de CHC em pacientes com HCV.....	80
4.1.4	Análise do perfil genotípico de polimorfismos e presença de cirrose em pacientes com HCV .....	82
<b>4.2</b>	<b>Hipermetilação de DNA em tecido hepático</b> .....	<b>85</b>
4.2.1	Análise do perfil demográfico e clinico-patológico das amostras analisadas.....	85

4.2.2	Análise dos níveis de metilação de DNA em tecido hepático não cirrótico, cirrótico e com CHC.....	87
4.2.3	Análise comparativa entre os níveis de metilação de DNA em tecido hepático com CHC e características demográficas e clinico-patológicas.....	88
4.2.4	Análise da frequência de hipermetilação de DNA em tecido hepático cirrótico e com CHC.....	89
<b>4.3</b>	<b>Hipermetilação em DNA livre circulante em soro.....</b>	<b>92</b>
4.3.1	Análise da qualidade de DNA livre circulante extraído.....	92
4.3.2	Análise da eficiência da seleção de DNA livre circulante.....	93
4.3.3	Análise da eficiência de construção da biblioteca de cfDNA.....	96
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>98</b>
5.1	Polimorfismos genéticos.....	98
5.2	Hipermetilação de DNA em tecido hepático.....	105
5.3	Hipermetilação em DNA livre circulante em soro.....	108
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>111</b>
<b>7</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>113</b>
<b>APÊNDICE A -</b>	<b>PROCOLO SPRISELECT MODIFICADO.....</b>	<b>132</b>
<b>APÊNDICE B -</b>	<b>APROVAÇÃO PELOS COMITÊS DE ÉTICA DO INSTITUTO OSWALDO CRUZ E DO HOSPITAL UNIVERSITÁRIO CLEMENTINO FRAGA FILHO.....</b>	<b>134</b>
<b>APÊNDICE C -</b>	<b>ARTIGO PUBLICADO.....</b>	<b>146</b>
<b>APÊNDICE D -</b>	<b>MANUSCRITO EM PREPARAÇÃO.....</b>	<b>156</b>
<b>APÊNDICE E -</b>	<b>PRODUÇÃO COMPLEMENTAR.....</b>	<b>158</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Incidência dos principais tipos de câncer no mundo em homens em 2012. ....	21
Figura 2 - Incidência dos principais tipos de câncer no mundo em mulheres em 2012. ....	22
Figura 3 - Mortalidade dos principais tipos de câncer no mundo em ambos os gêneros em 2012. ....	22
Figura 4 - Prevalência do carcinoma hepatocelular no mundo em 2012.....	23
Figura 5 - Principais agentes infecciosos associados ao câncer no mundo em 2012. ....	26
Figura 6 - Principais agentes etiológicos para o carcinoma hepatocelular no Brasil de acordo com as regiões geográficas. ....	27
Figura 7 - Estrutura do vírus da hepatite B. Modelo da partícula de Dane.....	29
Figura 8 - Microscopia eletrônica das partículas infecciosas e não infecciosas do vírus da hepatite B.....	30
Figura 9 - Modelo esquemático da organização genômica do vírus da hepatite B.....	31
Figura 10 - Modelo representativo dos genótipos do vírus da hepatite B. ....	33
Figura 11 - Distribuição global dos genótipos do vírus da hepatite B. ....	34
Figura 12: Distribuição dos genótipos do vírus da hepatite B no Brasil. ....	35
Figura 13 - Prevalência global de infecção pelo vírus da hepatite B. ....	37
Figura 14 - Perfil sorológico da hepatite B.....	39
Figura 15 - Estrutura do vírus da hepatite C.....	42
Figura 16 - Modelo esquemático da organização genômica e do processamento de proteínas do vírus da hepatite C e das vias biológicas para o desenvolvimento de CHC. ....	43
Figura 17 - Distribuição global dos genótipos do vírus da hepatite C. ....	47
Figura 18 - Prevalência global de infecção pelo vírus da hepatite C.....	49
Figura 19: Contexto genômico dos genótipos nulos dos genes GSTT1 e GSTM1.....	54
Figura 20: Mecanismo biológico dos genes TP53 e MDM2 no carcinoma hepatocelular.....	55
Figura 21: Representação do mecanismo de metilação de DNA.....	57
Figura 22: Mecanismos biológicos do gene RASSF1A no ciclo celular.....	58



<b>Figura 23: Mecanismos biológicos do gene DOK1 no ciclo celular. ....</b>	<b>59</b>
<b>Figura 24: Perfil genotípico dos polimorfismos analisados nos genes GSTT1, GSTM1, TP53 e MDM2 de acordo com a presença de CHC.....</b>	<b>78</b>
<b>Figura 25: Perfil genotípico dos polimorfismos analisados nos genes GSTT1, GSTM1, TP53 e MDM2 de acordo com a presença de cirrose.....</b>	<b>83</b>
<b>Figura 26: Níveis de metilação de DNA nos genes RASSF1A e DOK1 em tecidos não cirróticos, cirróticos e com CHC. ....</b>	<b>87</b>
<b>Figura 27: Eletroforese por gel de agarose após extração de DNA.....</b>	<b>93</b>
<b>Figura 28: Eletroforese por gel de agarose após seleção de tamanho. ....</b>	<b>94</b>
<b>Figura 29: Análise de tamanho de fragmentos após seleção de cfDNA. ....</b>	<b>96</b>
<b>Figura 30: Análise de tamanho de fragmentos após extração de DNA. ....</b>	<b>96</b>

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Interpretação dos marcadores sorológicos da infecção pelo vírus da hepatite B.....	40
Tabela 2: Principais genes associados ao CHC.....	53
Tabela 3: Oligonucleotídeos para amplificação da região Core do vírus da hepatite C.....	66
Tabela 4: Oligonucleotídeos para amplificação dos genes GSTT1, GSTM1, TP53 e MDM2.....	67
Tabela 5: Oligonucleotídeos para amplificação da região promotora dos genes RASSF1A e DOK1.....	69
Tabela 6: Oligonucleotídeos para o pirosequenciamento da região promotora dos genes RASSF1A e DOK1.....	70
Tabela 7: Perfil demográfico e clinico-patológico dos pacientes de acordo com a presença de cirrose e CHC.....	76
Tabela 8: Distribuição dos genótipos do vírus da hepatite C de acordo com a presença de cirrose e CHC.....	77
Tabela 9: Frequência genotípica dos polimorfismos analisados nos genes GSTT1, GSTM1, TP53 e MDM2 de acordo com a presença de CHC. ....	79
Tabela 10: Frequência genotípica de polimorfismos simultâneos nos genes GSTT1, GSTM1, TP53 e MDM2 de acordo com a presença de CHC. ....	81
Tabela 11: Frequência genotípica dos polimorfismos analisados nos genes GSTT1, GSTM1, TP53 e MDM2 de acordo com a presença de cirrose. ....	84
Tabela 12: Perfil demográfico e clinico-patológico dos pacientes analisados de acordo com a presença de cirrose e CHC.....	86
Tabela 13: Média dos níveis de metilação de DNA para os genes RASSF1A e DOK1 em tecidos não cirróticos, cirróticos e com CHC.....	88
Tabela 14: Média dos níveis de metilação de DNA para os genes RASSF1A e DOK1 em tecido hepático com CHC de acordo com as características demográficas e clinico-patológicas.....	89
Tabela 15: Frequência de hipermetilação em tecidos com cirrose e CHC de acordo com presença do HBV e HCV.....	91
Tabela 16: Quantidade de DNA recuperado após extração de DNA. ....	92
Tabela 17: Quantidade de cfDNA recuperado após seleção de tamanho. ....	95

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AFP	Alfafetoproteína
AFP-L3	Alfafetoproteína L3
ALB	Albumina
ALT	Alanina aminotransferase
Anti-HBc IGG	Imunoglobulina G contra o antígeno do core do vírus da hepatite B
Anti-HBc IGM	Imunoglobulina M contra o antígeno do core do vírus da hepatite B
Anti-HBe	Imunoglobulina contra o antígeno HBe do vírus da hepatite B
Anti-HBs	Imunoglobulina contra o antígeno de superfície do vírus da hepatite B
Anti-HCV	Imunoglobulina contra o vírus da hepatite C
AST	Aspartato aminotransferase
BCP	Promotor Basal do Core ( <i>basal core promoter</i> )
BIL T.	Bilirrubina total
cfDNA	DNA livre circulante ( <i>cell-free DNA</i> )
CHC	Carcinoma hepatocelular
CpG	Dinucleotídeos citosina e guanina
ctDNA	DNA tumoral circulante ( <i>circulating tumour DNA</i> )
DCP	Des-gama-carboxi protrombina
DNA	Ácido desoxirribonucleico ( <i>deoxyribonucleic acid</i> )
DNMT	DNA metiltransferase
DOK1	Gene <i>Docking protein 1</i>
E1	Glicoproteínas do envelope 1
E2	Glicoproteínas do envelope 2
EASL	Associação Europeia para o Estudo do Fígado (European Association for the Study of the Liver)
ELISA	Ensaio imunoenzimático ( <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i> )
EORTC	Organização Europeia para Pesquisa e Tratamento do Câncer (European Organisation for Research and Treatment of Cancer)
FAL	Fosfatase alcalina
GGT	Gama glutamil transpeptidase
GP73	Proteínas de Golgi 73
GRIK1	Gene <i>Glutamate ionotropic receptor kainate type subunit 1</i>
GSTT1	Gene <i>Glutathione S-transferase theta 1</i>

GSTM1	Gene <i>Glutathione S-transferase mu 1</i>
GWAS	Estudos de associação genômica ampla ( <i>genome-wide association study</i> )
HBcAg	Antígeno do core do vírus da hepatite B
HBeAg	Antígeno HBe do vírus da hepatite B
HBsAg	Antígeno de superfície do vírus da hepatite B
HBV	Vírus da hepatite B
HCV	Vírus da hepatite C
HDV	Vírus da hepatite Delta
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
HLA-DQA1	Gene <i>Major histocompatibility complex, class II, DQ alpha 1</i>
HLA-DRB1	Gene <i>Major histocompatibility complex, class II, DR beta 1</i>
HPV	Vírus do papiloma humano
IARC	Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (International Agency for Research on Cancer)
IL28B	Gene <i>Interleukin 28B</i>
IRES	Sítio interno de entrada ribossomal ( <i>internal ribosome entry site</i> )
kDa	Kilodalton
KIF1B	Gene <i>Kinesin family member 1B</i>
MDM2	Gene <i>MDM2 proto-oncogene</i>
MICA	Gene <i>MHC class I polypeptide-related sequence A</i>
NAFLD	Esteatose hepática não alcoólica
NASH	Esteato-hepatite não alcoólica
NCBI	Centro Nacional de Informação Biotecnológica dos Estados Unidos
ng	Nanogramas
nm	Nanômetro
NS	Não estrutural
nt	Nucleotídeo
ORF	Fase de leitura aberta ( <i>open reading frames</i> )
p53	Proteína p53
pb	Pares de base
PCR	Reação em cadeia da polimerase
pré-C	Pré-core
RASSF1A	Gene <i>Ras association domain family member 1 isoform A</i>
RIBA	Teste immunoblot recombinante ( <i>recombinant immunoblot assay</i> )

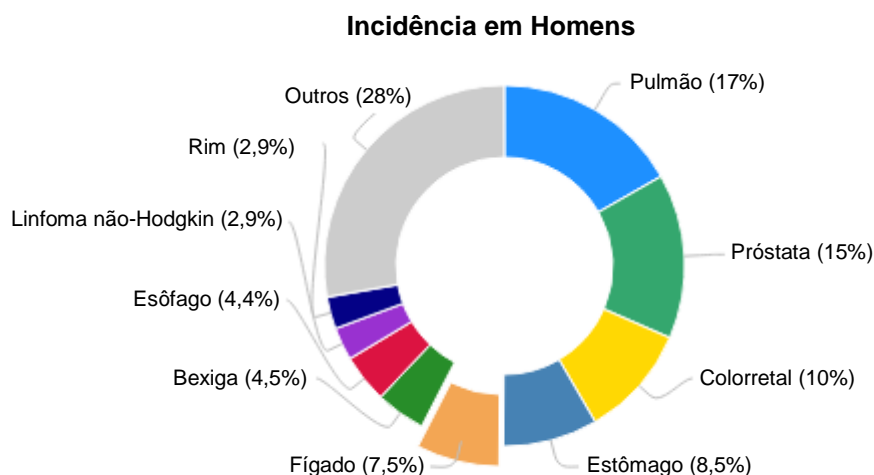
RNA	Ácido ribonucleico ( <i>ribonucleic acid</i> )
RpRd	RNA polimerase RNA dependente
RT-PCR	Reação em cadeia da polimerase com transcrição reversa
SNP	Polimorfismo de nucleotídeo único ( <i>single nucleotide polymorphism</i> )
STAT4	Gene <i>Signal transducer and activator of transcription 4</i>
Tag	Sequência de nucleotídeos adicionais para identificação da amostra
TP53	Gene <i>Tumor protein p53</i>
VIM	Gene <i>Vimentin</i>
WES	Sequenciamento completo do exoma ( <i>whole exome sequencing</i> )
UTR	Região genômica não traduzível ( <i>untranslated regions</i> )

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 O carcinoma hepatocelular

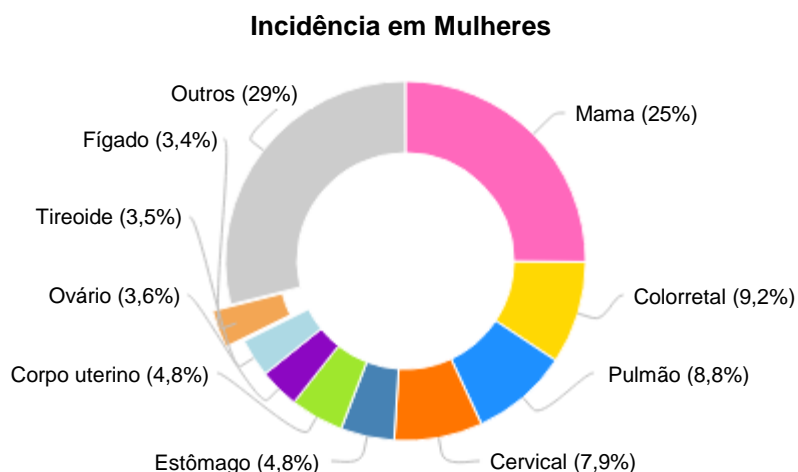
### 1.1.1 Epidemiologia do carcinoma hepatocelular

O hepatocarcinoma ou carcinoma hepatocelular (CHC) é a neoplasia maligna primária de fígado mais frequente, representando cerca de 85% a 90% dos casos (Nordenstedt et al., 2010). Devido a existência de múltiplos fatores de risco, o CHC apresenta uma alta incidência em muitos países. Com cerca de 782 mil novos casos a cada ano, o CHC é o quinto tipo de câncer mais comum no mundo em homens (figura 1) e a nona em mulheres (figura 2), segundo a Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (IARC), da Organização Mundial da Saúde (OMS). A taxa de mortalidade deste tipo de câncer é elevada, com aproximadamente 746 mil mortes por ano, sendo a segunda maior causa de morte por câncer no mundo (figura 3), atrás apenas do câncer de pulmão (Ervik et al., 2016). Isso ocorre principalmente devido ao curto tempo de evolução do CHC, que faz com que muitas vezes o tumor se encontre em fase avançada quando é feito o diagnóstico (Parkin et al., 2005). Além disso, a deficiência na triagem seriada de pacientes com o diagnóstico de cirrose hepática para identificação precoce de CHC é outro fator que contribui para maior mortalidade desses pacientes. A estratégia mais utilizada para a detecção precoce, quando o tumor ainda não produziu repercussão clínica, é a realização a cada seis meses de ultrassonografia abdominal para a detecção de lesões ainda pequenas com a possibilidade de cura.

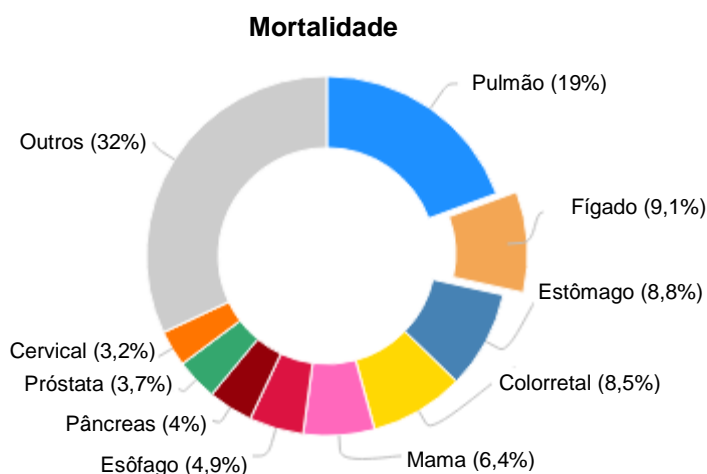


**Figura 1 - Incidência dos principais tipos de câncer no mundo em homens em 2012.**

Dados obtidos do banco de dados online Cancer Today da IARC. Disponível em: <http://gco.iarc.fr/today>. Acesso em: 5 janeiro 2018. (Figura adaptada).

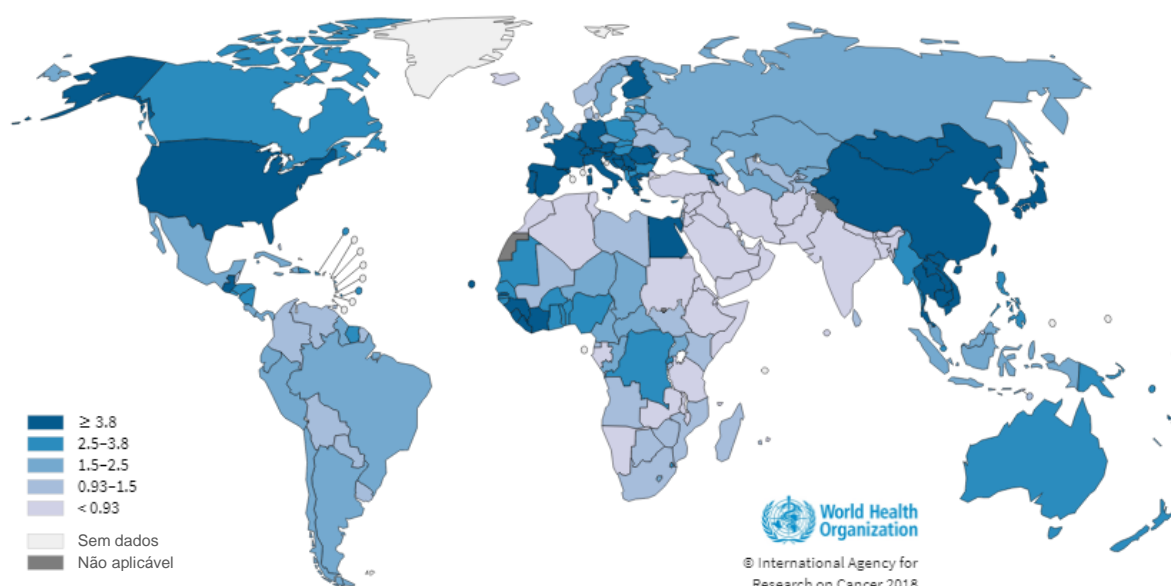


**Figura 2 - Incidência dos principais tipos de câncer no mundo em mulheres em 2012.** Dados obtidos do banco de dados online Cancer Today da IARC. Disponível em: <<http://gco.iarc.fr/today>>. Acesso em: 5 janeiro 2018. (Figura adaptada).



**Figura 3 - Mortalidade dos principais tipos de câncer no mundo em ambos os gêneros em 2012.** Dados obtidos do banco de dados online Cancer Today da IARC. Disponível em: <<http://gco.iarc.fr/today>>. Acesso em: 5 janeiro 2018. (Figura adaptada).

O CHC apresenta maior taxa de incidência (83%) em países em desenvolvimento, especialmente no Sudeste Asiático e na África subsaariana. A China é o país com maior número de casos, detendo 50% dos casos do mundo, segundo a IARC (Ervik et al., 2016). No entanto, a incidência do CHC tem aumentado nos países ocidentais nos últimos anos (figura 4). No Brasil, cerca de 9.500 novos casos de CHC são registrados a cada ano, representando 2,2% de todos os cânceres e 4,5% das mortes relacionadas ao câncer é atribuída ao CHC (Ervik et al., 2016).



**Figura 4 - Prevalência do carcinoma hepatocelular no mundo em 2012.**

Dados obtidos do banco de dados online Cancer Today da IARC. Disponível em: <<http://gco.iarc.fr/today>>. Acesso em: 5 janeiro 2018. (Figura adaptada).

### **1.1.2 Diagnóstico do carcinoma hepatocelular**

Um documento desenvolvido em conjunto pela Associação Europeia para o Estudo do Fígado (EASL) e pela Organização Europeia para Pesquisa e Tratamento do Câncer (EORTC), publicado em 2012 e utilizado em todo o mundo, preconiza as diretrizes para a conduta com o CHC (Easl-Eortc, 2012). O objetivo do documento é auxiliar no processo decisório de acordo com dados baseados na evidência. Dentre outros tópicos, neste documento é abordado como deve ser realizado o diagnóstico do CHC. Essa é a versão mais atual do principal documento de manejo de CHC no mundo, entretanto, possíveis adequações são aplicadas de acordo com as características epidemiológicas, fatores de riscos mais frequentes e condições disponíveis no país ou região em questão.

Conforme as diretrizes do documento Normas de Orientação Clínica da EASL e da EORTC: Abordagem do Carcinoma Hepatocelular, o diagnóstico do CHC pode ser realizado por meio de exame histopatológico através da análise de biópsias hepáticas ou de forma não invasiva por meio de exames de imagem. A sensibilidade da biópsia hepática pode variar entre 70% e 90% para todas as dimensões tumorais e depende da localização, tamanho e perícia. O diagnóstico histológico por meio de biópsia é particularmente complexo para os nódulos entre 1 e 2 cm, sendo recomendada a avaliação por um hepatopatologista (Roskams&Kojiro, 2010). Os métodos não invasivos baseiam-se em técnicas de imagem obtidas por



ultrassonografia, tomografia computadorizada ou ressonância magnética dinâmica com contraste. O diagnóstico é baseado em indícios típicos de CHC, como a presença de um nódulo hepático com hipervascularização que obedecem a determinados padrões nos estudos dinâmicos como a lavagem rápida de contraste na fase arterial (Easl-Eortc, 2012).

Em pacientes cirróticos, com detecção de nódulos maiores de 2 cm de diâmetro, a identificação de indícios típicos de CHC em um exame de imagem, na grande maioria dos casos, é suficiente para o diagnóstico de CHC. Apenas uma técnica de imagem é necessária para nódulos maiores de 2 cm de diâmetro, no entanto, uma abordagem mais conservadora indica a utilização de duas técnicas de imagem para confirmação. No caso de resultado inconclusivo ou detecção de alterações atípicas em exame de imagem, o diagnóstico é confirmado por meio da análise histopatológica através de biópsia hepática. Em pacientes cirróticos, com detecção de nódulos de 1 a 2 cm de diâmetro, o diagnóstico de CHC é baseado em critérios não invasivos, por meio de exames de imagem, quando possível. A confirmação histopatológica por biópsia deve ser considerada. Pacientes cirróticos, com detecção de nódulos menores de 1 cm de diâmetro em exame de imagem, são acompanhados com verificação periódica a cada 4 meses durante o primeiro ano e posteriormente a cada 6 meses. No caso de resultados inconclusivos ou mudança no padrão identificado no exame histopatológico durante o acompanhamento, uma nova biópsia confirmatória é realizada (Easl-Eortc, 2012).

A dosagem no sangue do marcador alfa-fetoproteína (AFP), classicamente utilizada para triagem de CHC foi retirada das diretrizes mais atuais para o diagnóstico do CHC, entretanto ainda é comumente utilizada como exame complementar. No entanto, esse marcador é encontrado elevado em apenas 40 a 60% dos indivíduos com CHC, demonstrando baixa sensibilidade (Giannelli et al., 2007; Giannelli et al., 2005; Hsia et al., 2007; Mao et al., 2010).

Diversos outros marcadores, como a proteína DCP (des-gama-carboxi protrombina), GP73 (proteínas de Golgi 73) e AFP-L3 (alfafetoproteína L3), foram investigados para utilização como diagnóstico de CHC de maneira minimamente invasiva (Li et al., 2017; Ricco et al., 2017; Volk et al., 2007). Entretanto, a sensibilidade e especificidade observadas não foram suficientemente relevantes para adoção na prática clínica. Um recente estudo observou também que a performance da proteína DCP foi significativamente influenciada pela etiologia do CHC (Ricco et al., 2017).

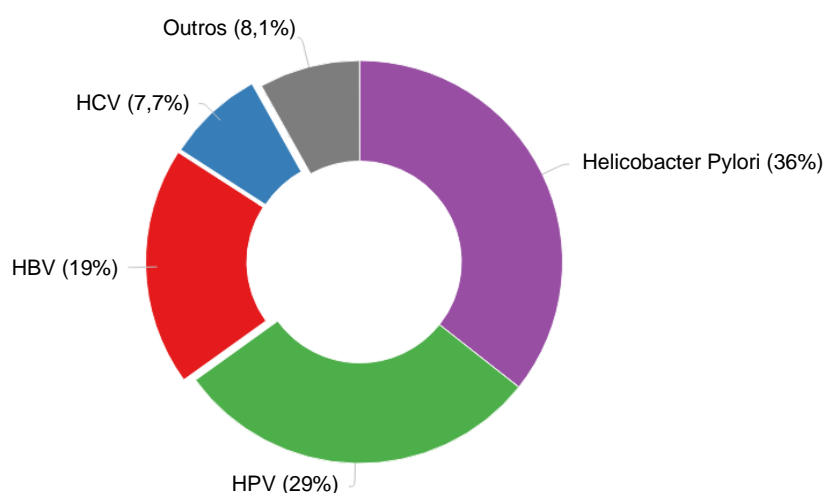
### **1.1.3 Fatores de risco para o carcinoma hepatocelular**

O mais importante fator de risco para a hepatocarcinogênese é a cirrose hepática, que acomete de 70 a 90% dos indivíduos que apresentam CHC (Fujiwara et al., 2018; Trad et al., 2017). No Brasil, a incidência de CHC cumulativa de cinco anos em pacientes cirróticos é estimada em 14,3% (Paranagua-Vezozzo et al., 2014). Portanto, as causas para a cirrose estão estreitamente associadas ao risco do desenvolvimento de CHC. Os fatores de risco mais conhecidos são as infecções crônicas pelo vírus da hepatite B (HBV) e pelo vírus da hepatite C (HCV), alcoolismo, fatores relacionados ao metabolismo como diabetes e obesidade, consumo de aflatoxina e fatores relacionados à imunidade do paciente como a hepatite autoimune (Trad et al., 2017).

Atualmente, a esteatose hepática não alcoólica (NAFLD) também é considerada um importante fator de risco, uma vez que a NAFLD pode ocasionar a esteato-hepatite não alcoólica (NASH) e posteriormente a cirrose (Younossi et al., 2016). A NAFLD é associada à obesidade, diabetes mellitus e a outros fatores relacionados ao metabolismo. Cerca de 25% dos indivíduos adultos apresentam NAFLD (Younossi et al., 2016) e 2 a 3% apresentam NASH (Neuschwander-Tetri, 2005). A prevalência de NASH em pacientes obesos pode variar de 20 a 80% (Donato et al., 2006; Gholam et al., 2007; Huang et al., 2007). A progressão de NASH para cirrose ocorre em 41% dos casos e a incidência anual de CHC em indivíduos com NASH é de aproximadamente 5,3% (Younossi et al., 2016). No Brasil, 52,7% dos pacientes com CHC por NASH apresentam obesidade e 73,6% apresentam diabetes (Cotrim et al., 2016).

As infecções pelo HBV e HCV são responsáveis por aproximadamente 76% dos casos de CHC no mundo (Maucort-Boulch et al., 2018). De forma geral, mais de um quarto dos casos de câncer causados por agentes infecciosos no mundo são atribuídos ao HBV e HCV (figura 5) (Plummer et al., 2016). Atualmente, a infecção crônica pelo HBV é a principal causa de CHC no mundo (Maucort-Boulch et al., 2018; Plummer et al., 2016), entretanto com o aumento da cobertura vacinal, é esperado que os casos de CHC por HBV diminuirão significativamente nas próximas décadas (Zidan et al., 2012). Nos países em desenvolvimento, aproximadamente 67% do CHC tem como causa o HBV e nos países desenvolvidos, cerca de 23%, enquanto o HCV é responsável por aproximadamente 12% dos casos de CHC em países em desenvolvimento e cerca de 44% em países desenvolvidos (Maucort-Boulch et al., 2018). O risco de CHC é aumentado de 5 a 15 vezes em portadores

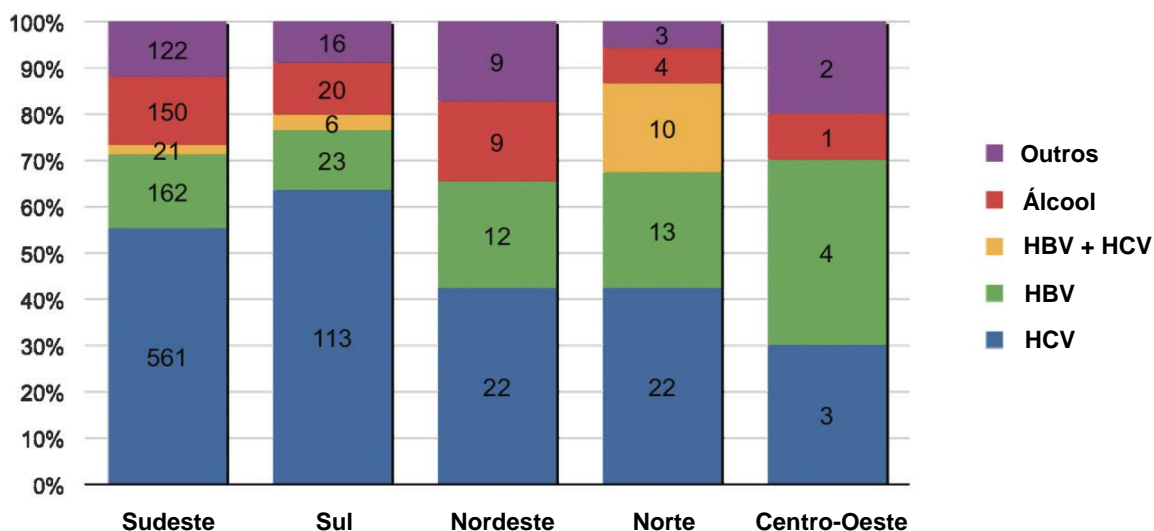
crônicos do HBV e de 11,5 a 17 vezes em pacientes infectados com o HCV (Tsai&Chung, 2010). A coinfeção com HBV e HCV confere um aumento no risco do desenvolvimento do CHC quando comparada com a monoinfeção por um destes vírus. Além disso, o CHC parece se desenvolver mais rapidamente nos casos de coinfeção com HBV e o vírus da hepatite Delta (HDV) (Fattovich et al., 2000; Gomaa et al., 2008; Tamura et al., 1993). O mesmo ocorre nos casos de coinfeção do HIV e HCV (Gomaa et al., 2008).



**Figura 5 - Principais agentes infecciosos associados ao câncer no mundo em 2012.**

Dados obtidos do banco de dados online Cancers Attributable to Infections da IARC Disponível em: <<http://gco.iarc.fr/infections>>. Acesso em: 5 janeiro 2018. (Figura adaptada).

Na América do Sul, o fator de risco mais importante é a infecção crônica pelo HCV (47%), seguida de alcoolismo (22%), infecção pelo HBV (14%) e NAFLD (9%), segundo estudo recente que analisou 14 centros de saúde de seis países (Debes et al., 2018). Mais especificamente no Brasil, um estudo de grande abrangência que incluiu um total de 1.405 pacientes com diagnóstico de CHC de diferentes regiões brasileiras, revelou que 54% dos casos de CHC tinham como agente etiológico a infecção pelo HCV, 16% a infecção pelo HBV e 14% o alcoolismo. No entanto, a prevalência desses agentes etiológicos varia de acordo com a região do Brasil (figura 6). A infecção pelo HCV é o agente etiológico mais comum na região Norte e Nordeste, sendo predominante na região Sul e Sudeste, enquanto a infecção pelo HBV é o agente etiológico mais comum na região Centro-Oeste. Neste estudo, foi observada uma prevalência de 98% de cirrose nos pacientes brasileiros com CHC (Carrilho et al., 2010).



**Figura 6 - Principais agentes etiológicos para o carcinoma hepatocelular no Brasil de acordo com as regiões geográficas.**  
(Carrilho et al., 2010).

Poucos estudos analisaram a dinâmica dos fatores de risco no Brasil, estando estes concentrados na região Sul e Sudeste. Um estudo recente em Porto Alegre, região Sul do Brasil, analisou 75 pacientes com CHC em um estudo retrospectivo de dez anos, e observou que o principal fator de risco foi a infecção pelo HCV, presente em 66,7% dos indivíduos, seguido do alcoolismo, presente em 21,3%, a infecção pelo HBV, presente em apenas 2,7% e NASH presente em 1,3% (Appel-Da-Silva et al., 2016).

Na região Sudeste, um estudo realizado em São Paulo analisou prospectivamente 72 pacientes com CHC durante pelo menos cinco anos. O principal fator de risco observado foi a infecção pelo HCV (65,3%), seguida da infecção pelo HBV (22,2%), alcoolismo (6,9%) e NASH (1,4%) (Paranagua-Vezozzo et al., 2014). Um segundo estudo em São Paulo analisou 130 pacientes com CHC e observou a infecção pelo HCV como principal fator de risco (56,8%), seguido do alcoolismo (19,8%), infecção pelo HBV (15,3%) e NASH (0,9%) (Teixeira et al., 2012). Teixeira e colaboradores observaram resultados semelhantes em um segundo estudo do grupo (Teixeira et al., 2013a). Outro estudo realizado em Minas Gerais, analisou dados de 215 pacientes em um estudo retrospectivo de doze anos. O principal fator de risco foi a infecção pelo HCV com 43% dos casos, seguida de alcoolismo com 32% e da infecção pelo HBV com 23% (Osorio et al., 2013). Por fim, um estudo no Espírito Santo analisou 274 pacientes e observou que, diferente dos outros estados do Sudeste, o principal fator de risco foi a infecção pelo HBV

(37,6%), seguida da infecção pelo HCV (24,6%), alcoolismo (17,1%) e NASH (2,6%) (Goncalves et al., 2014).

Mais estudos nas regiões Norte, Nordeste e Centro-Oeste são necessários para compreendermos melhor a diversidade e importância da ocorrência dos fatores de risco para o CHC no Brasil.

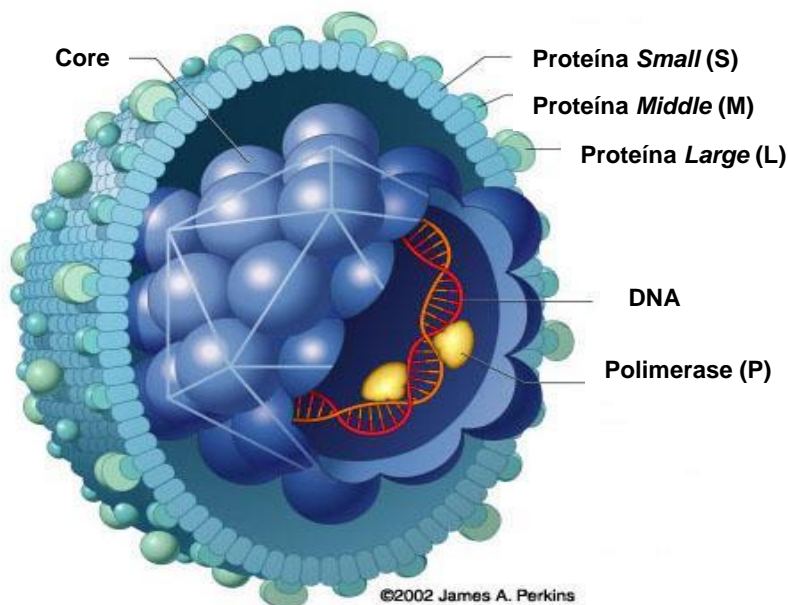
## **1.2 O vírus da hepatite B**

### **1.2.1 Classificação e morfologia do vírus da hepatite B**

O HBV pertence à família *Hepadnaviridae*, dentro da qual se inserem um pequeno número de vírus de DNA que infectam preferencialmente células hepáticas. A família *Hepadnaviridae* engloba dois gêneros: *Orthohepadnavirus*, que incluem os vírus que infectam humanos e outros mamíferos e *Avihepadnavirus*, que incluem os vírus que infectam aves. O HBV pertence ao gênero *Orthohepadnavirus* dentro do qual se inserem vírus que compartilham similaridades em sua organização genômica (Fields et al., 2013; Ictv, 2016).

Dois tipos diferentes de partículas virais são produzidos durante o processo de replicação do HBV. Por meio de análise de microscopia eletrônica de preparações de soro de indivíduos infectados, pode-se observar partículas completas infecciosas e partículas incompletas não infecciosas de dois diferentes formatos: esférico e filamentosos (Mosley et al., 1996).

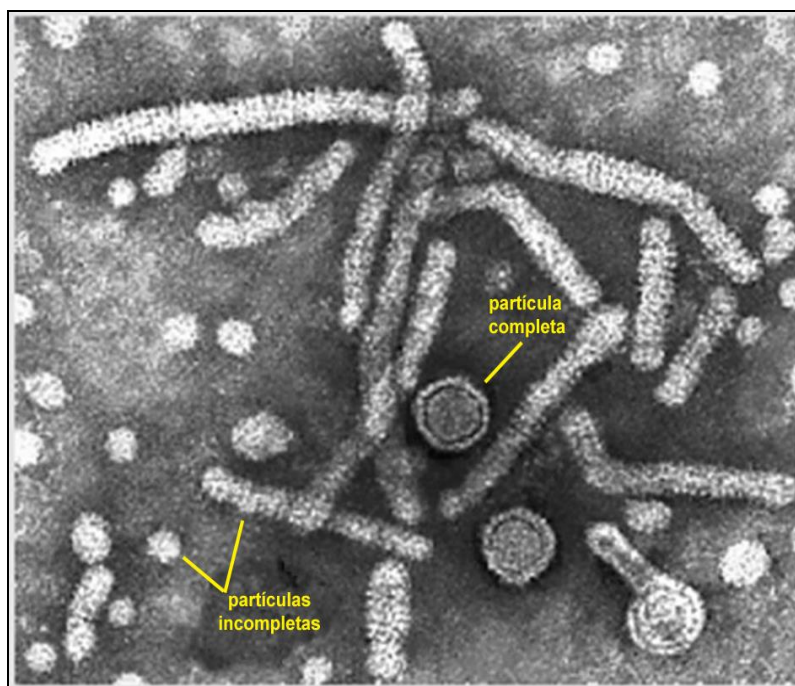
Conhecida como partícula de Dane, a partícula viral completa infecciosa, (figura 7), mede aproximadamente 42 nm e apresenta envelope lipoprotéico contendo glicoproteínas que constituem o seu antígeno de superfície (HBsAg). O HBsAg é composto pelas proteínas S (*Small*), M (*Middle*) e L (*Large*) que estão presentes em quantidades distintas no envoltório viral. A partícula de Dane, quando comparada às partículas não infecciosas, possui um número consideravelmente maior de proteína L, proteína que expõe os sítios de ligação do HBV aos receptores dos hepatócitos. O vírion apresenta um nucleocapsídeo com simetria icosaédrica formado pelo antígeno do core (HBcAg) que contém internamente o genoma do HBV e uma polimerase, fundamental para a replicação viral (Fields et al., 2013).



**Figura 7 - Estrutura do vírus da hepatite B. Modelo da partícula de Dane.**

Disponível em: <<http://people.rit.edu/japfaa/infectious.html>>. Acesso em: 5 janeiro 2018. (Figura adaptada)

Além das partículas virais completas e infecciosas, podem ser encontrados, no soro dos pacientes infectados, as partículas não infecciosas esféricas e as filamentosas, compostas exclusivamente pelo envelope lipoproteico sem o nucleocapsídeo (figura 8). As partículas esféricas possuem cerca de 22 nm de diâmetro, enquanto as filamentosas possuem, aproximadamente, a mesma largura das esféricas e comprimento variável. Tais partículas se apresentam em concentrações superiores a  $10^{12}$  partículas por ml de soro (Fields et al., 2013). Apesar de não gerarem infecção, essas partículas são imunogênicas. Dessa forma, funcionam como um mecanismo de escape viral da resposta humoral do hospedeiro, uma vez que os anticorpos neutralizantes (anti-HBs) produzidos seriam adsorvidos majoritariamente por essas partículas, devido a sua alta concentração no plasma sanguíneo (Rizzetto, 1998).



**Figura 8 - Microscopia eletrônica das partículas infecciosas e não infecciosas do vírus da hepatite B.**

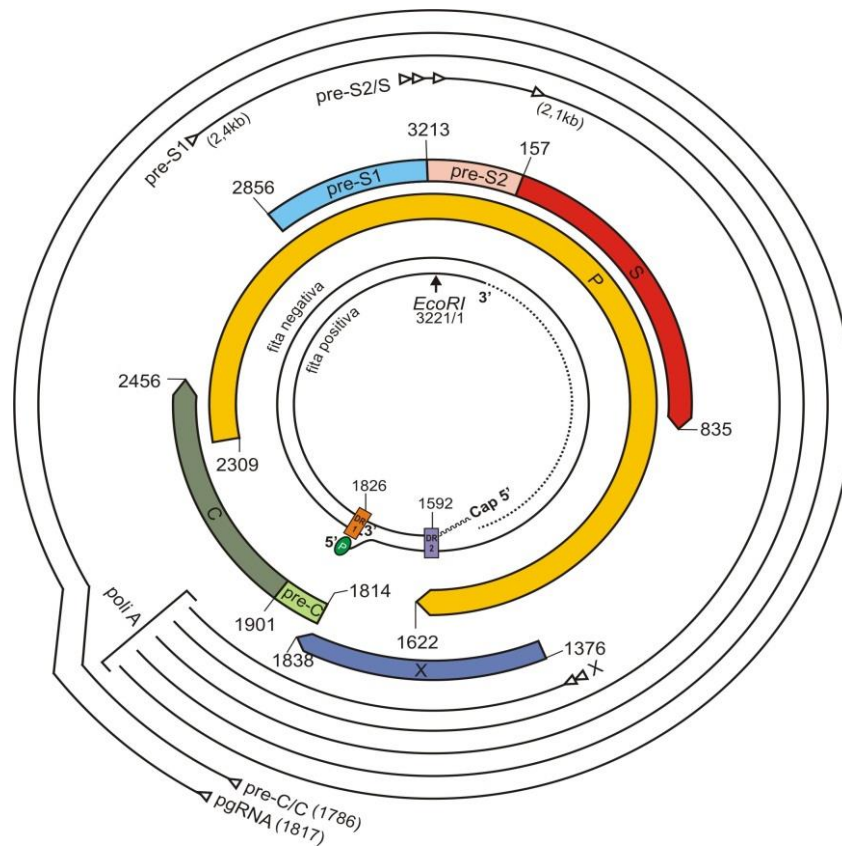
Disponível em: <<http://www.virology.uct.ac.za/vir/teaching/mbchb/hepatitis>>. Acesso em 5 janeiro 2018. (Figura adaptada)

### **1.2.2 Organização genômica do vírus da hepatite B**

O HBV possui genoma composto por uma molécula de DNA circular, parcialmente fita dupla, com aproximadamente 3.200 pares de base (pb), sendo considerado um dos menores genomas dentre os vírus que infectam o homem. Sua molécula de DNA é composta por duas fitas não simétricas: uma fita mais longa, a qual é complementar aos RNAs virais e por convenção possui polaridade negativa (fita negativa) e uma fita de polaridade positiva. Na fita de polaridade positiva, a posição da extremidade 5' terminal é fixa, enquanto que a posição da extremidade 3' terminal é variável. Desta maneira, o comprimento da fita positiva varia de 50% a 90% do comprimento da fita complementar (Fields et al., 2013; Ganem, 1996).

O genoma do HBV é altamente compactado e contém quatro fases de leitura abertas (*open reading frames* – ORFs) codificando o envelope viral (ORF pré-S/S), o core da partícula e o antígeno HBeAg (ORF pré-C/C), a polimerase viral (ORF P) e a proteína regulatória X (ORF X). As ORFs são parcialmente sobrepostas e não apresentam regiões não-codificantes (figura 9). Tal sobreposição dos genes permite ao HBV codificar 50% mais proteínas do que seria esperado devido ao tamanho reduzido de seu genoma (Fields et al., 2013; Heermann et al., 1984).





**Figura 9 - Modelo esquemático da organização genômica do vírus da hepatite B** (Gomes, 2003)

A ORF pré-S/S é responsável pela síntese das proteínas que constituem o envelope viral, o HBsAg, e pode ser estruturalmente e funcionalmente dividida em pré-S1, pré-S2 e S. Essa ORF apresenta três códons de iniciação que originam três proteínas. A maior delas é a proteína L (*Large*) cujo códon de iniciação está localizado no início da região pré-S1 e é codificada pelas regiões pré-S1, pré-S2 e S. A proteína de tamanho intermediário, proteína M (*Middle*), é codificada pelas regiões pré-S2 e S, enquanto que é a partir do códon de iniciação localizado no início da região S que a menor proteína (*Small*) é sintetizada. Essas proteínas apresentam o mesmo códon de terminação localizado no final da região S e estão distribuídas em proporções desiguais entre os diferentes tipos de partículas virais (Fields et al., 2013; Heermann et al., 1984). É comum a ocorrência de deleções na região pré-S/S do HBV em pacientes com CHC (Li-Shuai et al., 2017). Uma metanálise recente mostrou associação dessa deleção com o desenvolvimento de CHC (Wang et al., 2015).

A ORF pré-C/C é considerada a região mais conservada do genoma, dentre as quatro ORFs. Essa ORF possui dois códons de iniciação na mesma fase de leitura, separados por uma região de 87 pb chamada pré-core. Os dois principais



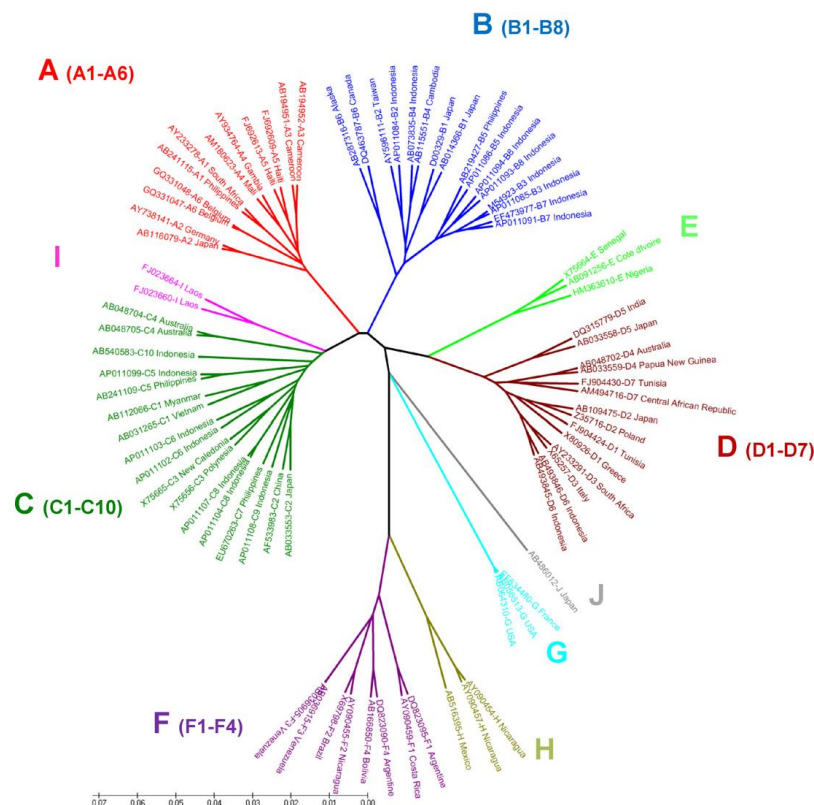
produtos gênicos são gerados por tradução alternada. Quando o códon de iniciação do core (segundo ATG) é traduzido, leva diretamente à síntese da proteína do core HBcAg, com 21kD, que é automontada no citoplasma para formar o nucleocapsídeo viral. Quando a síntese de proteínas começa no ATG da região pré-core (primeiro códon de iniciação), uma proteína precursora, com 25kD, é sintetizada e secretada com concomitante processamento nas extremidades amino e carbóxi-terminal resultando em uma proteína de 17kD, o antígeno HBe (HBeAg) (Bhat et al., 1990; Fields et al., 2013).

Cobrimdo cerca de  $\frac{3}{4}$  do genoma total e sobreposta a todos os demais genes, a ORF P constitui a sequência mais extensa e codifica uma enzima com atividade de DNA polimerase-DNA dependente, de transcriptase reversa e de RNase H. A ORF P difere de um nucleotídeo em relação à ORF pré-S/S. Existem quatro domínios na polimerase viral: o domínio amino-terminal, que atua como proteína-terminal ou primase, o qual é necessário para o início da síntese da fita de DNA de polaridade negativa; uma região conhecida como espaçadora, que aparentemente não possui nenhuma função em particular; o domínio da transcriptase reversa e o domínio C-terminal, que possui atividade de RNase H. Existe uma homologia entre a polimerase do HBV e outras transcriptases reversas. Estas enzimas compartilham o motivo Tyr-Met-Asp-Asp (YMDD), que é essencial para tal atividade (Fields et al., 2013; Gomes, 2003).

A ORF X codifica a proteína viral HBx, um regulador viral multifuncional que modula o processo de transcrição, participa de diversas vias de sinalização, degradação de proteínas e resposta celular a estresses, atribuições que afetam a replicação e a proliferação viral direta ou indiretamente (Fields et al., 2013; Murakami, 2001). A interação da proteína viral HBx com proteínas do hospedeiro afeta vias biológicas importantes associadas a oncogênese levando ao CHC. Além disso, a integração de sequências da região X do HBV no genoma do hospedeiro promove a instabilidade genética através de uma variedade de mecanismos e é um evento frequente em casos de CHC (Lee et al., 2011a; Xu et al., 2017). Outro mecanismo com potencial oncogênico inclui a interação com a DNA metiltransferase (DNMT) induzindo modificações epigenéticas anômalas associadas ao CHC (Park et al., 2007; Zheng et al., 2009).

### **1.2.3 Variabilidade do vírus da hepatite B**

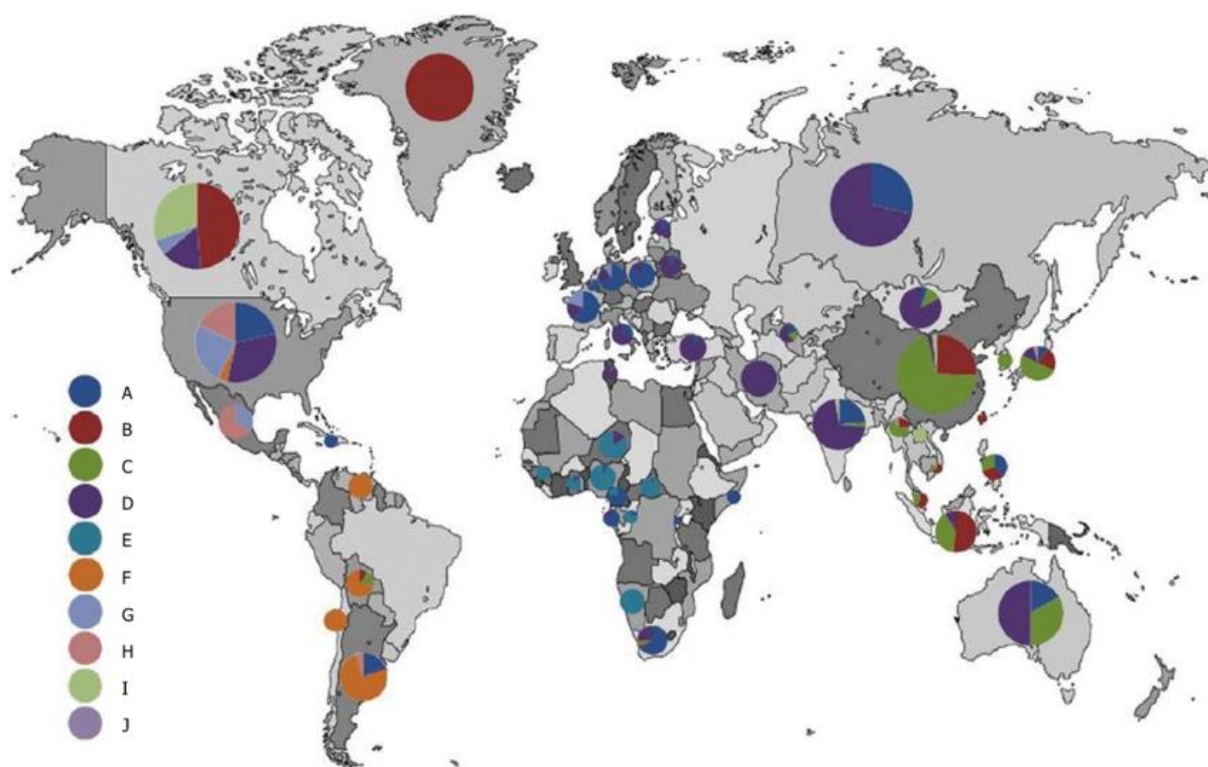
Tradicionalmente, o HBV é classificado em 8 genótipos bem conhecidos (A-H) baseando-se na divergência maior que 8% do genoma completo das cepas virais (Araujo et al., 2011; Sunbul, 2014). Mais recentemente, dois novos genótipos foram propostos, genótipo I (Olinger et al., 2008) e genótipo J (Tatematsu et al., 2009) (figura 10). A classificação do genótipo I parece ser bem aceita (Colson et al., 2009; Santos et al., 2010; Tran et al., 2008; Yu et al., 2010; Zhang et al., 2010b). No entanto, alguns autores acreditam que ainda são necessários mais estudos para que sejam justificadas tais classificações (Cao, 2009; Kurbanov et al., 2010; Liu et al., 2010).



**Figura 10 - Modelo representativo dos genótipos do vírus da hepatite B.**  
 Figura adaptada (Araujo et al., 2011).

Os diferentes genótipos do HBV apresentam distribuição mundial característica, refletindo suas origens e fluxo migratório das populações infectadas (figura 11). O genótipo A é encontrado predominantemente na África, porém está presente também na Europa, Ásia e Américas (Araujo et al., 2011; Kurbanov et al., 2010; Sunbul, 2014). Os genótipos B e C são predominantes na China, Japão e sudeste asiático. O genótipo D é muito difundido pelo mundo, predominando na região mediterrânea e no Oriente Médio. O genótipo E circula na África ocidental e o genótipo F tem sido encontrado no Alasca, América Central e América do Sul e

acredita-se ter se originado de populações aborígenes das Américas. O genótipo H tem sido encontrado na América Central e região meridional dos Estados Unidos. Análises filogenéticas com genomas completos de cepas do HBV encontrados na Nicarágua e Califórnia mostraram que o genótipo H tem grande proximidade genômica com o genótipo F, porém forma um ramo separado, denominado de genótipo H (Arauz-Ruiz et al., 2002; Kay&Zoulim, 2007; Norder et al., 2004; Schaefer, 2007; Sunbul, 2014). O genótipo G foi identificado pela primeira vez em um estudo que analisou amostras de pacientes com hepatite B crônica da França e dos Estados Unidos, porém já foi encontrado em outras regiões como México (Sanchez et al., 2007) e Brasil (Araujo et al., 2013; Bottecchia et al., 2008). Os novos genótipos propostos I e J foram encontrados no Vietnã e Japão, respectivamente.

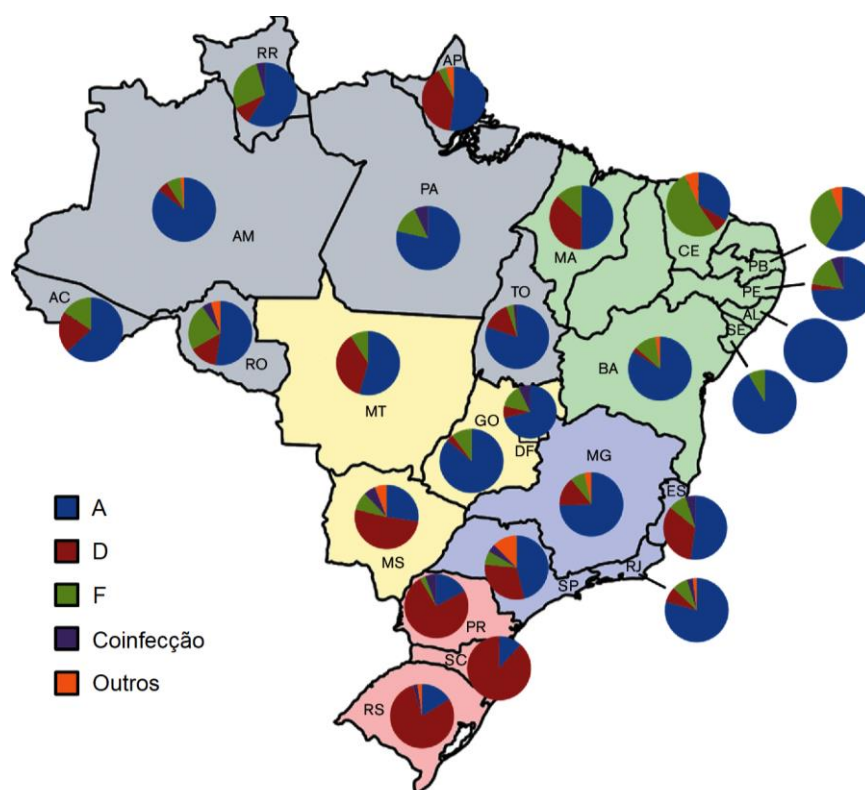


**Figura 11 - Distribuição global dos genótipos do vírus da hepatite B.** (KURBANOV *et al.*, 2010).

A maioria dos genótipos é dividida em subgenótipos com propriedades virológicas e epidemiológicas características (Schaefer, 2007). É aceito como critério para identificação de um subgenótipo, uma divergência que exceda 4%, porém não ultrapasse 8% na sequência de seu genoma completo. Quando a divergência é menor que 4% deve ser designado como clado (Sunbul, 2014). O genótipo A é subdividido em pelo menos seis subgenótipos (A1-A6), oito para o genótipo B (B1-

B8), dez para o genótipo C (C1-C10), sete para o genótipo D (D1-D7) e quatro para o genótipo F, alguns subdivididos em clados (F1a, F1b, F1d, F2a, F2b, F3 e F4). O genótipo E, assim como o genótipo G, H, I e J não possuem subgenótipos (Araujo et al., 2011; Chayama&Hayes, 2011).

No Brasil, os genótipos mais comumente encontrados são A, D e F, entretanto, os genótipos B, C, E e G circulam em menores proporções, o que reflete o alto grau de miscigenação da população brasileira (figura 12). Um recente estudo multicêntrico, que analisou amostras de 24 dos 26 estados e Distrito Federal, mostrou que o genótipo A é o mais prevalente com 58,7%, seguido do genótipo B com 23,4% e genótipo F com 11,3% (Lampe et al., 2017). Em relação a subgenótipos, Mello e colaboradores analisaram amostras HBsAg positivas em doadores de sangue das cinco regiões geográficas do Brasil encontrando os subgenótipos A1 ao A4, D1 ao D5 e subgenótipos F1, F2, F4. Neste estudo, foi encontrada uma maior prevalência do genótipo A, com predomínio do subgenótipo A1 (90%) (Mello et al., 2007), corroborando os resultados encontrados em um estudo anterior (Araujo et al., 2004).



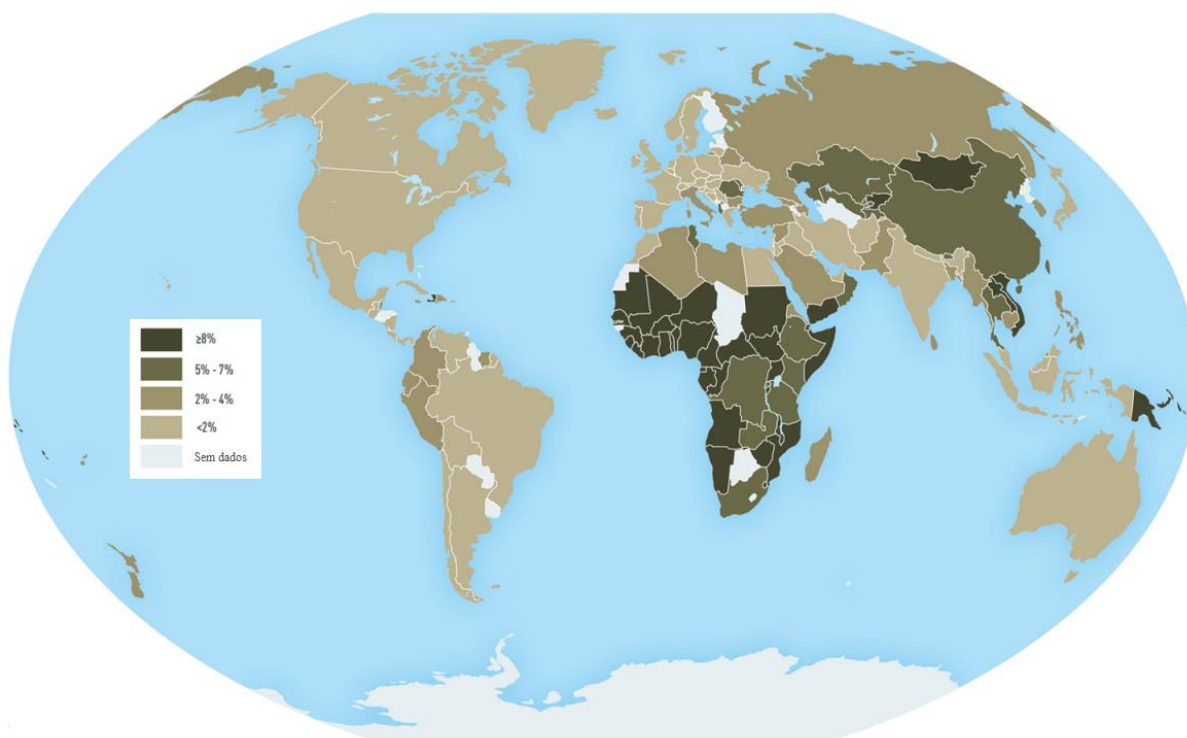
**Figura 12: Distribuição dos genótipos do vírus da hepatite B no Brasil.**  
Figura adaptada (Lampe et al., 2017).

As diferentes variantes virais do HBV influenciam na progressão da doença hepática de maneiras distintas. Em regiões geográficas onde os genótipos B e C do HBV são mais frequentes, o genótipo C tem sido associado a um maior risco de desenvolvimento de CHC (Wong et al., 2013). O genótipo C apresenta uma maior eficiência de integração no genoma do hospedeiro o que aumenta a instabilidade genômica, aumentando o risco de hepatocarcinogênese (Xu et al., 2017). As infecções pelo genótipo F (Livingston et al., 2007) e subgenótipo A1 (Kew et al., 2005) também já foram associadas a uma maior incidência de CHC.

#### **1.2.4 Epidemiologia da infecção pelo vírus da hepatite B**

A infecção causada pelo HBV consiste em um dos principais problemas de saúde pública mundial. Especula-se que sua infecção crônica atinja mais de 257 milhões de pessoas (Who, 2017a). É considerada uma das principais causas de doença hepática no mundo, com importância ainda maior devido aos altos índices de mortalidade e morbidade associados à doença (Menendez et al., 1999). Estima-se que ocorram, anualmente, 880.000 óbitos em função de alguma doença hepática relacionada ao HBV (Who, 2017a). No Brasil, a estimativa confirmada pelo Ministério da Saúde em 2016 é de aproximadamente 14.199 casos notificados para a infecção pelo HBV, sendo 217 casos apenas na cidade do Rio de Janeiro (Brasil, 2017).

A prevalência da infecção causada pelo HBV varia de acordo com a localização geográfica. O estado epidemiológico de um país, referente à infecção pelo HBV, depende de fatores socioeconômicos, da proporção de indivíduos com estilos de vida de risco, da disponibilidade da vacina contra o HBV e de medidas de higiene (Magnius&Norder, 1995). Tradicionalmente, existem três níveis de classificação de acordo com a endemicidade do HBV. Regiões hiperendêmicas, onde a prevalência do HBsAg é maior que 8%, regiões que apresentam endemicidade intermediária onde a prevalência varia entre 2 e 8% e regiões que apresentam baixa endemicidade onde a prevalência é menor que 2% (figura 13).



**Figura 13 - Prevalência global de infecção pelo vírus da hepatite B.**

Disponível em: <[https://www.cdc.gov/travel-static/yellowbook/2018/map\\_3-04.pdf](https://www.cdc.gov/travel-static/yellowbook/2018/map_3-04.pdf)>. Acesso em: 5 janeiro 2018. (Figura adaptada).

Regiões com altas taxas de prevalência são observadas na Ásia e África subsaariana. Prevalências intermediárias são encontradas na Ásia Central e parte do Oriente Médio, enquanto as regiões de baixa prevalência estão nos países da Europa, América do Norte e grande parte da América Latina (Who, 2017a).

No Brasil, a prevalência do marcador de infecção presente pelo HBV (HBsAg) é de 0,37% da população, segundo o último Inquérito Nacional das Hepatites Virais no Brasil, sendo classificado como um país de baixa endemicidade para a infecção pelo HBV (Brasil, 2010).

Um estudo que analisou uma amostragem representativa (7.881 indivíduos) da população no Nordeste, Centro Oeste e Distrito Federal mostrou que, nessas regiões, a prevalência de HBsAg não chegou a 1%, permitindo classificá-las como áreas de baixa endemicidade para o HBV (Pereira et al., 2009).

Segundo o último inquérito nacional do Ministério da Saúde realizado em 2010, a região Norte apresentou uma prevalência média variando de 0 a 0,9% de acordo com a faixa etária, a região Nordeste apresentou uma prevalência média de acordo com a faixa etária variando de 0,1 a 0,5%, a região Centro Oeste apresentou uma prevalência média de acordo com a faixa etária variando de 0,2 a 0,8%, a região Sudeste apresentou uma prevalência média de acordo com a faixa etária



variando de 0 a 0,4%, já região Sul apresentou uma prevalência média de acordo com a faixa etária variando de 0,2 a 0,6%, enquanto o Distrito Federal apresentou uma prevalência média de acordo com a faixa etária variando de 0,2 a 0,4% (Brasil, 2010).

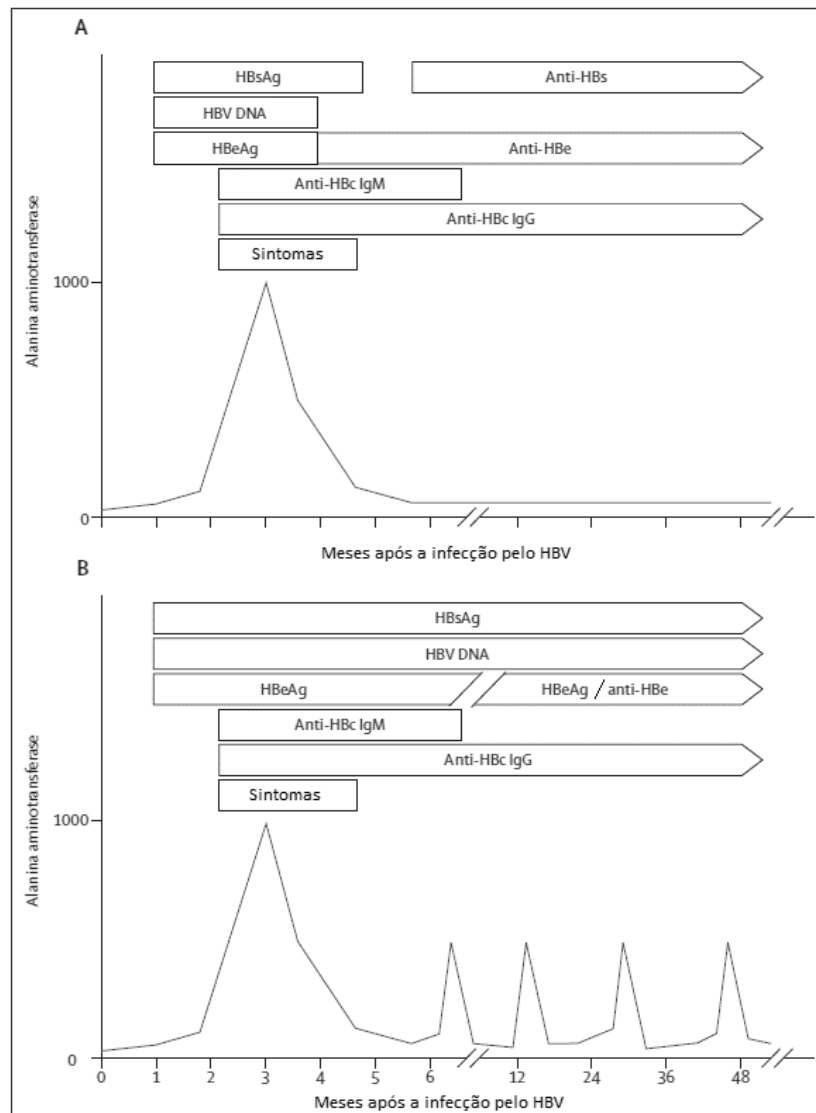
### **1.2.5 Aspectos clínicos e laboratoriais da infecção pelo vírus da hepatite B**

A infecção pelo HBV pode causar hepatite aguda, fulminante ou crônica. Indivíduos que desenvolvem hepatite crônica podem evoluir para um quadro clínico de cirrose hepática ou CHC (Fields et al., 2013). O HBV não ocasiona efeito citopático diretamente. As lesões hepáticas são provocadas pelo sistema imune do hospedeiro que produz os dois tipos de resposta, humoral e celular, diante da infecção pelo vírus, causando lesão ou necrose hepatocelular características da hepatite B. Durante a infecção pelo HBV são produzidos os antígenos HBsAg e HBeAg e os anticorpos anti-HBs, anti-HBe e anti-HBc IgM/IgG, que se apresentam de maneira diferente de acordo com a situação clínica do indivíduo (Trepo et al., 2014).

A hepatite B aguda (figura 14A) é caracterizada pela presença do antígeno de superfície viral, HBsAg, pelo surgimento de anticorpos anti-HBc da classe IgM, pela detecção do DNA do HBV e pela presença do HBeAg, antígeno indicador de replicação viral ativa no soro do paciente. A sintomatologia inicia-se juntamente com a elevação dos níveis das aminotransferases (ALT e AST) e bilirrubina no soro, entretanto a maior parte dos indivíduos, estimado em 70%, são assintomáticos. Durante o período de convalescença, os antígenos HBsAg e HBeAg tendem a desaparecer e surgem os anticorpos anti-HBe, anti-HBc IgG e anti-HBs. Os títulos de anti-HBc IgM decaem ao passo que os títulos de anti-HBc IgG aumentam, normalmente permanecendo detectáveis por toda a vida. Apenas uma pequena parcela evolui para a hepatite fulminante devido à morte maciça de hepatócitos por ação imunocitopática (Abara et al., 2017; Trepo et al., 2014).

A hepatite B crônica é definida pela persistência de HBsAg no soro por mais de 6 meses após a exposição ao vírus (figura 14B). Normalmente, 90% recém-nascidos infectados pelo vírus evoluem para a cronicidade, enquanto em adultos, apenas 5%. Os níveis de anti-HBc IgM tornam-se indetectáveis, permanecendo a detecção do DNA do HBV e dos anticorpos anti-HBc IgG, que persiste por toda a vida. O antígeno HBeAg, indicador de replicação viral e as manifestações clínicas evoluem conforme a interação do vírus com o hospedeiro. O aparecimento de

anticorpos anti-HBe corre em 10 a 20% após um ano de infecção. A progressão da doença hepática para cirrose em portadores crônicos para o HBV é estimada em 15 a 30% dos casos e a progressão para o CHC ocorre em 2 a 3% por ano (Abara et al., 2017; Trepo et al., 2014).



**Figura 14 - Perfil sorológico da hepatite B.**

**A.** Infecção aguda. **B.** Infecção crônica. Figura adaptada. (Trepo et al., 2014).

Uma vez que, na maior parte dos casos, a infecção pelo HBV não gera sintomas clínicos, o diagnóstico é normalmente realizado através de exames laboratoriais por meio de técnicas sorológicas e moleculares. Os testes sorológicos consistem na detecção de antígenos e anticorpos do HBV normalmente realizados por meio de testes imunoenzimáticos, como o ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay). Esses testes são frequentemente utilizados devido ao menor custo e maior eficiência. Apresentam excelente sensibilidade e especificidade, sendo maior que 94



e 97%, respectivamente. A ausência ou presença de um ou mais marcadores sorológicos podem indicar as diferentes fases da infecção pelo HBV (fase aguda ou crônica), determinar se o indivíduo é imune ao vírus, como resultado de infecção prévia ou vacinação ou, ainda, se é suscetível à infecção (tabela 1) (Abara et al., 2017; Villar et al., 2015).

**Tabela 1 - Interpretação dos marcadores sorológicos da infecção pelo vírus da hepatite B.**

Marcadores Sorológicos				Interpretação Sorológica
HBsAg	anti-HBc	anti-HBc IgM	anti-HBs	
Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Susceptíveis
Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Vacinados
Positivo	Positivo	Positivo	Negativo	Infecção aguda
Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Infecção crônica
Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Imunidade após contato
Negativo	Positivo	Negativo	Negativo	Provável infecção resolvida Falso positivo para anti-HBc Infecção oculta Resolvendo infecção aguda

O marcador sorológico HBsAg indica infecção presente pelo vírus e é frequentemente utilizado para o diagnóstico. A detecção do marcador anti-HBs é geralmente interpretado como indicativo de recuperação e imunidade contra hepatite B. A detecção do anti-HBs como marcador isolado indica vacinação contra o HBV. A detecção de anti-HBc indica infecção aguda ou crônica pelo HBV. A hepatite B aguda caracteriza-se pela detecção do antígeno HBsAg, de anticorpos anti-HBc da classe IgM e do HBeAg. Quando os anticorpos anti-HBc da classe IgM tornam-se indetectáveis, permanecendo a detecção de anti-HBc total e de HBsAg por mais de 6 meses caracteriza-se a infecção crônica pelo HBV. A detecção dos anticorpos anti-HBc e anti-HBs de maneira concomitante caracteriza um quadro clínico de imunidade gerada a partir de um contato prévio com o HBV. Já a detecção apenas de anti-HBc pode ser interpretada como uma infecção resolvida. A ausência de qualquer marcador sorológico da infecção pela hepatite B em testes sorológicos indica que esses indivíduos estão suscetíveis à infecção, sendo necessária a vacinação dos mesmos como meio de prevenção à doença (Abara et al., 2017; Trepo et al., 2014; Villar et al., 2015).

Por outro lado, métodos de diagnóstico laboratoriais moleculares, como ensaios de amplificação por reação em cadeia da polimerase (PCR), podem ser utilizados para detectar o material genético do HBV no soro ou fígado de pacientes. Os testes moleculares apresentam alta especificidade e sensibilidade, podendo

chegar a 6 IU/mL, no entanto, são relativamente mais caros. Esses métodos possuem uma série de vantagens como permitir a quantificação da carga viral, o monitoramento da eficácia do tratamento, a identificação de mutações de escape ao tratamento, a genotipagem viral, além da detecção de infecção em casos de pacientes HBsAg negativos. Podem ser utilizados métodos qualitativos ou quantitativos, este último utilizando PCR em tempo real, por exemplo (Villar et al., 2015).

A persistência do genoma viral em indivíduos que são negativos para o HBsAg foi primeiramente reportada em 1978, sendo caracterizada como hepatite B oculta (Hoofnagle et al., 1978). A hepatite B oculta é definida pela detecção do DNA do HBV em tecido hepático, independente da detecção em soro, em indivíduos HBsAg negativos. A infecção oculta pelo HBV pode ocorrer mesmo com a presença de outros marcadores da infecção, entretanto a ausência total dos marcadores é frequentemente encontrada em mais de 20% dos casos de infecção oculta pelo HBV. A não detecção do HBsAg pode ter como motivo a ocorrência de baixos níveis de replicação do vírus ocasionando produção insuficiente de HBsAg para a detecção em ensaios sorológicos, a presença de mutações que diminuíam a afinidade do HBsAg pelos testes comerciais de diagnóstico ou a presença de mutações que possam ser responsáveis pela retenção intracelular do antígeno (Makvandi, 2016; Raimondo et al., 2013).

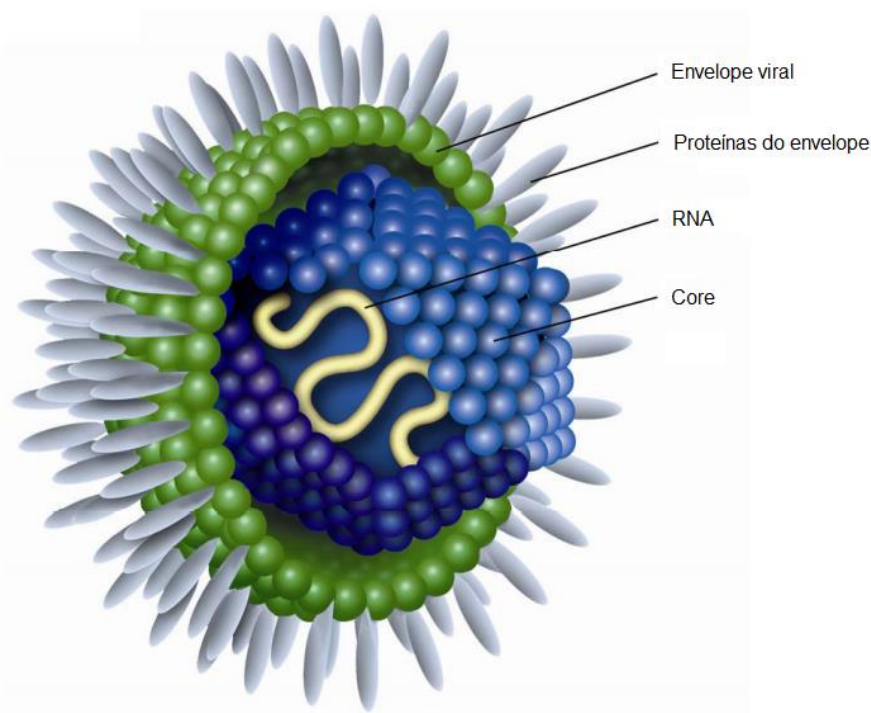
### **1.3 O vírus da hepatite C**

#### **1.3.1 Classificação e morfologia do vírus da hepatite C**

O HCV pertence à família *Flaviviridae*, que engloba vírus que compartilham similaridades na sequência de RNA e na organização genômica. A família *Flaviviridae* está dividida em quatro gêneros: *Flavivirus*, *Pegivirus*, *Pestivirus* e *Hepacivirus*. O HCV pertence ao gênero *Hepacivirus* (Ictv, 2016; Thiel et al., 2005).

O HCV foi caracterizado em 1989 por dois grupos de pesquisadores (Choo et al., 1989; Kuo et al., 1989). É composto por partículas esféricas medindo aproximadamente 30 a 80 nanômetros (nm) de diâmetro, possui um envelope lipídico, onde são encontradas as glicoproteínas virais E1 e E2, e um nucleocapsídeo com simetria icosaédrica formado pela proteína do Core que contém

o genoma de RNA de fita simples de polaridade positiva (figura 15) (Fields et al., 2013).



**Figura 15 - Estrutura do vírus da hepatite C.**  
Figura adaptada (Krekulova et al., 2006).

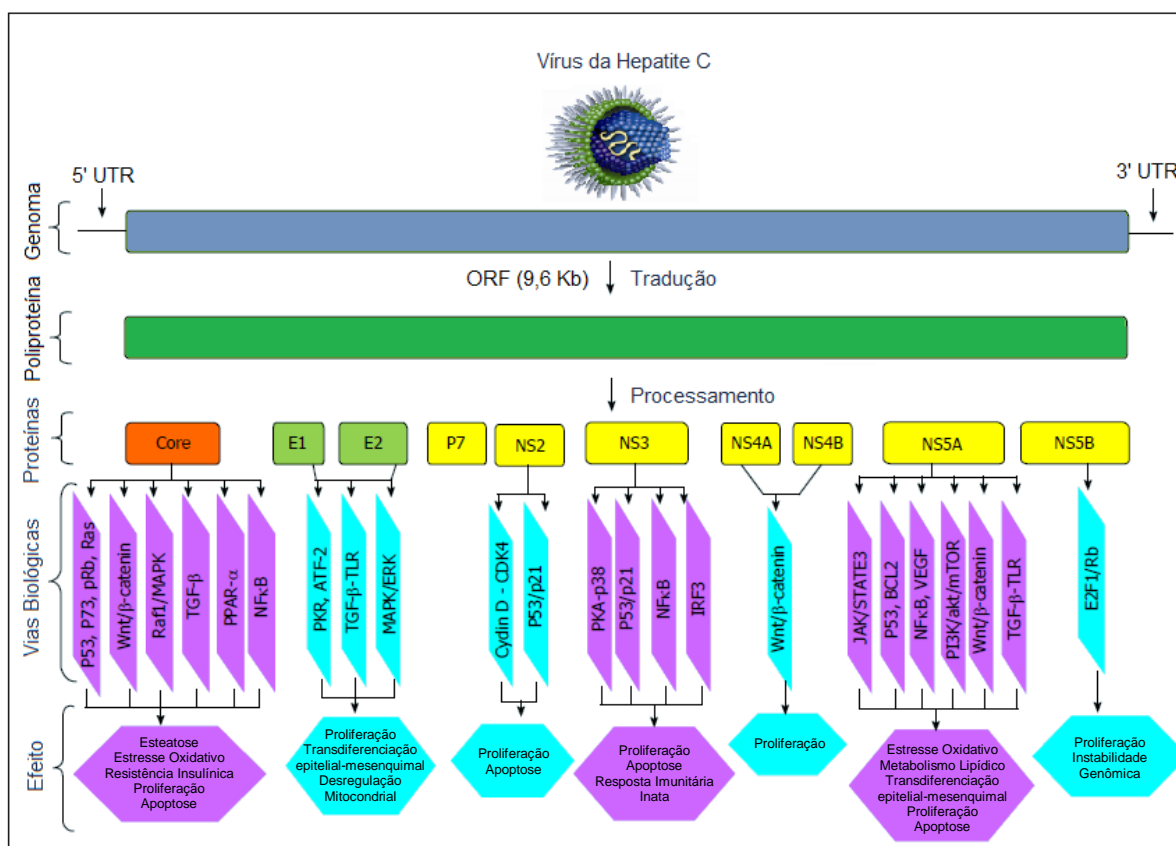
### **1.3.2 Organização genômica do vírus da hepatite C**

O genoma do HCV é composto por uma fita simples de RNA de polaridade positiva, atuando como um RNA-mensageiro, constituído por aproximadamente 9.600 nucleotídeos (figura 16). Sua estrutura genômica contém uma única fase de leitura aberta (ORF – Open reading frame) flanqueada em ambas as extremidades pelas regiões 5' e 3' não traduzíveis (UTRs – untranslated regions), que apresentam estruturas altamente conservadas entre as diferentes variantes de HCV. Tais estruturas apresentam funções importantes nas etapas de tradução e replicação do RNA genômico (Bartenschlager et al., 2004; Irshad et al., 2017).

A região genômica 5'UTR, constituída de aproximadamente 340 nucleotídeos, apresenta uma série descontínua de quatro domínios, denominados pelos números de I a IV. Esses domínios apresentam estruturas secundárias que fazem parte do sítio interno de entrada ribossomal (IRES – Internal ribosome entry site), responsável pela tradução da poliproteína que dará origem às proteínas estruturais e não estruturais (Lukavsky, 2009). Os domínios II e III são os principais domínios do IRES (sítio interno de entrada ribossomal), possuindo elementos estruturais essenciais para a tradução da fase de leitura aberta (Ji et al., 2004; Kieft et al., 1999).

A região genômica 3'UTR apresenta uma estrutura tripartida composta por uma pequena região genótipo-específica altamente variável de aproximadamente 40 nucleotídeos localizada próxima ao códon de terminação da ORF, um trecho formado somente por pirimidina (poli-U ou poli-UC) de tamanho variável e uma região altamente conservada, com cerca de 98 nucleotídeos, denominada cauda X (X-tail), que apresenta 3 estruturas secundárias, também conhecido como replicativo intermediário e parecem estar envolvidas na síntese do RNA fita negativa (Kolykhalov et al., 1996; Krekulova et al., 2006; Tanaka et al., 1996).

A única poliproteína, sintetizada pela tradução do RNA genômico, é clivada pelas proteases virais e celulares, dando origem a três proteínas estruturais e seis não estruturais (figura 16). As proteínas estruturais compreendem o nucleocapsídeo (core e genoma) e as glicoproteínas do envelope 1 (E1) e 2 (E2). As proteínas não estruturais (NS – nonstructural) são representadas por: NS2, NS3, NS4a, NS4b, NS5a e NS5b. Entre E2 e NS2 está um canal de íons (uma viroporina) denominada p7 (figura 16) (Irshad et al., 2017; Khaliq et al., 2011).



**Figura 16 - Modelo esquemático da organização genômica e do processamento de proteínas do vírus da hepatite C e das vias biológicas para o desenvolvimento de CHC.**

Figura adaptada (Irshad et al., 2017; Krekulova et al., 2006).

A proteína core é altamente conservada e constitui a estrutura do nucleocapsídeo. Apresenta 191 aminoácidos e é composta por três domínios distintos (I-III) que foram classificados de acordo com a sua hidrofobicidade. O domínio III (aminoácidos 175 ao 191) é uma região altamente hidrofóbica e atua como sequência sinal para a proteína do envelope E1 (Bukh et al., 1994; Krekulova et al., 2006). A interação da proteína core com inúmeras proteínas celulares pode afetar algumas vias biológicas no hospedeiro, podendo levar a esteatose, estresse oxidativo, alterações no metabolismo lipídico, resistência insulínica, proliferação e apoptose, aumentando o risco de CHC (Irshad et al., 2017).

As glicoproteínas E1 e E2 são proteínas transmembranas que constituem o envelope viral e tem um papel fundamental na ligação do vírus ao receptor celular e entrada do vírus na célula hospedeira. As complexas estruturas da E2 são necessárias para a interação com receptores e para a fusão do vírus com a membrana celular (Albecka et al., 2011). Sua localização na superfície viral como um heterodímero facilita a ligação do vírus aos receptores da célula hospedeira (Op De Beeck et al., 2004; Vieyres et al., 2010). As estruturas e funções do dímero E1-E2 são bastante conservadas, reforçando, portanto, a importância das estruturas destas proteínas na infecção viral (Gottwein et al., 2009). Alguns estudos mostraram que essas proteínas virais podem ocasionar, desregulação mitocondrial e transdiferenciação epitelial-mesenquimal e proliferação celular, o que aumenta o risco de desenvolvimento de CHC (Irshad et al., 2017).

A proteína p7 é um polipeptídeo com aproximadamente 63 aminoácidos que se localiza entre a região estrutural (E2) e não estrutural (NS2) do genoma do HCV. A proteína p7 é uma proteína integral de membrana e ainda não está claramente identificada como uma proteína estrutural ou não estrutural. Devido às suas características estruturais, fatores topológicos e atividade na formação de canais de íons na camada lipídica celular, a proteína p7 está incluída na classe das viroporinas (Griffin et al., 2003; Khaliq et al., 2011). Estudos mostraram que a proteína p7 do HCV é dispensável na entrada do vírus na célula e na replicação do RNA, porém, é essencial para a montagem e liberação do vírus infeccioso através dos poros formados na membrana do retículo endoplasmático (Khaliq et al., 2011; Sakai et al., 2003; Steinmann et al., 2007).

A proteína NS2 é uma cisteína-protease de 21 a 23 kDa. Alguns estudos têm demonstrado que a NS2 parece estar envolvida em várias interações com proteínas estruturais e não estruturais as quais incluem E1-E2, p7, NS3 e a NS5A. Tais

interações podem estar associadas ao recrutamento destas proteínas, resultando na montagem da partícula viral (Jirasko et al., 2010; Ma et al., 2011; Stapleford&Lindenbach, 2011). Além disso, alguns estudos sugerem que a NS2 interfere em vias biológicas do hospedeiro, como as do gene TP53, possivelmente contribuindo para o desenvolvimento de CHC (Irshad et al., 2017).

A proteína NS3 é multifuncional e apresenta aproximadamente 69 kDa. Cerca de um terço da porção N-terminal é responsável pela atividade serino-protease que, com o auxílio do co-fator não covalentemente ligado da NS4A, cliva todas as outras proteínas NS nas junções NS3/NS4, NS4A/NS4B, NS4B/NS5A e NS5A/NS5B. Cerca de dois terços da porção C-terminal tem atividade RNA-helicase e nucleotídeo-trifosfatase (NTPase) (Kolykhalov et al., 2000; Lam&Frick, 2006). A atividade protease da NS3/NS4A tem uma importante influência no escape viral do HCV, interferindo na sinalização da resposta antiviral mediada pelo interferon- $\beta$  (Irshad et al., 2017; Seth et al., 2006). Além da interação na via da resposta imunitária, essa proteína viral modula vias de proliferação celular, podendo gerar hepatocarcinogênese (Irshad et al., 2017).

A proteína NS4A, de 8 kDa, é formada por aproximadamente 54 aminoácidos, que atua como um cofator para as atividades proteolíticas da NS3, capaz de clivar o sítio que une as proteínas NS (Bartenschlager et al., 1994; Lin et al., 1995; Wolk et al., 2000). A proteína NS4B é uma proteína integral de membrana de 27 kDa e sua função sido relacionada com a indução de alterações na membrana do retículo endoplasmático onde é formado o complexo de replicação denominado rede membranosa (Brass et al., 2006; Elazar et al., 2004; Lundin et al., 2003). Pouco se sabe sobre a influência dessas proteínas virais no desenvolvimento de CHC, entretanto, parecem estar envolvidas em vias que modulam a proliferação celular (Irshad et al., 2017).

A proteína NS5A é uma fosfoproteína hidrofílica. Sua mobilidade eletroforética permite a distinção de uma forma basicamente fosforilada, de 56 kDa, e outra, hiperfosforilada, de 58 kDa (Krekulova et al., 2006). A NS5A tem sua importância na replicação do RNA e na montagem do vírion (Appel et al., 2008; Tellinghuisen et al., 2008). A fosforilação diferencial da NS5A está associada à regulação da sua própria função durante a replicação do HCV. Além disso, tal mecanismo parece interferir na interação e formação de complexos de proteína com outras proteínas (Evans et al., 2004). A proteína NS5A já foi descrita modulando diversas vias biológicas no hospedeiro que podem levar ao desenvolvimento de CHC, como vias associadas ao

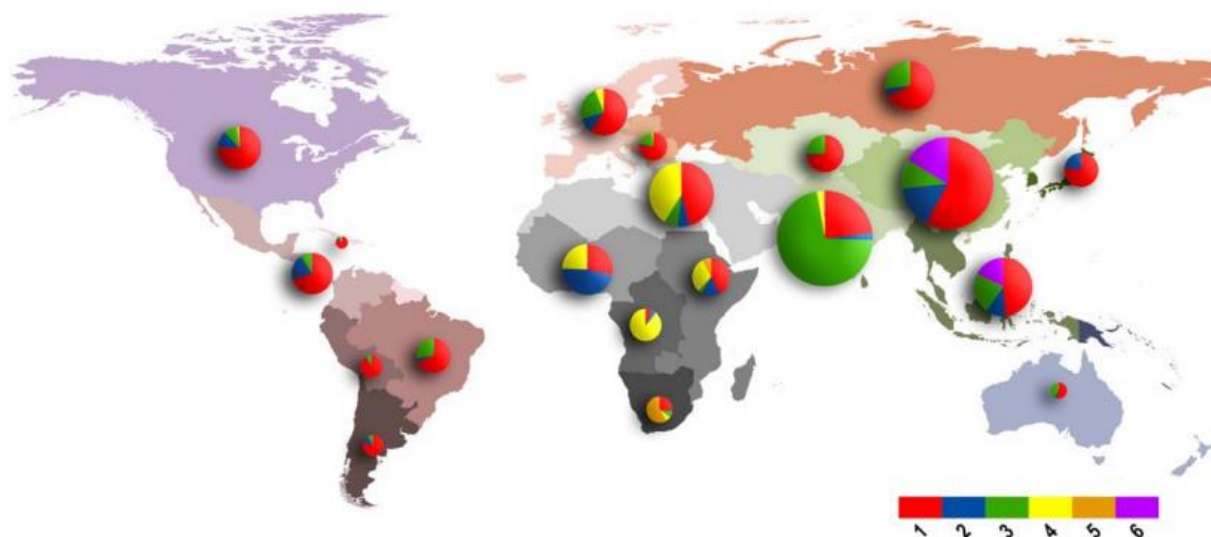
metabolismo lipídico, estresse oxidativo, transdiferenciação epitelial-mesenquimal, proliferação e apoptose (Irshad et al., 2017).

A proteína NS5B, é uma fosfoproteína de 65 kDa, ligada à membrana do retículo endoplasmático, que possui atividade de RNA polimerase RNA dependente (RpRd), e possui um papel essencial no ciclo replicativo do HCV (Krekulova et al., 2006). A RpRd apresenta especial predileção para ligações com segmentos de poli U, presente na extremidade 3' UTR do HCV. A ligação específica da estrutura secundária da enzima com a extremidade 3' do genoma viral garante a iniciação da replicação do genoma completo a partir da região 3' UTR (Friebe et al., 2005). Entretanto, não apresenta a capacidade de correção de erros (*proofreading*) durante a incorporação de nucleotídeos na replicação viral, ocasionando na formação de variantes virais ou quasispecies (McCormick et al., 2006). Além disso, a NS5B tem um importante papel na progressão para o CHC, uma vez que já foi descrita sua modulação na proliferação celular e instabilidade genômica (Irshad et al., 2017)

### **1.3.3 Variabilidade do vírus da hepatite C**

O HCV apresenta grande variabilidade genética devido a sua alta taxa de mutação, estimada em  $2,9-3,4 \times 10^{-2}$  substituições de base por sítio por ano. Dessa maneira, ocorre o aparecimento de subpopulações variantes em um mesmo hospedeiro, geneticamente relacionadas entre si, porém com divergências em sua sequência de nucleotídeos, sendo atribuído o conceito de quasispecies (Sede et al., 2014).

Atualmente, o HCV está classificado em sete genótipos bem conhecidos (1-7) e em muitos subtipos (a, b, c...). As sequências de nucleotídeos do HCV diferem em torno de 15% entre os subtipos, e de 30% a 35% entre os genótipos (Messina et al., 2015). Os diferentes genótipos do HCV apresentam distribuição característica no mundo (figura 17). Enquanto os genótipos 1, 2 e 3 tem ampla distribuição mundial, os genótipos 4, 5 e 6 são mais frequentes na África e sudeste da Ásia. O genótipo 4 é predominante no norte e centro-oeste da África, o genótipo 5 na África do Sul e o genótipo 6 no sudeste da Ásia. O genótipo 7 parece circular apenas no Canadá e África Central (Messina et al., 2015; Thrift et al., 2017).



**Figura 17 - Distribuição global dos genótipos do vírus da hepatite C.**  
 Figura adaptada (Messina et al., 2015).

No Brasil, os genótipos mais comuns são os 1, 2 e 3, mas também já foram identificados em baixas frequências, os genótipos 4 e 5, no Sudeste (Araujo et al., 2014; Campiotto et al., 2005; Lampe et al., 2013; Scalioni et al., 2017). O genótipo 1 é o de maior prevalência em todos os estados. O genótipo 2 foi mais encontrado no Centro-Oeste, enquanto o genótipo 3 na região Sul. De uma forma geral, no Brasil, o genótipo 1 apresenta frequências mais altas (64,0-72,0%), seguido pelo 3 (25-30%) e 2 (2-5%) (Campiotto et al., 2005; Lampe et al., 2013; Martins et al., 1998; Oliveira et al., 1999). Especificamente no Rio de Janeiro, têm sido encontrados os subtipos 1b (39-64%), 1a (25-43%), 3a (9-18%) e eventualmente o 4 (0,9%) (Araujo et al., 2014; De Almeida et al., 2004; Delvaux et al., 2015; Peres-Da-Silva et al., 2012; Scalioni et al., 2017).

Estudos têm demonstrado associação do genótipo 1 com um risco aumentado de desenvolvimento de CHC. Mais especificamente o subtipo 1b já foi associado ao desenvolvimento de CHC em diversos estudos (El-Shamy et al., 2013; Lee et al., 2014). Uma metanálise estimou um risco superior de desenvolvimento de CHC em 2,5 vezes em pacientes com genótipo 1b do HCV, quando comparados com outros genótipos, o que indica que o vírus do genótipo 1b tem um potencial oncogênico mais elevado (Raimondi et al., 2009). Alterações na sequência da região Core do HCV também já foram associadas com o aumento do risco de CHC (Korba et al., 2015). Outros estudos demonstraram que o genótipo 3 está associado a esteatose hepática mais severa (Hezode et al., 2004; Negro, 2006). Além disso, um



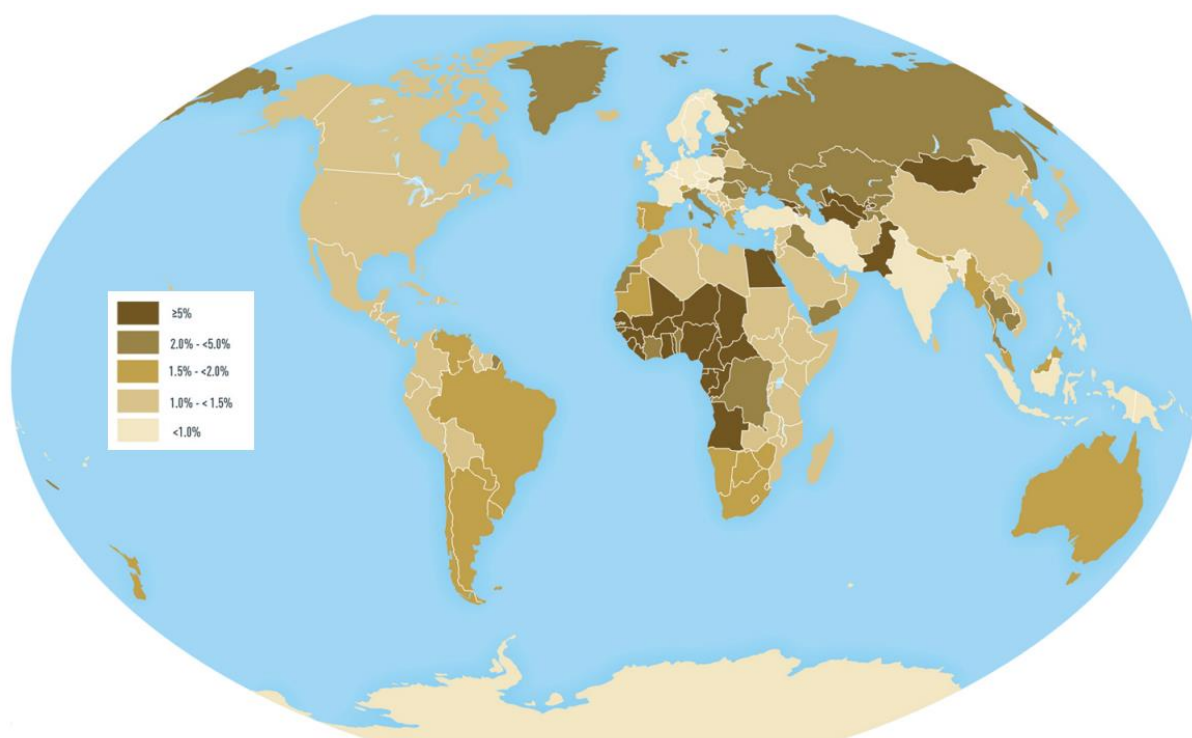
estudo demonstrou uma associação entre o genótipo 3a e CHC em pacientes do Paquistão (Idrees et al., 2009).

#### **1.3.4 Epidemiologia da infecção pelo vírus da hepatite C**

A infecção causada pelo HCV consiste em uma das principais causas de doença hepática no mundo, agravada devido à inexistência de vacinação, sendo considerada um dos principais problemas de saúde pública mundial. Estima-se que a infecção crônica pelo HCV atinja aproximadamente 71 milhões de pessoas e que ocorram, anualmente, 400 mil óbitos em função de alguma doença hepática relacionada ao HCV (Who, 2017b).

Baseando-se na prevalência de anticorpos anti-HCV, a prevalência global da infecção pelo HCV é estimada em 2,35%. O Continente Americano apresenta uma das mais baixas prevalências, estimada em 1,5%, juntamente com a Oceania com prevalência de 1,2%. O Oriente Médio aparece com a maior prevalência da infecção pelo HCV com 4,7%, seguido da África com 3,2%, Europa com 2,3%, e Ásia com 2,1% (figura 18). Em termos de número absoluto, a maior parte da população infectada está localizada na Ásia e África com uma estimativa de 111 milhões de infectados pelo HCV (Lavanchy, 2011; Mohd Hanafiah et al., 2013).

Devido ao aumento no uso de drogas injetáveis na China, na Índia e no Oriente Médio, estas regiões também estão susceptíveis a um aumento substancial na incidência de cirrose e CHC relacionados a infecção pelo HCV, na próxima década (Lavanchy, 2011). É esperado também que a incidência de cirrose e CHC relacionados à infecção pelo HCV aumente drasticamente, em países como Austrália (Dore et al., 2003), Canadá (Zou et al., 2000), França (Deuffic-Burban et al., 2009), Reino Unido (Hutchinson et al., 2005; Hutchinson et al., 2002; Sweeting et al., 2007) e EUA (Deuffic-Burban et al., 2007). Apesar da excelente resposta ao tratamento antiviral atingida recentemente, um aumento na prevalência global do HCV ainda poderá ocorrer, devido a China e a Índia serem os países mais populosos do mundo. Um aumento de 1% em ambos resultaria em um adicional de 25 milhões de indivíduos infectados com HCV (Calvaruso et al., 2018; Lavanchy, 2011).



**Figura 18 - Prevalência global de infecção pelo vírus da hepatite C.**

Disponível em: <[https://www.cdc.gov/travel-static/yellowbook/2018/map\\_3-05.pdf](https://www.cdc.gov/travel-static/yellowbook/2018/map_3-05.pdf)>. Acesso em: 5 janeiro 2018. (Figura adaptada).

No Brasil, a estimativa confirmada pelo Ministério da Saúde em 2016 é de aproximadamente 27.358 casos notificados para a infecção pelo HCV, sendo aproximadamente 873 casos apenas na cidade do Rio de Janeiro (Brasil, 2017). Segundo o Inquérito Nacional das Hepatites Virais no Brasil, a prevalência do marcador de infecção pelo HCV (anti-HCV) é de 1,38% da população, sendo o Brasil classificado como um país de baixa endemicidade para a infecção pelo HCV. Segundo o inquérito, a região Norte apresentou uma prevalência média variando de 1,0 a 3,2% de acordo com a faixa etária, a região Nordeste 0,4 a 1,0%, a região Centro Oeste 1,0 a 1,6%, a região Sudeste 1,0 a 1,6%, a região Sul 0,5 a 1,7%, enquanto o Distrito Federal 0,6 a 1,1% (Pereira et al., 2013).

### **1.3.5 Aspectos clínicos e laboratoriais da infecção pelo vírus da hepatite C**

A infecção pelo HCV pode causar hepatite aguda, fulminante ou crônica, podendo evoluir para um quadro clínico de cirrose hepática e CHC. O curso evolutivo da infecção pelo HCV é bastante variável e normalmente, não gera sintomas clínicos ou icterícia, dificultando o seu diagnóstico. A evolução natural para a cura espontânea ocorre em cerca de 15 a 40% até o 6º mês da infecção. Mulheres

tem mais chances de cura espontânea que homens, apresentando ocorrência média de 40% contra 22% em média (Westbrook&Dusheiko, 2014). Além disso, altas taxas de cura espontânea já foram associadas a certos polimorfismos genéticos, como rs12979860 (Ge et al., 2009), rs8099917 (Tanaka et al., 2009) e rs368234815 (Prokunina-Olsson et al., 2013).

O período de incubação da infecção é de 6 a 7 semanas em média, podendo chegar a 26 semanas em alguns casos. Quando os sintomas aparecem, geralmente ocorrem durante a fase aguda da doença e é observado em apenas 20 a 30% dos casos (Sagnelli et al., 2014). O pico sérico de aminotransferases, atingindo 10 a 20 vezes os níveis usuais, normalmente ocorre entre a 8ª a 10ª semana, na fase aguda da doença, entretanto níveis normais persistentes são observados em 20 a 30% dos indivíduos após 6 meses de infecção (Lingala&Ghany, 2015). Casos graves de hepatite aguda fulminante podem ocorrer, porém são raros (Jayakumar et al., 2013).

A grande maioria dos casos (85%) evolui para a cronicidade, caracterizada pela permanência do HCV-RNA circulante em níveis detectáveis por um período superior a 6 meses (Sagnelli et al., 2014). Muitos indivíduos permanecem vários anos sem nenhuma evidência bioquímica de hepatite, apesar de muitos deles já apresentarem alterações histológicas compatíveis com hepatite. Outros indivíduos podem evoluir ao longo de 20 a 30 anos para a cirrose e o CHC. Nestes casos, podem ser observados os indicativos de progressão da doença através de dados clínicos, laboratoriais e histológicos que indicam complicações da doença hepática crônica, como a cirrose hepática descompensada e o CHC (Westbrook&Dusheiko, 2014).

Uma vez que a infecção pelo HCV, normalmente, não gera sintomas clínicos, o diagnóstico laboratorial deve ser realizado por meio de testes sorológicos ou moleculares. A abordagem sorológica se baseia na detecção de anticorpos anti-HCV no soro de pacientes infectados através de testes imunoenzimáticos como o ELISA. Esses testes são os mais utilizados em todo o mundo devido ao menor custo e maior simplicidade, apresentando sensibilidade e especificidade maior que 99%. No entanto, é menos sensível em pacientes imunossuprimidos e pacientes que realizam hemodiálise. Nesses pacientes, um resultado negativo não exclui a possibilidade de infecção pelo HCV, sendo necessário um teste complementar para que se possa confirmar o real estado do paciente com mais clareza. O teste RIBA (recombinant immunoblot assay) é um ensaio suplementar que pode ser utilizado para confirmar o resultado de um ELISA, especialmente nesse tipo de paciente (Villar et al., 2015).

A abordagem molecular consiste predominantemente na detecção do RNA viral do HCV no soro ou tecido do paciente infectado. A presença do HCV-RNA pode ser detectada no soro entre a 1ª e 3ª semana após o contágio, um mês antes do aparecimento do anti-HCV. Os testes qualitativos podem ser realizados por meio da técnica de reação em cadeia da polimerase precedida pela transcrição reversa (RT-PCR) de fragmentos de RNA viral e apresentam limite de detecção de 50 IU/mL. Os testes quantitativos podem ser realizados por PCR em tempo real e apresentam limite de detecção de 10 IU/mL com especificidade de 99,5%. Os testes moleculares apresentam alta sensibilidade e especificidade, entretanto são relativamente mais caros. Por outro lado, possuem uma série de vantagens como permitir a detecção de viremia em pacientes anti-HCV negativos, o monitoramento da eficácia do tratamento, além da identificação de mutações de escape ao tratamento (Villar et al., 2015).

#### **1.4 Fatores genéticos e epigenéticos na Hepatocarcinogênese**

##### **1.4.1 Fatores genéticos associados ao desenvolvimento carcinoma hepatocelular**

A variabilidade genética tem sido bastante discutida como um importante fator para o desenvolvimento de CHC, uma vez que muitos dos pacientes expostos a fatores de risco conhecidos nunca chegam a desenvolver cirrose ou CHC. Assim como, uma minoria significativa de casos desenvolve CHC sem apresentar nenhum fator de risco (Baldissera et al., 2016; El-Serag&Rudolph, 2007). Nesse sentido, muitos estudos têm sido realizados buscando variáveis genéticas associadas ao processo de hepatocarcinogênese.

Ao invés de ocorrer ao acaso, as mutações podem ocorrerem em *hot-spots*, pontos onde as mutações ocorrem com uma frequência mais elevada. Os polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) correspondem a uma modificação na sequência de DNA devido à substituição de um único nucleotídeo e são responsáveis por mais de 90% das disparidades alélicas em seres humanos. Embora a maior parte destas modificações genéticas ocorra em regiões não codificantes, algumas podem modificar a expressão e função de um gene, podendo afetar diferentes vias biológicas (Nahon&Zucman-Rossi, 2012).

O sequenciamento completo do exoma (WES) de amostras de CHC de diversas etiologias tem identificado genes chaves associados ao aparecimento desse tumor (Cleary et al., 2013; Schulze et al., 2015). No entanto, a maior parte dos estudos de associação genômica ampla (GWAS) tem apresentado baixa reprodutibilidade devido a heterogeneidade da população estudada (Ioannidis et al., 2001; Nahon&Zucman-Rossi, 2012; Ringelhan et al., 2017). Porém, por outro ponto de vista, esses estudos fornecem dados relevantes sobre genes candidatos que podem ser validados por estudos posteriores (Nahon&Zucman-Rossi, 2012). Uma revisão recente analisou os quatro principais estudos GWAS com objetivo de identificar SNPs associados ao CHC em pacientes crônicos para o HBV e HCV (Zhu et al., 2017). Três deles investigaram pacientes chineses e o quarto pacientes japoneses e os principais genes identificados foram KIF1B (Zhang et al., 2010a), GRIK1, HLA-DQA1, HLA-DRB1 (Li et al., 2012), HLA-DQA1, STAT4 (Jiang et al., 2013) e MICA (Kumar et al., 2011).

Outra importante revisão sistemática da literatura foi realizada recentemente com objetivo de identificar os principais genes com SNPs associados ao desenvolvimento de CHC em pacientes crônicos para o HCV (Walker et al., 2018). Foram identificados 137 genes, sendo 17 genes classificados como tendo forte evidência de uma associação com CHC (tabela 2). O estudo observou associação para outros 37 genes, mas esse achado ainda não foi replicado em outros estudos. Observou também 56 genes que apresentaram evidência limitada de associação, além de 27 genes que não apresentaram associação.

Diversos polimorfismos genéticos já foram associados ao desenvolvimento de CHC, entretanto a maior parte dos resultados não foram replicados em estudos posteriores (Walker et al., 2018). Nesse sentido, é extremamente relevante avaliar o potencial das alterações genéticas identificadas em influenciar vias biológicas importantes relacionadas a hepatocarcinogênese, como as envolvidas em processos de detoxificação, inflamação, estresse oxidativo, reparo do DNA, fatores de crescimento e ciclo celular (Baldissera et al., 2016; Llovet et al., 2016; Nahon&Zucman-Rossi, 2012; Ochi et al., 2017; Schulze et al., 2015; Walker et al., 2018; Zucman-Rossi et al., 2015).

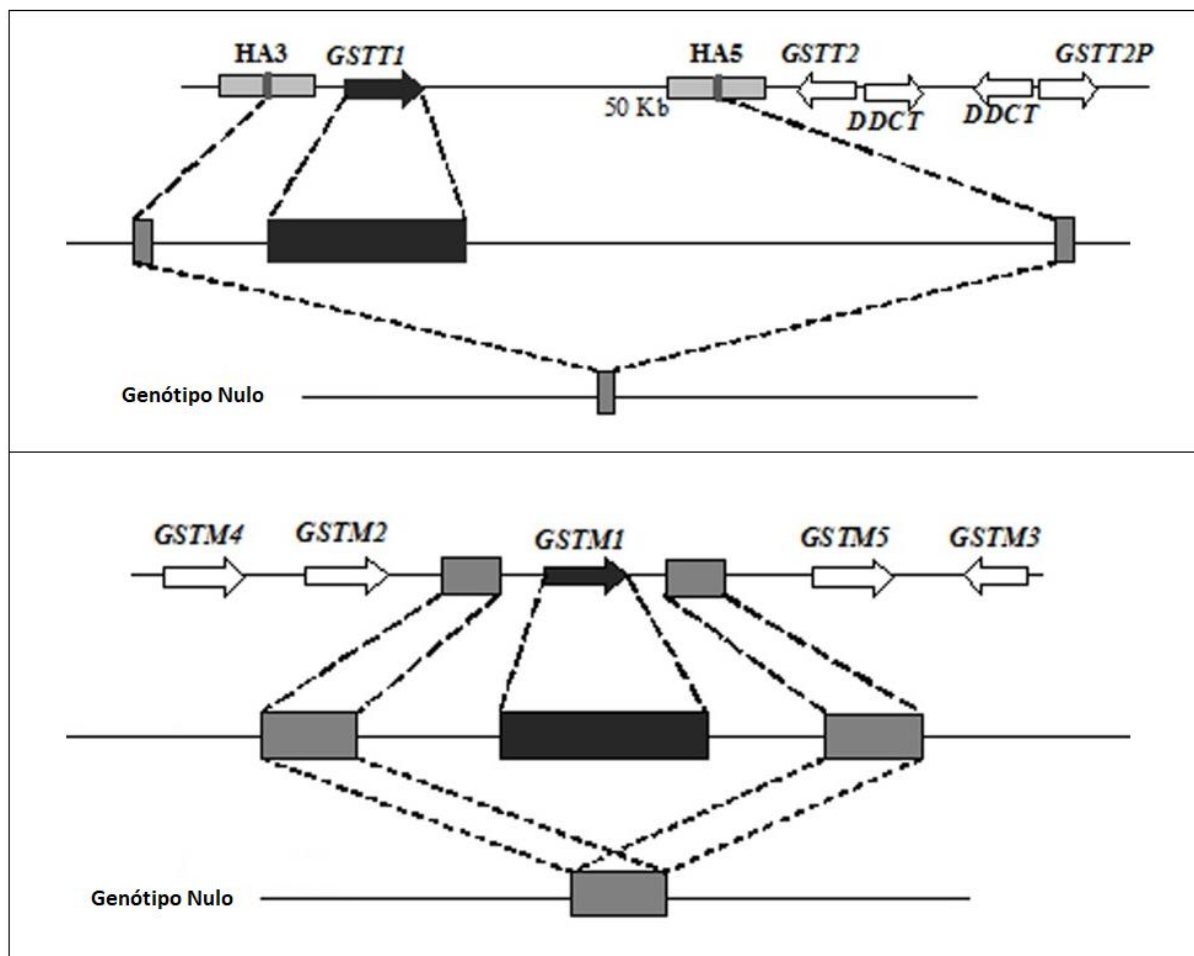
**Tabela 2: Principais genes associados ao CHC.**

Gene	Etnia / País	Número de indivíduos	Número de estudos	Metanálises
ALDH2	Japão	638	2	Não
CAT	Caucasiano, Marrocos	482	2	Não
EGF	Japão, China, Egito	578	3	Sim
GSTM1	Egito, Índia	189	2	Não
GSTT1	Egito, Índia	189	2	Não
HLA	Espanha	293	3	Não
HLA-Bw4+KIR3DS1	Espanha, Austrália, Itália	776	3	Não
HSPA1B	China, Índia	666	2	Não
IFNL3	Asiático, Caucasiano, Egito, Japão, Marrocos, Espanha	3154	10	Sim
IL-1b	Caucasiano, Japão	1226	4	Não
MDM2	Africano, Asiático, Caucasiano, Japão, Marrocos	745	2	Sim
MICA	Caucasiano, Japão, Espanha	15152	5	Não
MnSOD	Caucasiano, Egito, Marrocos	755	4	Não
PNPLA3	Europeu, Itália, Japão, Marrocos	1252	3	Sim
TGF- $\beta$ 1	China, Egito	705	2	Não
TNF	Caucasiano, China, Egito	871	4	Não
UGT1A7	China, França, Alemanha, Japão, Taiwan	1450	6	Não

Dados obtidos de uma revisão sistemática da literatura (Walker et al., 2018).

Dois importantes genes cuja associação com o CHC tem sido investigada, são o GSTT1 e GSTM1, pois desempenham um papel crítico na proteção celular a vários tipos de danos, e seu mau funcionamento pode resultar em carcinogênese (Mcilwain et al., 2006; Shen et al., 2014). Os genes GSTT1 e GSTM1 codificam as enzimas Glutathionas S-transferases (GSTs) da classe theta1 e mu1, respectivamente. Ao todo são sete classes de enzimas GSTs: alpha, mu, omega, pi, sigma, theta e zeta. As GSTs fazem parte da mais importante família de enzimas envolvidas na detoxificação de carcinógenos, toxinas, quimioterápicos e produtos gerados por danos de espécies reativas de oxigênio (Hayes et al., 2005; Shen et al., 2014). A variante mais comum dos genes GSTM1 e GSTT1 em humanos é a deleção homozigótica, caracterizada pelo genótipo nulo (figura 19), que ocasiona a perda de atividade enzimática, aumento da vulnerabilidade ao dano citogenético e

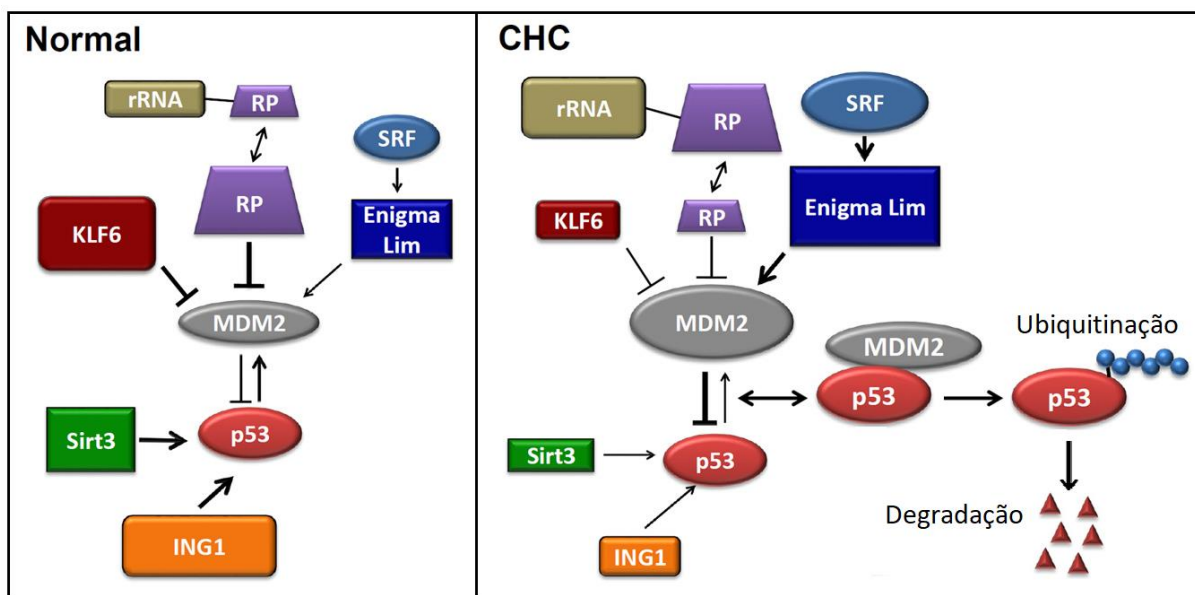
ao dano oxidativo do DNA (Hayes&Strange, 2000). Diversos estudos têm demonstrado associação entre o genótipo polimórfico nulo dos genes *GSTM1* e *GSTT1* e a hepatocarcinogênese. Entretanto, apesar da plausibilidade biológica do envolvimento dos genótipos nulos dos genes *GSTM1* e *GSTT1* com o aumento do risco de desenvolvimento de CHC, os resultados publicados ainda são inconsistentes, o que poderia ser explicado pela restrição do tamanho da amostra e diversidade étnica (Abd El-Moneim et al., 2008; Asim et al., 2010; Covolo et al., 2005; Deng et al., 2005; Kiran et al., 2008; Shen et al., 2014).



**Figura 19: Contexto genômico dos genótipos nulos dos genes *GSTT1* e *GSTM1*.**  
 Figura adaptada (Teixeira et al., 2013c).

Outro gene importante é o TP53, um supressor tumoral envolvido na regulação do ciclo celular e integridade genômica. A perda da função da proteína p53, permite que células danificadas escapem ao controle do ciclo celular e se tornem cancerígenas, o que coloca variantes do gene TP53 como candidatos dignos de investigação para aumento do risco CHC (figura 20) (Meng et al., 2014; Staib et al., 2003). A ocorrência de uma mutação no códon 249 do gene TP53, devido a

conversão de uma guanina em uma timina, resultando em alteração do aminoácido arginina para serina na proteína p53. Essa mutação foi descrita como uma evidência molecular para o CHC associado ao consumo de aflatoxina, bastante frequentes em regiões Asiáticas e Africanas (Ozturk, 1991).



**Figura 20: Mecanismo biológico dos genes TP53 e MDM2 no carcinoma hepatocelular.**  
 Figura adaptada (Meng et al., 2014).

Outro SNP importante no gene TP53 ocorre no códon 72 (rs1042522), que codifica o aminoácido prolina (Pro ou P) no lugar de arginina (Arg ou R) por uma transverso de guanina (G) a citosina (C). Observou-se que em linhagens celulares a variante Arg induz a apoptose mais acentuadamente do que a variante Pro, indicando menor susceptibilidade ao desenvolvimento de tumor. Portanto, indivíduos que possuem a variante Pro estariam susceptíveis ao câncer (Dumont et al., 2003). Diversos estudos foram conduzidos para investigar a associação entre esse SNP no códon 72 e a susceptibilidade ao CHC. (Di Vuolo et al., 2011; Ezzikouri et al., 2007; Hu et al., 2014; Mah et al., 2011; Sumbul et al., 2012; Yoon et al., 2008; Zhu et al., 2005). Algumas metanálises foram conduzidas e observaram a associação entre esse SNP e o desenvolvimento do CHC (Ding et al., 2012; Lv et al., 2013). Entretanto uma metanálise mais recente não observou associação (Peng et al., 2013). Portanto, os resultados relatados ainda são conflitantes, sendo necessários mais estudos em diferentes populações para investigar se essa associação ocorre apenas em algumas etnias ou em conjunto com outro fator de risco.

Um importante regulador da proteína p53, o gene MDM2, tem sido descrito como um acelerador da hepatocarcinogênese, inibindo a atividade da p53 e



umentando sua destruição proteolítica via ubiquitinação (figura 20) (Bond et al., 2005; Meng et al., 2014). Um polimorfismo na região promotora do gene MDM2, caracterizado pela alteração de timina (T) para guanina (G) no nucleotídeo 309 (rs2279744), foi associada à superexpressão de MDM2 e, por conseguinte, a inibição da atividade da p53 (Bond et al., 2004). Em conjunto, os dois polimorfismos TP53 R72P e o MDM2 T309G podem induzir a carcinogênese diretamente afetando a função da p53 e indiretamente por regulação negativa da p53, por meio da superexpressão do gene MDM2. Por bastante tempo, diversos estudos têm analisado a influência do SNP MDM2 T309G no desenvolvimento de CHC, porém os resultados permanecem controversos (Peng et al., 2013). De acordo com uma metanálise, realizada por Ma e colaboradores (2012), o SNP MDM2 T309G está associado ao aumento do risco de CHC em asiáticos e caucasianos, entretanto, o mesmo foi questionado por não incluir na análise alguns estudos elegíveis (Tomoda et al., 2012; Yang et al., 2013). Além disso, as etnias estudadas são extremamente limitadas. Dessa forma, novos estudos abordando a influência do SNP MDM2 T309G na hepatocarcinogênese em populações de diferentes regiões geográficas e expostas a fatores de risco diferentes são necessários.

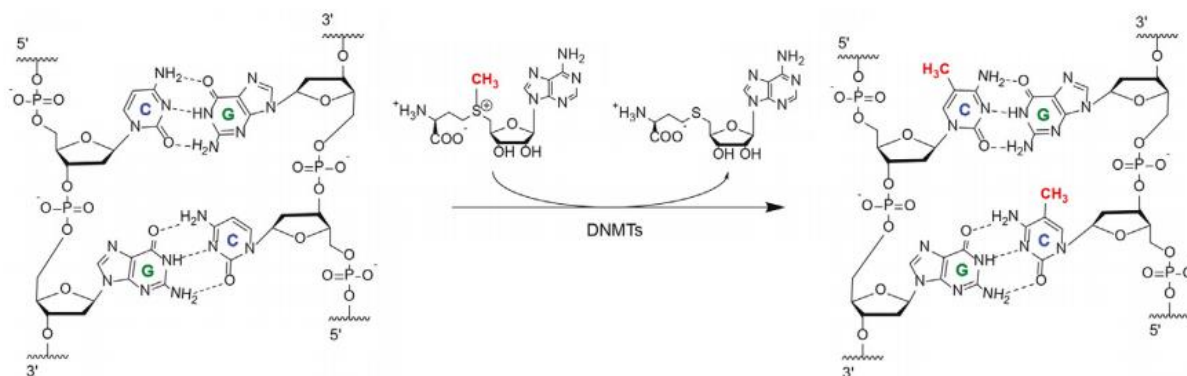
Diversos outros polimorfismos têm sido associados ao desenvolvimento do CHC, entretanto a heterogeneidade tumoral, a diversidade étnica e a exposição a fatores de risco adicionais variados são desafios complexos enfrentados pela comunidade científica na busca de um perfil genético associado a um maior risco de desenvolvimento de CHC (Nahon&Zucman-Rossi, 2012; Ringelhan et al., 2017).

#### ***1.4.2 Fatores epigenéticos associados ao desenvolvimento carcinoma hepatocelular***

Em oposição às alterações genéticas, alterações epigenéticas não alteram a sequência dos nucleotídeos, mas são capazes de modular a expressão gênica interferindo nos níveis transcricional e pós-transcricional. Existem duas classes de genes críticos para o câncer: protooncogenes e genes supressores de tumor. Alterações epigenéticas frequentemente resultam na ativação de protooncogenes e na inativação de genes supressores de tumor (Momparker, 2003).

A metilação de DNA é o principal mecanismo epigenético de silenciamento de genes e consiste na adição covalente de um grupo metil na posição 5' de uma citosina precedida de guanina (CpGs). Enquanto as CpGs metiladas estão localizadas aleatoriamente em todo o genoma, as CpGs não metiladas normalmente

são agrupados em ilhas CpG, encontradas principalmente nas regiões promotoras de muitos genes (Gros et al., 2012; Pechalrieu et al., 2017). Em células de mamíferos, a metilação do DNA é catalisada por DNA metiltransferases (DNMTs) (figura 21) (Jurkowska et al., 2011).

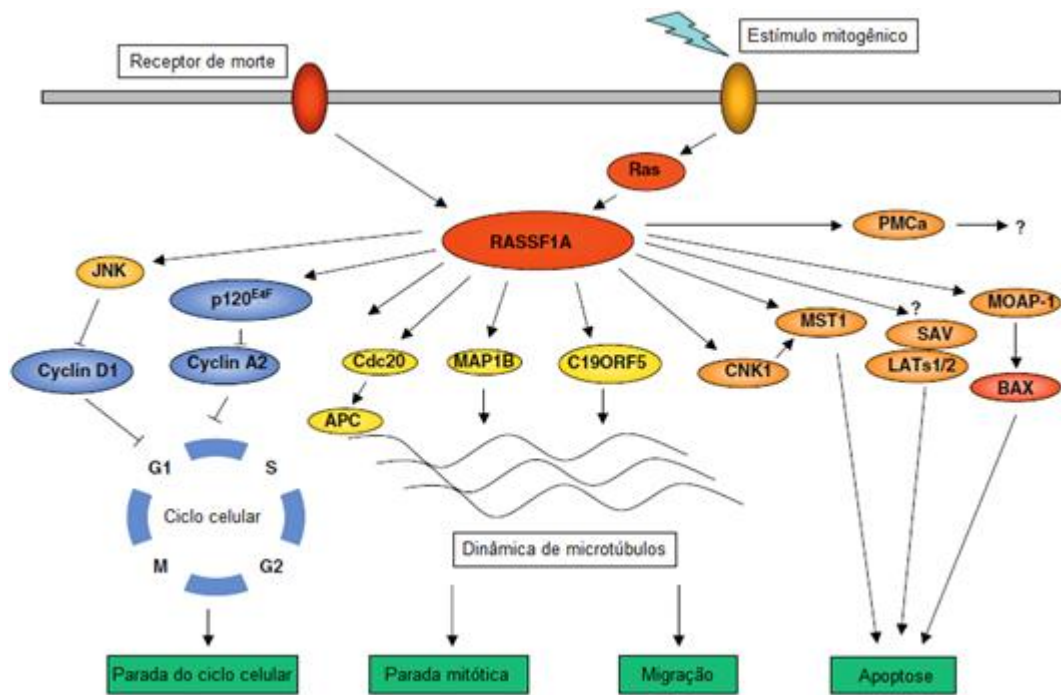


**Figura 21: Representação do mecanismo de metilação de DNA.**

Figura adaptada (Pechalrieu et al., 2017).

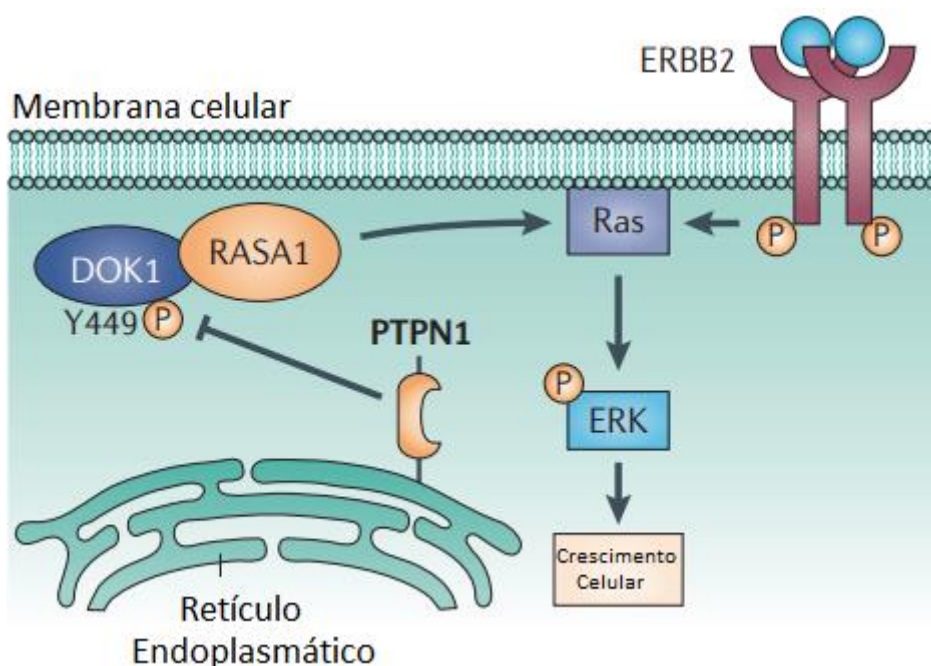
Em muitos tipos de tumores, a ocorrência de hipermetilação em regiões promotoras tem sido associada à inativação de genes supressores de tumor (Lee et al., 2003). Diversos estudos têm demonstrado um papel importante da hipermetilação de promotores no silenciamento gênico em casos de CHC e revelado uma correlação positiva com sua progressão (Tischhoff&Tannapfe, 2008). A hipermetilação está entre as primeiras alterações moleculares que ocorrem antes da oncogênese e tem sido observada em diversos tipos de câncer, entre eles o CHC (Issa, 2004; Jones&Baylin, 2002; Shen et al., 2002).

Análises de tecido hepático com CHC revelaram um padrão anômalo de hipermetilação de DNA em diversos genes (Hernandez-Vargas et al., 2010; Lambert et al., 2011; Yang et al., 2003). Dentre eles, um gene humano frequentemente hipermetilados em casos de CHC é o RASSF1A, um supressor de tumor envolvido na via de sinalização de Ras, que exerce um papel fundamental no controle do ciclo celular, estabilização de microtúbulos, adesão celular, motilidade celular e apoptose (figura 22) (Agathangelou et al., 2005; Donniger et al., 2007). Estudos anteriores observaram, por diferentes metodologias, altas frequências de hipermetilação (76-100%) no gene RASSF1A em amostras de CHC, após análise de diferentes ilhas CpGs (Di Gioia et al., 2006; Lambert et al., 2011; Zhang et al., 2013; Zhang et al., 2002).



**Figura 22: Mecanismos biológicos do gene RASSF1A no ciclo celular.**  
 Figura adaptada (Donninger et al., 2007).

Além disso, Lambert e colaboradores (2011) demonstraram uma associação entre os níveis de metilação de RASSF1A e outros genes e a área geográfica analisada. Um dos genes analisados, o supressor tumoral DOK1, foi observado hipermetilado em 62% dos tecidos de CHC analisados. Ao comparar pacientes de duas localidades, ambos os genes RASSF1A e DOK1 apresentaram níveis de metilação mais baixos em pacientes com CHC da Tailândia do que em pacientes com CHC da França (Lambert et al., 2011). O supressor tumoral DOK1 é expresso nas células B e T, assim como em macrófagos e neutrófilos, e está envolvido em uma ampla gama de vias de sinalização de imunorreceptores (figura 23). Além disso, DOK1 está envolvido em vias de sinalização de Ras, levando ao crescimento e proliferação celular (Julien et al., 2011; Mashima et al., 2009). No entanto, poucos dados estão disponíveis na literatura científica sobre o perfil de metilação do gene DOK1 em câncer hepático. Dessa forma, estudos que analisem o perfil de metilação desses genes em outras regiões geográficas devem ser incentivados, já que a identificação de genes associados a hepatocarcinogênese pode se tornar uma ferramenta útil para o rastreamento do CHC no futuro.



**Figura 23: Mecanismos biológicos do gene DOK1 no ciclo celular.**  
 Figura adaptada (Julien et al., 2011).

Para utilizar perfis de metilação de DNA de determinados genes como biomarcadores para aplicação em pré-diagnóstico é essencial o desenvolvimento de métodos de análise não invasivos. Nesse sentido, a identificação de biomarcadores epigenéticos em DNA livre circulante (cfDNA, do inglês *cell-free DNA*) no soro ou plasma tem se tornado uma linha de pesquisa promissora, especialmente com o recente desenvolvimento de métodos de sequenciamento de alto desempenho, essencial para o avanço desta área.

O cfDNA consiste em pequenos fragmentos de cadeia dupla de DNA e são encontrados no sangue em quantidades variáveis entre diferentes indivíduos (Suzuki et al., 2008). Entretanto, uma fração do cfDNA em particular, o DNA tumoral circulante (ctDNA, do inglês *circulating tumour DNA*), possui grande potencial no contexto de biomarcadores não invasivos para o diagnóstico precoce e para o prognóstico (Chan et al., 2013; Dawson et al., 2013; Goto et al., 2012; Lee et al., 2011b; Nakamura et al., 2011; Perkins et al., 2012; Taniguchi et al., 2011). A presença de ctDNA na corrente sanguínea parece estar relacionada a eventos de necrose, apoptose e secreção de células tumorais (Schwarzenbach et al., 2011). Além disso, a quantidade de cfDNA, assim como da fração de ctDNA, aumenta com a gravidade da doença e o volume do tumor (Bettegowda et al., 2014; Newman et al., 2014). No entanto, como o ctDNA pode representar apenas uma fração muito

pequena do cfDNA, existem desafios metodológicos que limitam a sensibilidade de detecção de ctDNA (Diehl et al., 2008).

O sequenciamento de alto desempenho apresenta uma alta sensibilidade e tem grande potencial e aplicabilidade em estudos envolvendo o ctDNA em contextos epidemiológicos, clínicos e moleculares. Diversos estudos têm demonstrado que essa tecnologia pode ser aplicada para a detecção de mutações somáticas relacionadas com tumor em ctDNA, sugerindo que podem ser gradualmente trazidas para o contexto clínico (Crowley et al., 2013; Diehl et al., 2008; Newman et al., 2014). Por outro lado, praticamente todos os estudos que visaram a detecção de metilação em ctDNA utilizaram PCR específico ou métodos semelhantes que, além de outras limitações, fornecem informações sobre a presença de um número restrito de sítios metilados (Ammerpohl et al., 2012; Begum et al., 2011; Church et al., 2014; Iyer et al., 2010; Wong et al., 2000).

Embora as atuais evidências sugiram que as alterações na metilação do DNA em amostras de soro ou plasma tem potencial para diagnóstico e monitoramento em vários tipos de câncer, incluindo o CHC, informações sobre a abordagem por sequenciamento de alto desempenho para análise de metilação em cfDNA ainda são escassas (Vaca-Paniagua et al., 2015). Entretanto, um grupo de pesquisadores Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (IARC, International Agency for Research on Cancer), em um trabalho pioneiro, analisou a região promotora de seis genes, por sequenciamento de alta vazão, e encontrou uma associação entre presença de CHC e níveis de metilação mais elevados do gene VIM ao comparar cfDNA obtidos de pacientes com e sem CHC (Vaca-Paniagua et al., 2015). Nesse contexto, estudos que instiguem fatores epigenéticos utilizando uma abordagem não invasiva são extremamente relevantes no sentido de identificar e validar possíveis biomarcadores com potencial uso no contexto clínico.

## **1.5 Justificativa**

O CHC é um importante problema de saúde a nível global, sendo considerado a segunda causa de mortalidade por câncer. Os principais agentes etiológicos para o desenvolvimento de CHC no mundo são as infecções crônicas pelo HBV e HCV, que juntos representam quase 80% dos casos de CHC. A infecção crônica por esses vírus atinge, atualmente, 328 milhões de pessoas, e são fortes indutores de lesão hepática crônica, resultando frequentemente no desenvolvimento de cirrose hepática

e CHC. Entretanto, os motivos pelos quais somente uma parte dos pacientes desenvolvem cirrose e CHC ainda não estão claros.

Diversas linhas de evidência indicam que o desenvolvimento do CHC é um processo de múltiplas etapas, influenciado por fatores hereditários e adquiridos. O acúmulo de alterações genéticas em genes críticos para o câncer é capaz de modificar vias celulares importantes e iniciar o processo de carcinogênese. Estudos têm demonstrado a associação de diferentes polimorfismos genéticos com o desenvolvimento do CHC. Entretanto, poucos estudos foram realizados com pacientes brasileiros até o momento. Embora a maior parte destas modificações ocorra em regiões não codificantes, algumas podem modificar a expressão e função de um gene, podendo afetar diferentes vias biológicas e levar ao CHC. Estudos de associação genômica ampla (GWAS) e de meta-análise têm demonstrado uma associação entre a presença de determinados polimorfismos genéticos com o desenvolvimento do CHC, em indivíduos com hepatite crônica. Dessa maneira, estudos que identifiquem possíveis polimorfismos genéticos associados ao desenvolvimento de cirrose e CHC são de extrema importância.

Por outro lado, tendo em vista os crescentes achados de alterações epigenéticas em diversos tumores, estudos epigenéticos são de grande importância para o melhor entendimento do desenvolvimento dessas doenças e podem contribuir para descobertas de possíveis marcadores tumorais, além do desenvolvimento de terapias medicamentosas, uma vez que essas alterações epigenéticas são potencialmente reversíveis. A metilação de DNA é o principal mecanismo epigenético de silenciamento de genes e tem sido observada em diferentes cânceres humanos. Alguns estudos têm demonstrado um papel importante da hipermetilação de promotores no silenciamento gênico em casos de CHC e revelado uma correlação positiva com a progressão do tumor. Portanto, o perfil de metilação de determinados genes está associado à evolução da doença hepática e pode se tornar uma ferramenta útil para o rastreamento do CHC.

O padrão ouro para a análise da influência do perfil de metilação de genes com a progressão da doença hepática é a análise de tecido hepático. Entretanto, no sentido de identificar biomarcadores para possível aplicação em pré-diagnóstico é essencial o desenvolvimento de métodos de análise não invasivos. Nesse sentido, a identificação de biomarcadores epigenéticos em cfDNA no soro ou plasma se torna uma linha de pesquisa promissora, especialmente com o recente desenvolvimento de métodos de sequenciamento de alto desempenho, essencial para o avanço desta

área. Diversos estudos têm demonstrado que essa tecnologia pode ser aplicada para a detecção de mutações somáticas associadas ao tumor em cfDNA, sugerindo que podem ser gradualmente trazidas para o contexto clínico. A grande maioria dos estudos que analisam metilação em cfDNA utilizam PCR específico ou métodos semelhantes, obtendo dessa forma informações sobre a presença de um número restrito de sítios metilados, dentre outras limitações. Portanto, apesar do potencial das alterações na metilação do DNA, em amostras de soro ou plasma para diagnóstico e monitoramento em vários tipos de câncer, dentre eles o CHC, informações sobre a abordagem por sequenciamento de alto desempenho para análise de metilação em cfDNA ainda são escassas.

Uma vez que o bom prognóstico do CHC depende fundamentalmente da detecção precoce do tumor, é de extrema relevância a identificação de fatores genéticos e epigenéticos que poderão ser utilizados futuramente na rotina laboratorial como biomarcadores de detecção precoce do CHC, bem como de seleção de pacientes com hepatite crônica em alto risco de desenvolver este tumor. Até o momento, apenas dois estudos investigaram a relação do perfil de metilação em cfDNA com o desenvolvimento de CHC utilizando a tecnologia de sequenciamento de alto desempenho, destacando o pioneirismo dessa abordagem no contexto mundial. Além disso, no Brasil poucos estudos investigaram a influência de polimorfismos e nenhum estudo investigou alterações epigenéticas relacionadas ao CHC. Portanto esse trabalho contribui com importantes dados em uma linha de investigação internacionalmente competitiva com a aplicação de tecnologia de ponta promovendo a participação mais efetiva do país nesse campo da ciência internacional.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Avaliar se a ocorrência de polimorfismos genéticos e da hipermetilação de DNA estão associados à progressão da doença hepática para o desenvolvimento de cirrose e carcinoma hepatocelular (CHC), em pacientes brasileiros com hepatite crônica.

### 2.2 Objetivos Específicos

- a-** Analisar o perfil demográfico e a prevalência dos genótipos do HCV em pacientes crônicos de acordo com a presença de cirrose e CHC;
- b-** Determinar a frequência dos genótipos polimórficos GSTT1 nulo (deleção), GSTM1 nulo (deleção), TP53 R72P (rs1042522) e MDM2 T309G (rs2279744) em amostras de soro de pacientes infectados pelo HCV em três diferentes graus da doença hepática: hepatite crônica, cirrose e CHC;
- c-** Investigar a associação entre os polimorfismos estudados e a progressão da doença hepática para o desenvolvimento de cirrose e CHC;
- d-** Determinar os níveis de metilação de DNA na região promotora dos genes RASSF1A e DOK1 em amostras de tecido hepático com i) hepatite crônica, ii) cirrose e iii) CHC;
- e-** Investigar a associação entre os perfis de metilação de DNA encontrados nos genes estudados e a progressão da doença hepática para o desenvolvimento de cirrose e CHC;
- f-** Isolar e quantificar os níveis de DNA livre circulante (cfDNA) em soro de pacientes infectados pelo HCV e investigar a associação com progressão da doença hepática para o desenvolvimento de cirrose e CHC;
- g-** Determinar os níveis de metilação de cfDNA em amostras de soro de pacientes infectados pelo HCV em três diferentes graus da doença hepática: hepatite crônica, cirrose e CHC;
- h-** Investigar a associação entre os perfis de metilação em cfDNA encontrados e a progressão da doença hepática para o desenvolvimento de cirrose e CHC.



## 3 MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo foi realizado por meio de colaborações entre o Laboratório de Virologia Molecular do Instituto Oswaldo Cruz (IOC-FIOCRUZ) e o Departamento de Anatomia Patológica e o Serviço de Hepatologia do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho (HUCFF-UFRJ, e o *Epigenetics Group, Section of Mechanisms of Carcinogenesis*, da *International Agency for Research on Cancer* (IARC), em Lyon, França. A descrição metodológica foi organizada em três sessões: i) polimorfismos genéticos; ii) hipermetilação de DNA em tecido hepático; e iii) hipermetilação em DNA livre circulante em soro.

### 3.1 Polimorfismos genéticos

#### 3.1.1 Amostragem

Para a análise da frequência de polimorfismos genéticos foram selecionados, por meio de análise de prontuários, 190 pacientes com hepatite C crônica, atendidos no ambulatório do Serviço de Hepatologia do HUCFF-UFRJ durante o período de fevereiro de 2011 a maio de 2015. Os indivíduos selecionados foram submetidos à coleta de sangue e um questionário foi preenchido contendo dados demográficos, clínicos e epidemiológicos dos pacientes. Dentre eles, 47 pacientes tinham diagnóstico apenas de hepatite crônica, 83 pacientes tinham diagnóstico de cirrose e 60 pacientes tinham diagnóstico de CHC.

Os critérios de inclusão no estudo foram indivíduos maiores de 18 anos com diagnóstico de hepatite C crônica, com e sem diagnóstico de cirrose hepática e CHC, e que tenham aceitado participar do estudo após a leitura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), conforme Resolução nº 466, de 12 de dezembro de 2012, do Conselho Nacional de Saúde, Ministério da Saúde, Brasil. O diagnóstico de hepatite C crônica foi determinado pela presença de anticorpo anti-HCV e RNA viral por mais de seis meses. O diagnóstico de cirrose foi definido por meio de exame histopatológico através da análise de biópsias hepáticas sendo observado estágio 4 segundo a classificação de METAVIR ou por meio de elastografia hepática transitória. O diagnóstico de CHC foi determinado segundo o critério de Barcelona (Easl-Eortc, 2012).

Os critérios de exclusão foram pacientes coinfectados com o vírus da hepatite B (HBV) e o vírus da imunodeficiência humana (HIV), pacientes com nódulo hepático sem diagnóstico, pacientes que não tiveram condições de se submeter à coleta de sangue e pacientes que não concordaram com o TCLE. O diagnóstico de hepatite B e de infecção pelo HIV foram determinados pela presença do antígeno HBsAg, e presença do anticorpo anti-HIV, respectivamente.

As amostras de sangue total obtidas na coleta de sangue periférico foram centrifugadas a 3.000 rpm por 5 minutos para obtenção do soro. Em seguida, as amostras de soro foram aliquotadas e estocadas a - 20°C.

### **3.1.2 Isolamento de ácido nucléico**

A extração simultânea de DNA e RNA foi realizada a partir de 200 µL de soro utilizando-se o High Pure Viral Nucleic Acid kit (Roche Diagnostics, Basileia, Suíça), segundo protocolo do fabricante. As amostras extraídas foram armazenadas a temperatura de - 70°C.

### **3.1.3 Genotipagem do vírus da hepatite C**

Para a genotipagem do HCV, foi realizada a amplificação da região Core, em duas etapas, através de uma nested-PCR, seguida de análise filogenética. Para a amplificação foi utilizado o SuperScript III One-Step RT-PCR System with Platinum Taq DNA Polymerase (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA). A primeira etapa corresponde à síntese de DNA complementar (cDNA) seguida de amplificação, realizada utilizando-se 4 µL do RNA extraído, 1 µL de Super script III e 10 pmol dos oligonucleotídeos Sc2 e Ac2 (tabela 3). Em um termociclador utilizou-se o seguinte ciclo: 45°C por 30 minutos, 94°C por 2 minutos, 20 ciclos de 94°C por 1 minuto, 45°C por 1 minuto e 68°C por 1 minuto, 20 ciclos de 94°C por 1 minuto, 60°C por 1 minuto e 68°C por 1 minuto, seguido pelo alongamento final a 68°C durante 5 minutos. O produto final obtido na primeira amplificação foi de 440 pb. Para a segunda etapa de amplificação, foi utilizado 2 µL do produto da primeira etapa, 1 U de Taq DNA polimerase e 10 pmol dos oligonucleotídeos S7 e A5 (tabela 3). No termociclador, o ciclo utilizado foi 94°C por 2 minutos, 30 ciclos de 94°C por 1 minuto, 62°C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto, seguido pelo alongamento final a 72°C por 7 minutos, resultando um produto final de 354 pb. A genotipagem foi realizada por análise filogenética pelo método de neighbor joining no software Mega 7.

**Tabela 3: Oligonucleotídeos para amplificação da região Core do vírus da hepatite C.**

Etapa	Oligonucleotídeo*	Sequência nucleotídica	Posição genoma <sup>#</sup>	Fragmento Amplificado
1	Sc2 (senso)	5' GGG AGG TCT CGT AGA CCG TGC ACC ATG 3'	nt -24 – nt 3	440 pb
	Ac2 (anti-senso)	5' GAG (AC)GG (GT)AT (AG)TA CCC CAT GAG (AG)TC GGC 3'	nt 417 – nt 391	
2	S7 (senso)	5' AGA CCG TGC ACC ATG AGC AC 3'	nt -12 – nt 8	354 pb
	A5 (anti-senso)	5' TAC GCC GGG GGT CA(TG) T(GA)G GGC CCC A 3'	nt 343 – nt 319	

\*Oligonucleotídeos (Ohno et al., 1997). <sup>#</sup>Posição no genoma considerando a posição 0 o códon de iniciação da fase de leitura aberta.

### 3.1.4 Genotipagem dos polimorfismos

Os genes humanos GSTT1, GSTM1, TP53 e MDM2 foram analisados quanto à presença de polimorfismos genéticos. Foi analisada a presença de deleções nos genes GSTT1 e GSTM1, caracterizando o genótipo polimórfico nulo, por meio da técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) multiplex, utilizando oligonucleotídeos específicos (tabela 4), conforme descrito em um estudo anterior (Ueda et al., 2003). O gene da  $\beta$ -globina foi utilizado como controle positivo da PCR e a genotipagem dos polimorfismos foi realizada com base na presença ou ausência (deleção) de bandas, após eletroforese em gel de agarose a 3%.

A genotipagem do polimorfismo no códon R72P (rs1042522) do gene TP53, foi realizada por PCR seguida da análise do polimorfismo dos fragmentos de restrição (RFLP), conforme descrito em estudo anterior (Ueda et al., 2006). Para amplificação, foi utilizado 2  $\mu$ L do DNA extraído, 1 U de Taq DNA polimerase e 10 pmol dos oligonucleotídeos (tabela 4) em 50  $\mu$ L de reação. No termociclador, o ciclo utilizado foi 96°C por 3 minutos, 40 ciclos de 94°C por 1 minuto, 60°C por 1 minuto e 72°C por 2 minutos, seguido pelo alongamento final a 72°C por 7 minutos. O RFLP foi realizado durante 3h a 37°C com a endonuclease BstUI e os genótipos foram determinados pelo padrão de bandas em gel de agarose a 3%. O genótipo Arg/Arg foi determinado pela presença de dois fragmentos em gel de agarose (113 e 86 pb), devido a clivagem pela BstUI, o genótipo Pro/Pro foi determinado pela presença de um único fragmento (199 pb), devido à ausência de clivagem, enquanto o genótipo heterozigoto Arg/Pro foi determinado pela presença de três fragmentos no gel de agarose (199, 113 e 86 pb).

A região do gene MDM2 contendo o SNP T309G (rs2279744) foi amplificada por PCR seguida de RFLP, conforme descrito em estudo anterior (Wang et al., 2009). Na amplificação, foi utilizado 2  $\mu$ L do DNA extraído, 1 U de Taq DNA

polimerase e 10 pmol dos oligonucleotídeos (tabela 4) em 50 µL de reação. No termociclador, o ciclo utilizado foi 94°C por 4 minutos, 35 ciclos de 94°C por 30 segundos, 62°C por 30 segundos e 72°C por 30 segundos, seguido pelo alongamento final a 72°C por 7 minutos. As digestões enzimáticas foram realizadas por 3 horas à 37°C utilizando a endonuclease MspA1I. A genotipagem por análise do perfil em gel de agarose a 3%. O genótipo T/T foi determinado pela presença de um único fragmento em gel de agarose (237 pb), o genótipo G/G foi determinado pela presença de dois fragmentos em gel de agarose (189 e 48 pb), devido a clivagem pela endonuclease, enquanto o genótipo heterozigoto T/G foi determinado pela presença de três fragmentos em gel de agarose (237, 189 e 48 pb).

Os genótipos polimórficos em cada um dos quatro genes analisados foram atribuídos aos pacientes e todos os polimorfismos foram analisados de maneira individual e de forma simultânea, investigando possíveis associações com a presença de cirrose e CHC, sendo os principais resultados mostrados nos itens 4.1.2 a 4.1.4.

**Tabela 4: Oligonucleotídeos para amplificação dos genes GSTT1, GSTM1, TP53 e MDM2.**

Gene	Oligonucleotídeo*	Sequência nucleotídica	Direção
GSTT1	GSTT1-sense	5' TTC CTT ACT GGT CCT CAC ATC TC 3'	Senso
	GSTT1-anti	5' TCA CCG GAT CAT GGC CAG CA 3'	Antissenso
GSTM1	GSTM1-sense	5' GAA CTC CCT GAA AAG CTA AAG C 3'	Senso
	GSTM1-anti	5' GTT GGG CTC AAA AAT ATA CGG TG 3'	Antissenso
β-globina	β-globina-sense	5' CAA CTT CAT CCA CGT TCA CC 3'	Senso
	β-globina-anti	5' GAA GAG CCA AGG ACA GGT AC 3'	Antissenso
TP53	TP53-sense	5' TTG CCG TCC CAA GCA ATG GAT GA 3'	Senso
	TP53-anti	5' TCT GGG AAG GGA CAG AAG ATG AC 3'	Antissenso
MDM2	MDM2-sense	5' CGC GGG AGT TCA GGG TAA AG 3'	Senso
	MDM2-anti	5' AGC TGG AGA CAA GTC AGG ACT TAA C 3'	Antissenso

\*Oligonucleotídeos (Ueda et al., 2003; Ueda et al., 2006; Wang et al., 2009).

## **3.2 Hipermetilação de DNA em tecido hepático**

### **3.2.1 Amostragem**

Para a análise dos níveis de metilação de DNA, foram selecionadas de forma aleatória 41 amostras de tecido hepático tumoral e não-tumoral conservadas em parafina de pacientes com hepatite crônica de qualquer etiologia, obtidas de um banco de tecidos por meio da colaboração com o Departamento de Anatomia Patológica do HUCFF-UFRJ. Foi realizada análise histológica das amostras para confirmar a caracterização de hepatite crônica, caracterizada por inflamação com ou sem fibrose. As amostras foram obtidas de 36 pacientes, sendo 20 pacientes com CHC, 4 com cirrose e 12 com apenas hepatite crônica. Adicionalmente, foram obtidas 5 amostras de tecido cirrótico adjacente de pacientes com CHC. Portanto, foram obtidas 41 amostras dos 36 pacientes.

As amostras de tecido com CHC e amostras de tecido cirrótico foram obtidas a partir de explantes de fígado ou ressecção cirúrgica, enquanto tecidos com hepatite crônica sem cirrose e câncer foram obtidos por biópsia percutânea do fígado. Dados demográficos e clínico-patológicos, como idade, gênero, histologia e infecções pelo HBV e HCV foram obtidos a partir de registros médicos.

### **3.2.2 Isolamento de ácido nucléico de tecido hepático**

Para cada amostra foram obtidas cinco seções de 10 µm do bloco de tecido conservado em parafina. As amostras foram desparafinizadas em 1 mL de xileno absoluto e centrifugadas a 13 200 rpm por 2 minutos. O sobrenadante foi removido e 1 mL de etanol 96% foi adicionado ao precipitado para remoção do xileno. Uma nova centrifugação a 13 200 rpm por 2 minutos foi realizada e o sobrenadante foi removido. As amostras foram incubadas por 10 minutos em temperatura ambiente com a tampa do tubo aberta para evaporação dos resíduos de etanol. Em seguida, as amostras foram submetidas à extração do DNA celular utilizando-se o QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (QIAGEN, Valencia, CA), conforme protocolo do fabricante. Posteriormente, foram armazenadas a temperatura de - 70°C.

### **3.2.3 Tratamento de DNA com bissulfito de sódio**

O DNA extraído das amostras de tecido hepático foi submetido ao tratamento com bissulfito de sódio, utilizando o EZ DNA Methylation-Lightning Kit (Zymo Research, Irvine, CA), seguindo o protocolo do fabricante. O princípio dessa

metodologia consiste na adição de íons bissulfito ( $\text{HSO}_3^-$ ) que seletivamente desaminam as citosinas não metiladas, seguida da conversão das citosinas não metiladas em uracilas. Dessa forma, as citosinas metiladas permanecem inalteradas, permitindo a identificação e quantificação posterior de sítios metilados na região de interesse. Após tratamento com bissulfito, as amostras foram armazenadas a temperatura de  $-70^\circ\text{C}$ .

### 3.2.4 Amplificação do DNA extraído do tecido

Após o tratamento com bissulfito de sódio, o DNA extraído foi amplificado por PCR para a região promotora dos genes RASSF1A e DOK1, segundo condições previamente descritas (Lambert et al., 2011). A região de interesse abrange seis dinucleotídeos CpG para o gene RASSF1A e cinco dinucleotídeos CpG para o gene DOK1, e foram amplificadas utilizando oligonucleotídeos específicos (tabela 5), sendo um deles biotilado. A modificação na região 5' pela adição de uma molécula de biotina nos oligonucleotídeos antissenso, gera uma alta afinidade por estreptavidina, permitindo a utilização da fita biotilada como molde durante a posterior etapa de síntese que ocorre no pirosequenciamento. A PCR foi realizada utilizando  $4\ \mu\text{l}$  do DNA tratado com bissulfito de sódio,  $10\ \text{pmol}$  dos oligonucleotídeo e  $1\ \text{U}$  de Platinum Taq DNA Polimerase High Fidelity (Invitrogen, San Diego, CA), em um volume final de reação de  $50\ \mu\text{l}$ . As amostras foram levadas ao termociclador utilizando-se o mesmo ciclo para ambos os genes:  $94^\circ\text{C}$  por 30 segundos, 35 ciclos de  $94^\circ\text{C}$  por 30 segundos,  $55^\circ\text{C}$  por 30 segundos e  $68^\circ\text{C}$  por 1 minuto, seguido por uma extensão final de 7 minutos a  $68^\circ\text{C}$ . Após a amplificação, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose a 2% para verificar o sucesso da amplificação e posteriormente armazenadas a  $-20^\circ\text{C}$ .

**Tabela 5: Oligonucleotídeos para amplificação da região promotora dos genes RASSF1A e DOK1.**

Gene	Oligonucleotídeo*	Sequência nucleotídica	Direção
RASSF1A	RAS-sense	5' AGT TTG GAT TTT GGG GGA GG 3'	Senso
	RAS-bio <sup>#</sup>	5' Bio-CAA CTC AAT AAA CTC AAA CTC CCC 3'	Antissenso
DOK1	DOK1-sense	5' GAG GTG GAG GAA GAT TTG 3'	Senso
	DOK1-bio <sup>#</sup>	5' Bio-CCA CAC TCA CAC ACT CAA 3'	Antissenso

\*Oligonucleotídeos (Lambert et al., 2011). <sup>#</sup>Biotilado.

### 3.2.5 Análise da metilação de DNA

Para a quantificação dos níveis de metilação, os produtos amplificados foram submetidos à reação de pirosequenciamento no pirosequenciador PyroMark Q96 ID (QIAGEN), utilizando o programa Pyro Q-CpG (QIAGEN). Essa técnica consiste em sequenciamento por síntese com monitoramento da incorporação de nucleotídeos em tempo real e conversão enzimática do pirofosfato liberado em sinal luminoso quantitativamente proporcional. Os oligonucleotídeos utilizados para o sequenciamento da região promotora dos genes RASSF1A e DOK1 podem ser vistos na tabela 6. Os resultados gerados podem ser avaliados em um pirograma e os níveis de metilação para cada gene foram obtidos pelas médias das porcentagens de metilação de seis sítios CpG na região promotora do gene RASSF1A e cinco na região promotora do gene DOK1. Para avaliar as frequências de hipermetilação de DNA em amostras de CHC e cirrose, foram definidos valores de corte (*cut-off*) para os genes RASSF1A e DOK1, obtidos a partir do quantile representando os 95% superiores em níveis de metilação de amostras sem cirrose e sem CHC, conforme definido anteriormente (Lambert et al., 2011). Portanto, as frequências de hipermetilação de DNA de indivíduos com cirrose e com CHC foram representadas como a porcentagem de amostras com níveis de metilação acima do valor de corte definido para cada gene.

**Tabela 6: Oligonucleotídeos para o pirosequenciamento da região promotora dos genes RASSF1A e DOK1.**

Gene	Oligonucleotídeo*	Sequência nucleotídica	Concentração
RASSF1A	RAS-seq	5' GGG TTA GTT TTG TGG TTT 3'	0,4 µM
DOK1	DOK-seq	5' AGT TTT GGG GGT GGT 3'	

\*Oligonucleotídeos (Lambert et al., 2011).

## 3.3 Hipermetilação em DNA livre circulante em soro

### 3.3.1 Amostragem

Para o estudo da hipermetilação em cfDNA circulante em soro, 115 indivíduos foram selecionados de forma consecutiva durante o período de março de 2011 a março de 2017. Por meio de análise de prontuários, foram selecionados 95 pacientes com hepatite C crônica atendidos no ambulatório do Serviço de Hepatologia do HUCFF-UFRJ. Destes, 26 pacientes apresentaram apenas hepatite

C crônica, 37 apresentaram cirrose e 32 apresentaram CHC. Adicionalmente, 20 indivíduos sem doença hepática também foram selecionados para este estudo. Todos os indivíduos foram submetidos à coleta de sangue e um questionário foi preenchido contendo dados demográficos, clínicos e epidemiológicos.

Os critérios de inclusão de pacientes com diagnóstico de hepatite C crônica, foram indivíduos maiores de 18 anos, com e sem diagnóstico de cirrose hepática e CHC, e que tenham aceitado participar do estudo após a leitura do TCLE. Os critérios de inclusão de indivíduos sem doença hepática foram idade superior a 18 anos, diagnóstico negativo para o anticorpo anti-HCV e ter aceitado participar do estudo após a leitura do TCLE. O diagnóstico de hepatite C crônica foi determinado pela presença de anticorpo anti-HCV e RNA viral por mais de seis meses. O diagnóstico de cirrose foi definido por meio de exame histopatológico através da análise de biópsias hepáticas sendo observado estágio 4 segundo a classificação de METAVIR ou por meio de elastografia hepática transitória. O diagnóstico de CHC foi determinado segundo o critério de Barcelona (Easl-Eortc, 2012).

Os critérios de exclusão de pacientes com diagnóstico de hepatite C crônica foram coinfeção com HBV ou HIV, nódulo hepático sem diagnóstico, além de pacientes que não tiveram condições de se submeter à coleta de sangue e que não concordaram com o TCLE. Os critérios de exclusão de indivíduos sem doença hepática foram diagnósticos prévios de hepatite C, hepatite B (anti-HCV, HBsAg e anti-HBc negativos) e infecção pelo HIV. O diagnóstico de hepatite B e de infecção pelo HIV foram determinados pela presença do antígeno HBsAg e presença do anticorpo anti-HIV, respectivamente.

As amostras de sangue total, obtidas na coleta de sangue periférico, foram centrifugadas a 3.000 rpm por 5 minutos para obtenção do soro e em seguida, foram aliquotadas e estocadas a - 20°C. Após o período da coleta, as 115 amostras foram transportadas ao laboratório da IARC, em Lyon, França.

### **3.3.2 Extração de DNA**

No laboratório da IARC, as 115 amostras foram submetidas à extração de DNA partindo de 1 mL de soro utilizando-se o QIAamp circulating nucleic acid kit (QIAGEN) com o QIAvac 24 Plus vacuum manifold, de acordo com as instruções do fabricante. Posteriormente, o DNA extraído foi quantificado pelo equipamento Qubit 2.0 Fluorometer (Thermo Fisher Scientific), que atua como um espectrofotômetro, possibilitando a quantificação utilizando apenas 1 µl de DNA. Adicionalmente, o



conteúdo total de duas amostras extraídas foi submetido à eletroforese em gel de agarose a 2%. Além disso, após extração de DNA, uma amostra foi submetida ao equipamento 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Santa Clara, CA), utilizando o High Sensitivity DNA Chip (Agilent Technologies) para verificação dos tamanhos dos fragmentos de DNA obtidos. Essa técnica consiste em eletroforese capilar baseada em microfluídica com utilização de chip.

### **3.3.3 Seleção do cfDNA livre circulante**

A etapa de seleção do DNA livre circulante foi realizada para excluir possíveis fragmentos de DNA maiores, oriundos de células sanguíneas liberadas no soro durante o processamento das amostras. Dessa forma, foram selecionados fragmentos de DNA de menor tamanho, correspondentes ao cfDNA, por meio do reagente AMPure XP (Beckman Coulter, Brea, CA), utilizando o protocolo do SPRIselect (Beckman) modificado (descrito no apêndice A).

Essa técnica foi padronizada utilizando os marcadores de peso molecular 1 kb DNA Ladder e 100 bp DNA Ladder (New England Biolabs, Ipswich, MA), misturados na quantidade total de 200 ng, para simular as amostras, uma vez que juntos apresentam fragmentos de DNA de 100 pares de bases até 10 mil pares de bases. Adicionalmente, uma amostra de soro extraída (LCR 36), que apresentou a maior quantidade de DNA após extração (585,6 ng), também foi utilizada na padronização da técnica.

Utilizando marcadores de peso molecular como amostras, foram testadas três diferentes estratégias de acordo com as razões entre *beads* e DNA, em duas etapas do procedimento, conforme protocolo. Para a primeira estratégia, a quantidade de *beads* utilizada foi de 0.55x a quantidade de DNA, na primeira etapa e de 1.25x na segunda etapa. Para a segunda estratégia, a quantidade de *beads* utilizada foi de 0.65x seguida de 1.15x e para a terceira etapa a quantidade utilizada foi de 0.75x seguida de 1.05x. Adicionalmente, a amostra LCR 36 foi homogeneizada e aliquoteada em dois tubos e, em seguida, os dois tubos foram submetidos à duas estratégias de seleção, com a razão entre *beads* e DNA de 0.55x, seguida de 1.25x e com a razão 0.75x seguida de 1.05x. A eficiência da seleção de cfDNA foi verificada por gel de agarose a 2% e pelo Qubit 2.0 Fluorometer.

Posteriormente, 48 amostras extraídas foram submetidas à seleção de fragmentos utilizando o protocolo já padronizado. Para essa etapa, foram selecionadas as 12 amostras com maior quantidade de DNA de cada um dos quatro

grupos de estudo: indivíduos sem doença hepática, pacientes com hepatite C crônica, pacientes com hepatite C crônica e cirrose e pacientes com CHC. Todas as 48 amostras foram quantificadas pelo Qubit 2.0 Fluorometer e 10 amostras foram submetidas ao 2100 Bioanalyzer para verificação dos tamanhos dos fragmentos selecionados.

#### **3.3.4 Tratamento com bissulfito de sódio**

Após seleção do cfDNA, as 24 amostras que apresentaram maior quantidade de DNA após a seleção do cfDNA (> 6,56 ng) foram submetidas ao tratamento com bissulfito de sódio pelo EpiTect Bisulfite Kit (QIAGEN), seguindo o protocolo do fabricante. O tratamento citado promove a conversão de todas as citosinas não metiladas em uracilas. Durante a conversão, ocorre a adição de íons bissulfito ( $\text{HSO}_3^-$ ) que seletivamente desaminam as citosinas não metiladas. Ao final do tratamento, apenas as citosinas metiladas permanecem, permitindo sua posterior identificação e quantificação.

#### **3.3.5 Construção da biblioteca de cfDNA**

Para a construção da biblioteca de cfDNA foi utilizado o Nextera® XT DNA Library Preparation (Illumina, San Diego, CA), segundo protocolo do fabricante. Essa técnica permite a utilização de 1 ng de DNA inicial, ideal para amostras com baixa quantidade de DNA isolado e foi realizada por meio de duas estratégias. Como não é possível quantificar com confiabilidade o DNA das amostras após o tratamento com bissulfito de sódio, pois apresentam-se parcialmente fita dupla, foram testadas diferentes quantidades de DNA inicial na etapa de tagmentação, primeira etapa para a construção da biblioteca de DNA. Para isso, foi considerada a quantificação pelo equipamento Qubit 2.0 Fluorometer antes da etapa de conversão com bissulfito de sódio, levando em conta uma perda de DNA após essa etapa. Em uma primeira estratégia, quatro diferentes amostras foram submetidas ao procedimento, considerando a taxa de DNA recuperado após a etapa de conversão com bissulfito de sódio de 60%, 70%, 80% e 100%. Após o cálculo da taxa de DNA recuperado, foi utilizado 1 ng de DNA de cada amostra na etapa de tagmentação e em seguida as amostras foram submetidas ao Qubit 2.0 Fluorometer para quantificação e ao 2100 Bioanalyzer para verificação dos tamanhos dos fragmentos obtidos.

Em uma segunda estratégia, cinco amostras extraídas e não submetidas ao tratamento com bissulfito de sódio foram utilizadas para checar a eficiência da

tagmentação com diferentes concentrações de DNA inicial. As amostras foram utilizadas na concentração de 0,8 ng, 1 ng, 1,2 ng, 1,8 ng 2 ng e submetidas ao procedimento segundo protocolo do fabricante. Em seguida, as amostras foram submetidas ao equipamento Qubit 2.0 Fluorometer e ao equipamento 2100 Bioanalyzer para quantificação e verificação dos tamanhos dos fragmentos obtidos, sendo esperado um aumento na quantidade de DNA, devido a etapa de amplificação, e um tamanho do fragmento de 135 pb.

### **3.4 Análise estatística**

As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o software estatístico SPSS versão 20 (*Statistical Package for Social Sciences* – IBM Corporation, NY, EUA). O valor de significância adotado foi de 5%. Para a análise dos polimorfismos, as frequências genotípicas foram checadas quanto ao equilíbrio de Hardy-Weinberg. Na análise descritiva, as variáveis numéricas foram apresentadas sob a forma de média e desvio padrão, enquanto as variáveis categóricas foram expressas em frequência. Na análise comparativa, foram utilizados os testes Chi-quadrado de Pearson ou teste exato de Fisher para as variáveis categóricas, quando apropriado. Após teste de normalidade, todas as variáveis numéricas foram consideradas não normais e foram utilizados os testes de Mann-Whitney, quando analisados dois grupos e Kruskal-Wallis quando analisados três grupos. O erro de tipo 1 foi ajustado para comparações múltiplas, quando necessário. Para o cálculo do Odds Ratio (OR) considerou-se um intervalo de confiança de 95%.

### **3.5 Aspectos éticos**

Este estudo foi aprovado pelos Comitês de Ética em Pesquisa com Seres Humanos do Instituto Oswaldo Cruz (nº do parecer 1.358.935) e do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho (nº 139/10) e podem ser visualizados no apêndice B.

## 4 RESULTADOS

Para melhor compreensão, a descrição dos resultados foi organizada em três sessões: i) polimorfismos genéticos; ii) hipermetilação de DNA em tecido hepático; e iii) hipermetilação em DNA livre circulante em soro.

### 4.1 Polimorfismos genéticos

#### 4.1.1 *Análise do perfil demográfico e clinico-patológico dos pacientes analisados de acordo com a presença de cirrose e CHC*

Para análise do perfil dos pacientes no estudo da frequência de polimorfismos genéticos, foram analisados 190 pacientes com infecção crônica para o HCV quanto as suas características demográficas e clinico-patológicas (tabela 7). Destes, 47 pacientes tinham diagnóstico de hepatite crônica (sem cirrose e sem câncer), 83 pacientes tinham diagnóstico de cirrose, e 60 pacientes tinham diagnóstico de CHC.

A média de idade dos pacientes foi de 60 anos ( $\pm 10,0$ ). Ao comparar os três diferentes estágios da doença hepática, a presença de CHC foi associada à idade média mais avançada (64 anos,  $p < 0,001$ ), enquanto não houve diferença significativa na idade média dos pacientes de acordo com a presença ou ausência de cirrose, ambos com 59 anos.

A frequência de indivíduos do gênero masculino foi maior em pacientes com CHC (53,3%), sendo 1,24 vezes maior que a presença de homens no grupo de pacientes sem CHC (43,1%). Além disso, ao comparar a frequência de indivíduos do gênero masculino em pacientes em estágios mais avançados da doença hepática, com presença de cirrose ou CHC (51,7%), a mesma foi significativamente maior ( $p = 0,009$ ) quando comparado com o grupo de pacientes com apenas hepatite crônica (29,9%).

Os níveis médios de ALT, AST, FAL, GGT, BIL T. e AFP foram significativamente mais elevados em pacientes em estágios de doença hepática mais avançados, com presença de cirrose ou CHC ( $p < 0,025$ ), enquanto os níveis médios de ALB foram significativamente mais baixos ( $p = 0,021$ ). Ao comparar a presença ou ausência de CHC, apenas AST, FAL e AFP foram significativamente mais elevados em pacientes com CHC.

**Tabela 7: Perfil demográfico e clínico-patológico dos pacientes de acordo com a presença de cirrose e CHC.**

Dados	CHC	Sem CHC		<i>p</i>		
		Cirrose	Hepatite crônica	CHC vs sem CHC	Cirrose vs hepatite crônica	CHC + cirrose vs hepatite crônica
Idade (ano, média ± $\sigma$ )	63,7 ± 1,5 (59)	59,2 ± 1,4 (76)	59,3 ± 3,5 (47)	0,000*	0,204	0,009*
Gênero masculino	53.3% (32/60)	50.6% (42/83)	29.8% (14/47)	0,188	0,021*	0,009*
ALT (U/L, média ± $\sigma$ )	86,0 ± 6,8 (42)	101,5 ± 11,5 (62)	54,4 ± 6,3 (32)	0,393	0,060	0,024*
AST (U/L, média ± $\sigma$ )	99,2 ± 9,9 (42)	90,4 ± 11,6 (61)	46,9 ± 7,8 (33)	0,026*	0,009*	0,001*
FAL (U/L, média ± $\sigma$ )	167,3 ± 23,4 (42)	118,0 ± 6,4 (60)	89,7 ± 9,7 (29)	0,008*	0,000*	0,000*
GGT (U/L, média ± $\sigma$ )	217,8 ± 52,8 (42)	176,7 ± 34,5 (62)	94,0 ± 23,4 (29)	0,051	0,019*	0,004*
ALB (g/dL, média ± $\sigma$ )	3,6 ± 0,1 (40)	3,6 ± 0,1 (58)	3,7 ± 0,1 (28)	0,609	0,021*	0,021*
BIL T. (mg/dL, média ± $\sigma$ )	1,2 ± 0,1 (41)	1,0 ± 0,1 (59)	0,6 ± 0,1 (31)	0,059	0,010*	0,002*
AFP (ng/mL, média ± $\sigma$ )	703,8 ± 2775,1 (39)	15,6 ± 21,3 (39)	5,6 ± 4,1 (19)	0,000*	0,518	0,019*
Tratamento antiviral	55,8% (29/52)	72,1% (49/68)	75,6% (34/45)	0,024*	0,680	0,196

$\sigma$ : desvio padrão. \**p* valor significativo. Testes Chi-quadrado de Pearson, teste exato de Fisher ou teste de Mann-Whitney, quando apropriado. CHC: carcinoma hepatocelular. ALT: alanina aminotransferase. AST: aspartato aminotransferase. FAL: fosfatase alcalina. GGT: gama glutamil transpeptidase. ALB: albumina. BIL T.: bilirrubina total. AFP: alfafetoproteína.

O número de indivíduos que nunca foram submetidos ao tratamento antiviral para o HCV foi significativamente maior em pacientes com CHC ( $p = 0,024$ ), quando comparados a pacientes sem CHC.

Na análise molecular para o HCV, foi possível determinar os subtipos do HCV em 133 pacientes conforme a tabela 8. De forma geral, o subtipo mais frequente foi o 1a com 44,4%, seguido do 1b com 41,3% e do 3a com 14,3%. No grupo de pacientes com CHC o subtipo mais frequente foi o 1b com 41,3%, no grupo de pacientes com cirrose o subtipo mais frequente foi o 1a com 55,4% e no grupo de pacientes com apenas hepatite C crônica o subtipo mais frequente foi o 1b com 51,6%. A análise estatística demonstrou a associação entre o subtipo 1a e a presença de cirrose hepática ( $p = 0,039$ ).

**Tabela 8: Distribuição dos genótipos do vírus da hepatite C de acordo com a presença de cirrose e CHC.**

Genótipos do HCV	Sem CHC			$p$		
	CHC (n = 46)	Cirrose (n = 56)	Hepatite crônica (n = 31)	CHC vs sem CHC	Cirrose vs hepatite crônica	CHC + cirrose vs hepatite crônica
1a	39,1% (18)	55,4% (31)	32,3% (10)	0,103	0,039*	0,121
1b	41,3% (19)	35,7% (20)	51,6% (16)	0,563	0,149	0,185
3a	19,6% (9)	8,9% (5)	16,1% (5)	0,120	0,319	0,772

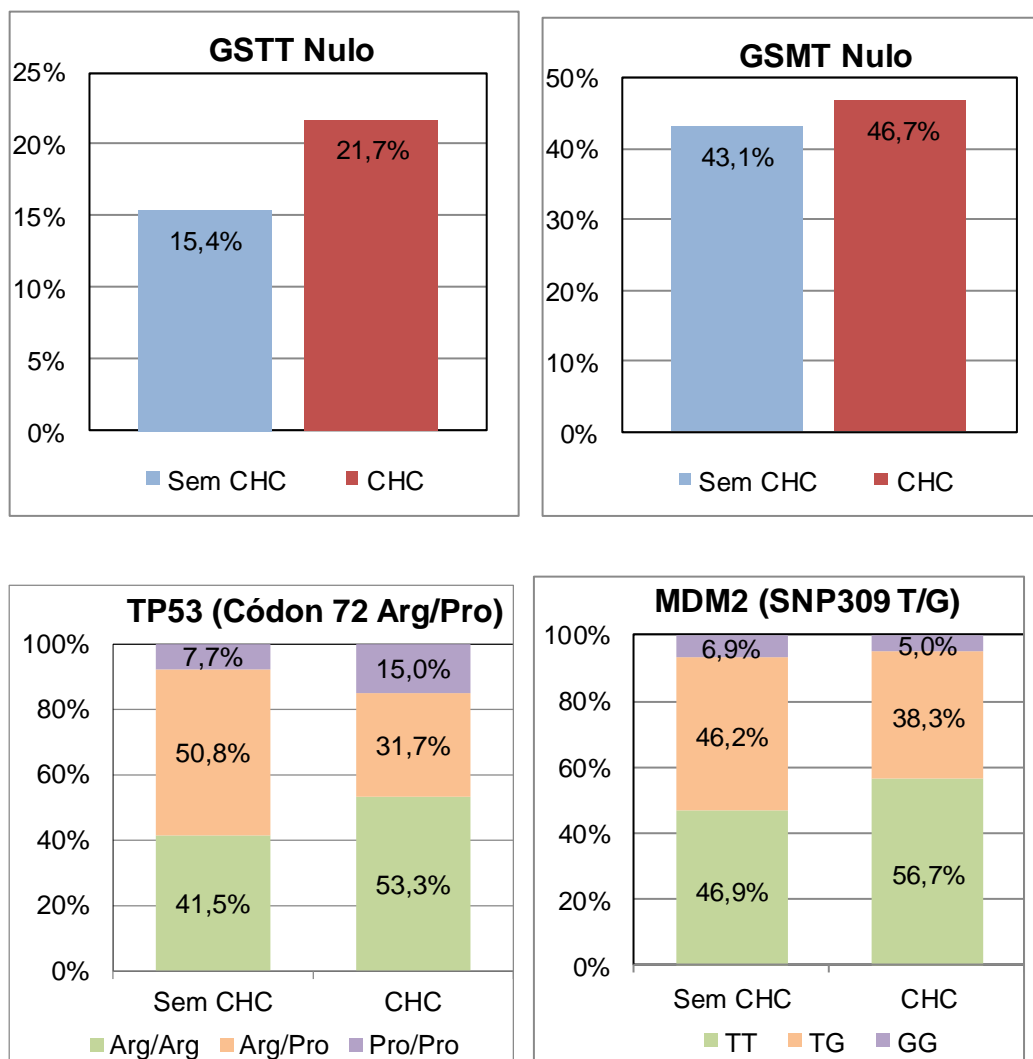
\* $p$  valor significativo. Testes Chi-quadrado de Pearson ou teste exato de Fisher, quando apropriado. CHC: carcinoma hepatocelular. HCV: vírus da hepatite C.

#### **4.1.2 Análise do perfil genotípico de polimorfismos e presença de CHC em pacientes com HCV**

Para a análise da frequência de polimorfismos genéticos quanto a presença de CHC, foram selecionados 190 pacientes com infecção crônica para o HCV, sendo 60 destes pacientes com CHC e 130 pacientes sem CHC (figura 24 e tabela 9).

Pacientes com CHC apresentaram uma maior frequência do genótipo nulo para os genes GSTT1 (21,7%) e GSTM1 (46,7%), quando comparados aos pacientes sem CHC (15,4% e 43,1%, respectivamente). O mesmo ocorreu para ambos os genótipos homozigotos Pro/Pro e Arg/Arg para o gene TP53, encontrados

em 15% e 53,3% em pacientes com CHC e em 7,7% e 41,5% em pacientes sem CHC, respectivamente. Assim como o genótipo TT para o gene MDM2, que apresentou frequência de 56,7% no grupo de pacientes com CHC e 46,9% no grupo sem CHC. Enquanto o genótipo G/G para o gene MDM2 foi encontrado com maior frequência em pacientes sem CHC (6,9% vs 5%). Entretanto, não houve associação estatística entre a presença de CHC e os genótipos polimórficos analisados.



**Figura 24: Perfil genotípico dos polimorfismos analisados nos genes GSTT1, GSTM1, TP53 e MDM2 de acordo com a presença de CHC.**

CHC: carcinoma hepatocelular. GSTT1: gene *Glutathione S-transferase theta 1*. GSTM1: gene *Glutathione S-transferase mu 1*. TP53: gene *Tumor protein p53*. MDM2: gene *MDM2 proto-oncogene*.

**Tabela 9: Frequência genotípica dos polimorfismos analisados nos genes GSTT1, GSTM1, TP53 e MDM2 de acordo com a presença de CHC.**

Gene	SNP rs number	Genótipo	CHC (n = 60)	Sem CHC (n = 130)	<i>p</i>	OR	95%CI
GSTT1	-	Nulo <sup>#</sup>	21,7% (13)	15,4% (20)	0,288	1,52	0,70 – 3,31
GSTM1	-	Nulo <sup>#</sup>	46,7% (28)	43,1% (56)	0,643	1,16	0,63 – 2,14
TP53	rs1042522	Pro/Pro	15,0% (9)	7,7% (10)	0,119	2,12	0,81 – 5,52
		Arg/Arg	53,3% (32)	41,5% (54)	0,129	1,61	0,87 – 2,98
MDM2	rs2279744	G/G	5,0% (3)	6,9% (9)	0,756	0,71	0,19 – 2,71
		T/T	56,7% (34)	46,9% (61)	0,212	1,48	0,80 – 2,74

Testes Chi-quadrado de Pearson ou teste exato de Fisher, quando apropriado. OR: cálculo do Odds Ratio. 95%CI: intervalo de confiança de 95%. CHC: carcinoma hepatocelular. GSTT1: gene *Glutathione S-transferase theta 1*. GSTM1: gene *Glutathione S-transferase mu 1*. TP53: gene *Tumor protein p53*. MDM2: gene *MDM2 proto-oncogene*. <sup>#</sup>genótipo nulo: deleção.



#### **4.1.3 Análise do perfil genotípico de polimorfismos simultâneos e presença de CHC em pacientes com HCV**

Na análise da frequência de polimorfismos genéticos de mais de um gene simultaneamente, quanto à presença de CHC, foram analisados 190 pacientes com infecção crônica para o HCV. Destes, 60 foram pacientes com CHC e 130 pacientes sem CHC (tabela 10).

Pacientes com CHC apresentaram uma maior frequência do genótipo nulo (deleção) para ambos os genes GSTT1 e GSTM1 (8,3%), quando comparados aos pacientes sem CHC (3,1%). Os genótipos simultâneos GSTT1 nulo e TP53 Pro/Pro também foram encontrados com maior frequência em pacientes com CHC (6,7%), ao comparar a pacientes com ausência do tumor (0,8%). Ademais, os genótipos simultâneos GSTM1 nulo e MDM2 T/T, foram encontrados com frequência maior em pacientes com CHC (30%), quando comparados aos pacientes sem CHC (20,8%). O mesmo ocorreu para os genótipos simultâneos GSTM1 nulo e TP53 Arg/Arg, encontrados em 26,7% dos pacientes com CHC e em 13,1% dos pacientes sem CHC. Além disso, os genótipos simultâneos GSTM1 nulo, TP53 Arg/Arg e MDM2 T/T foram encontrados em 15% dos pacientes com CHC e em apenas 5,4% dos pacientes sem CHC. Já a ocorrência simultânea dos genótipos TP53 Pro/Pro e MDM2 G/G só foi observada em pacientes com CHC (3,3%).

Após análise estatística, o perfil genotípico simultâneo GSTT1 nulo e TP53 Pro/Pro, o perfil genotípico simultâneo GSTM1 nulo e TP53 Arg/Arg, além do perfil genotípico simultâneo GSTM1 nulo, TP53 Arg/Arg e MDM2 T/T, foram associados a presença de CHC ( $p < 0,050$ ).

**Tabela 10: Frequência genotípica de polimorfismos simultâneos nos genes GSTT1, GSTM1, TP53 e MDM2 de acordo com a presença de CHC.**

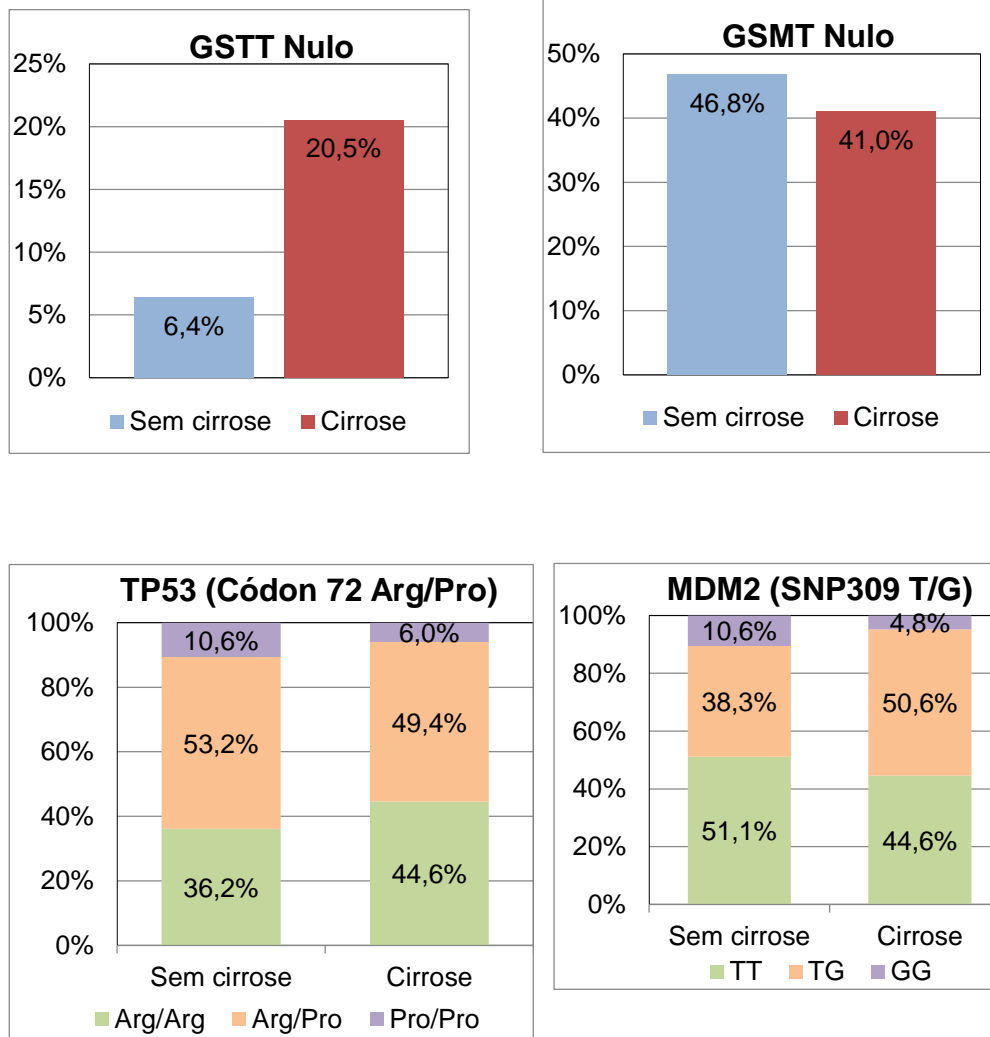
Gene	Genótipo	CHC (n = 60)	Sem CHC (n = 130)	<i>p</i>	OR	95%CI
GSTT1/GSTM1	Nulo <sup>#</sup>	8,3% (5)	3,1% (4)	0,144	2,86	0,74 – 11,07
GSTT1/TP53	Nulo <sup>#</sup> + Pro/Pro	6,7% (4)	0,8% (1)	0,035*	9,21	1,01 – 84,31
GSTM1/MDM2	Nulo <sup>#</sup> + TT	30,0% (18)	20,8% (27)	0,164	1,64	0,82 – 3,28
GSTM1/TP53	Nulo <sup>#</sup> + Arg/Arg	26,7% (16)	13,1% (17)	0,022*	2,42	1,12 – 5,20
TP53/MDM2	Pro/Pro + GG	3,3% (2)	0% (0)	0,099	11,15	0,53 – 236,00
GSTM1/TP53/MDM2	Nulo <sup>#</sup> + Arg/Arg + TT	15,0% (9)	5,4% (7)	0,027*	3,10	1,10 – 8,78

\**p* valor significativo. Testes Chi-quadrado de Pearson ou teste exato de Fisher, quando apropriado. OR: cálculo do Odds Ratio. 95%CI: intervalo de confiança de 95%. CHC: carcinoma hepatocelular. GSTT1: gene *Glutathione S-transferase theta 1*. GSTM1: gene *Glutathione S-transferase mu 1*. TP53: gene *Tumor protein p53*. MDM2: gene *MDM2 proto-oncogene*. <sup>#</sup>genótipo nulo: deleção.

#### **4.1.4 Análise do perfil genotípico de polimorfismos e presença de cirrose em pacientes com HCV**

Na análise da frequência de polimorfismos genéticos quanto à presença de cirrose, foram analisados 130 pacientes com infecção crônica para o HCV, dentre eles 83 pacientes com cirrose e 47 pacientes sem cirrose (figura 25 e tabela 11).

Pacientes com cirrose apresentaram uma maior frequência do genótipo nulo para o gene GSTT1, com frequência de 20,5%, quando comparados a pacientes sem cirrose, com frequência de 6,4%. O genótipo Arg/Arg para o gene TP53 também foi mais frequente em pacientes com cirrose, apresentando frequência de 44,6%, comparado com pacientes sem cirrose com frequência de 36,2%. Entretanto, o genótipo nulo para o gene GSTM1 foi encontrado com menor frequência em pacientes com cirrose (41%), quando comparados a pacientes sem cirrose (46,8%). Além disso, o genótipo Arg/Arg para o gene TP53 também foi encontrado em menor frequência em pacientes com cirrose (6%), quando comparados a pacientes sem cirrose (10,6%). O mesmo ocorreu para os genótipos GG e TT do gene MDM2, que apresentaram frequência de 4,8% e 44,6% em pacientes com cirrose, respectivamente, e frequência de 10,6% e 51,1% em pacientes sem cirrose, respectivamente. Entretanto, após análise estatística, apenas o genótipo nulo para o gene GSTT1 foi associado a presença de cirrose ( $p = 0,032$ ).



**Figura 25: Perfil genotípico dos polimorfismos analisados nos genes GSTT1, GSTM1, TP53 e MDM2 de acordo com a presença de cirrose.**

CHC: carcinoma hepatocelular. GSTT1: gene *Glutathione S-transferase theta 1*. GSTM1: gene *Glutathione S-transferase mu 1*. TP53: gene *Tumor protein p53*. MDM2: gene *MDM2 proto-oncogene*.

**Tabela 11: Frequência genotípica dos polimorfismos analisados nos genes GSTT1, GSTM1, TP53 e MDM2 de acordo com a presença de cirrose.**

Gene	SNP rs number	Genótipo	Cirrose (n = 83)	Sem Cirrose (n = 47)	<i>p</i>	OR	95%CI
GSTT1	-	Nulo <sup>#</sup>	20,5% (17)	6,4% (3)	0,032*	3,78	1,05 – 13,66
GSTM1	-	Nulo <sup>#</sup>	41,0% (34)	46,8% (22)	0,518	0,79	0,38 – 1,62
TP53	rs1042522	Pro/Pro	6,0% (5)	10,6% (5)	0,495	0,54	0,15 – 1,97
		Arg/Arg	44,6% (37)	36,2% (17)	0,350	1,42	0,68 – 2,96
MDM2	rs2279744	GG	4,8% (4)	10,6% (5)	0,283	0,43	0,11 – 1,67
		TT	44,6% (37)	51,1% (24)	0,477	0,77	0,38 – 1,58

\**p* valor significativo. Testes Chi-quadrado de Pearson ou teste exato de Fisher, quando apropriado. OR: cálculo do Odds Ratio. 95%CI: intervalo de confiança de 95%. CHC: carcinoma hepatocelular. GSTT1: gene Glutathione S-transferase theta 1. GSTM1: gene Glutathione S-transferase mu 1. TP53: gene Tumor protein p53. MDM2: gene MDM2 proto-oncogene. <sup>#</sup>genótipo nulo: deleção.

## **4.2 Hipermetilação de DNA em tecido hepático**

Os resultados apresentados a seguir, sobre o estudo da hipermetilação de DNA em tecido hepático tumoral e não tumoral, foram publicados na revista científica PLOS ONE em 2016 (apêndice C).

### ***4.2.1 Análise do perfil demográfico e clinico-patológico das amostras analisadas***

Dentre 36 pacientes incluídos no estudo, 41 amostras de tecidos foram analisadas, 12 amostras de pacientes com hepatite crônica sem cirrose, 4 de pacientes com cirrose e 20 de pacientes com CHC. Adicionalmente, 5 amostras de tecido cirrótico adjacente foram analisadas de pacientes com CHC.

O perfil demográfico e clinico-patológico das amostras analisadas contendo informações sobre idade, gênero, histologia e infecções pelo HBV e HCV pode ser visto na tabela 12. A idade média dos pacientes foi de 57 anos (de 19 a 78 anos), com 47% apresentando idade superior a 60 anos. A maior parte (72%) dos pacientes eram homens. A infecção crônica pelo HCV foi o principal fator etiológico, representando 56% dos casos, seguida de infecção crônica pelo HBV com 19% dos casos. A maior parte (70%) dos pacientes com CHC apresentava tumor moderadamente diferenciado e metade apresentava tamanho de tumor superior a 5 cm.

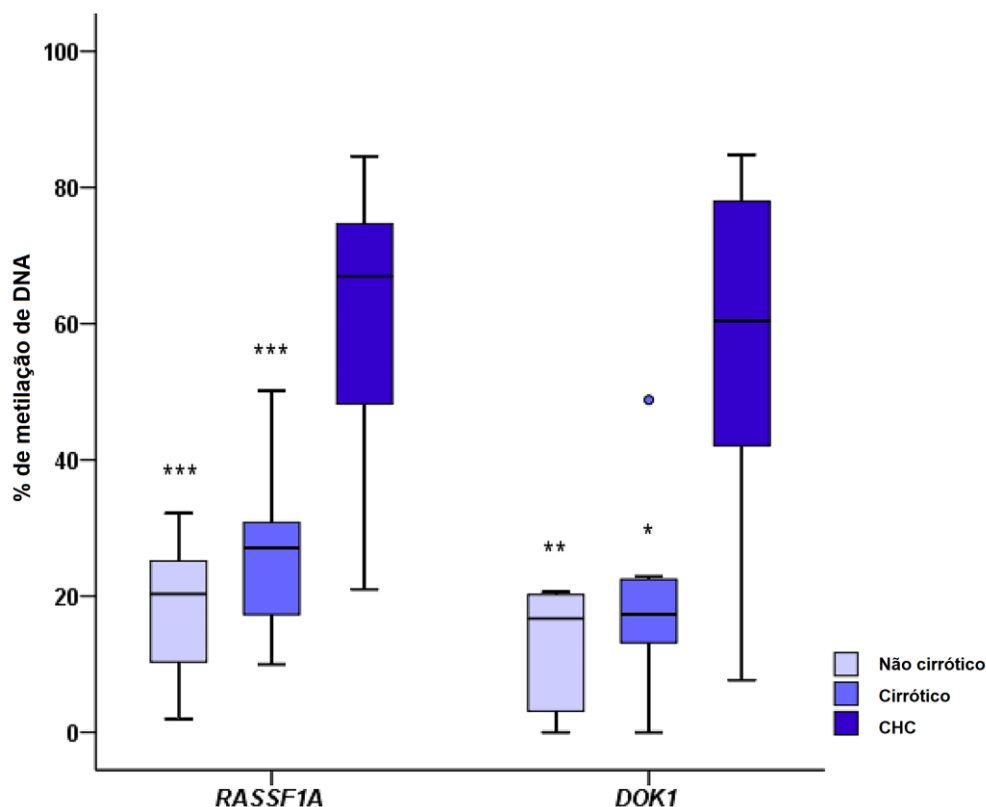
**Tabela 12: Perfil demográfico e clínico-patológico dos pacientes analisados de acordo com a presença de cirrose e CHC.**

	CHC (n=20)	Cirrose (n=4)	Hepatite crônica (n=12)	Total (n=36)
<b>Idade (ano)</b>				
<40	3 (15%)	0	1 (8%)	4 (11%)
[40-60]	7 (35%)	1 (25%)	5 (42%)	13 (36%)
≥60	10 (50%)	3 (75%)	4 (33%)	17 (47%)
ND	0	0	2 (17%)	2 (6%)
<b>Gênero</b>				
Feminino	4 (20%)	0	4 (33%)	8 (22%)
Masculino	16 (80%)	4 (100%)	6 (50%)	26 (72%)
ND	0	0	2 (17%)	2 (6%)
<b>Infecção viral</b>				
HBV	5 (25%)	0	2 (17%)	7 (19%)
HCV	10 (50%)	1 (25%)	9 (75%)	20 (56%)
Sem vírus	2 (10%)	3 (75%)	1 (8%)	6 (17%)
ND	3 (15%)	0	0	3 (8%)
<b>Diferenciação do tumor</b>				
Alta	0	NA	NA	NA
Moderada	14 (70%)			
Baixa	6 (30%)			
<b>Tamanho do tumor</b>				
<5 cm	8 (40%)	NA	NA	NA
>5 cm	10 (50%)			
ND	2 (10%)			
<b>Amostras de tecido (n=41)</b>				
CHC	20	0	0	20
Cirrótico	5	4	0	9
Não Cirrótico	0	0	12	12

NA: não aplicável. ND: Não determinado. CHC: carcinoma hepatocelular. HBV: vírus da hepatite B. HCV: vírus da hepatite C.

#### 4.2.2 Análise dos níveis de metilação de DNA em tecido hepático não cirrótico, cirrótico e com CHC

Os níveis de metilação de DNA foram expressos como a porcentagem média de todos as CpGs analisadas para cada gene. Para ambos os genes, foram observados níveis de metilação mais baixos nos tecidos não cirróticos, moderados em tecidos cirróticos e mais elevados em tecidos com CHC (Figura 26).



**Figura 26: Níveis de metilação de DNA nos genes RASSF1A e DOK1 em tecidos não cirróticos, cirróticos e com CHC.**

\*Outliers. CHC: carcinoma hepatocelular. RASSF1A: gene *Ras association domain family member 1 isoform A*. DOK1: gene *Docking protein 1*.

A média dos níveis de metilação de DNA para os genes RASSF1A e DOK1 foi 16,2% e 12,0% em tecido não cirrótico, 26,1% e 19,6% em tecido cirrótico e 59,1% e 56,0% em tecidos com CHC, respectivamente. Foi observada uma associação entre níveis de metilação mais elevados e a presença de CHC para ambos os genes. No entanto, não foi observada diferença estatisticamente significativa nos níveis de metilação entre tecidos cirróticos e não cirróticos nos genes analisados (tabela 13).



**Tabela 13: Média dos níveis de metilação de DNA para os genes RASSF1A e DOK1 em tecidos não cirróticos, cirróticos e com CHC.**

Gene	Não Cirrótico	Cirrótico	CHC	<i>p</i>		
				Cirrótico x Não Cirrótico	CHC x Não Cirrótico	CHC x Cirrótico
RASSF1A, média ± $\sigma$ (%)	16,2 ± 9,4	26,1 ± 11,7	59,1 ± 19,3	0,165	<0,001*	<0,001*
DOK1, média ± $\sigma$ (%)	12,0 ± 9,6	19,6 ± 15,0	56,0 ± 23,3	1,000	0,003*	0,012*

$\sigma$ : desvio padrão. \**p* valor significativo. Teste de Mann-Whitney. CHC: carcinoma hepatocelular. RASSF1A: gene *Ras association domain family member 1 isoform A*. DOK1: gene *Docking protein 1*.

Ao analisar amostras pareadas de tecidos com CHC e tecidos adjacentes cirróticos, observou-se uma associação entre níveis de metilação de DNA mais elevados e a presença de CHC, para o gene DOK1. Entretanto essa associação não foi observada para o gene RASSF1A. Os níveis de metilação de DNA em tecidos cirróticos de pacientes sem CHC e tecidos cirróticos adjacentes de pacientes com CHC também foram comparados, no entanto não houve diferença significativa em ambos os genes (RASSF1A,  $p = 0,652$ ; DOK1,  $p = 0,231$ ).

#### **4.2.3 Análise comparativa entre os níveis de metilação de DNA em tecido hepático com CHC e características demográficas e clinico-patológicas**

A análise da associação entre os níveis de metilação de DNA determinados em amostras de tecidos hepáticos com CHC e as características demográficas e clínico-patológicas idade, gênero, histologia e infecções pelo HBV e HCV, estão demonstradas na tabela 14. De forma geral, foram observados padrões similares para ambos os genes RASSF1A e DOK1, entretanto não foi observada associação entre as características analisadas e os níveis de metilação do gene RASSF1A.

Ao analisar a faixa etária, observou-se uma diferença estatisticamente significativa ao comparar os níveis de metilação de DOK1 entre as faixas etárias analisadas ( $p = 0,036$ ), com maiores níveis de metilação de DNA no grupo de pacientes mais jovens (<40 anos). Além disso, foi observada uma associação ( $p = 0,005$ ) entre níveis mais elevados de metilação de DNA e amostras de tumor classificadas como moderadamente diferenciados, ao comparar com amostras classificadas como pouco diferenciados. Embora os níveis de metilação de DNA dos

genes RASSF1A e DOK1 tenham sido maiores no gênero feminino e em tumores positivos para o HBV, nenhuma diferença significativa foi observada. Além disso, não foi encontrada associação entre o tamanho do tumor e os níveis de metilação para ambos os genes.

**Tabela 14: Média dos níveis de metilação de DNA para os genes RASSF1A e DOK1 em tecido hepático com CHC de acordo com as características demográficas e clínico-patológicas.**

	RASSF1A média (%)	<i>p</i>	DOK1 média (%)	<i>p</i>
<b>Gênero</b>				
Mulher	68,0	0,116	78,1	0,001
Homem	56,9		51,2	
<b>Idade</b>				
<40	61,7	0,959	74,8	0,008
[40-60]	57,1		36,9	
≥60	59,7		60,3	
<b>Infecção viral</b>				
Sem vírus	54,9	0,983	42,8	0,244
HBV	58,5		74,7	
HCV	56,2		53,7	
<b>Diferenciação do tumor</b>				
Moderada	62,4	0,315	68,0	0,004
Baixa	51,4		34,0	
<b>Tamanho do tumor</b>				
<5 cm	55,4	0,511	56,2	0,873
>5 cm	61,9		57,9	

Testes Chi-quadrado de Pearson ou teste exato de Fisher, quando apropriado. RASSF1A: gene *Ras association domain family member 1 isoform A*. DOK1: gene *Docking protein 1*. HBV: vírus da hepatite B. HCV: vírus da hepatite C.

#### **4.2.4 Análise da frequência de hipermetilação de DNA em tecido hepático cirrótico e com CHC**

A análise das frequências de hipermetilação de DNA revelou que os genes RASSF1A e DOK1 foram encontrados hipermetilados na maior parte (88%, 15/17) dos tecidos de CHC analisados (tabela 15). Além disso, a hipermetilação simultânea de ambos os genes foi observada em 82% (14/17) dos tecidos de CHC. No entanto, ao analisar amostras de tecidos cirróticos, observou-se frequências mais baixas de hipermetilação, 29% (2/7) para o gene RASSF1A, 43% (3/7) para o gene DOK1 e 29% (2/7) para ambos os genes. Ao analisar a presença da infecção para o HBV em tecido com CHC, para o gene DOK1, todas as amostras foram consideradas hipermetiladas. A hipermetilação concomitante dos genes RASSF1A e DOK1 foi observada mais frequentemente nos tumores positivos para HBV (75%, 3/4) e HCV (89%, 8/9) do que os negativos para ambos os vírus (50%, 1/2). Da mesma forma, a hipermetilação concomitante para ambos os genes foi observada em 67% (2/3) dos tecidos cirróticos positivos para o HCV, porém em nenhum (0/4) dos tecidos negativos para o HCV. Adicionalmente, as frequências de hipermetilação entre os tecidos cirróticos de pacientes sem CHC e tecidos cirróticos adjacentes de pacientes com CHC foram semelhantes.

**Tabela 15: Frequência de hipermetilação em tecidos com cirrose e CHC de acordo com presença do HBV e HCV.**

Gene	CHC				Cirrótico				Cut-off
	Total (n = 17)	HBV (n =4)	HCV (n =9)	Sem vírus (n =2)	Total (n = 7)	HBV (n =0)	HCV (n =3)	Sem vírus (n = 4)	
RASSF1A	88% (15)	75% (3)	89% (8)	100% (2)	29% (2)	NA	67% (2)	0% (0)	32,15%
DOK1	88% (15)	100% (4)	89% (8)	50% (1)	43% (3)	NA	67% (2)	25% (1)	20,62%
Ambos os genes	82% (14)	75% (3)	89% (8)	50% (1)	29% (2)	NA	67% (2)	0% (0)	-

NA: não aplicável. CHC: carcinoma hepatocelular. HBV: vírus da hepatite B. HCV: vírus da hepatite C. RASSF1A: gene *Ras association domain family member 1 isoform A*. DOK1: gene *Docking protein 1*. Cut-off: valor de corte para classificação como amostra hipermetilada, obtido a partir do quantile que representa os 95% superiores em níveis de metilação nas amostras não cirróticas, conforme descrito previamente (Lambert et al., 2011).

### 4.3 Hipermetilação em DNA livre circulante em soro

#### 4.3.1 Análise da qualidade de DNA livre circulante extraído

No estudo da hipermetilação em cfDNA, as 115 amostras de soro obtidas foram extraídas e submetidas a análise de qualidade de forma quantitativa e qualitativa. A análise da qualidade foi realizada por meio da quantificação pelo Qubit 2.0 Fluorometer e por eletroforese de duas amostras para visualização dos fragmentos de DNA obtidos pela extração.

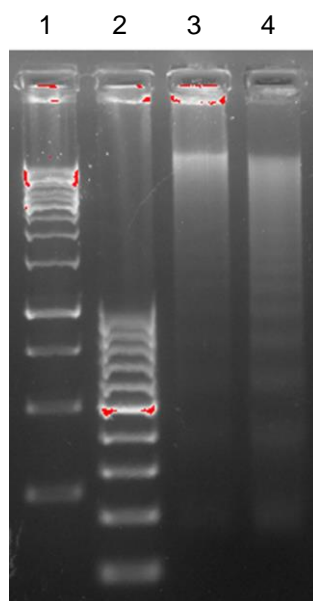
A quantidade total de DNA por amostra obtida variou de 11,94 ng a 585,60 ng. A média da quantidade de DNA no grupo de indivíduos sem doença hepática foi 133,69 ng, no grupo de pacientes com apenas hepatite C crônica foi 120,06 ng, no grupo de pacientes com hepatite C crônica e cirrose foi 121,31 ng e no grupo de pacientes com CHC foi 106,51 ng (tabela 16).

**Tabela 16: Quantidade de DNA recuperado após extração de DNA.**

	Quantidade de DNA (ng, média $\pm$ $\sigma$ )	Máximo e mínimo (ng)	
CHC	106,51 $\pm$ 70,36	402,60	32,82
Cirrose	121,31 $\pm$ 106,19	585,60	11,94
Hepatite C crônica	120,06 $\pm$ 84,24	408,40	22,26
Sem doença hepática	133,69 $\pm$ 76,99	393,00	36,96

$\sigma$ : desvio padrão. CHC: carcinoma hepatocelular.

Para checar a presença dos fragmentos de DNA de interesse e a possível presença de fragmentos maiores, oriundos de células sanguíneas destruídas durante o processamento, duas amostras, com 210,6 ng e 314,4 ng de DNA, foram submetidas a eletroforese por gel de agarose para a visualização dos fragmentos de DNA obtidos pela extração. Em ambas as amostras o padrão observado foi de *smear*, evidenciando a presença de DNA de diferentes tamanhos, dentre eles os fragmentos de interesse de tamanho aproximado de 180 pares de bases (figura 27).



**Figura 27: Eletroforese por gel de agarose após extração de DNA.**

Poço 1: Marcador 1 kb DNA Ladder. Poço 2: Marcador 100 bp DNA Ladder. Poços 3 e 4: Amostras.

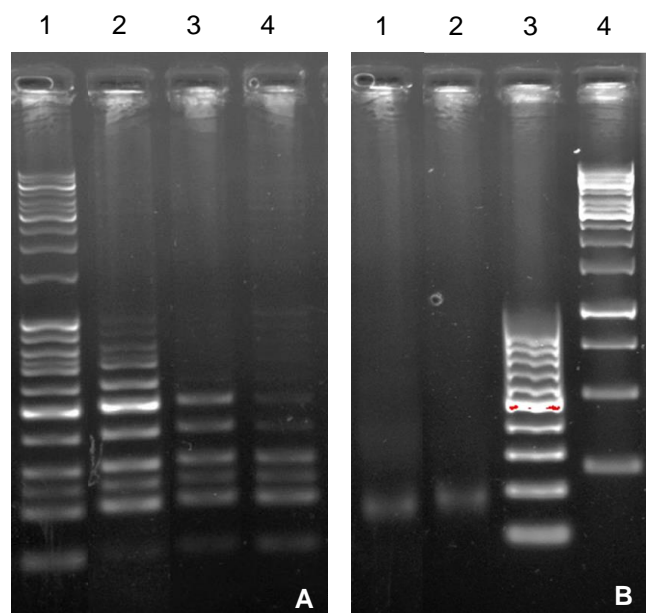
#### **4.3.2 Análise da eficiência da seleção de DNA livre circulante**

No intuito de selecionar apenas fragmentos correspondentes ao cfDNA, foi realizada a seleção de tamanho dos fragmentos de DNA de 48 amostras extraídas, 12 amostras de cada um dos quatro grupos de estudo: indivíduos sem doença hepática, pacientes com hepatite C crônica, pacientes com hepatite C crônica e cirrose e pacientes com CHC.

Para a padronização da técnica, foram utilizados os marcadores de peso molecular 1 kb DNA Ladder e 100 bp DNA Ladder misturados, em três diferentes razões entre *beads* e DNA (figura 28A). Foi verificado que, o protocolo I com a razão entre *beads* e DNA 0.55x, na primeira etapa, seguida da razão 1.25x, na segunda etapa, foi adequado para a seleção de fragmentos de DNA entre 200 e 700 pares de bases (poço 2), o protocolo II com a razão 0.65x seguida de 1.15x foi adequado para a seleção de fragmentos de DNA entre 100 e 500 pares de bases (poço 3) e o protocolo III com a razão 0.75x seguida de 1.05x foi adequado para a seleção de fragmentos de DNA entre 100 e 300 pares de bases (poço 4), conforme análise em gel de agarose.

Em seguida, ao analisar duas estratégias (protocolo I e III) utilizando uma amostra de paciente extraída, foi possível verificar, em gel de agarose, que ambas foram eficientes para a seleção de fragmentos no tamanho correspondente ao cfDNA (figura 28B). Por meio da quantificação com o Qubit 2.0 Fluorometer, a porcentagem de DNA recuperado após seleção foi de 6,9% e 4,1% utilizando as

estratégias com as razões entre *beads* e DNA de 0.55x, seguida de 1.25x (protocolo I) e com a razão 0.75x seguida de 1.05x (protocolo III), respectivamente. Após a análise qualitativa e quantitativa, foi determinado que a estratégia mais adequada para a seleção de fragmentos correspondentes ao tamanho do cfDNA foi a utilização do protocolo com a razão entre *beads* e DNA de 0.65x seguida de 1.15x.



**Figura 28: Eletroforese por gel de agarose após seleção de tamanho.**

**Figura A:** Poço 1: Marcadores 1 kb DNA Ladder e 100 bp DNA Ladder misturados. Poço 2: Protocolo I (0.55x e 1.25x) para seleção de tamanho de fragmentos utilizando os marcadores 1 kb DNA Ladder e 100 bp DNA Ladder misturados. Poço 3: Protocolo II (0.65x e 1.15x) para seleção de tamanho de fragmentos utilizando os marcadores 1 kb DNA Ladder e 100 bp DNA Ladder misturados. Poço 4: Protocolo III (0.75x e 1.05x) para seleção de tamanho de fragmentos utilizando os marcadores 1 kb DNA Ladder e 100 bp DNA Ladder misturados. **Figura B:** Poço 1: Protocolo I (0.55x e 1.25x) para seleção de tamanho de fragmentos utilizando amostra de paciente. Poço 2: Protocolo III (0.75x e 1.05x) para seleção de tamanho de fragmentos utilizando amostra de paciente. Poço 3: Marcador 100 bp DNA Ladder. Poço 4: Marcador 1 kb DNA Ladder.

A partir da padronização da metodologia de seleção de cfDNA, o protocolo selecionado foi utilizado para as 48 amostras (12 de cada grupo) que apresentaram maior quantidade de DNA após extração. A porcentagem média de DNA recuperado após seleção foi de 8,2% e variou de 2,16 ng a 115,2 ng. A quantidade média de cfDNA em soro no grupo de indivíduos sem doença hepática foi de 7,98ng, no grupo de pacientes com hepatite C crônica foi de 11,01 ng, no grupo de pacientes com cirrose foi de 15,11 ng e no grupo de pacientes com CHC foi de 25,01 ng (tabela 17). Observamos níveis crescentes de cfDNA em soro de acordo o grau da doença hepática.

**Tabela 17: Quantidade de cfDNA recuperado após seleção de tamanho.**

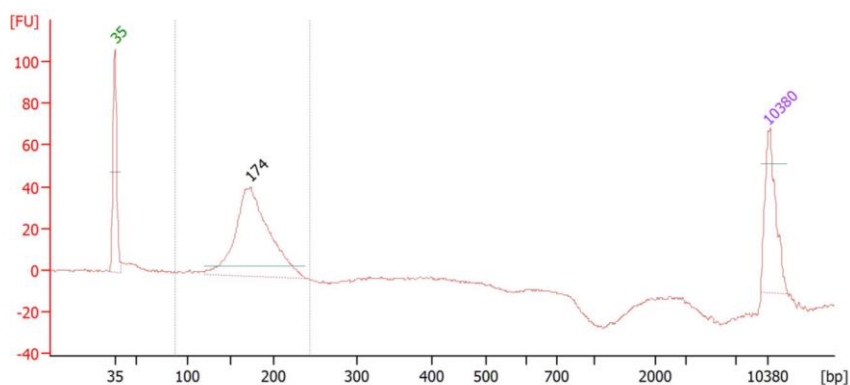
	Quantidade de DNA após seleção de tamanho (ng, média $\pm$ $\sigma$ )	Máximo e mínimo (ng)	
CHC	25,01 $\pm$ 28,94	115,20	4,40
Cirrose	15,11 $\pm$ 6,30	24,12	6,04
Hepatite C crônica	11,01 $\pm$ 3,66	20,84	7,28
Sem doença hepática	7,98 $\pm$ 4,65	17,16	2,16

$\sigma$ : desvio padrão. CHC: carcinoma hepatocelular.

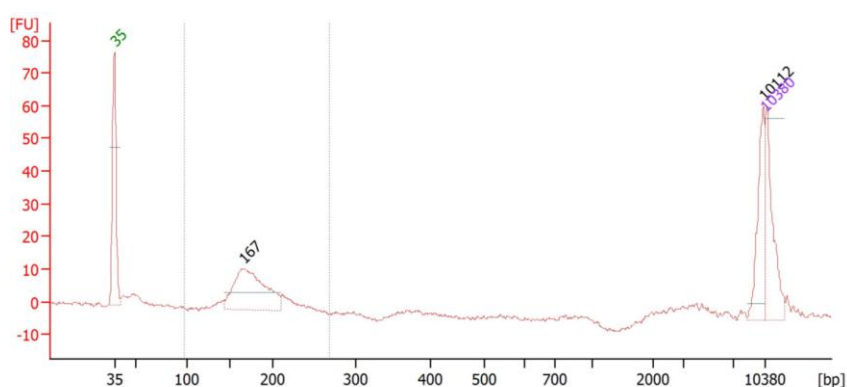
Após análise estatística comparativa entre os grupos, observamos uma diferença significativa na quantidade média de cfDNA ( $p = 0,009$ ). Níveis mais altos de cfDNA em soro foram associados à presença de CHC, ao compararmos com indivíduos sem CHC ( $p = 0,046$ ) e ao compararmos com indivíduos sem doença hepática ( $p = 0,006$ ). Além disso, observamos uma diferença significativa entre os níveis de cfDNA, ao compararmos indivíduos sem doença hepática com pacientes com apenas hepatite C crônica (ausência de cirrose e CHC,  $p = 0,038$ ), e ao compararmos com pacientes com hepatite C crônica, independente da presença de cirrose e CHC ( $p = 0,002$ ). Por outro lado, ao analisarmos apenas o grupo de pacientes com doença hepática, não observamos diferença significativa de acordo com a presença de cirrose ou CHC ( $p = 0,223$ ).

Na análise da eficiência de seleção do cfDNA, dez amostras foram submetidas ao 2100 Bioanalyzer para verificação dos tamanhos dos fragmentos selecionados e todas evidenciaram apenas a presença de fragmentos com tamanhos correspondentes ao cfDNA. Um exemplo de amostra após seleção de tamanho pode ser visto na figura 29, no qual é observado apenas a presença de fragmentos de tamanho aproximado a 174 pares de bases. É possível comparar a um exemplo de amostra após extração de DNA (figura 30), no qual é observado a presença marcante de DNA genômico, de tamanho aproximado a 10.112 pares de bases, e de cfDNA, de tamanho aproximado a 167 pares de bases.





**Figura 29: Análise de tamanho de fragmentos após seleção de cfDNA.**  
 Marcadores em verde e roxo de tamanhos 35 e 10.380 pares de bases, respectivamente.



**Figura 30: Análise de tamanho de fragmentos após extração de DNA.**  
 Marcadores em verde e roxo de tamanhos 35 e 10.380 pares de bases, respectivamente.

### 4.3.3 Análise da eficiência de construção da biblioteca de cfDNA

A construção da biblioteca de cfDNA foi realizada utilizando o Nextera® XT DNA Library Preparation e para a análise da eficiência, as amostras foram submetidas ao equipamento Qubit 2.0 Fluorometer para quantificação e ao equipamento 2100 Bioanalyzer para verificação dos tamanhos dos fragmentos obtidos. Previamente, 24 amostras foram submetidas ao tratamento com bissulfito de sódio utilizando o EpiTect Bisulfite Kit (QIAGEN), logo após seleção do cfDNA. Somente então, as amostras foram submetidas à construção da biblioteca de cfDNA, que foi realizada utilizando duas estratégias.

Na primeira estratégia, foi utilizado 1 ng de DNA (conforme protocolo do fabricante) de quatro amostras na etapa de tagmentação. Foram consideradas as taxas de DNA recuperado após a etapa de conversão com bissulfito de sódio de 60%, 70%, 80% e 100%. As quatro amostras foram amplificadas com sucesso, entretanto, o tamanho dos fragmentos obtidos variou de 53 pb a 76 pb, longe do

fragmento esperado de 205 pb, calculado por 170 pb do cfDNA, menos 100 pb eliminados pelos transposons, somados a 135 pb da *Tag* (sequência de nucleotídeos adicionada para identificação da amostra).

Em uma segunda estratégia, cinco amostras extraídas e não submetidas ao tratamento com bissulfito de sódio foram submetidas à tagmentação utilizando diferentes concentrações de DNA inicial: 0,8 ng, 1 ng, 1,2 ng, 1,8 ng 2 ng. As amostras foram amplificadas com sucesso, no entanto, novamente o tamanho dos fragmentos obtidos não correspondeu ao fragmento esperado de 205 pb, variando de 51 pb a 74 pb. A biblioteca de cfDNA construída, utilizando o Nextera® XT DNA Library Preparation, não atingiu qualidade mínima para o sequenciamento de alta vazão, devido ao tamanho do fragmento gerado. O tamanho mínimo dos fragmentos é de 200 pb.

## 5 DISCUSSÃO

### 5.1 Polimorfismos genéticos

O CHC é um dos principais tipos de câncer no mundo, sendo a segunda causa de mortalidade por câncer, com aproximadamente 746 mil mortes anuais. No entanto, a taxa de incidência e mortalidade difere de acordo com a região geográfica, sendo maior em países em desenvolvimento (Ervik et al., 2016). No Brasil, cerca de 9.500 novos casos de CHC são registrados a cada ano (Ervik et al., 2016), entretanto, estudos envolvendo pacientes brasileiros com CHC ainda são escassos. Pouco se sabe sobre os aspectos clínicos, epidemiológicos, genéticos e epigenéticos destes pacientes.

Uma vez que o bom prognóstico do CHC depende fundamentalmente da detecção precoce do tumor, a identificação de fatores de risco para o desenvolvimento de CHC é de extrema importância. Sabe-se que estão envolvidos fatores relacionados ao hospedeiro, como a idade avançada, gênero, presença de cirrose hepática, fatores genéticos e epigenéticos e fatores relacionados ao ambiente, como alcoolismo, exposição a aflatoxina e presença de infecções virais pelo HBV e HCV, dentre outros (Fujiwara et al., 2018).

No presente estudo, analisamos o perfil demográfico e clinico-patológico de pacientes crônicos para o HCV de acordo com a presença de cirrose e CHC. A média de idade dos indivíduos com CHC foi de 64 anos, significativamente maior que a média de idade dos indivíduos sem CHC ( $p < 0,001$ ), independente da presença ou ausência de cirrose, ambos com média de 59 anos. Média de idade elevada, como é comum a encontrada em países desenvolvidos como os Estados Unidos, onde a média de idade dos pacientes é de 62 anos (Yang et al., 2017) e o Japão com idade média de 68 anos (Hiraoka et al., 2017).

No Brasil, dois estudos analisaram indivíduos com CHC de diferentes agentes etiológicos e regiões do país. O primeiro estudo, publicado em 1997, analisou 287 indivíduos e encontrou a média de idade de 56 anos. No entanto, a média de idade de indivíduos com CHC e HCV como agente etiológico foi maior (63 anos) em relação a indivíduos com HBV como agente etiológico (49 anos) (Goncalves et al., 1997). O segundo estudo, publicado em 2010, analisou mais de 1400 indivíduos com CHC de diferentes etiologias e encontrou a média de idade de 59 anos (Carrilho

et al., 2010), entretanto, a média de idade não foi analisada em apenas indivíduos com HCV como agente etiológico, conforme nosso estudo. Um terceiro estudo expressivo, que analisou 540 pacientes de apenas dois estados (São Paulo e Rio Grande do Sul), observou a média de idade de 61 anos e também não analisou a média de idade em apenas indivíduos com HCV (Debes et al., 2018).

Ao restringirmos a análise apenas ao HCV como agente etiológico, e compararmos o estudo brasileiro de Gonçalves e colaboradores (1997) com nosso estudo, a média de idade é bastante similar, 63 e 64 anos. De forma geral, os estudos locais no Brasil demonstram médias de idade similares aos dois estudos de abrangência nacional, entretanto apenas foram analisados pacientes da região Sul e Sudeste do Brasil, como Minas Gerais (Osorio et al., 2013) e Espírito Santo (Goncalves et al., 2014) com média de idade de 57 anos, dois estudos em São Paulo (Paranagua-Vezozzo et al., 2014; Teixeira et al., 2012) com média de idade de 56 e 57 anos, Porto Alegre (Appel-Da-Silva et al., 2016) com média de idade de 55 anos e Rio de Janeiro (Araujo et al., 2014) com média de idade de 59 anos. Apenas três desses estudos compararam as médias de idade de acordo com a etiologia do CHC (Araujo et al., 2014; Goncalves et al., 2014; Osorio et al., 2013) e todos observaram uma maior média de idade em indivíduos com HCV como agente etiológico, quando comparado ao HBV, corroborando com estudos anteriores que indicam o maior potencial oncogênico da infecção crônica pelo HBV (El-Serag&Rudolph, 2007; Fattovich, 2003). O que pode explicar a média de idade elevada (64 anos) encontrada no presente estudo, uma vez que foram analisados apenas indivíduos com HCV.

Além da idade, a frequência de indivíduos do gênero masculino, em nosso estudo, também foi superior em pacientes com CHC (53,3%), sendo 1,24 vezes maior que a presença de homens no grupo de pacientes sem CHC (43,1%). Ademais, encontramos uma diferença mais marcante, sendo significativamente maior ( $p = 0,009$ ), ao compararmos pacientes em estágios mais avançados da doença hepática, com presença de cirrose ou CHC (51,7%), quando comparado com o grupo de pacientes com apenas hepatite crônica (29,9%). No entanto, a frequência de indivíduos do gênero masculino que observamos em pacientes com CHC (53,3%) foi inferior a observada por nosso grupo em estudo anterior, no qual a frequência foi de 57,5% em indivíduos com HCV como agente etiológico do CHC (Araujo et al., 2014). Da mesma forma, todos os demais estudos brasileiros, que analisaram a frequência do gênero masculino em indivíduos com CHC e HCV como

agente etiológico, observaram frequências maiores, como 67,1% no estado de Minas Gerais (Osorio et al., 2013), 82,3% no Espírito Santo (Goncalves et al., 2014) e 75% em estudo de abrangência nacional (Goncalves et al., 1997). No contexto internacional, o relatório mais recente da Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (IARC), estima que aproximadamente 71% dos 782 000 casos anuais de CHC registrados no mundo são do gênero masculino (Ervik et al., 2016). Entretanto, os dados não diferem por etiologia.

A diferença da incidência entre os gêneros poderia ser explicada por três hipóteses: os homens estariam mais expostos a infecções pelo HBV ou carcinógenos hepáticos; os efeitos da testosterona poderiam aumentar a sinalização de receptores andrógenos nos homens, promovendo a proliferação de hepatócitos; os efeitos do estrogênio poderiam suprimir o processo inflamatório mediado pela interleucina-6 (IL-6) em mulheres, reduzindo a lesão hepática e a proliferação compensatória de hepatócitos (Baldissera et al., 2016; Kalra et al., 2008).

Além de fatores de risco, o HBV e HCV, são os principais agentes etiológicos do CHC, sendo o HCV responsável por mais de 50% dos casos de CHC no Brasil (Appel-Da-Silva et al., 2016; Carrilho et al., 2010). No entanto, a progressão da doença hepática difere de acordo com o genótipo da infecção pelo HCV (Thrift et al., 2017). No estado do Rio de Janeiro, o subtipo mais frequente é o 1b (39-64%), seguido do 1a (25-43%) e 3a (9-18%) (Araujo et al., 2014; De Almeida et al., 2004; Delvaux et al., 2015; Peres-Da-Silva et al., 2012; Scalioni et al., 2017). De forma geral, em nosso estudo, o subtipo mais frequente foi o 1a com 44,4%, seguido do 1b com 41,3% e do 3a com 14,3%. No entanto, no grupo de pacientes com CHC o subtipo mais frequente foi o 1b com 41,3%, o que corrobora com uma metanálise que demonstrou o maior potencial oncogênico do subtipo 1b do HCV, aumentando o risco em até 2,5% (Raimondi et al., 2009).

Observamos também que no grupo de pacientes com cirrose o subtipo mais frequente foi o 1a com 55,4%, sendo verificada uma associação com presença de cirrose hepática ( $p = 0,039$ ), enquanto no grupo de pacientes com apenas hepatite C crônica o subtipo mais frequente foi o 1b com 51,6%. Diversos estudos têm demonstrado uma associação entre o subtipo 1b e uma melhor resposta virológica sustentada quando comparado a outros subtipos, ao mesmo tempo em que o subtipo 1a está associado a uma pior resposta ao tratamento com interferon e ribavirina, aumentando as chances da progressão da doença (Legrand-Abravanel et

al., 2009; Nicot et al., 2011; Poveda et al., 2012; Rallon et al., 2012). O que justificaria sua associação com a presença de cirrose em nosso estudo.

Os fatores de risco para o desenvolvimento de CHC estão bem estabelecidos, no entanto, uma grande parcela de indivíduos expostos a fatores de risco conhecidos não desenvolve cirrose ou CHC, indicando possíveis fatores genéticos protetores. Por outro lado, uma pequena parcela de indivíduos desenvolve CHC sem apresentar nenhum fator de risco, indicando possíveis predisposições genéticas (Baldissera et al., 2016; El-Serag&Rudolph, 2007; Llovet et al., 2016). Nesse sentido, um dos principais objetivos desse estudo foi avaliar a ocorrência de polimorfismos genéticos e possíveis associações com a progressão da doença hepática para o desenvolvimento de cirrose e CHC em pacientes brasileiros com hepatite C crônica.

Diversas linhas de evidência têm demonstrado a associação de diferentes polimorfismos genéticos com o desenvolvimento de câncer, dentre eles o CHC. As principais vias envolvidas estão relacionadas com processos de detoxificação, inflamação, estresse oxidativo, reparo do DNA, fatores de crescimento e ciclo celular (Baldissera et al., 2016; Llovet et al., 2016; Nahon&Zucman-Rossi, 2012; Ochi et al., 2017; Schulze et al., 2015; Zucman-Rossi et al., 2015). No Brasil poucos estudos investigaram a influência de polimorfismos e o desenvolvimento de CHC, e nenhum analisou os genes selecionados para o nosso estudo (Aroucha et al., 2016; Carmo et al., 2016; Nogueira et al., 2009; Peres et al., 2016; Teixeira et al., 2013a; Teixeira et al., 2013b).

Foram avaliados, no presente estudo, polimorfismos em quatro genes (GSTT1, GSTM1, TP53 e MDM2) em indivíduos com hepatite C crônica sem cirrose, após desenvolvimento de cirrose e após desenvolvimento de CHC. Nos genes GSTT1 e GSTM1 foram avaliadas as frequências do genótipo polimórfico nulo e observamos uma maior frequência desse genótipo, para ambos os genes, em pacientes com CHC (21,7% para GSTT1 e 46,7% para GSTM1), quando comparados aos pacientes sem CHC (15,4% para GSTT1 e 43,1% para GSTM1). Tais genes desempenham um papel crítico na proteção celular a vários tipos de danos, e seu mau funcionamento pode ocasionar a perda de atividade enzimática, aumento da vulnerabilidade ao dano citogenético e ao dano oxidativo do DNA, podendo levar ao desenvolvimento de câncer (Hayes&Strange, 2000; Mcilwain et al., 2006; Shen et al., 2014). Outros estudos tem demonstrado a associação entre a ocorrência dos genótipos nulos nos genes GSTT1 e GSTM1 e a

hepatocarcinogênese, no entanto, os resultados publicados até o momento ainda não são consistentes (Abd El-Moneim et al., 2008; Asim et al., 2010; Covolo et al., 2005; Deng et al., 2005; Kiran et al., 2008; Shen et al., 2014). Após análise estatística, não encontramos associação entre os polimorfismos analisados e a presença de CHC, entretanto observamos que a ocorrência do genótipo polimórfico nulo para o gene GSTT1, em pacientes crônicos para a hepatite C, está associado à presença de cirrose ( $p = 0,032$ ). Isso pode indicar um envolvimento desse polimorfismo com a progressão da doença hepática e indiretamente ao desenvolvimento de CHC, já que a cirrose hepática é o principal fator de risco para a hepatocarcinogênese (Blum, 2005; Carrilho et al., 2010; Fattovich et al., 1997).

Investigamos também a ocorrência do SNP R72P (rs1042522) no gene TP53, que leva a codificação do aminoácido prolina (P) no lugar de arginina (R). O TP53 é um importante gene supressor tumoral envolvido na regulação do ciclo celular e integridade genômica, portanto polimorfismos genéticos podem ocasionar a perda da função da proteína p53, permitindo que células danificadas escapem ao controle do ciclo celular e se tornem cancerígenas (Marte, 2002; Meng et al., 2014; Staib et al., 2003). Em nosso estudo, observamos uma maior frequência do genótipo homozigoto Arg/Arg em pacientes com CHC (53,3%), quando comparados a pacientes sem CHC (41,5%). No entanto, o genótipo homozigoto Pro/Pro também apresentou uma maior frequência em pacientes com CHC (15%) do que em pacientes sem CHC (7,7%). Estudos em linhagens celulares demonstraram que a variante Arg induz a apoptose mais acentuadamente do que a variante Pro, indicando maior susceptibilidade ao desenvolvimento de tumor associada a variante Pro (Dumont et al., 2003). Entretanto os resultados dos estudos que investigaram a associação entre esse SNP no códon 72 e a susceptibilidade ao CHC foram conflitantes (Di Vuolo et al., 2011; Ezzikouri et al., 2007; Hu et al., 2014; Mah et al., 2011; Sumbul et al., 2012; Yoon et al., 2008; Zhu et al., 2005). Ao analisarmos a frequência do genótipo homozigoto Pro/Pro de acordo com a presença de cirrose, observamos uma menor frequência em pacientes com cirrose (6%) do que em pacientes apenas com hepatite C crônica (10,6%). No nosso conhecimento, não há relato na literatura até o momento de dados sobre a frequência desse polimorfismo de acordo com a presença de cirrose. Em nosso estudo, não observamos diferença estatisticamente significativa entre a presença de CHC ou cirrose e os genótipos polimórficos analisados no gene TP53. O que corrobora com uma metanálise mais recente que também não observou associação com o CHC. O autor comenta que

analisou um número maior de estudos e, portanto, teria um maior poder estatístico que as metanálises anteriores (Peng et al., 2013). Além disso, a análise de coortes heterogêneas de pacientes também pode introduzir fatores de confusão em metanálises. Dessa maneira, mais estudos são necessários estratificando a população analisada por idade, gênero, genótipo viral e outros fatores de risco para se entender melhor o papel desse polimorfismo (Nahon&Zucman-Rossi, 2012).

Analisamos também, o SNP T309G (rs2279744) no gene MDM2, um importante regulador da proteína p53, inibindo sua atividade e promovendo sua destruição proteolítica (Bond et al., 2005; Meng et al., 2014). O SNP T309G, caracterizado pela alteração de timina para guanina no nucleotídeo 309, ocorre na região promotora do gene MDM2 e foi associada à sua superexpressão, resultando, desse modo, na inibição da atividade da p53, podendo induzir o CHC (Bond et al., 2004). Observamos em nosso estudo uma menor frequência do genótipo GG para o gene MDM2 em pacientes com CHC (5%) do que em pacientes sem CHC (6,9%). Enquanto o genótipo TT apresentou maior frequência no grupo de pacientes com CHC (56,7%) do que no grupo sem CHC (46,9%). O gene MDM2, tem sido descrito como um acelerador da hepatocarcinogênese em pacientes asiáticos, entretanto os resultados permanecem controversos (Peng et al., 2013). Um estudo que analisou 583 pacientes com CHC por HBV na Coreia (Yoon et al., 2008) mostrou associação com a presença do tumor, entretanto o autor cita que a frequência do genótipo GG encontrada (34%) foi maior do que em estudos anteriores que analisaram populações diferentes, como japoneses (27%) (Dharel et al., 2006), chineses (25%) (Hu et al., 2006) e caucasianos (12%) (Bond et al., 2004). A associação encontrada entre esse SNP e o maior risco de CHC tem sido descrita principalmente em grupos de pacientes asiáticos, portanto, estudos de confirmação em outras populações de pacientes são necessários. Na análise da frequência do SNP T309G de acordo com a presença de cirrose, observamos menor frequência dos genótipos GG (4,8%) e TT (44,6%) em pacientes com cirrose do que em pacientes sem cirrose (10,6% e 51,1%, respectivamente). No nosso conhecimento, não há relato na literatura até o momento de dados sobre a frequência desse polimorfismo de acordo com a presença de cirrose. Em nosso estudo, não encontramos diferença estatisticamente significativa entre a presença de CHC ou cirrose e os genótipos polimórficos do SNP T309G.

Com exceção da associação do genótipo nulo para o gene GSTT1 com a presença de cirrose, após análise estatística não observamos associação direta



entre os polimorfismos analisados, de forma isolada, nos quatro genes e a presença de CHC. A análise de polimorfismos com o desenho de estudo transversal, observado na maior parte dos estudos, pode dificultar a observação de diferenças estatisticamente significativas e ser um fator limitante na nossa análise, visto que uma parcela de indivíduos dos grupos controle muito provavelmente apresentam polimorfismos genéticos que promovem o surgimento do CHC, o que interfere na frequência dos polimorfismos nos grupos controle. Além disso, o número reduzido de casos de câncer por população, a heterogeneidade tumoral e a exposição a fatores de risco adicionais variados também são desafios na busca de um perfil genético associado a um maior risco de desenvolvimento de CHC (Nahon&Zucman-Rossi, 2012; Ringelhan et al., 2017).

No presente estudo, analisamos a presença de polimorfismos de forma simultânea, ou seja, sua ocorrência no mesmo paciente. Observamos o perfil genotípico simultâneo MDM2 G/G e TP53 Pro/Pro apenas no grupo de pacientes com CHC ( $p < 0,100$ ), o que corrobora com uma metanálise que reportou associação entre esse perfil genotípico simultâneo e o CHC (Peng et al., 2013). Observamos também o genótipo simultâneo GSTT1 nulo e GSTM1 nulo mais frequente ( $p = 0,144$ ) no grupo de pacientes com CHC (8,3%) do que sem CHC (3,1%), o que corrobora com uma importante metanálise que relatou a associação entre perfil genotípico simultâneo para os genes GSTT1 e GSTM1 e o aumento de risco de CHC (Shen et al., 2014). Além disso, ao analisarmos a ocorrência de forma simultânea dos perfis genotípicos nos genes analisados, observamos associação com a presença de CHC ( $p < 0,050$ ) em alguns deles: perfil genotípico simultâneo GSTT1 nulo e TP53 Pro/Pro, perfil genotípico simultâneo GSTM1 nulo e TP53 Arg/Arg, além do perfil genotípico simultâneo GSTM1 nulo, MDM2 T/T e TP53 Arg/Arg.

Esse é o primeiro estudo que relatou a associação entre a ocorrência desses perfis genotípicos simultâneos e a presença de CHC. Sabe-se que o acúmulo de alterações genéticas em genes críticos para o câncer é capaz de modificar vias celulares importantes e iniciar o processo de carcinogênese (Momparler, 2003). Além disso, estudos anteriores demonstraram o aumento do risco de CHC ao analisar polimorfismos em conjunto (Tomoda et al., 2012; Yang et al., 2013). A descrição de SNPs associados a hepatocarcinogênese pode permitir uma melhor seleção de pacientes em alto risco de desenvolvimento de CHC, além de possibilitar um futuro tratamento por meio de edição genética. Visto que, recentemente, foi

descrita a primeira edição genética em um embrião humano para evitar uma doença genética cardíaca (Ma et al., 2017).

Em suma, esse trabalho contribuiu com informações relevantes sobre a influência dos polimorfismos GSTT1 genótipo nulo, GSTM1 genótipo nulo, TP53 R72P (rs1042522) e MDM2 T309G (rs2279744) em indivíduos brasileiros com hepatite C crônica. A descrição de um panorama genético altamente associado a hepatocarcinogênese, poderia contribuir para que esses indivíduos evitem exposição a outros fatores de risco conhecidos, além de permitir o acompanhamento para a identificação de CHC em estágio inicial e por último possibilitar um futuro tratamento por meio de edição genética.

## **5.2 Hipermetilação de DNA em tecido hepático**

Até o momento, nenhum estudo investigou alterações epigenéticas relacionadas ao desenvolvimento de CHC no Brasil. Portanto, este é o primeiro estudo que analisou fatores epigenéticos em pacientes brasileiros em busca de um melhor entendimento sobre o desenvolvimento desse tumor. Neste estudo, analisamos de maneira quantitativa o perfil de metilação da região promotora dos genes RASSF1A e DOK1, em tecidos hepáticos com CHC, tecidos hepáticos cirróticos e tecidos hepáticos não cirróticos, assim como em amostras pareadas de tecido com CHC e tecido cirrótico adjacente. Ambos os genes têm propriedades de supressão de tumor e estão envolvidos em vários processos celulares nesse sentido. O gene RASSF1A está envolvido na via de sinalização de Ras, que desempenha um papel fundamental no controle do ciclo celular, estabilização de microtúbulos, adesão celular, motilidade celular e apoptose (Agathangelou et al., 2005). O gene DOK1 é expresso nas células B e T, assim como em macrófagos e neutrófilos, e está envolvido em uma ampla gama de vias de sinalização de imunorreceptores (Mashima et al., 2009).

No presente estudo, os níveis de metilação nos genes RASSF1A e DOK1 mostraram um aumento gradual de acordo com a progressão da doença hepática, com níveis significativamente maiores nos tecidos tumorais. Além disso, observamos frequências de hipermetilação bastante altas nos genes RASSF1A (88%) e DOK1 (88%) em amostras de CHC, com frequências de hipermetilação concomitante de 82%. Estudos anteriores usando diferentes metodologias, assim como diferentes ilhas CpGs, também encontraram altas frequências de hipermetilação (76-100%) no

gene RASSF1A em amostras de CHC (Di Gioia et al., 2006; Lambert et al., 2011; Zhang et al., 2013; Zhang et al., 2002). Por outro lado, poucos dados estão disponíveis sobre o perfil de metilação do gene DOK1 em câncer hepático. Entretanto, um estudo mostrou a ocorrência de hipermetilação na maior parte (62%) dos tecidos de CHC analisados (Lambert et al., 2011).

Nossos resultados reforçam a hipótese de uma associação entre o silenciamento epigenético desses genes e a hepatocarcinogênese. Observamos hipermetilação concomitante nos genes RASSF1A e DOK1 em quase 30% dos tecidos cirróticos analisados. Níveis elevados de metilação foram observados não apenas em amostras cirróticas de pacientes com CHC (amostras pareadas), mas também em amostras cirróticas de pacientes sem CHC, sugerindo que o aumento dos níveis de metilação em tecido cirrótico devido apenas à presença de células tumorais adjacentes é improvável. Esses achados indicam que níveis elevados de metilação em hepatócitos de tecidos cirróticos podem preceder a oncogênese e promover o desenvolvimento do CHC.

A potencial influência da etnia na metilação do DNA ainda não foi amplamente estudada. No entanto, alguns trabalhos já descreveram diferenças significativas na metilação global do DNA genômico de acordo com a etnia (Hsiung et al., 2007; Zhang et al., 2011). Foi sugerido que alguns polimorfismos genéticos, como os de enzimas metabolizadoras de folato, podem contribuir para as diferenças étnicas na metilação do DNA (De Vogel et al., 2009). Lambert e colaboradores (2011) demonstraram uma associação entre os níveis de metilação em vários genes e área geográfica, com níveis de metilação dos genes RASSF1A e DOK1 mais baixos em pacientes com CHC da Tailândia do que em pacientes com CHC da França. O presente estudo baseou-se nas ilhas CpGs analisadas anteriormente pelo grupo citado e os níveis de metilação de DNA obtidos foram determinados pela mesma metodologia quantitativa de pirosequenciamento (Lambert et al., 2011). Curiosamente, observamos maiores níveis de metilação nos genes RASSF1A e DOK1 em amostras de CHC brasileiras em comparação com os níveis encontrados em amostras de CHC da Tailândia (2,7 e 3,1 vezes) e França (1,9 e 1,8 vezes), respectivamente. Esses resultados corroboram com a hipótese de que fatores genéticos e ambientais podem contribuir para as diferenças no perfil de metilação de DNA, em casos de CHC de diferentes etnias ou regiões geográficas.

Vários estudos investigaram possíveis associações entre fatores de risco, como infecções por HBV e HCV, além de características demográficas e clínicas,

como idade, gênero e histologia do tumor com o perfil de metilação de DNA em casos de CHC (Di Gioia et al., 2006; Gao et al., 2008; Hernandez-Vargas et al., 2010; Lambert et al., 2011; Zhang et al., 2013; Zhang et al., 2002). A metilação anormal de ilhas CpGs associadas ao promotor gênico foi considerada uma das mudanças moleculares mais relevantes que podem ser observadas durante o envelhecimento (Issa, 1999). Um estudo anterior mostrou que todos os pacientes com mais de 40 anos tinham o promotor do gene RASSF1A metilado em células não neoplásicas do fígado (Waki et al., 2003). No entanto, observamos níveis mais elevados de metilação nos promotores gênicos de RASSF1A e DOK1 nos tecidos com CHC do grupo de pacientes mais jovens (<40 anos), com diferença estatisticamente significativa na análise do gene DOK1 ( $p = 0,036$ ). No presente trabalho, todos os pacientes com CHC com idade inferior a 40 anos estavam cronicamente infectados pelo HBV. Vários estudos mostraram que a proteína X do HBV (HBx) modula positivamente a atividade de DNA metiltransferase (DNMT), promovendo hipermetilação de genes supressores de tumores específicos (Park et al., 2007; Zheng et al., 2009). Portanto, a presença de infecção crônica pelo HBV nos pacientes mais jovens (<40 anos) pode ter contribuído para os maiores níveis de metilação observados em nosso estudo. Além disso, estudos anteriores também encontraram níveis mais elevados de metilação nos genes RASSF1A e DOK1 em amostras de CHC em grupos de pacientes mais jovens, embora as diferenças não tenham sido estatisticamente significativas (Gao et al., 2008; Lambert et al., 2011). Além disso, foram relatados anteriormente níveis significativamente mais altos de metilação no gene DOK1 em tecidos cirróticos na faixa etária <40 anos (Lambert et al., 2011).

Por fim, observamos que os níveis de metilação dos genes RASSF1A e DOK1 foram maiores em tumores moderadamente diferenciados quando comparados a tumores mal diferenciados, apresentando diferença significativa em DOK1 ( $p = 0,005$ ). Nenhum dos pacientes com CHC incluídos em nosso estudo apresentou tumores bem diferenciados, não sendo possível obter uma comparação mais detalhada entre os níveis de metilação de DNA e o grau de diferenciação do tumor. Em um trabalho anterior, ao serem analisados diferentes graus de diferenciação do tumor em pacientes com CHC, os níveis de metilação do gene RASSF1A foram semelhantes (Gao et al., 2008). Até o momento, não há relatos sobre a relação dos níveis de metilação do gene DOK1 e o grau de diferenciação do tumor em pacientes com CHC.

Nossos resultados confirmam que a hipermetilação dos promotores gênicos de RASSF1A e DOK1 contribui para a hepatocarcinogênese e é um evento inicial no desenvolvimento do câncer, assim como sofre influência de fatores de risco como infecções virais, além de características demográficas e clínicas. Portanto, a hipermetilação dos genes RASSF1A e DOK1 poderá ser utilizada como um biomarcador valioso para o diagnóstico precoce de CHC e um potencial alvo molecular para a terapia de base epigenética.

### **5.3 Hipermetilação em DNA livre circulante em soro**

A análise do perfil de metilação de DNA em tecido hepático é o padrão ouro para estudos que investiguem a associação de fatores epigenéticos com a hepatocarcinogênese. No entanto, no sentido de identificar biomarcadores para possível aplicação em pré-diagnóstico de CHC se torna essencial o desenvolvimento de métodos de análise não invasivos. Nesse contexto, esse estudo tinha como objetivo investigar a associação entre os perfis de metilação em cfDNA e a progressão da doença hepática para cirrose e CHC. Para isso, o cfDNA foi isolado de soro de indivíduos sem doença hepática, de pacientes com hepatite C sem cirrose, com cirrose e com CHC.

Estudos têm demonstrado que o sequenciamento de alta vazão pode ser aplicado para a detecção de mutações somáticas relacionadas com tumor em ctDNA, sugerindo que podem ser gradualmente trazidas para o contexto clínico (Crowley et al., 2013; Diehl et al., 2008; Newman et al., 2014). No entanto, como o ctDNA pode representar apenas uma fração muito pequena do cfDNA, existem desafios metodológicos que limitam a sensibilidade de detecção de ctDNA (Diehl et al., 2008). O desenvolvimento de métodos utilizando o sequenciamento de alto desempenho para análise de metilação de DNA associadas ao desenvolvimento de câncer é essencial para o avanço desta área.

No nosso estudo, após o isolamento do cfDNA, observamos que a quantidade média de cfDNA em soro parece estar relacionada com a progressão da doença hepática, sendo encontrados níveis baixos em pacientes sem doença hepática, níveis intermediários em pacientes com hepatite C crônica, níveis elevados em pacientes com cirrose e níveis ainda mais elevados em pacientes com CHC. Realizamos análise estatística comparativa entre os diferentes grupos estudados e observamos uma diferença significativa na quantidade média de cfDNA ( $p = 0,009$ ).

A presença de ctDNA na corrente sanguínea parece estar relacionada a eventos de necrose, apoptose e secreção de células tumorais (Schwarzenbach et al., 2011). Outros estudos demonstraram que a quantidade de cfDNA, assim como da fração de ctDNA, aumenta com a gravidade da doença e o volume do tumor (Bettegowda et al., 2014; Newman et al., 2014). Em nosso estudo, observamos níveis mais altos de cfDNA em soro associados à presença de CHC, ao compararmos com indivíduos sem CHC ( $p = 0,046$ ) e ao compararmos com indivíduos sem doença hepática ( $p = 0,006$ ). Observamos também uma diferença significativa entre os níveis de cfDNA, ao compararmos indivíduos sem doença hepática com pacientes com apenas hepatite C crônica, ou seja, com ausência de cirrose e CHC ( $p = 0,038$ ). O mesmo ocorreu ao compararmos com todos os pacientes com hepatite C crônica, independente da presença de cirrose e CHC ( $p = 0,002$ ). Por outro lado, ao analisarmos apenas o grupo de pacientes com doença hepática, não observamos diferença significativa de acordo com a presença de cirrose ou CHC ( $p = 0,223$ ).

Praticamente todos os estudos que visaram a detecção de metilação em ctDNA utilizaram PCR específico ou métodos similares que, além de outras limitações, fornecem informações sobre a presença de um número restrito de sítios metilados (Ammerpohl et al., 2012; Begum et al., 2011; Church et al., 2014; Iyer et al., 2010; Wong et al., 2000). Embora as atuais evidências sugiram o enorme potencial da identificação de alterações epigenéticas em amostras de soro ou plasma para diagnóstico e monitoramento em vários tipos de câncer, incluindo o CHC, informações sobre a abordagem por sequenciamento de alto desempenho para análise de metilação em cfDNA ainda são escassas (Vaca-Paniagua et al., 2015).

Em um trabalho pioneiro, um grupo de pesquisadores Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (IARC) analisou o perfil de metilação da região promotora de seis genes, por sequenciamento de alta vazão, e encontrou uma associação entre presença de CHC e níveis de metilação mais elevados para o gene VIM ao comparar amostras de cfDNA obtidos de pacientes com e sem CHC. O trabalho demonstrou a aplicabilidade do sequenciamento de alto desempenho como uma abordagem não invasiva, de baixo custo e eficiente em termos de tempo para identificar e validar novos biomarcadores com potencial uso no contexto clínico (Vaca-Paniagua et al., 2015). No nosso trabalho, o isolamento do cfDNA foi realizado com sucesso, entretanto, a biblioteca de cfDNA construída em nosso estudo não atingiu qualidade mínima para o sequenciamento de alta vazão, devido

ao tamanho reduzido do fragmento de cfDNA obtido (menos de 200 bp). Dessa forma, não foi possível analisar os níveis de metilação em cfDNA devido a limitações metodológicas e, portanto, novas abordagens devem ser adotadas para análise dos níveis de metilação de cfDNA a fim de investigar potenciais biomarcadores não invasivos, úteis para o diagnóstico precoce e prognóstico de CHC. Nesse contexto, abordagens não-invasivas, como a utilização de DNA livre circulante em soro ou plasma, para avaliar o perfil de metilação de genes de interesse, como RASSF1A e DOK1, devem ser mais amplamente estudadas.

## 6 CONCLUSÕES

- A presença de CHC foi associada à idade média mais avançada (64 anos,  $p < 0,001$ ). Além disso, indivíduos do gênero masculino foram significativamente mais frequentes em estágios mais avançados da doença hepática, com presença de cirrose ou CHC quando comparado com o grupo de pacientes com apenas hepatite crônica ( $p = 0,009$ ).
- O HCV apresentou uma variabilidade genética diferente de acordo com o estágio da progressão da doença hepática. O subtipo mais frequente em indivíduos com CHC foi o 1b e o subtipo 1a foi associado a presença de cirrose.
- A ocorrência do genótipo polimórfico nulo para o gene GSTT1 está associada à progressão da doença hepática para cirrose em pacientes brasileiros crônicos para a hepatite C.
- A ocorrência do perfil genotípico simultâneo GSTT1 nulo e TP53 Pro/Pro (rs1042522), o perfil genotípico simultâneo GSTM1 nulo e TP53 Arg/Arg (rs1042522), além do perfil genotípico simultâneo GSTM1 nulo, MDM2 T/T (rs2279744) e TP53 Arg/Arg (rs1042522) estão associados ao desenvolvimento de CHC em pacientes brasileiros crônicos para a hepatite C.
- A análise das diferentes combinações entre polimorfismos nos genes GSTT1, GSTM1, TP53 e MDM2 é extremamente relevante para a identificação de fatores genéticos associados à hepatocarcinogênese, uma vez que a complexa relação entre eles pode mostrar associação de genótipos diferentes para o mesmo polimorfismo com o desenvolvimento de CHC.
- Os níveis de metilação de DNA nos promotores dos genes RASSF1A e DOK1, em tecido hepático, foram associados ao desenvolvimento de CHC.



- Níveis crescentes de cfDNA em soro foram observados de acordo com a progressão da doença hepática, sendo encontrados níveis baixos em pacientes sem doença hepática, níveis intermediários em pacientes com hepatite C crônica, níveis elevados em pacientes com cirrose e níveis ainda mais elevados em pacientes com CHC, indicando aumento de acordo com a gravidade da doença hepática.
- Níveis médios mais elevados de cfDNA em soro foram associados à presença de CHC e a hepatite C crônica ao serem comparados com indivíduos sem doença hepática.
- Não foi possível analisar os níveis de metilação em cfDNA devido a limitações metodológicas. A biblioteca de cfDNA construída não atingiu qualidade mínima para o sequenciamento de alta vazão, devido ao tamanho reduzido do fragmento de cfDNA obtido (menor que 200 pb). Novas abordagens devem ser adotadas para análise dos níveis de metilação de cfDNA.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abara WE, Qaseem A, Schillie S et al. Hepatitis B Vaccination, Screening, and Linkage to Care: Best Practice Advice From the American College of Physicians and the Centers for Disease Control and Prevention. *Ann Intern Med.* 2017; 167(11): 794-804.
- Abd El-Moneim E, Younis FA, Allam N et al. Gene deletion of glutathione S-transferase M1 and T1 and risk factors of hepatocellular carcinoma in Egyptian patients. *Egypt J Immunol.* 2008; 15(2): 125-34.
- Agathangelou A, Cooper WN, Latif F. Role of the Ras-association domain family 1 tumor suppressor gene in human cancers. *Cancer Res.* 2005; 65(9): 3497-508.
- Albecka A, Montserret R, Krey T et al. Identification of new functional regions in hepatitis C virus envelope glycoprotein E2. *J Virol.* 2011; 85(4): 1777-92.
- Ammerpohl O, Pratschke J, Schafmayer C et al. Distinct DNA methylation patterns in cirrhotic liver and hepatocellular carcinoma. *Int J Cancer.* 2012; 130(6): 1319-28.
- Appel-Da-Silva MC, Miozzo SA, Dossin IA et al. Incidence of hepatocellular carcinoma in outpatients with cirrhosis in Brazil: A 10-year retrospective cohort study. *World J Gastroenterol.* 2016; 22(46): 10219-10225.
- Appel N, Zayas M, Miller S et al. Essential role of domain III of nonstructural protein 5A for hepatitis C virus infectious particle assembly. *PLoS Pathog.* 2008; 4(3): e1000035.
- Araujo NM, Araujo OC, Silva EM et al. Identification of novel recombinants of hepatitis B virus genotypes F and G in human immunodeficiency virus-positive patients from Argentina and Brazil. *J Gen Virol.* 2013; 94(Pt 1): 150-8.
- Araujo NM, Mello FC, Yoshida CF et al. High proportion of subgroup A' (genotype A) among Brazilian isolates of Hepatitis B virus. *Arch Virol.* 2004; 149(7): 1383-95.
- Araujo NM, Waizbort R, Kay A. Hepatitis B virus infection from an evolutionary point of view: how viral, host, and environmental factors shape genotypes and subgenotypes. *Infect Genet Evol.* 2011; 11(6): 1199-207.
- Araujo OC, Barros JJ, Do OK et al. Genetic variability of hepatitis B and C viruses in Brazilian patients with and without hepatocellular carcinoma. *J Med Virol.* 2014; 86(2): 217-23.
- Arauz-Ruiz P, Norder H, Robertson BH et al. Genotype H: a new Amerindian genotype of hepatitis B virus revealed in Central America. *J Gen Virol.* 2002; 83(Pt 8): 2059-73.
- Aroucha DC, Carmo RF, Vasconcelos LR et al. TNF-alpha and IL-10 polymorphisms increase the risk to hepatocellular carcinoma in HCV infected individuals. *J Med Virol.* 2016; 88(9): 1587-95.

Asim M, Khan LA, Husain SA et al. Genetic polymorphism of glutathione S transferases M1 and T1 in Indian patients with hepatocellular carcinoma. *Dis Markers*. 2010; 28(6): 369-76.

Baldissera VD, Alves AF, Almeida S et al. Hepatocellular carcinoma and estrogen receptors: Polymorphisms and isoforms relations and implications. *Med Hypotheses*. 2016; 86 67-70.

Bartenschlager R, Ahlborn-Laake L, Mous J et al. Kinetic and structural analyses of hepatitis C virus polyprotein processing. *J Virol*. 1994; 68(8): 5045-55.

Bartenschlager R, Frese M, Pietschmann T. Novel insights into hepatitis C virus replication and persistence. *Adv Virus Res*. 2004; 63 71-180.

Begum S, Brait M, Dasgupta S et al. An epigenetic marker panel for detection of lung cancer using cell-free serum DNA. *Clin Cancer Res*. 2011; 17(13): 4494-503.

Bettegowda C, Sausen M, Leary RJ et al. Detection of circulating tumor DNA in early- and late-stage human malignancies. *Sci Transl Med*. 2014; 6(224): 224ra24.

Bhat RA, Ulrich PP, Vyas GN. Molecular characterization of a new variant of hepatitis B virus in a persistently infected homosexual man. *Hepatology*. 1990; 11(2): 271-6.

Blum HE. Hepatocellular carcinoma: therapy and prevention. *World J Gastroenterol*. 2005; 11(47): 7391-400.

Bond GL, Hu W, Bond EE et al. A single nucleotide polymorphism in the MDM2 promoter attenuates the p53 tumor suppressor pathway and accelerates tumor formation in humans. *Cell*. 2004; 119(5): 591-602.

Bond GL, Hu W, Levine AJ. MDM2 is a central node in the p53 pathway: 12 years and counting. *Curr Cancer Drug Targets*. 2005; 5(1): 3-8.

Bottecchia M, Souto FJ, O KM et al. Hepatitis B virus genotypes and resistance mutations in patients under long term lamivudine therapy: characterization of genotype G in Brazil. *BMC Microbiol*. 2008; 8 11.

Brasil. Ministério da Saúde. Estudo de Prevalência de Base Populacional das Infecções pelos Vírus das Hepatites A, B e C nas Capitais do Brasil. 2010.

Brasil. Ministério da Saúde. Boletim Epidemiológico de Hepatites Virais - 2017. 2017. Disponível em: < <http://www.aids.gov.br/pt-br/pub/2017/boletim-epidemiologico-de-hepatites-virais-2017> >. Acesso em: 5 janeiro 2018.

Brass V, Moradpour D, Blum HE. Molecular virology of hepatitis C virus (HCV): 2006 update. *Int J Med Sci*. 2006; 3(2): 29-34.

Bukh J, Purcell RH, Miller RH. Sequence analysis of the core gene of 14 hepatitis C virus genotypes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994; 91(17): 8239-43.

- Calvaruso V, Petta S, Craxi A. Is global elimination of HCV realistic? *Liver Int.* 2018; 38 Suppl 1 40-46.
- Campiotto S, Pinho JR, Carrilho FJ et al. Geographic distribution of hepatitis C virus genotypes in Brazil. *Braz J Med Biol Res.* 2005; 38(1): 41-9.
- Cao GW. Clinical relevance and public health significance of hepatitis B virus genomic variations. *World J Gastroenterol.* 2009; 15(46): 5761-9.
- Carmo RF, Aroucha D, Vasconcelos LR et al. Genetic variation in PTX3 and plasma levels associated with hepatocellular carcinoma in patients with HCV. *J Viral Hepat.* 2016; 23(2): 116-22.
- Carrilho FJ, Kikuchi L, Branco F et al. Clinical and epidemiological aspects of hepatocellular carcinoma in Brazil. *Clinics (Sao Paulo).* 2010; 65(12): 1285-90.
- Chan KC, Jiang P, Zheng YW et al. Cancer genome scanning in plasma: detection of tumor-associated copy number aberrations, single-nucleotide variants, and tumoral heterogeneity by massively parallel sequencing. *Clin Chem.* 2013; 59(1): 211-24.
- Chayama K, Hayes CN. Hepatitis C virus: How genetic variability affects pathobiology of disease. *J Gastroenterol Hepatol.* 2011; 26 Suppl 1 83-95.
- Choo QL, Kuo G, Weiner AJ et al. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science.* 1989; 244(4902): 359-62.
- Church TR, Wandell M, Lofton-Day C et al. Prospective evaluation of methylated SEPT9 in plasma for detection of asymptomatic colorectal cancer. *Gut.* 2014; 63(2): 317-25.
- Cleary SP, Jeck WR, Zhao X et al. Identification of driver genes in hepatocellular carcinoma by exome sequencing. *Hepatology.* 2013; 58(5): 1693-702.
- Colson P, Roquelaure B, Tamalet C. Detection of a newly identified hepatitis B virus genotype in southeastern France. *J Clin Virol.* 2009; 45(2): 165-7.
- Cotrim HP, Oliveira CP, Coelho HS et al. Nonalcoholic steatohepatitis and hepatocellular carcinoma: Brazilian survey. *Clinics (Sao Paulo).* 2016; 71(5): 281-4.
- Covolo L, Gelatti U, Talamini R et al. Alcohol dehydrogenase 3, glutathione S-transferase M1 and T1 polymorphisms, alcohol consumption and hepatocellular carcinoma (Italy). *Cancer Causes Control.* 2005; 16(7): 831-8.
- Crowley E, Di Nicolantonio F, Loupakis F et al. Liquid biopsy: monitoring cancer-genetics in the blood. *Nat Rev Clin Oncol.* 2013; 10(8): 472-84.
- Dawson SJ, Tsui DW, Murtaza M et al. Analysis of circulating tumor DNA to monitor metastatic breast cancer. *N Engl J Med.* 2013; 368(13): 1199-209.
- De Almeida AJ, Campos-De-Magalhaes M, De Melo Marcal OP et al. Hepatitis C virus-associated thrombocytopenia: a controlled prospective, virological study. *Ann Hematol.* 2004; 83(7): 434-40.

- De Vogel S, Wouters KA, Gottschalk RW et al. Genetic variants of methyl metabolizing enzymes and epigenetic regulators: associations with promoter CpG island hypermethylation in colorectal cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2009; 18(11): 3086-96.
- Debes JD, Chan AJ, Balderramo D et al. Hepatocellular carcinoma in South America: Evaluation of risk factors, demographics and therapy. *Liver Int.* 2018; 38(1): 136-143.
- Delvaux N, Costa VD, Costa MM et al. Inosine triphosphatase allele frequency and association with ribavirin-induced anaemia in Brazilian patients receiving antiviral therapy for chronic hepatitis C. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2015; 110(5): 636-43.
- Deng ZL, Wei YP, Ma Y. Polymorphism of glutathione S-transferase mu 1 and theta 1 genes and hepatocellular carcinoma in southern Guangxi, China. *World J Gastroenterol.* 2005; 11(2): 272-4.
- Deuffic-Burban S, Mathurin P, Valleron AJ. Modelling the past, current and future HCV burden in France: detailed analysis and perspectives. *Stat Methods Med Res.* 2009; 18(3): 233-52.
- Deuffic-Burban S, Poynard T, Sulkowski MS et al. Estimating the future health burden of chronic hepatitis C and human immunodeficiency virus infections in the United States. *J Viral Hepat.* 2007; 14(2): 107-15.
- Dharel N, Kato N, Muroyama R et al. MDM2 promoter SNP309 is associated with the risk of hepatocellular carcinoma in patients with chronic hepatitis C. *Clin Cancer Res.* 2006; 12(16): 4867-71.
- Di Gioia S, Bianchi P, Destro A et al. Quantitative evaluation of RASSF1A methylation in the non-lesional, regenerative and neoplastic liver. *BMC Cancer.* 2006; 6 89.
- Di Vuolo V, Buonaguro L, Izzo F et al. TP53 and MDM2 gene polymorphisms and risk of hepatocellular carcinoma among Italian patients. *Infect Agent Cancer.* 2011; 6 13.
- Diehl F, Schmidt K, Choti MA et al. Circulating mutant DNA to assess tumor dynamics. *Nat Med.* 2008; 14(9): 985-90.
- Ding C, Yu H, Yu H et al. TP53 codon 72 polymorphism with hepatocellular carcinoma: a metaanalysis. *J Int Med Res.* 2012; 40(2): 446-54.
- Donato F, Gelatti U, Limina RM et al. Southern Europe as an example of interaction between various environmental factors: a systematic review of the epidemiologic evidence. *Oncogene.* 2006; 25(27): 3756-70.
- Donninger H, Vos MD, Clark GJ. The RASSF1A tumor suppressor. *J Cell Sci.* 2007; 120(Pt 18): 3163-72.
- Dore GJ, Law M, Macdonald M et al. Epidemiology of hepatitis C virus infection in Australia. *J Clin Virol.* 2003; 26(2): 171-84.

Dumont P, Leu JI, Della Pietra AC, 3rd et al. The codon 72 polymorphic variants of p53 have markedly different apoptotic potential. *Nat Genet.* 2003; 33(3): 357-65.

Easl-Eortc. EASL-EORTC clinical practice guidelines: management of hepatocellular carcinoma. *J Hepatol.* 2012; 56(4): 908-43.

El-Serag HB, Rudolph KL. Hepatocellular carcinoma: epidemiology and molecular carcinogenesis. *Gastroenterology.* 2007; 132(7): 2557-76.

El-Shamy A, Shindo M, Shoji I et al. Polymorphisms of the core, NS3, and NS5A proteins of hepatitis C virus genotype 1b associate with development of hepatocellular carcinoma. *Hepatology.* 2013; 58(2): 555-63.

Elazar M, Liu P, Rice CM et al. An N-terminal amphipathic helix in hepatitis C virus (HCV) NS4B mediates membrane association, correct localization of replication complex proteins, and HCV RNA replication. *J Virol.* 2004; 78(20): 11393-400.

Ervik M, Lam F, Ferlay J et al. *Cancer Today.* Lyon, France, 2016. Disponível em: < <http://gco.iarc.fr/today> >. Acesso em: 5 de janeiro de 2018.

Evans MJ, Rice CM, Goff SP. Phosphorylation of hepatitis C virus nonstructural protein 5A modulates its protein interactions and viral RNA replication. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004; 101(35): 13038-43.

Ezzikouri S, El Feydi AE, Chafik A et al. The Pro variant of the p53 codon 72 polymorphism is associated with hepatocellular carcinoma in Moroccan population. *Hepatol Res.* 2007; 37(9): 748-54.

Fattovich G. Natural history and prognosis of hepatitis B. *Semin Liver Dis.* 2003; 23(1): 47-58.

Fattovich G, Giustina G, Christensen E et al. Influence of hepatitis delta virus infection on morbidity and mortality in compensated cirrhosis type B. The European Concerted Action on Viral Hepatitis (Eurohep). *Gut.* 2000; 46(3): 420-6.

Fattovich G, Giustina G, Degos F et al. Morbidity and mortality in compensated cirrhosis type C: a retrospective follow-up study of 384 patients. *Gastroenterology.* 1997; 112(2): 463-72.

Fields BN, Knipe DM, Howley PM. *Fields Virology.* 6th. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2013. 2456

Friebe P, Boudet J, Simorre JP et al. Kissing-loop interaction in the 3' end of the hepatitis C virus genome essential for RNA replication. *J Virol.* 2005; 79(1): 380-92.

Fujiwara N, Friedman SL, Goossens N et al. Risk factors and prevention of hepatocellular carcinoma in the era of precision medicine. *J Hepatol.* 2018; 68(3): 526-549.

- Ganem D. Hepadnaviridae and their replication. In: FIELDS, B. N.; KNIPE, D. M., *et al* (Ed.). *Fields Virology*. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers, 1996. p.2703-2737.
- Gao W, Kondo Y, Shen L *et al*. Variable DNA methylation patterns associated with progression of disease in hepatocellular carcinomas. *Carcinogenesis*. 2008; 29(10): 1901-10.
- Ge D, Fellay J, Thompson AJ *et al*. Genetic variation in IL28B predicts hepatitis C treatment-induced viral clearance. *Nature*. 2009; 461(7262): 399-401.
- Gholam PM, Flancbaum L, Machan JT *et al*. Nonalcoholic fatty liver disease in severely obese subjects. *Am J Gastroenterol*. 2007; 102(2): 399-408.
- Giannelli G, Fransvea E, Trerotoli P *et al*. Clinical validation of combined serological biomarkers for improved hepatocellular carcinoma diagnosis in 961 patients. *Clin Chim Acta*. 2007; 383(1-2): 147-52.
- Giannelli G, Marinosci F, Trerotoli P *et al*. SCCA antigen combined with alpha-fetoprotein as serologic markers of HCC. *Int J Cancer*. 2005; 117(3): 506-9.
- Gomaa AI, Khan SA, Toledano MB *et al*. Hepatocellular carcinoma: epidemiology, risk factors and pathogenesis. *World J Gastroenterol*. 2008; 14(27): 4300-8.
- Gomes SA. O genoma do vírus da hepatite B. In: FOCACCIA, R. (Ed.). *Tratado das Hepatites Virais*. São Paulo: Atheneu, 2003. p.119-125.
- Goncalves CS, Pereira FEL, Gayotto LCC. Hepatocellular carcinoma in Brazil: report of a national survey (Florianópolis, SC, 1995). *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*. 1997; 39(3): 165-170.
- Goncalves PL, Zago-Gomes Mda P, Goncalves CS *et al*. Hepatitis virus and hepatocellular carcinoma in Brazil: a report from the State of Espírito Santo. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2014; 47(5): 559-63.
- Goto K, Ichinose Y, Ohe Y *et al*. Epidermal growth factor receptor mutation status in circulating free DNA in serum: from IPASS, a phase III study of gefitinib or carboplatin/paclitaxel in non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol*. 2012; 7(1): 115-21.
- Gottwein JM, Scheel TK, Jensen TB *et al*. Development and characterization of hepatitis C virus genotype 1-7 cell culture systems: role of CD81 and scavenger receptor class B type I and effect of antiviral drugs. *Hepatology*. 2009; 49(2): 364-77.
- Griffin SD, Beales LP, Clarke DS *et al*. The p7 protein of hepatitis C virus forms an ion channel that is blocked by the antiviral drug, Amantadine. *FEBS Lett*. 2003; 535(1-3): 34-8.
- Gros C, Fahy J, Halby L *et al*. DNA methylation inhibitors in cancer: recent and future approaches. *Biochimie*. 2012; 94(11): 2280-96.

- Hayes JD, Flanagan JU, Jowsey IR. Glutathione transferases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2005; 45 51-88.
- Hayes JD, Strange RC. Glutathione S-transferase polymorphisms and their biological consequences. *Pharmacology*. 2000; 61(3): 154-66.
- Heermann KH, Goldmann U, Schwartz W et al. Large surface proteins of hepatitis B virus containing the pre-s sequence. *J Virol*. 1984; 52(2): 396-402.
- Hernandez-Vargas H, Lambert MP, Le Calvez-Kelm F et al. Hepatocellular carcinoma displays distinct DNA methylation signatures with potential as clinical predictors. *PLoS One*. 2010; 5(3): e9749.
- Hezode C, Roudot-Thoraval F, Zafrani ES et al. Different mechanisms of steatosis in hepatitis C virus genotypes 1 and 3 infections. *J Viral Hepat*. 2004; 11(5): 455-8.
- Hiraoka A, Michitaka K, Kumada T et al. Validation and Potential of Albumin-Bilirubin Grade and Prognostication in a Nationwide Survey of 46,681 Hepatocellular Carcinoma Patients in Japan: The Need for a More Detailed Evaluation of Hepatic Function. *Liver Cancer*. 2017; 6(4): 325-336.
- Hoofnagle JH, Seeff LB, Bales ZB et al. Type B hepatitis after transfusion with blood containing antibody to hepatitis B core antigen. *N Engl J Med*. 1978; 298(25): 1379-83.
- Hsia CY, Huo TI, Chiang SY et al. Evaluation of interleukin-6, interleukin-10 and human hepatocyte growth factor as tumor markers for hepatocellular carcinoma. *Eur J Surg Oncol*. 2007; 33(2): 208-12.
- Hsiung DT, Marsit CJ, Houseman EA et al. Global DNA methylation level in whole blood as a biomarker in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2007; 16(1): 108-14.
- Hu S, Zhao L, Yang J et al. The association between polymorphism of P53 Codon72 Arg/Pro and hepatocellular carcinoma susceptibility: evidence from a meta-analysis of 15 studies with 3,704 cases. *Tumour Biol*. 2014; 35(4): 3647-56.
- Hu Z, Ma H, Lu D et al. Genetic variants in the MDM2 promoter and lung cancer risk in a Chinese population. *Int J Cancer*. 2006; 118(5): 1275-8.
- Huang HL, Lin WY, Lee LT et al. Metabolic syndrome is related to nonalcoholic steatohepatitis in severely obese subjects. *Obes Surg*. 2007; 17(11): 1457-63.
- Hutchinson SJ, Bird SM, Goldberg DJ. Modeling the current and future disease burden of hepatitis C among injection drug users in Scotland. *Hepatology*. 2005; 42(3): 711-23.
- Hutchinson SJ, McIntyre PG, Molyneaux P et al. Prevalence of hepatitis C among injectors in Scotland 1989-2000: declining trends among young injectors halt in the late 1990s. *Epidemiol Infect*. 2002; 128(3): 473-7.



Ictv. Index of Viruses. Virus Taxonomy: 2016 release, Budapest, 2016. Disponível em: < <https://talk.ictvonline.org/taxonomy/> >. Acesso em: Acesso em 5 janeiro 2018.

Idrees M, Rafique S, Rehman I et al. Hepatitis C virus genotype 3a infection and hepatocellular carcinoma: Pakistan experience. *World J Gastroenterol.* 2009; 15(40): 5080-5.

Irshad M, Gupta P, Irshad K. Molecular basis of hepatocellular carcinoma induced by hepatitis C virus infection. *World J Hepatol.* 2017; 9(36): 1305-1314.

Issa JP. Aging, DNA methylation and cancer. *Crit Rev Oncol Hematol.* 1999; 32(1): 31-43.

Issa JP. CpG island methylator phenotype in cancer. *Nat Rev Cancer.* 2004; 4(12): 988-93.

Iyer P, Zekri AR, Hung CW et al. Concordance of DNA methylation pattern in plasma and tumor DNA of Egyptian hepatocellular carcinoma patients. *Exp Mol Pathol.* 2010; 88(1): 107-11.

Jayakumar S, Chowdhury R, Ye C et al. Fulminant viral hepatitis. *Crit Care Clin.* 2013; 29(3): 677-97.

Ji H, Fraser CS, Yu Y et al. Coordinated assembly of human translation initiation complexes by the hepatitis C virus internal ribosome entry site RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004; 101(49): 16990-5.

Jiang DK, Sun J, Cao G et al. Genetic variants in STAT4 and HLA-DQ genes confer risk of hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma. *Nat Genet.* 2013; 45(1): 72-5.

Jirasko V, Montserret R, Lee JY et al. Structural and functional studies of nonstructural protein 2 of the hepatitis C virus reveal its key role as organizer of virion assembly. *PLoS Pathog.* 2010; 6(12): e1001233.

Jones PA, Baylin SB. The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat Rev Genet.* 2002; 3(6): 415-28.

Julien SG, Dube N, Hardy S et al. Inside the human cancer tyrosine phosphatome. *Nat Rev Cancer.* 2011; 11(1): 35-49.

Jurkowska RZ, Jurkowski TP, Jeltsch A. Structure and function of mammalian DNA methyltransferases. *Chembiochem.* 2011; 12(2): 206-22.

Kalra M, Mayes J, Assefa S et al. Role of sex steroid receptors in pathobiology of hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol.* 2008; 14(39): 5945-61.

Kay A, Zoulim F. Hepatitis B virus genetic variability and evolution. *Virus Res.* 2007; 127(2): 164-76.

- Kew MC, Kramvis A, Yu MC et al. Increased hepatocarcinogenic potential of hepatitis B virus genotype A in Bantu-speaking sub-saharan Africans. *J Med Virol.* 2005; 75(4): 513-21.
- Khaliq S, Jahan S, Hassan S. Hepatitis C virus p7: molecular function and importance in hepatitis C virus life cycle and potential antiviral target. *Liver Int.* 2011; 31(5): 606-17.
- Kieft JS, Zhou K, Jubin R et al. The hepatitis C virus internal ribosome entry site adopts an ion-dependent tertiary fold. *J Mol Biol.* 1999; 292(3): 513-29.
- Kiran M, Chawla YK, Kaur J. Glutathione-S-transferase and microsomal epoxide hydrolase polymorphism and viral-related hepatocellular carcinoma risk in India. *DNA Cell Biol.* 2008; 27(12): 687-94.
- Kolykhalov AA, Feinstone SM, Rice CM. Identification of a highly conserved sequence element at the 3' terminus of hepatitis C virus genome RNA. *J Virol.* 1996; 70(6): 3363-71.
- Kolykhalov AA, Mihalik K, Feinstone SM et al. Hepatitis C virus-encoded enzymatic activities and conserved RNA elements in the 3' nontranslated region are essential for virus replication in vivo. *J Virol.* 2000; 74(4): 2046-51.
- Korba B, Shetty K, Medvedev A et al. Hepatitis C virus Genotype 1a core gene nucleotide patterns associated with hepatocellular carcinoma risk. *J Gen Virol.* 2015; 96(9): 2928-37.
- Krekulova L, Rehak V, Riley LW. Structure and functions of hepatitis C virus proteins: 15 years after. *Folia Microbiol (Praha).* 2006; 51(6): 665-80.
- Kumar V, Kato N, Urabe Y et al. Genome-wide association study identifies a susceptibility locus for HCV-induced hepatocellular carcinoma. *Nat Genet.* 2011; 43(5): 455-8.
- Kuo G, Choo QL, Alter HJ et al. An assay for circulating antibodies to a major etiologic virus of human non-A, non-B hepatitis. *Science.* 1989; 244(4902): 362-4.
- Kurbanov F, Tanaka Y, Mizokami M. Geographical and genetic diversity of the human hepatitis B virus. *Hepatol Res.* 2010; 40(1): 14-30.
- Lam AM, Frick DN. Hepatitis C virus subgenomic replicon requires an active NS3 RNA helicase. *J Virol.* 2006; 80(1): 404-11.
- Lambert MP, Paliwal A, Vaissiere T et al. Aberrant DNA methylation distinguishes hepatocellular carcinoma associated with HBV and HCV infection and alcohol intake. *J Hepatol.* 2011; 54(4): 705-15.
- Lampe E, Lewis-Ximenez L, Espirito-Santo MP et al. Genetic diversity of HCV in Brazil. *Antivir Ther.* 2013; 18(3 Pt B): 435-44.

- Lampe E, Mello FCA, Do Espirito-Santo MP et al. Nationwide overview of the distribution of hepatitis B virus genotypes in Brazil: a 1000-sample multicentre study. *J Gen Virol*. 2017; 98(6): 1389-1398.
- Lavanchy D. Evolving epidemiology of hepatitis C virus. *Clin Microbiol Infect*. 2011; 17(2): 107-15.
- Lee MH, Yang HI, Lu SN et al. Hepatitis C virus genotype 1b increases cumulative lifetime risk of hepatocellular carcinoma. *Int J Cancer*. 2014; 135(5): 1119-26.
- Lee S, Lee HJ, Kim JH et al. Aberrant CpG island hypermethylation along multistep hepatocarcinogenesis. *Am J Pathol*. 2003; 163(4): 1371-8.
- Lee SA, Mun HS, Kim H et al. Naturally occurring hepatitis B virus X deletions and insertions among Korean chronic patients. *J Med Virol*. 2011a; 83(1): 65-70.
- Lee YJ, Yoon KA, Han JY et al. Circulating cell-free DNA in plasma of never smokers with advanced lung adenocarcinoma receiving gefitinib or standard chemotherapy as first-line therapy. *Clin Cancer Res*. 2011b; 17(15): 5179-87.
- Legrand-Abravanel F, Colson P, Leguillou-Guillemette H et al. Influence of the HCV subtype on the virological response to pegylated interferon and ribavirin therapy. *J Med Virol*. 2009; 81(12): 2029-35.
- Li-Shuai Q, Yu-Yan C, Hai-Feng Z et al. Pre-S deletions of hepatitis B virus predict recurrence of hepatocellular carcinoma after curative resection. *Medicine (Baltimore)*. 2017; 96(43): e8311.
- Li B, Li B, Guo T et al. Artificial neural network models for early diagnosis of hepatocellular carcinoma using serum levels of alpha-fetoprotein, alpha-fetoprotein-L3, des-gamma-carboxy prothrombin, and Golgi protein 73. *Oncotarget*. 2017; 8(46): 80521-80530.
- Li S, Qian J, Yang Y et al. GWAS identifies novel susceptibility loci on 6p21.32 and 21q21.3 for hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis B virus carriers. *PLoS Genet*. 2012; 8(7): e1002791.
- Lin C, Thomson JA, Rice CM. A central region in the hepatitis C virus NS4A protein allows formation of an active NS3-NS4A serine proteinase complex in vivo and in vitro. *J Virol*. 1995; 69(7): 4373-80.
- Lingala S, Ghany MG. Natural History of Hepatitis C. *Gastroenterol Clin North Am*. 2015; 44(4): 717-34.
- Liu SF, Hsieh MH, Hou NJ et al. Hepatitis B virus genotyping by enzyme-linked immunosorbent assay in Taiwan. *Hepatol Int*. 2010; 4(3): 601-7.
- Livingston SE, Simonetti JP, McMahon BJ et al. Hepatitis B virus genotypes in Alaska Native people with hepatocellular carcinoma: preponderance of genotype F. *J Infect Dis*. 2007; 195(1): 5-11.

- Llovet JM, Zucman-Rossi J, Pikarsky E et al. Hepatocellular carcinoma. *Nat Rev Dis Primers*. 2016; 2: 16018.
- Lukavsky PJ. Structure and function of HCV IRES domains. *Virus Res*. 2009; 139(2): 166-71.
- Lundin M, Monne M, Widell A et al. Topology of the membrane-associated hepatitis C virus protein NS4B. *J Virol*. 2003; 77(9): 5428-38.
- Lv L, Wang P, Zhou X et al. Association between the p53 codon 72 Arg/Pro polymorphism and hepatocellular carcinoma risk. *Tumour Biol*. 2013; 34(3): 1451-9.
- Ma H, Marti-Gutierrez N, Park SW et al. Correction of a pathogenic gene mutation in human embryos. *Nature*. 2017; 548(7668): 413-419.
- Ma HB, Huang T, Han F et al. Association between MDM2 promoter SNP309 T/G polymorphism and liver cancer risk - a meta-analysis. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2012; 13(6): 2841-6.
- Ma Y, Anantpadma M, Timpe JM et al. Hepatitis C virus NS2 protein serves as a scaffold for virus assembly by interacting with both structural and nonstructural proteins. *J Virol*. 2011; 85(1): 86-97.
- Magnius LO, Norder H. Subtypes, genotypes and molecular epidemiology of the hepatitis B virus as reflected by sequence variability of the S-gene. *Intervirology*. 1995; 38(1-2): 24-34.
- Mah YH, Hsu CS, Liu CH et al. Serum p53 gene polymorphisms and severity of hepatitis B or C-related chronic liver diseases in Taiwan. *Hepatol Int*. 2011; 5(3): 814-21.
- Makvandi M. Update on occult hepatitis B virus infection. *World J Gastroenterol*. 2016; 22(39): 8720-8734.
- Mao Y, Yang H, Xu H et al. Golgi protein 73 (GOLPH2) is a valuable serum marker for hepatocellular carcinoma. *Gut*. 2010; 59(12): 1687-93.
- Marte B. Cancer: super p53. *Nature*. 2002; 420(6913): 279.
- Martins RM, Vanderborght BO, Yoshida CF. Hepatitis C virus genotypes among blood donors from different regions of Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1998; 93(3): 299-300.
- Mashima R, Hishida Y, Tezuka T et al. The roles of Dok family adapters in immunoreceptor signaling. *Immunol Rev*. 2009; 232(1): 273-85.
- Maucort-Boulch D, De Martel C, Franceschi S et al. Fraction and incidence of liver cancer attributable to hepatitis B and C viruses worldwide. *Int J Cancer*. 2018
- Mccormick CJ, Brown D, Griffin S et al. A link between translation of the hepatitis C virus polyprotein and polymerase function; possible consequences for hyperphosphorylation of NS5A. *J Gen Virol*. 2006; 87(Pt 1): 93-102.

- McIlwain CC, Townsend DM, Tew KD. Glutathione S-transferase polymorphisms: cancer incidence and therapy. *Oncogene*. 2006; 25(11): 1639-48.
- Mello FC, Souto FJ, Nabuco LC et al. Hepatitis B virus genotypes circulating in Brazil: molecular characterization of genotype F isolates. *BMC Microbiol*. 2007; 7: 103.
- Menendez C, Sanchez-Tapias JM, Kahigwa E et al. Prevalence and mother-to-infant transmission of hepatitis viruses B, C, and E in Southern Tanzania. *J Med Virol*. 1999; 58(3): 215-20.
- Meng X, Franklin DA, Dong J et al. MDM2-p53 pathway in hepatocellular carcinoma. *Cancer Res*. 2014; 74(24): 7161-7.
- Messina JP, Humphreys I, Flaxman A et al. Global distribution and prevalence of hepatitis C virus genotypes. *Hepatology*. 2015; 61(1): 77-87.
- Mohd Hanafiah K, Groeger J, Flaxman AD et al. Global epidemiology of hepatitis C virus infection: new estimates of age-specific antibody to HCV seroprevalence. *Hepatology*. 2013; 57(4): 1333-42.
- Momparler RL. Cancer epigenetics. *Oncogene*. 2003; 22(42): 6479-83.
- Mosley JW, Huang W, Stram DO et al. Donor levels of serum alanine aminotransferase activity and antibody to hepatitis B core antigen associated with recipient hepatitis C and non-B, non-C outcomes. *Transfusion*. 1996; 36(9): 776-81.
- Murakami S. Hepatitis B virus X protein: a multifunctional viral regulator. *J Gastroenterol*. 2001; 36(10): 651-60.
- Nahon P, Zucman-Rossi J. Single nucleotide polymorphisms and risk of hepatocellular carcinoma in cirrhosis. *J Hepatol*. 2012; 57(3): 663-74.
- Nakamura T, Sueoka-Aragane N, Iwanaga K et al. A noninvasive system for monitoring resistance to epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors with plasma DNA. *J Thorac Oncol*. 2011; 6(10): 1639-48.
- Negro F. Mechanisms and significance of liver steatosis in hepatitis C virus infection. *World J Gastroenterol*. 2006; 12(42): 6756-65.
- Neuschwander-Tetri BA. Nonalcoholic steatohepatitis and the metabolic syndrome. *Am J Med Sci*. 2005; 330(6): 326-35.
- Newman AM, Bratman SV, To J et al. An ultrasensitive method for quantitating circulating tumor DNA with broad patient coverage. *Nat Med*. 2014; 20(5): 548-54.
- Nicot F, Alric L, Barange K et al. Influence of HCV genotype 1 subtypes on the virus response to PEG interferon alpha-2a plus ribavirin therapy. *J Med Virol*. 2011; 83(3): 437-44.

- Nogueira JA, Ono-Nita SK, Nita ME et al. 249 TP53 mutation has high prevalence and is correlated with larger and poorly differentiated HCC in Brazilian patients. *BMC Cancer*. 2009; 9 204.
- Nordenstedt H, White DL, El-Serag HB. The changing pattern of epidemiology in hepatocellular carcinoma. *Dig Liver Dis*. 2010; 42 Suppl 3 S206-14.
- Norder H, Courouce AM, Coursaget P et al. Genetic diversity of hepatitis B virus strains derived worldwide: genotypes, subgenotypes, and HBsAg subtypes. *Intervirology*. 2004; 47(6): 289-309.
- Ochi Y, Hashimoto S, Kawabe N et al. HLA-DQ gene polymorphisms are associated with hepatocellular carcinoma and hepatitis B surface antigen in chronic hepatitis B virus infection. *Hepatol Res*. 2017; 47(8): 755-766.
- Ohno O, Mizokami M, Wu R et al. New hepatitis C virus (HCV) genotyping system that allows for identification of HCV genotypes 1a, 1b, 2a, 2b, 3a, 3b, 4, 5a, and 6a. *Journal of clinical microbiology*. 1997; 35(1): 201-207.
- Olinger CM, Jutavijittum P, Hubschen JM et al. Possible new hepatitis B virus genotype, southeast Asia. *Emerg Infect Dis*. 2008; 14(11): 1777-80.
- Oliveira ML, Bastos FI, Sabino RR et al. Distribution of HCV genotypes among different exposure categories in Brazil. *Braz J Med Biol Res*. 1999; 32(3): 279-82.
- Op De Beeck A, Voisset C, Bartosch B et al. Characterization of functional hepatitis C virus envelope glycoproteins. *J Virol*. 2004; 78(6): 2994-3002.
- Osorio FM, Lauar GM, Lima AS et al. Epidemiological aspects of hepatocellular carcinoma in a referral center of Minas Gerais, Brazil. *Arq Gastroenterol*. 2013; 50(2): 97-100.
- Ozturk M. p53 mutation in hepatocellular carcinoma after aflatoxin exposure. *Lancet*. 1991; 338(8779): 1356-9.
- Paranagua-Vezozzo DC, Ono SK, Alvarado-Mora MV et al. Epidemiology of HCC in Brazil: incidence and risk factors in a ten-year cohort. *Ann Hepatol*. 2014; 13(4): 386-93.
- Park IY, Sohn BH, Yu E et al. Aberrant epigenetic modifications in hepatocarcinogenesis induced by hepatitis B virus X protein. *Gastroenterology*. 2007; 132(4): 1476-94.
- Parkin DM, Bray F, Ferlay J et al. Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin*. 2005; 55(2): 74-108.
- Pechalrieu D, Etievant C, Arimondo PB. DNA methyltransferase inhibitors in cancer: From pharmacology to translational studies. *Biochem Pharmacol*. 2017; 129 1-13.
- Peng Q, Lao X, Chen Z et al. TP53 and MDM2 gene polymorphisms, gene-gene interaction, and hepatocellular carcinoma risk: evidence from an updated meta-analysis. *PLoS One*. 2013; 8(12): e82773.

Pereira LM, Martelli CM, Merchan-Hamann E et al. Population-based multicentric survey of hepatitis B infection and risk factor differences among three regions in Brazil. *Am J Trop Med Hyg.* 2009; 81(2): 240-7.

Pereira LM, Martelli CM, Moreira RC et al. Prevalence and risk factors of Hepatitis C virus infection in Brazil, 2005 through 2009: a cross-sectional study. *BMC Infect Dis.* 2013; 13 60.

Peres-Da-Silva A, Almeida AJ, Lampe E. Genetic diversity of NS3 protease from Brazilian HCV isolates and possible implications for therapy with direct-acting antiviral drugs. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2012; 107(2): 254-61.

Peres NP, Galbiatti-Dias AL, Castanhole-Nunes MM et al. Polymorphisms of folate metabolism genes in patients with cirrhosis and hepatocellular carcinoma. *World J Hepatol.* 2016; 8(29): 1234-1243.

Perkins G, Yap TA, Pope L et al. Multi-purpose utility of circulating plasma DNA testing in patients with advanced cancers. *PLoS One.* 2012; 7(11): e47020.

Plummer M, De Martel C, Vignat J et al. Global burden of cancers attributable to infections in 2012: a synthetic analysis. *Lancet Glob Health.* 2016; 4(9): e609-16.

Poveda E, Vispo E, Barreiro P et al. Predicted effect of direct acting antivirals in the current HIV-HCV-coinfected population in Spain. *Antivir Ther.* 2012; 17(3): 571-5.

Prokunina-Olsson L, Muchmore B, Tang W et al. A variant upstream of IFNL3 (IL28B) creating a new interferon gene IFNL4 is associated with impaired clearance of hepatitis C virus. *Nat Genet.* 2013; 45(2): 164-71.

Raimondi S, Bruno S, Mondelli MU et al. Hepatitis C virus genotype 1b as a risk factor for hepatocellular carcinoma development: a meta-analysis. *J Hepatol.* 2009; 50(6): 1142-54.

Raimondo G, Caccamo G, Filomia R et al. Occult HBV infection. *Semin Immunopathol.* 2013; 35(1): 39-52.

Rallon NI, Pineda JA, Soriano V et al. Differences in virological response to peginterferon-alpha plus ribavirin in HIV-positive patients coinfecting with HCV subtypes 1a or 1b. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2012; 60(2): 117-23.

Ricco G, Cavallone D, Cosma C et al. Impact of etiology of chronic liver disease on hepatocellular carcinoma biomarkers. *Cancer Biomark.* 2017

Ringelhan M, Mckeating JA, Protzer U. Viral hepatitis and liver cancer. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2017; 372(1732):

Rizzetto M. Viral hepatitis in the third millennium. *Res Virol.* 1998; 149(5): 251-6.

Roskams T, Kojiro M. Pathology of early hepatocellular carcinoma: conventional and molecular diagnosis. *Semin Liver Dis.* 2010; 30(1): 17-25.

- Sagnelli E, Santantonio T, Coppola N et al. Acute hepatitis C: clinical and laboratory diagnosis, course of the disease, treatment. *Infection*. 2014; 42(4): 601-10.
- Sakai A, Claire MS, Faulk K et al. The p7 polypeptide of hepatitis C virus is critical for infectivity and contains functionally important genotype-specific sequences. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003; 100(20): 11646-51.
- Sanchez LV, Tanaka Y, Maldonado M et al. Difference of hepatitis B virus genotype distribution in two groups of mexican patients with different risk factors. High prevalence of genotype H and G. *Intervirol*. 2007; 50(1): 9-15.
- Santos AO, Alvarado-Mora MV, Botelho L et al. Characterization of hepatitis B virus (HBV) genotypes in patients from Rondonia, Brazil. *Virol J*. 2010; 7 315.
- Scalioni LP, Da Silva AP, Miguel JC et al. Lack of Association between Hepatitis C Virus core Gene Variation 70/91aa and Insulin Resistance. *Int J Mol Sci*. 2017; 18(7):
- Schaefer S. Hepatitis B virus taxonomy and hepatitis B virus genotypes. *World J Gastroenterol*. 2007; 13(1): 14-21.
- Schulze K, Imbeaud S, Letouze E et al. Exome sequencing of hepatocellular carcinomas identifies new mutational signatures and potential therapeutic targets. *Nat Genet*. 2015; 47(5): 505-511.
- Schwarzenbach H, Hoon DS, Pantel K. Cell-free nucleic acids as biomarkers in cancer patients. *Nat Rev Cancer*. 2011; 11(6): 426-37.
- Sede M, Jones LR, Moretti F et al. Inter and intra-host variability of hepatitis C virus genotype 1a hypervariable envelope coding domains followed for a 4-11 year of human immunodeficiency virus coinfection and highly active antiretroviral therapy. *Virology*. 2014; 471-473 19-28.
- Seth RB, Sun L, Chen ZJ. Antiviral innate immunity pathways. *Cell Res*. 2006; 16(2): 141-7.
- Shen L, Ahuja N, Shen Y et al. DNA methylation and environmental exposures in human hepatocellular carcinoma. *J Natl Cancer Inst*. 2002; 94(10): 755-61.
- Shen YH, Chen S, Peng YF et al. Quantitative assessment of the effect of glutathione S-transferase genes GSTM1 and GSTT1 on hepatocellular carcinoma risk. *Tumour Biol*. 2014; 35(5): 4007-15.
- Staib F, Hussain SP, Hofseth LJ et al. TP53 and liver carcinogenesis. *Hum Mutat*. 2003; 21(3): 201-16.
- Stapleford KA, Lindenbach BD. Hepatitis C virus NS2 coordinates virus particle assembly through physical interactions with the E1-E2 glycoprotein and NS3-NS4A enzyme complexes. *J Virol*. 2011; 85(4): 1706-17.
- Steinmann E, Penin F, Kallis S et al. Hepatitis C virus p7 protein is crucial for assembly and release of infectious virions. *PLoS Pathog*. 2007; 3(7): e103.



- Sumbul AT, Akkiz H, Bayram S et al. p53 codon 72 polymorphism is associated with susceptibility to hepatocellular carcinoma in the Turkish population: a case-control study. *Mol Biol Rep.* 2012; 39(2): 1639-47.
- Sunbul M. Hepatitis B virus genotypes: global distribution and clinical importance. *World J Gastroenterol.* 2014; 20(18): 5427-34.
- Suzuki N, Kamataki A, Yamaki J et al. Characterization of circulating DNA in healthy human plasma. *Clin Chim Acta.* 2008; 387(1-2): 55-8.
- Sweeting MJ, De Angelis D, Brant LJ et al. The burden of hepatitis C in England. *J Viral Hepat.* 2007; 14(8): 570-6.
- Tamura I, Kurimura O, Koda T et al. Risk of liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma in subjects with hepatitis B and delta virus infection: a study from Kure, Japan. *J Gastroenterol Hepatol.* 1993; 8(5): 433-6.
- Tanaka T, Kato N, Cho MJ et al. Structure of the 3' terminus of the hepatitis C virus genome. *J Virol.* 1996; 70(5): 3307-12.
- Tanaka Y, Nishida N, Sugiyama M et al. Genome-wide association of IL28B with response to pegylated interferon-alpha and ribavirin therapy for chronic hepatitis C. *Nat Genet.* 2009; 41(10): 1105-9.
- Taniguchi K, Uchida J, Nishino K et al. Quantitative detection of EGFR mutations in circulating tumor DNA derived from lung adenocarcinomas. *Clin Cancer Res.* 2011; 17(24): 7808-15.
- Tatematsu K, Tanaka Y, Kurbanov F et al. A genetic variant of hepatitis B virus divergent from known human and ape genotypes isolated from a Japanese patient and provisionally assigned to new genotype J. *J Virol.* 2009; 83(20): 10538-47.
- Teixeira AC, Mendes-Junior CT, Souza FF et al. The 14bp-deletion allele in the HLA-G gene confers susceptibility to the development of hepatocellular carcinoma in the Brazilian population. *Tissue Antigens.* 2013a; 81(6): 408-13.
- Teixeira AC, Mendes CT, Jr., Marano LA et al. Alleles and genotypes of polymorphisms of IL-18, TNF-alpha and IFN-gamma are associated with a higher risk and severity of hepatocellular carcinoma (HCC) in Brazil. *Hum Immunol.* 2013b; 74(8): 1024-9.
- Teixeira AC, Mente ED, Cantao CaB et al. Clinical Characteristics of 130 Patients With Hepatocellular Carcinoma Followed at a Tertiary Hospital From Brazil. *World J Oncol.* 2012; 3(4): 165-172.
- Teixeira RLF, Lopes MQP, Suff PN et al. Tuberculosis Pharmacogenetics: State of The Art. In: MAHBOUB, B. H. e VATS, M. G. (Ed.). *Tuberculosis - Current Issues in Diagnosis and Management.* Rijeka: InTech, 2013c. p.478.
- Tellinghuisen TL, Foss KL, Treadaway JC et al. Identification of residues required for RNA replication in domains II and III of the hepatitis C virus NS5A protein. *J Virol.* 2008; 82(3): 1073-83.

- Thiel HJ, Collett MS, Gould EA et al. Flaviviridae. In: FAUQUET, C. M.;MAYO, M. A., *et al* (Ed.). *Virus Taxonomy*. London: Elsevier/Academic Press, 2005. p.979-996.
- Thrift AP, El-Serag HB, Kanwal F. Global epidemiology and burden of HCV infection and HCV-related disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2017; 14(2): 122-132.
- Tischoff I, Tannapfe A. DNA methylation in hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol*. 2008; 14(11): 1741-8.
- Tomoda T, Nouse K, Sakai A et al. Genetic risk of hepatocellular carcinoma in patients with hepatitis C virus: a case control study. *J Gastroenterol Hepatol*. 2012; 27(4): 797-804.
- Trad D, Bibani N, Sabbah M et al. Known, new and emerging risk factors of hepatocellular carcinoma (review). *Presse Med*. 2017; 46(11): 1000-1007.
- Tran TT, Trinh TN, Abe K. New complex recombinant genotype of hepatitis B virus identified in Vietnam. *J Virol*. 2008; 82(11): 5657-63.
- Trepo C, Chan HL, Lok A. Hepatitis B virus infection. *Lancet*. 2014; 384(9959): 2053-63.
- Tsai WL, Chung RT. Viral hepatocarcinogenesis. *Oncogene*. 2010; 29(16): 2309-24.
- Ueda M, Hung YC, Terai Y et al. Glutathione S-transferase GSTM1, GSTT1 and p53 codon 72 polymorphisms in human tumor cells. *Hum Cell*. 2003; 16(4): 241-51.
- Ueda M, Terai Y, Kanda K et al. Germline polymorphism of p53 codon 72 in gynecological cancer. *Gynecol Oncol*. 2006; 100(1): 173-8.
- Vaca-Paniagua F, Oliver J, Nogueira Da Costa A et al. Targeted deep DNA methylation analysis of circulating cell-free DNA in plasma using massively parallel semiconductor sequencing. *Epigenomics*. 2015; 7(3): 353-62.
- Vieyres G, Thomas X, Descamps V et al. Characterization of the envelope glycoproteins associated with infectious hepatitis C virus. *J Virol*. 2010; 84(19): 10159-68.
- Villar LM, Cruz HM, Barbosa JR et al. Update on hepatitis B and C virus diagnosis. *World J Virol*. 2015; 4(4): 323-42.
- Volk ML, Hernandez JC, Su GL et al. Risk factors for hepatocellular carcinoma may impair the performance of biomarkers: a comparison of AFP, DCP, and AFP-L3. *Cancer Biomark*. 2007; 3(2): 79-87.
- Waki T, Tamura G, Sato M et al. Age-related methylation of tumor suppressor and tumor-related genes: an analysis of autopsy samples. *Oncogene*. 2003; 22(26): 4128-33.

Walker AJ, Peacock CJ, Pedergnana V et al. Host genetic factors associated with hepatocellular carcinoma in patients with hepatitis C virus infection: A systematic review. *J Viral Hepat.* 2018

Wang C, Teng Z, Zhu Y et al. Associations between pre-S deletion mutation of hepatitis B virus and risk of hepatocellular carcinoma in the Asian population: a meta-analysis. *Med Sci Monit.* 2015; 21 1072-7.

Wang X, Yang J, Ho B et al. Interaction of *Helicobacter pylori* with genetic variants in the MDM2 promoter, is associated with gastric cancer susceptibility in Chinese patients. *Helicobacter.* 2009; 14(5): 114-9.

Westbrook RH, Dusheiko G. Natural history of hepatitis C. *J Hepatol.* 2014; 61(1 Suppl): S58-68.

Who. Hepatitis B. World Health Organization Fact Sheet N°204. 2017a. Disponível em: < <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs204/en> >. Acesso em: 5 janeiro 2018.

Who. Hepatitis C. World Health Organization Fact Sheet N°164. 2017b. Disponível em: < <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs164/en/> >. Acesso em: 5 janeiro 2018.

Wolk B, Sansonno D, Krausslich HG et al. Subcellular localization, stability, and trans-cleavage competence of the hepatitis C virus NS3-NS4A complex expressed in tetracycline-regulated cell lines. *J Virol.* 2000; 74(5): 2293-304.

Wong GL, Chan HL, Yiu KK et al. Meta-analysis: The association of hepatitis B virus genotypes and hepatocellular carcinoma. *Aliment Pharmacol Ther.* 2013; 37(5): 517-26.

Wong IH, Johnson PJ, Lai PB et al. Tumor-derived epigenetic changes in the plasma and serum of liver cancer patients. Implications for cancer detection and monitoring. *Ann N Y Acad Sci.* 2000; 906 102-5.

Xu W, Yu J, Wong VW. Mechanism and prediction of HCC development in HBV infection. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 2017; 31(3): 291-298.

Yang B, Guo M, Herman JG et al. Aberrant promoter methylation profiles of tumor suppressor genes in hepatocellular carcinoma. *Am J Pathol.* 2003; 163(3): 1101-7.

Yang JD, Altekruse SF, Nguyen MH et al. Impact of country of birth on age at the time of diagnosis of hepatocellular carcinoma in the United States. *Cancer.* 2017; 123(1): 81-89.

Yang Y, Xia T, Li N et al. Combined effects of p53 and MDM2 polymorphisms on susceptibility and surgical prognosis in hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma. *Protein Cell.* 2013; 4(1): 71-81.

Yoon YJ, Chang HY, Ahn SH et al. MDM2 and p53 polymorphisms are associated with the development of hepatocellular carcinoma in patients with chronic hepatitis B virus infection. *Carcinogenesis.* 2008; 29(6): 1192-6.

Younossi ZM, Koenig AB, Abdelatif D et al. Global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease-Meta-analytic assessment of prevalence, incidence, and outcomes. *Hepatology*. 2016; 64(1): 73-84.

Yu H, Yuan Q, Ge SX et al. Molecular and phylogenetic analyses suggest an additional hepatitis B virus genotype "I". *PLoS One*. 2010; 5(2): e9297.

Zhang FF, Cardarelli R, Carroll J et al. Significant differences in global genomic DNA methylation by gender and race/ethnicity in peripheral blood. *Epigenetics*. 2011; 6(5): 623-9.

Zhang H, Zhai Y, Hu Z et al. Genome-wide association study identifies 1p36.22 as a new susceptibility locus for hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis B virus carriers. *Nat Genet*. 2010a; 42(9): 755-8.

Zhang X, Li HM, Liu Z et al. Loss of heterozygosity and methylation of multiple tumor suppressor genes on chromosome 3 in hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol*. 2013; 48(1): 132-43.

Zhang YJ, Ahsan H, Chen Y et al. High frequency of promoter hypermethylation of RASSF1A and p16 and its relationship to aflatoxin B1-DNA adduct levels in human hepatocellular carcinoma. *Mol Carcinog*. 2002; 35(2): 85-92.

Zhang YL, Cheng T, Cai YJ et al. RNA Interference inhibits hepatitis B virus of different genotypes in vitro and in vivo. *BMC Microbiol*. 2010b; 10 214.

Zheng DL, Zhang L, Cheng N et al. Epigenetic modification induced by hepatitis B virus X protein via interaction with de novo DNA methyltransferase DNMT3A. *J Hepatol*. 2009; 50(2): 377-87.

Zhu H, Wu J, Shen X. Genome-wide association study: new genetic insights into HBV/HCV-related hepatocellular carcinoma genomes. *Scand J Gastroenterol*. 2017; 52(2): 209-215.

Zhu ZZ, Cong WM, Liu SF et al. Homozygosity for Pro of p53 Arg72Pro as a potential risk factor for hepatocellular carcinoma in Chinese population. *World J Gastroenterol*. 2005; 11(2): 289-92.

Zidan A, Scheuerlein H, Schule S et al. Epidemiological pattern of hepatitis B and hepatitis C as etiological agents for hepatocellular carcinoma in Iran and worldwide. *Hepat Mon*. 2012; 12(10 HCC): e6894.

Zou S, Tepper M, El Saadany S. Prediction of hepatitis C burden in Canada. *Can J Gastroenterol*. 2000; 14(7): 575-80.

Zucman-Rossi J, Villanueva A, Nault JC et al. Genetic Landscape and Biomarkers of Hepatocellular Carcinoma. *Gastroenterology*. 2015; 149(5): 1226-1239 e4.

## Apêndice A - Protocolo SPRIselect modificado

Protocolo SPRIselect (Beckman Coulter, Brea, CA) modificado utilizado no estudo:

1. Agite bem o frasco SPRIselect para ressuspender as microesferas SPRI até o líquido ficar homogêneo. Adicione o volume necessário de SPRIselect para a o volume de amostra utilizando o cálculo abaixo:

Volume da amostra x Taxa = volume de SPRIselect.

Exemplo:  $50 \mu\text{L} \times 0,7 = 35 \mu\text{L}$  de SPRIselect

2. Misture cada tubo ou placa em um vortex por 30 segundos a uma velocidade adequada até ficar homogêneo. Centrifugue brevemente (spin).

3. Coloque os tubos ou placa contendo a reação em um suporte magnético ou placa magnética apropriada e aguarde a atuação do ímã por 3 minutos.

4. Utilizando uma pipeta, transfira o sobrenadante claro, que contém a amostra selecionada para um novo tubo ou placa. Deve-se ter cuidado para não aspirar quantidades significativas de microesferas SPRI durante esta etapa para evitar a presença de tamanhos de fragmentos indesejados. Descartar os tubos ou placa contendo as microesferas SPRI restantes com fragmentos indesejados.

5. Adicione o volume necessário de SPRIselect, usando o cálculo abaixo, ao sobrenadante da etapa 4 acima.

Volume de amostra x (1,8 - Taxa inicial) = volume de SPRIselect

Exemplo:  $50 \mu\text{L} \times (1,8 - 0,7) = 55 \mu\text{L}$  de SPRIselect

6. Execute o seguinte:

a. Misture cada tubo ou placa em um vortex por 30 segundos a uma velocidade adequada até ficar homogêneo. Centrifugue brevemente (spin).

b. Coloque os tubos ou placa contendo a reação em um suporte magnético ou placa magnética apropriada e aguarde a atuação do ímã por 5 minutos.

c. Remova e descarte o sobrenadante transparente. Deve-se ter cuidado para não aspirar quantidades significativas de microesferas SPRI durante esta etapa para evitar rendimento reduzido, pois a biblioteca desejada está associada às microesferas.

7. Com os tubos ou placa contendo a reação ainda no ímã, adicione  $180 \mu\text{L}$  de etanol a 85% e incube à temperatura ambiente por 30 segundos. Remova e

descarte o sobrenadante de etanol com cuidado para não aspirar quantidades significativas de microesferas SPRI já associadas à biblioteca.

8. Para eluir a amostra:

a. Remova os tubos ou placa contendo a reação do ímã e adicione  $\geq 20 \mu\text{L}$  água ou solução tampão padrão, como Tris ou TE.

b. Misture cada tubo ou placa em um vortex por 1 minuto a uma velocidade adequada até ficar homogêneo. Centrifugue brevemente (spin).

c. Coloque os tubos ou placa contendo a reação em um suporte magnético ou placa magnética apropriada e aguarde a atuação do ímã por 1 minuto.

9. Transfira o eluato com a biblioteca de tamanho selecionada para um recipiente de armazenamento apropriado.

# Apêndice B - Aprovação pelos Comitês de Ética do Instituto Oswaldo Cruz e do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO  
Hospital Universitário Clementino Fraga Filho  
Faculdade de Medicina  
Comitê de Ética em Pesquisa - CEP

- Coordenador:  
 Alice Helena Dutra Vianna  
Médico - Prof. Associado
- Membros Titulares:  
 Beatriz Maria Almeida de Paula  
Antropóloga - Prof. Associado  
 Eliza Regina Ambrosio  
Assistente Social - Mestre  
 Helena Wazyneley  
Representante dos Usários  
 Lúcia da Conceição de Araújo Marques  
Enfermeiro - Mestre  
 Mariana Zornita  
Psicóloga  
 Mário Teixeira Antonio  
Farmacêutico - Especialista  
 Natália Conceição Fernandes  
Médico - Prof. Adjunto  
 Paulo Fajó Barros  
Médico - Prof. Assistente  
 Roberto Coury Padroni  
Médico - Doutor  
 Roberto Takashi Sudo  
Médico - Prof. Titular
- Membros Suplentes:  
 Anna Paula Trindade Rodin Perucci  
Nutricionista - Professor Auxiliar  
 Beatriz Moritz Trepe  
Médico - Doutora  
 Carlos Alberto Guimarães  
Médico - Prof. Associado  
 Ana Tereza Rocco Sussara  
Assistente Social  
 Lucia Helena Luiza Vicini Amari  
Biólogo - Mestre  
 Gilvan Renato Muzy de Souza  
Médico - Prof. Associado  
 Miriam Benedita Tavares Soares  
Representante dos Usários  
 Maria da Conceição Lopes Barroque  
Assistente Social  
 Mariana Lima Oliveira da Silva  
Enfermeiro  
 Michel Jean Marie Thollent  
Sociólogo - Prof. Adjunto  
 Natália Henriques Silva Canedo  
Médico - Professor Adjunto  
 Renato Moritz Vianier Rodrigues Almeida  
Engenheiro - Professor Adjunto  
 Rui Haddock  
Médico - Prof. Adjunto

CEP - MEMO - n.º 898/10 Rio de Janeiro, 10 de dezembro de 2010.

Da: Coordenadora do CEP

A (o): Sr. (a) Pesquisador (a): Drª Natalia Motta de Araújo

Assunto: Parecer sobre projeto de pesquisa.

Sr. (a) Pesquisador (a),

Informo a V. S.a. que o CEP constituído nos Termos da Resolução n.º 196/96 do Conselho Nacional de Saúde e, devidamente registrado na Comissão Nacional de Ética em Pesquisa, recebeu, analisou e emitiu parecer sobre a documentação referente ao protocolo de pesquisa páginas 001 a 024 e seu respectivo Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, conforme abaixo discriminado:

Protocolo de Pesquisa: 139/10 - CEP

Título: "Análise da variabilidade genética do vírus da hepatite B em pacientes com hepatocarcinoma dos padrões de metilação de DNA em tecidos de hepatocarcinoma de diferentes etiologias".

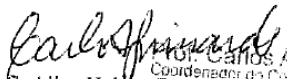
Pesquisador (a) responsável: Drª Natalia Motta de Araújo

Data de apreciação do parecer: 18/11/2010

Parecer: "APROVADO"

Informo ainda, que V. Sa. deverá apresentar relatório semestral, previsto para 18/05/2011, anual e/ou relatório final para este Comitê acompanhar o desenvolvimento do projeto. (item VII. 13.d., da Resolução n.º 196/96 - CNS/MS).

Atenciosamente,

  
 Prof. Carlos Alberto Guimarães  
 Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa  
 Faculdade de Medicina / HUCCF / UFRJ  
 Profa. Alice Helena Dutra Vianna  
 Coordenadora do CEP



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO  
Hospital Universitário Clementino Fraga Filho  
Faculdade de Medicina  
Comitê de Ética em Pesquisa - CEP

CEP - MEMO - nº 638/12

Rio de Janeiro, 29 de maio de 2012.

Do: Coordenador do CEP

A (o): Sr. (a) Pesquisador (a): Natalia Motta de Araújo

Assunto: Parecer sobre Emenda ao Protocolo e Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

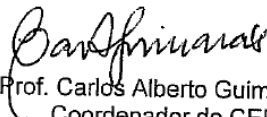
Referência: Projeto nº 139/10 – CEP

Título: "Análise da variabilidade genética dos vírus da hepatite B e da hepatite C em pacientes com hepatocarcinoma e comparação dos padrões de metilação DNA em tecidos de hepatocarcinoma de diferentes etiologias"

Sr.(a) Pesquisador(a),

Informo a V. S.a., que em reunião deste CEP realizada em 21/05/2012, foi apreciado e considerado "APROVADO", o parecer referente ao Projeto de Pesquisa acima referenciado.

Atenciosamente,

  
Prof. Carlos Alberto Guimarães  
Coordenador do CEP





**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP**

**DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

**Título da Pesquisa:** Análise da variabilidade genética dos vírus da hepatite B e da hepatite C em pacientes com hepatocarcinoma e comparação dos padrões de metilação de DNA em tecidos de hepatocarcinoma de diferentes etiologias.

**Pesquisador:** Natalia Motta de Araujo

**Área Temática:** Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP;);

**Versão:** 3

**CAAE:** 45156315.0.0000.5248

**Instituição Proponente:** FUNDACAO OSWALDO CRUZ

**Patrocinador Principal:** Instituto Oswaldo Cruz-RJ

**DADOS DO PARECER**

**Número do Parecer:** 1.358.935

**Apresentação do Projeto:**

O hepatocarcinoma ou carcinoma hepatocelular (CHC) é o mais frequente tumor maligno primário de fígado, apresentando uma alta incidência em muitos países devido principalmente ao seu diagnóstico tardio e a existência de múltiplos fatores de risco [1, 2]. O CHC é o quinto tipo de câncer mais comum no mundo, com cerca de 630 mil novos casos a cada ano. Devido ao curto tempo de evolução do CHC, geralmente o tumor se encontra avançado quando é feito o diagnóstico, fazendo com que a taxa de mortalidade desse tipo de câncer seja elevada. [3]. No Brasil, um total de 6.995 mortes foi registrado no ano de 2008 em virtude do câncer de fígado [22]. Os fatores de risco conhecidos para o desenvolvimento de CHC são as infecções crônicas pelos vírus da hepatite B (HBV) e da hepatite C (HCV), alcoolismo e fatores relacionados ao metabolismo e imunidade do paciente [4]. O CHC possui a possibilidade de prevenção, sendo essa classificada em primária e secundária. A prevenção primária do CHC é baseada principalmente na interrupção da transmissão do HBV, através da utilização da vacina. A prevenção secundária depende da detecção precoce do tumor, constando da remoção cirúrgica quando o tumor ainda não produziu repercussão clínica, mas já foi detectado pela dosagem no sangue de um marcador

Endereço: Av. Brasil 4036, Sala 705 (Campus Expansão)  
Bairro: Manguinhos CEP: 21.040-360  
UF: RJ Município: RIO DE JANEIRO  
Telefone: (21)3882-9011 Fax: (21)2561-4815 E-mail: cepfiocruz@ioc.fiocruz.br

Continuação do Parecer: 1.358.935

tumoral chamado alfafeto-proteína. Entretanto, essa substância é produzida em apenas 40 a 70% dos fígados acometidos pelo câncer [22]. A infecção pelo HBV é uma das infecções virais mais prevalentes em humanos e é um grave problema de saúde pública em muitos países, sobretudo nos países Asiáticos.

Cerca de dois bilhões de pessoas em todo o mundo (ou um terço da população mundial) já tiveram contato com o HBV e cerca de 360 milhões destes estão cronicamente infectados e em risco de desenvolver cirrose e CHC [5]. A infecção pelo HBV é comumente diagnosticada pela presença do antígeno de superfície viral (HBsAg) no soro do paciente infectado. Entretanto, o desenvolvimento de ensaios de PCR mais sensíveis tem permitido a detecção do DNA do HBV em soros de pacientes negativos para o HBsAg. A detecção do HBVDNA em pacientes com sorologia negativa para o HBsAg caracteriza a ocorrência de infecção oculta pelo HBV. Estudos prévios demonstraram uma prevalência de hepatite B oculta em pacientes com CHC variando de 12% a 61% [24]. Estima-se que dos 360 milhões de portadores crônicos para o HBV, 25% deles desenvolverá CHC [8, 9]. O HBV pode ser classificado em oito genótipos distintos (designados de A-H) de acordo com divergências encontradas entre as sequências nucleotídicas [10].

A infecção pelo HCV atinge cerca de 2 a 3% da população mundial. Mais de 70% das infecções pelo HCV se tornam crônicas, sendo que destas, 5 a 20% progride para cirrose e carcinoma hepatocelular [25]. Sendo um vírus identificado apenas em 1989 [26], acredita-se que um considerável número de indivíduos ainda desconheça o seu estado de portador crônico para esta infecção. Até o momento, não existe uma vacina disponível contra a infecção pelo HCV e o tratamento com drogas antivirais, são eficazes em apenas 40% dos pacientes [27]. O HCV é entre os vírus de importância clínica que infectam o homem, um dos que possuem a maior taxa de mutação, existindo dentro de um indivíduo como quasiespecies [28]. Atualmente o HCV é dividido em seis genótipos (1 a 6) e múltiplos subtipos, os quais apresentam diferenças significativas com relação à prevalência global, alguns com distribuição mundial, outros mais restritos a certas regiões [29]. No Brasil, os poucos estudos realizados nesta área têm demonstrado uma maior prevalência para os genótipos 1, 2 e 3 [30, 31] (Bassit et al., 2000; Espírito-Santo et al., 2007). As razões pelas quais alguns pacientes com hepatite B ou hepatite C crônica desenvolvem CHC e outros não, ainda são desconhecidas. Entretanto, um crescente número de estudos tem revelado que o genótipo da cepa infectante e a presença de determinadas

Endereço: Av. Brasil 4036, Sala 705 (Campus Expansão)  
Bairro: Manguinhos CEP: 21.040-360  
UF: RJ Município: RIO DE JANEIRO  
Telefone: (21)3882-9011 Fax: (21)2561-4815 E-mail: cepfiocruz@ioc.fiocruz.br

Continuação do Parecer: 1.358.935

mutações em regiões genômicas específicas do HBV e do HCV, são fatores virológicos que podem estar associados à ocorrência do CHC [11, 12, 13, 14]. Além disso, estudos têm discutido um possível papel da infecção oculta pelo HBV no desenvolvimento do CHC [24]. A metilação de DNA é o principal mecanismo de silenciamento de genes e tem sido observada em diferentes cânceres humanos [15, 16]. Nas células eucarióticas a metilação do DNA ocorre nos motivos CpG, que são frequentes nas regiões promotoras dos genes. Em muitos tipos de tumores, a ocorrência de hipermetilação em regiões promotoras tem sido relacionada à inativação de genes supressores de tumor [17].

Vários estudos têm demonstrado um papel importante da hipermetilação de promotores no silenciamento gênico em casos de CHC e revelado uma correlação positiva com a progressão do tumor [18]. Importantes genes supressores de tumor frequentemente hipermetilados em casos de CHC incluem RASSF1A e p16INK4a [19, 20]. Além disso, um estudo recente, avaliando os padrões de metilação de inúmeros promotores de genes associados ao câncer, revelou padrões de metilação de DNA específicos para os diferentes fatores de risco e fases de progressão do CHC [21]. Nesse sentido, um perfil de metilação desregulado pode ser um marcador precoce da doença e uma ferramenta útil para o rastreamento do CHC.

#### Metodologia Proposta:

**Amostragem:** A pesquisa será realizada em colaboração com o Serviço de Hepatologia do Hospital Universitário da UFRJ (HUCFF) onde as amostras de soro de pacientes acompanhados ambulatorialmente ou internados serão coletadas. Serão convidados a participar desse estudo 100 pacientes com diagnóstico de CHC atendidos no HUCFF. Como grupo controle, serão convidados para participar do estudo um total de 100 pacientes com hepatite B crônica sem CHC e 100 pacientes com hepatite C crônica sem CHC, também atendidos no HUCFF. Para o estudo da metilação, serão utilizadas as amostras de soro coletadas e amostras de tecido hepático tumoral e pareado normal oriundas de casos de CHC de qualquer etiologia, conservadas em parafina, provenientes do Departamento de Anatomia Patológica do HUCFF-UFRJ. Um banco de dados será formulado contendo dados epidemiológicos e clínicos dos indivíduos que aceitarem participar do projeto. As informações para a formulação do banco de dados serão colhidas através de um questionário elaborado especificamente para esse projeto (Ficha do paciente em anexo).

**Extração dos genomas viral e humano:** Os genomas do HBV, HCV e humano serão extraídos a

Endereço: Av. Brasil 4036, Sala 705 (Campus Expansão)  
Bairro: Manguinhos CEP: 21.040-360  
UF: RJ Município: RIO DE JANEIRO  
Telefone: (21)3882-9011 Fax: (21)2561-4815 E-mail: cepfiocruz@ioc.fiocruz.br



Continuação do Parecer: 1.358.935

partir do soro dos pacientes com e sem CHC, utilizando High Pure Viral Nucleic Acid kit (Roche Diagnostics, Alemanha). As amostras de tecido hepático serão submetidas à extração do DNA humano através do QIAamp DNA Mini kit (QIAGEN, Valencia, CA). Amplificação dos genomas viral e humano: Os ácidos nucleicos extraídos serão submetidos à PCR (Reação da Polimerase em Cadeia) em um termociclador, utilizando oligonucleotídeos específicos para as diferentes regiões genômicas de interesse dos genomas viral e humano.

Sequenciamento do DNA: O sequenciamento será realizado na Plataforma de Sequenciamento de DNA PDTIS/FIOCRUZ, usando-se BigDye Terminator mix em sequenciador automático de 48 capilares, modelo ABI3730 (Applied Biosystems, Foster City, CA). A análise das sequências de DNA para a determinação dos genótipos e mutações do HBV e do HCV será realizada através do programa MEGA3. - Quantificação da metilação do DNA humano: O DNA humano das amostras de tecido hepático será submetido ao tratamento com bissulfito de sódio para conversão das citosinas não metiladas em uracilas, utilizando o EZ DNA Methylation-Gold kit (Zymo Research, Orange, CA). Após modificação pelo bissulfito, a quantificação da metilação do DNA será feita através da técnica de pirosequenciamento (PyroMark Q96, QIAGEN), utilizando o programa Pyro Q-CpG (QIAGEN). Além disso, os níveis de metilação do DNA humano livre no soro serão avaliados em um painel de genes através do Illumina GoldenGate methylation assay (Illumina, San Diego, CA), de acordo com metodologia estabelecida por Hernandez-Vargas et al., 2010 [32]. Esta etapa será realizada no laboratório do Dr. Zdenko Herceg, na International Agency for Research on Cancer (IARC) em Lyon, França, através de um doutorado sanduíche previsto para 2016, do aluno Oscar Rafael Carmo Araújo, que está desenvolvendo a sua tese pelo curso de pós-graduação em Biologia Parasitária do IOC/FIOCRUZ.

- Determinação da carga viral: A quantificação da carga viral nas amostras de soro será realizada através de técnica de PCR em tempo real.

Análise estatística: Para comparar as frequências dos genótipos e mutações virais entre os pacientes com e sem CHC será utilizado o teste de qui-quadrado (2) de Pearson ou teste exato de Fisher, quando apropriado. Para comparar os níveis de metilação de DNA em amostras de tecido hepático tumoral e não tumoral será utilizado o teste de Mann-Whitney ou teste T de student, quando apropriado e ao

Endereço: Av. Brasil 4036, Sala 705 (Campus Expansão)  
Bairro: Manguinhos CEP: 21.040-360  
UF: RJ Município: RIO DE JANEIRO  
Telefone: (21)3882-9011 Fax: (21)2561-4815 E-mail: cepfiocruz@ioc.fiocruz.br

Continuação do Parecer: 1.358.935

comparar os grupos com CHC e sem CHC serão utilizados os testes de Kruskal-Wallis e ANOVA, quando apropriado. O Odds Ratio (OR) será calculado considerando-se um intervalo de confiança de 95%. Adicionalmente será realizada a análise multivariada por meio do método de regressão logística.

**Critério de Inclusão:**

Serão incluídos na pesquisa indivíduos com idade entre 18 e 70 anos com ou sem CHC, atendidos no ambulatório do Serviço de Hepatologia do HUCFF, e que concordarem em participar da pesquisa após a assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido.

**Critério de Exclusão:**

Serão excluídos da pesquisa indivíduos com idade inferior a 18 anos e os indivíduos que não concordarem em assinar o termo de consentimento livre e esclarecido.

**Objetivo da Pesquisa:**

Objetivos:

- 1- Comparar as prevalências dos genótipos do HBV e do HCV e de determinadas mutações nos genomas do HBV e HCV encontradas em um grupo de pacientes com CHC (grupo de estudo) com as prevalências encontradas em um grupo de pacientes com hepatite B ou hepatite C crônica sem CHC (grupo controle);
- 2- Avaliar a prevalência de infecção oculta pelo HBV no grupo de pacientes com CHC;
- 3- Analisar e comparar os padrões de metilação de DNA humano em amostras de tecido hepático tumoral e pareado normal oriundas de casos de CHC de qualquer etiologia, buscando assim padrões característicos

Endereço: Av. Brasil 4036, Sala 705 (Campus Expansão)  
Bairro: Manguinhos CEP: 21.040-360  
UF: RJ Município: RIO DE JANEIRO  
Telefone: (21)3882-9011 Fax: (21)2561-4815 E-mail: cepfiocruz@ioc.fiocruz.br





Continuação do Parecer: 1.358.935

para os diferentes fatores de risco e fases de progressão da doença;

4- Analisar e comparar os padrões de metilação do DNA humano livre no soro em um painel de genes de pacientes com e sem CHC.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Riscos:

Segundo a pesquisadora principal, os únicos riscos estão associados a possíveis desconfortos durante o procedimento de coleta de sangue, fato que pode ser minimizado pela alta qualificação e experiência dos membros da equipe médica colaboradora do projeto.

Benefícios:

Individualmente, os benefícios aos sujeitos que aderirem ao projeto serão, a identificação da carga viral e do genótipo do HBV ou do HCV e a identificação de cepas mutantes associadas à resistência aos antivirais, que poderão auxiliar no tratamento da hepatite B.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

O projeto está claro em seus propósitos, devidamente fundamentado, e tem relevância científica. Nessa versão do projeto, a pesquisadora responsável respondeu as pendências apontadas no parecer anterior! O projeto também deveria ter sido qualificado na PB como de cooperação estrangeira, uma vez que uma etapa do estudo será realizada no laboratório do Dr. Zdenko Herceg, na International Agency for Research on Cancer (IARC) em Lyon, França, através de um doutorado sanduíche previsto para 2016, do aluno Oscar Rafael Carmo Araújo, que está desenvolvendo a sua tese pelo curso de pós-graduação em Biologia Parasitária do IOC/FIOCRUZ. Entretanto, se enquadra no grupo de pesquisas com cooperação estrangeira, mas com copatrocínio do Governo Brasileiro

Endereço: Av. Brasil 4036, Sala 705 (Campus Expansão)  
Bairro: Manguinhos CEP: 21.040-360  
UF: RJ Município: RIO DE JANEIRO  
Telefone: (21)3882-9011 Fax: (21)2561-4815 E-mail: cepfiocruz@ioc.fiocruz.br

Continuação do Parecer: 1.358.935

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

Pendências em relação ao TCLE:

O termo de consentimento livre e esclarecido deverá ser redigido na terceira pessoa e não na primeira, ou seja, você está sendo convidado para participar deste estudo..Deverá se elaborado em duas vias ,rubricadas em todas as suas páginas e assinadas, ao seu término, pelo convidado a participar da pesquisa, ou por seu representante legal, assim como pelo pesquisador responsável, ou pela (s) pessoa (s) por ele delegada (s), devendo as páginas de assinaturas estar na mesma folha. Em ambas as vias deverão constar o endereço e contato telefônico ou outro, dos responsáveis pela pesquisa e do CEP local e da CONEP, quando pertinente.

Garantir plena liberdade ao participante da pesquisa de recusar-se a participar, ou retirar seu consentimento, em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma.

Pendência atendida.

(No TCLE não consta o nome da pessoa que deverá ser contactada caso o participante tenha alguma dúvida ou necessite esclarecimetnos). Explicitação da garantia de ressarcimento e como serão cobertas as despesas tidas pelos participantes da pesquisa e dela decorrentes.

Pendência atendida.

(O participante tem direito ao ressarcimento do transporte no dia da avaliação clínica). Se não for o caso, esclarecer que somente os paciente regularmente agendados para o acompanhamento clínico no serviço serão convidados a participar da pesquisa, e que não serão agendadas visitas somente pela pesquisa.

Pendência decorrente da ausência da identificação clara do(s) risco(s) no TCLE:

Os riscos envolvidos neste estudo não foram apresentados no TCLE (nem no Projeto). Cabe ressaltar que de acordo com a Resolução CNS 466/12, considera-se que toda pesquisa envolvendo seres humanos envolve risco. O dano eventual poderá ser imediato ou tardio, comprometendo o indivíduo ou a coletividade. Ressalte-se ainda que a resolução define como risco da pesquisa - possibilidade de danos à dimensão física, psíquica, moral, intelectual, social, cultural ou espiritual do ser humano, em qualquer fase de uma pesquisa e dela decorrente. Solicitamos adequação.

Endereço: Av. Brasil 4036, Sala 705 (Campus Expansão)  
Bairro: Manguinhos CEP: 21.040-360  
UF: RJ Município: RIO DE JANEIRO  
Telefone: (21)3882-9011 Fax: (21)2561-4815 E-mail: cepfiocruz@ioc.fiocruz.br



Continuação do Parecer: 1.358.935

Pendência atendida.

Todas as cartas anexadas à PB deverão estar assinadas pela pesquisador proponente.

Pendência atendida.

Anexar carta de anuência da instituição co-participante (UFRJ).

Pendência atendida.

Necessita atualização do cronograma.

Pendência atendida.

O projeto também deveria ter sido qualificado na PB como de cooperação estrangeira, uma vez que uma etapa do estudo será realizada no laboratório do Dr. Zdenko Herceg, na International Agency for Research on Cancer (IARC) em Lyon, França, através de um doutorado sanduíche previsto para 2016, do aluno Oscar Rafael Carmo Araújo, que está desenvolvendo a sua tese pelo curso de pósgraduação em Biologia Parasitária do IOC/FIOCRUZ. Esclarecer se o projeto aprovado em 2010 já previa colaboração estrangeira. Foi aprovado pela CONEP?

Pendência atendida.

#### **Recomendações:**

Apresentar relatórios parciais (anuais) e relatório final do projeto de pesquisa é responsabilidade indelegável do pesquisador principal.

Qualquer modificação ou emenda ao projeto de pesquisa em pauta deve ser submetida à apreciação do CEP Fiocruz/IOC.

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

Diante do exposto, o Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Oswaldo Cruz (CEP FIOCRUZ/IOC), em sua 211ª Reunião Ordinária, realizada em 08.12.2015, de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 466/12, manifesta-se pela aprovação do projeto de pesquisa proposto

Endereço: Av. Brasil 4036, Sala 705 (Campus Expansão)  
Bairro: Manguinhos CEP: 21.040-360  
UF: RJ Município: RIO DE JANEIRO  
Telefone: (21)3882-9011 Fax: (21)2561-4815 E-mail: cepfiocruz@ioc.fiocruz.br



Continuação do Parecer: 1.358.935

**Considerações Finais a critério do CEP:**

O sujeito de pesquisa ou seu representante, quando for o caso, deverá rubricar todas as folhas do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido -TCLE apondo sua assinatura na última página do referido Termo.

O pesquisador responsável deverá da mesma forma, rubricar todas as folhas do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - TCLE apondo sua assinatura na última página do referido Termo.

**Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:**

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Outros	carta_anuencia_IARC_traduzida.docx	26/10/2015 14:42:54	Anselmo Gomes de Araujo	Aceito
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_510940.pdf	20/10/2015 16:52:14		Aceito
Outros	carta_anuencia_IARC.docx	20/10/2015 16:45:25	Natalia Motta de Araujo	Aceito
Outros	carta_resposta.pdf	20/10/2015 16:43:32	Natalia Motta de Araujo	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto.doc	20/10/2015 16:35:14	Natalia Motta de Araujo	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.doc	14/10/2015 13:33:11	Natalia Motta de Araujo	Aceito
Outros	Carta solicitação de emenda (assinada).docx	10/08/2015 13:47:53		Aceito
Outros	Carta de anuência_Patologia.pdf	10/08/2015 13:32:48		Aceito
Outros	Carta de anuência_Hepatologia.pdf	10/08/2015 13:32:29		Aceito
Folha de Rosto	Folha de rosto.pdf	07/05/2015 10:08:35		Aceito
Parecer Anterior	Parecer sobre Relatório Anual.jpg	05/05/2015 14:13:56		Aceito
Parecer Anterior	Parecer sobre projeto de pesquisa.jpg	05/05/2015 14:13:44		Aceito
Parecer Anterior	Parecer sobre Emenda.jpg	05/05/2015		Aceito

Endereço: Av. Brasil 4036, Sala 705 (Campus Expansão)  
 Bairro: Manguinhos CEP: 21.040-360  
 UF: RJ Município: RIO DE JANEIRO  
 Telefone: (21)3882-9011 Fax: (21)2561-4815 E-mail: cepfiocruz@ioc.fiocruz.br



FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ -  
FIOCRUZ/IOC



Continuação do Parecer: 1.358.935

Parecer Anterior	Parecer sobre Emenda.jpg	14:13:27		Aceito
Outros	FICHA DO PACIENTE.doc	05/05/2015 13:59:09		Aceito
Outros	Pedido de isenção de TCLE.doc	05/05/2015 13:58:51		Aceito

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

RIO DE JANEIRO, 09 de Dezembro de 2015

---

Assinado por:  
José Henrique da Silva Pilotto  
(Coordenador)

# Apêndice C - Artigo publicado

RESEARCH ARTICLE

## *RASSF1A* and *DOK1* Promoter Methylation Levels in Hepatocellular Carcinoma, Cirrhotic and Non-Cirrhotic Liver, and Correlation with Liver Cancer in Brazilian Patients

Oscar C. Araujo<sup>1</sup>, Agatha S. Rosa<sup>1</sup>, Arlete Fernandes<sup>2</sup>, Christian Niel<sup>1</sup>, Cristiane A. Villela-Nogueira<sup>3</sup>, Vera Pannain<sup>2</sup>, Natalia M. Araujo<sup>1\*</sup>

**1** Laboratory of Molecular Virology, Oswaldo Cruz Institute, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brazil, **2** Department of Pathology, Clementino Fraga Filho University Hospital, Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil, **3** Hepatology Division, Clementino Fraga Filho University Hospital, Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

\* [nma.raujo@ioc.fiocruz.br](mailto:nma.raujo@ioc.fiocruz.br)



CrossMark  
click for updates

### OPEN ACCESS

**Citation:** Araujo OC, Rosa AS, Fernandes A, Niel C, Villela-Nogueira CA, Pannain V, et al. (2016) *RASSF1A* and *DOK1* Promoter Methylation Levels in Hepatocellular Carcinoma, Cirrhotic and Non-Cirrhotic Liver, and Correlation with Liver Cancer in Brazilian Patients. PLoS ONE 11(4): e0153796. doi:10.1371/journal.pone.0153796

**Editor:** Isabelle A. Chemin, ORCL-INSERM, FRANCE

**Received:** February 11, 2016

**Accepted:** April 4, 2016

**Published:** April 14, 2016

**Copyright:** © 2016 Araujo et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Data Availability Statement:** All relevant data are within the paper.

**Funding:** This work was funded by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (<http://cnpq.br/>), grant number 444071/2014-8, to NMA, and Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (<http://www.faperj.br/>), grant number E-26/111.528/2013, to NMA. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

### Abstract

Hepatocellular carcinoma (HCC) is the second most common cause of cancer mortality worldwide. Most cases of HCC are associated with cirrhosis related to chronic hepatitis B virus or hepatitis C virus infections. Hypermethylation of promoter regions is the main epigenetic mechanism of gene silencing and has been involved in HCC development. The aim of this study was to determine whether aberrant methylation of *RASSF1A* and *DOK1* gene promoters is associated with the progression of liver disease in Brazilian patients. Methylation levels were measured by pyrosequencing in 41 (20 HCC, 9 cirrhotic, and 12 non-cirrhotic) liver tissue samples. Mean rates of methylation in *RASSF1A* and *DOK1* were 16.2% and 12.0% in non-cirrhotic, 26.1% and 19.6% in cirrhotic, and 59.1% and 56.0% in HCC tissues, respectively, showing a gradual increase according to the progression of the disease, with significantly higher levels in tumor tissues. In addition, hypermethylation of *RASSF1A* and *DOK1* was found in the vast majority (88%) of the HCC cases. Interestingly, *DOK1* methylation levels in HCC samples were significantly higher in the group of younger (<40 years) patients, and higher in moderately differentiated than in poorly differentiated tumors ( $p < 0.05$ ). Our results reinforce the hypothesis that hypermethylation of *RASSF1A* and *DOK1* contributes to hepatocarcinogenesis and is associated to clinicopathological characteristics. *RASSF1A* and *DOK1* promoter hypermethylation may be a valuable biomarker for early diagnosis of HCC and a potential molecular target for epigenetic-based therapy.

### Introduction

Liver cancer is the second leading cause of cancer-related mortality, with an estimated 700,000 deaths each year worldwide [1]. Hepatocellular carcinoma (HCC) is by far the most common

**Competing Interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

type of primary liver cancer and one of the few cancers with well-defined major risk factors. Approximately 80% of all HCC cases are associated with chronic hepatitis B virus (HBV) or hepatitis C virus (HCV) infections [2], although chronic alcoholism and nonalcoholic steatohepatitis (NASH) are also major causes [3, 4]. These risk factors induce chronic liver damage often leading to cirrhosis, which is present in 80–90% of patients with HCC [4, 5]. Since HCC prognosis depends on tumor stage at diagnosis, lower survival rates have been observed among patients at the advanced stage [6], highlighting the importance of the identification of biomarkers for early liver cancer detection and therapeutic interventions.

The molecular mechanisms underlying hepatocarcinogenesis remain unclear. Similar to other tumors, the development and progression of HCC are due to a multistep process including accumulation of genetic and epigenetic alterations in regulatory genes, which lead to the activation of different oncogenes and inactivation of tumor suppressor genes. Hypermethylation of promoter CpG islands is an epigenetic mechanism of gene silencing involved in a wide range of human cancers, including HCC [7, 8]. Aberrant DNA methylation has also been demonstrated in premalignant conditions such as dysplastic nodules or cirrhotic liver [9–11], suggesting that it is an early event in hepatocarcinogenesis and a valuable marker for risk assessment. The Ras association domain family 1A (*RASSF1A*) and downstream of tyrosine kinases 1 (*DOK1*) are tumor suppressor genes frequently silenced through epigenetic mechanism in a variety of human malignancies [12, 13]. Aberrant methylation of these genes has been proposed to play an important role in the malignant transformation of the hepatocyte [10, 14]. Notably, hypermethylation of these genes in HCC has been reported to show geographical variations, suggesting that ethnicity may influence DNA methylation levels [10].

Brazilian people are the result of an intense admixture between European colonizers or immigrants, African slaves, and native Amerindians. In Brazil, almost 9,000 deaths were attributed to HCC in 2013 [15], and chronic HCV infection is the major risk factor, accounting for more than 50% of the cases [16]. To our knowledge, no report has been published so far on the epigenetic factors associated to HCC in Brazil.

In this study, we performed a quantitative DNA methylation analysis by pyrosequencing in Brazilian patients at HCC, cirrhotic, and non-cirrhotic stages, and assessed the relationship between methylation levels and clinicopathological characteristics, with the aim of examining the relevance of the hypermethylation of *RASSF1A* and *DOK1* as a molecular marker of HCC.

## Materials and Methods

### Ethics Statement

The study protocol was approved by the Research Ethics Committee of the Clementino Fraga Filho University Hospital (approval number 139/10) and performed in accordance with the declaration of Helsinki. Due to the retrospective nature of the study, the Ethics Committee concluded that no written informed consent was required from the patients.

### Patients and tissue samples

Archived formalin-fixed paraffin-embedded tissue blocks were obtained at the Department of Pathology of the Clementino Fraga Filho University Hospital, Rio de Janeiro, Brazil. Liver samples from 20 patients with HCC, four with cirrhosis without HCC, and 12 with chronic hepatitis (non-cirrhotic) were analyzed (Table 1). Additionally, the surrounding cirrhotic tissue was analyzed for five HCC patients (total = 41 samples). Histological analysis revealed features compatible with chronic hepatitis (inflammation with or without fibrosis)

**Table 1. Clinicopathological characteristics of the patients.**

	HCC (n = 20)	Cirrhosis only <sup>a</sup> (n = 4)	Chronic hepatitis only <sup>b</sup> (n = 12)	Total (n = 36)
<b>Age (years)</b>				
<40	3 (15%)	0	1 (8%)	4 (11%)
40–60	7 (35%)	1 (25%)	5 (42%)	13 (36%)
≥60	10 (50%)	3 (75%)	4 (33%)	17 (47%)
ND	0	0	2 (17%)	2 (6%)
<b>Gender</b>				
Male	16 (80%)	4 (100%)	6 (50%)	26 (72%)
Female	4 (20%)	0	4 (33%)	8 (22%)
ND	0	0	2 (17%)	2 (6%)
<b>Viral status<sup>c</sup></b>				
HBV	5 (25%)	0	2 (17%)	7 (19%)
HCV	10 (50%)	1 (25%)	9 (75%)	20 (56%)
No virus	2 (10%)	3 (75%)	1 (8%)	6 (17%)
ND	3 (15%)	0	0	3 (8%)
<b>Tumor differentiation</b>				
Well	0	NA	NA	NA
Moderately	14 (70%)			
Poorly	6 (30%)			
<b>Tumor size</b>				
<5 cm	8 (40%)	NA	NA	NA
>5 cm	10 (50%)			
ND	2 (10%)			
<b>Tissue samples (n = 41)</b>				
HCC	20	0	0	20
Cirrhotic	5	4	0	9
Non-cirrhotic	0	0	12	12

<sup>a</sup>Without HCC;

<sup>b</sup>Without HCC or cirrhosis;

<sup>c</sup>HBV, HBsAg positive; HCV, anti-HCV and HCV-RNA positive; No virus, HBsAg, anti-HCV and HCV-RNA negative; NA, not applicable; ND, not determined.

doi:10.1371/journal.pone.0153796.t001

in all non-cirrhotic liver tissues. HCC and cirrhotic tissue samples were obtained from liver explants or surgical resection, while tissues from patients with chronic hepatitis were obtained by percutaneous liver biopsy. All HCC patients included in this study had cirrhotic livers.

Demographic and clinicopathological data were obtained from medical records in order to evaluate the association of age, gender, histology, and HBV and HCV infections with DNA methylation. The viral status of the patients was established as follows: HBV infection, HBsAg positive; HCV infection, anti-HCV and HCV-RNA positive; no virus, HBsAg, anti-HCV and HCV-RNA negative.

The mean age of the patients was 57 (range 19–78) years, with 47% of them aged ≥ 60 years. Twenty-six (72%) patients were men. HCV infection was the main etiological factor of liver disease (56% of the cases), followed by HBV (19%). Fourteen (70%) HCC patients had a moderately differentiated tumor, and ten (50%) had a tumor size >5 cm (Table 1).



### DNA isolation and sodium bisulfite conversion

Five sections of 10  $\mu\text{m}$  were cut from each block, deparaffinized in 1 mL of absolute xylene, and rehydrated in 1 mL of 96% ethanol. Genomic DNA extraction was carried out by using the QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (Qiagen, Valencia, CA), according to the manufacturer's protocol. Approximately 500 ng of genomic DNA was subjected to bisulfite modification treatment to convert all unmethylated cytosines to thymines. This was performed by using the EZ DNA Methylation-Lightning Kit (Zymo Research, Irvine, CA). The modified DNA was stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  for further analysis.

### DNA methylation analysis by pyrosequencing

DNA methylation levels of *RASSF1A* and *DOK1* promoter regions were measured by the highly sensitive pyrosequencing technology (PyroMark Q96 ID, Qiagen) at multiple CpG sites. Bisulfite-treated DNA was PCR amplified in a volume of 50  $\mu\text{L}$  reaction, which contained 1U of Platinum Taq DNA Polymerase, High Fidelity (Invitrogen, Carlsbad, CA) and 0.2  $\mu\text{M}$  of each oligonucleotide primer [10], under the following conditions:  $94^{\circ}\text{C}$  for 30 sec; 35 cycles at  $94^{\circ}\text{C}$  for 30 sec,  $55^{\circ}\text{C}$  for 30 sec, and  $68^{\circ}\text{C}$  for 1 min, followed by a final elongation step at  $68^{\circ}\text{C}$  for 7 min. Ten microliters of PCR product was analyzed on agarose gel by electrophoresis. The remaining 40  $\mu\text{L}$  of the biotinylated PCR product was captured on streptavidin-coated beads (GE Healthcare, Milwaukee, WI) and the pyrosequencing reaction was set up using the PyroMark Gold Q96 kit (Qiagen), according to the manufacturer's instructions. The set of sequencing primers has been previously designed [10]. The percentages of methylation were measured at six and five CpG sites in the *RASSF1A* and *DOK1* promoters, respectively, and expressed as the means of all CpGs analyzed at a given gene. To assess DNA hypermethylation frequencies in HCC and cirrhotic samples, cut-off values for *RASSF1A* and *DOK1* were obtained from the quantile representing the upper 95% of methylation levels in non-cirrhotic samples, as previously defined [10]. Therefore, the frequencies of DNA hypermethylation were represented as the percentage of HCC and cirrhotic samples with methylation levels above the cut-off value for each gene.

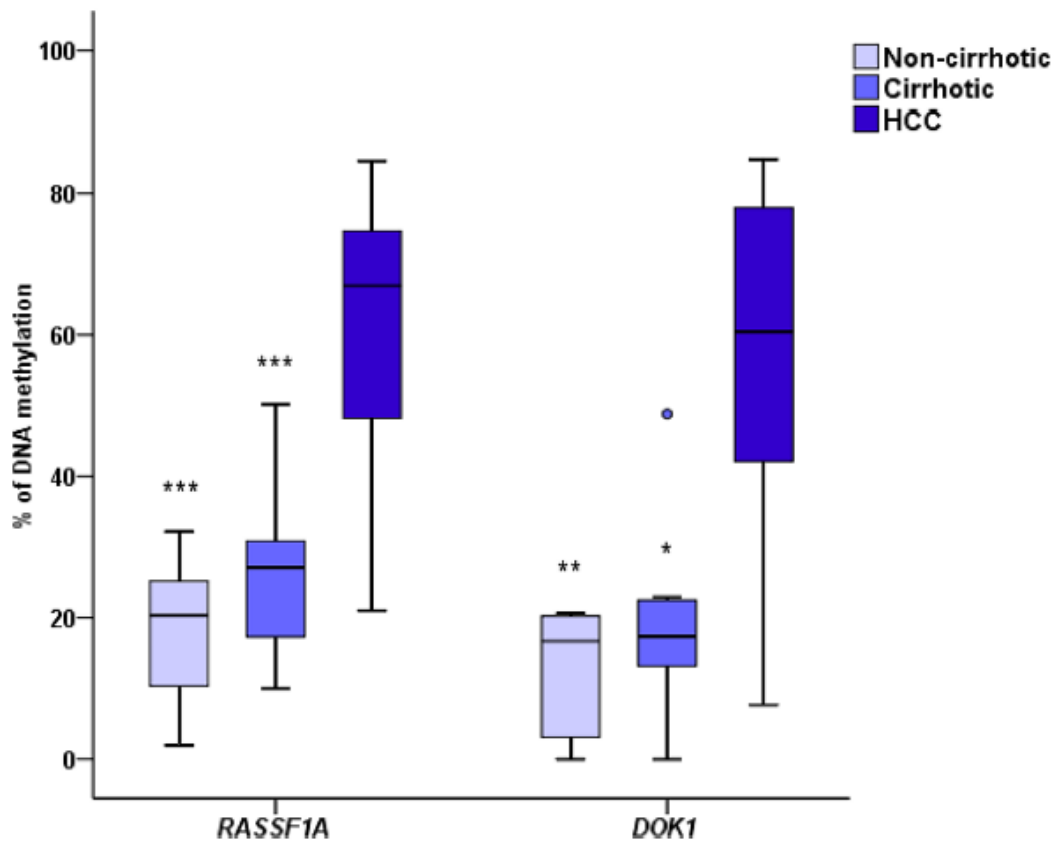
### Statistical analysis

All statistical analyses were performed using the SPSS 20.0 software (IBM, Armonk, NY). The Kruskal-Wallis test (or Mann-Whitney U test, when appropriate) was used to compare methylation levels in HCC, cirrhotic, and non-cirrhotic liver samples, as well as to test associations between methylation levels and clinicopathological characteristics. Type 1 error was adjusted for multiple comparisons. Differences were considered statistically significant for  $p$  values less than 0.05.

## Results

### DNA methylation levels in non-cirrhotic, cirrhotic and HCC tissue samples

Pyrosequencing analysis was successfully performed in 41 (20 HCC, 9 cirrhotic and 12 non-cirrhotic) and 31 (17 HCC, 7 cirrhotic and 7 non-cirrhotic) tissue samples for *RASSF1A* and *DOK1*, respectively. The results of the quantitative analysis of DNA methylation, expressed as the mean percentage of all CpGs analyzed at a given gene, are shown in Fig 1. Overall, methylation levels were lower in non-cirrhotic, moderate in cirrhotic, and higher in HCC tissues for both genes. Mean rates of methylation in *RASSF1A* and *DOK1* were as follows: 16.2% and 12.0% in non-cirrhotic, 26.1% and 19.6% in cirrhotic, and 59.1% and 56.0% in HCC tissues,



**Fig 1.** Boxplot showing *RASSF1A* and *DOK1* promoter methylation levels in non-cirrhotic, cirrhotic, and HCC tissues. Methylation levels were measured by pyrosequencing at different CpG sites and expressed as the mean percentage of all CpGs analyzed at a given gene. The statistical significance for DNA methylation level in non-cirrhotic and cirrhotic tissues was calculated by comparison to HCC samples.

doi:10.1371/journal.pone.0153796.g001

respectively (Table 2). No statistical difference in methylation levels was detected between cirrhotic and non-cirrhotic tissues (*RASSF1A*,  $p = 0.165$ ; *DOK1*,  $p = 1.000$ ). However, we observed a highly significant difference of methylation levels between HCC and non-HCC tissues for both genes (Table 2). Methylation levels in cirrhotic tissues from patients without HCC and

**Table 2.** Correlation between tissue type and DNA methylation levels.

Gene	Non-cirrhotic	Cirrhotic	HCC	p values		
				Cirrhotic x Non-cirrhotic	HCC x Non-cirrhotic	HCC x Cirrhotic
<i>RASSF1A</i> , mean ± SD (%)	16.2 ± 9.4	26.1 ± 11.7	59.1 ± 19.3	0.165	< 0.001	< 0.001
<i>DOK1</i> , mean ± SD (%)	12.0 ± 9.6	19.6 ± 15.0	56.0 ± 23.3	1.000	0.003	0.012

SD, standard deviation

doi:10.1371/journal.pone.0153796.t002

adjacent cirrhotic tissues from patients with HCC were also compared. The differences between these two groups were not statistically significant (*RASSF1A*,  $p = 0.652$ ; *DOK1*,  $p = 0.231$ ). A correlation of *DOK1* methylation levels was observed between HCC- and cirrhotic paired samples, with HCC/cirrhotic paired tissues displaying simultaneously the highest or the lowest levels of methylation. However, such a correlation was not observed for *RASSF1A* methylation (data not shown).

### DNA methylation status and clinicopathological parameters

The associations between clinicopathological characteristics (age, gender, and histology) and risk factors (HBV and HCV infections) on one hand, and methylation levels in HCC tissues on the other hand, are shown in [Table 3](#). Overall, *RASSF1A* and *DOK1* exhibited similar methylation patterns according to the parameters analyzed. We found a statistically significant difference in *DOK1* methylation levels from an age group to another ( $p = 0.036$ ), with higher methylation levels in the group of younger (<40 years) patients. In addition, significantly higher levels ( $p = 0.005$ ) of *DOK1* methylation were observed in moderately differentiated than in poorly differentiated HCCs. Although *RASSF1A* and *DOK1* methylation levels were higher in women and in HBV positive tumors, no statistical difference could be observed. Also, no association was found between tumor size and methylation levels ([Table 3](#)).

### DNA hypermethylation frequencies in cirrhotic and HCC tissues

Analysis of the DNA hypermethylation frequencies revealed that *RASSF1A* and *DOK1* genes were hypermethylated in the vast majority (15/17, 88%) of the HCC tissues ([Table 4](#)). Moreover, the simultaneous hypermethylation of both genes was detected in 14/17 (82%) HCC tissues. However, lower frequencies of hypermethylation were observed among cirrhotic tissues (2/7, 29% in *RASSF1A*; 3/7, 43% *DOK1*; and 2/7, 29% both genes). With respect to viral status, all HBV positive HCCs showed hypermethylation in *DOK1*. The concomitant

**Table 3. DNA methylation levels in HCC samples stratified by clinicopathological characteristics and viral status.**

	<i>RASSF1A</i>		<i>DOK1</i>	
	mean (%)	<i>p</i> value	mean (%)	<i>p</i> value
<b>Age</b>				
<40	61.7	0.945	74.8	0.036
40–60	57.1		36.9	
≥60	59.7		60.3	
<b>Gender</b>				
Men	56.9	0.395	51.2	0.059
Women	68.0		78.1	
<b>Viral status</b>				
HBV	58.5	0.792	74.7	0.227
HCV	56.2		53.7	
No virus	54.9		42.8	
<b>Tumor differentiation</b>				
Moderately	62.4	0.284	68.0	0.005
Poorly	51.4		34.0	
<b>Tumor size</b>				
<5 cm	55.4	0.374	56.2	0.540
>5 cm	61.9		57.9	

doi:10.1371/journal.pone.0153796.t003



**Table 4. Frequency of DNA hypermethylation according to tissue type and viral status.**

Gene	HCC <sup>a</sup>				Cirrhotic <sup>a</sup>				Cut-off
	AI <sup>b,c</sup> (n = 17)	HBV (n = 4)	HCV (n = 9)	No virus (n = 2)	All <sup>b</sup> (n = 7)	HBV (n = 0)	HCV (n = 3)	No virus (n = 4)	
RASSF1A	15 (88%)	3 (75%)	8 (89%)	2 (100%)	2 (29%)	NA	2 (67%)	0	32.15%
DOK1	15 (88%)	4 (100%)	8 (89%)	1 (50%)	3 (43%)	NA	2 (67%)	1 (25%)	20.62%
Both	14 (82%)	3 (75%)	8 (89%)	1 (50%)	2 (29%)	NA	2 (67%)	0	-

<sup>a</sup>Samples with methylation levels above the quantile representing the upper 95% of methylation in non-cirrhotic samples.

<sup>b</sup>Only samples having both RASSF1A and DOK1 methylation levels were included in the analysis.

<sup>c</sup>Viral status is not available for two samples.

NA, not applicable.

doi:10.1371/journal.pone.0153796.t004

hypermethylation of these genes was more frequently observed in HBV (3/4, 75%) and HCV (8/9, 89%) positive tumors than HBV and HCV negative ones (1/2, 50%). Similarly, concurrent hypermethylation was detected in 2/3 (67%) HCV positive cirrhotic tissues, but in none (0/4) of the HCV negative ones (Table 4). Frequencies of hypermethylation were similar between cirrhotic tissues from patients without HCC and adjacent cirrhotic tissues from patients with HCC (data not shown).

### Discussion

In the present study, we have analyzed quantitatively the methylation profile of RASSF1A and DOK1 promoter genes in non-cirrhotic and cirrhotic livers without HCC, as well as in HCC and cirrhotic paired samples. Both genes have tumor suppressor properties and are involved in several key cellular processes. RASSF1A is implicated in the Ras signaling pathway, which plays a pivotal role in cell cycle control, microtubule stabilization, cellular adhesion, cell motility, and apoptosis [17]. DOK1 is expressed in B- and T cells as well as in myeloid cells (macrophages and neutrophils), and is involved in a wide range of immunoreceptor signaling pathways [18]. Herein, RASSF1A and DOK1 methylation levels showed a gradual increase according to the progression of the disease, with significantly higher levels in tumor tissues. Additionally, we observed very high rates of RASSF1A (88%) and DOK1 (88%) hypermethylation in HCC samples, with a concomitant hypermethylation of 82%. Previous studies using different methodologies, as well as different sets of CpGs, have also found high (76–100%) frequencies of RASSF1A hypermethylation in HCC [10, 19–21]. On the other hand, few data are available on the methylation profile of DOK1 in liver cancer. One study reported the occurrence of hypermethylation in the majority (62%) of the HCC tissues [10]. Our results thus reinforce the hypothesis of an association between epigenetic silencing of these key cellular genes and hepatocarcinogenesis. Of note, we found concomitant RASSF1A and DOK1 hypermethylation in almost 30% of the cirrhotic tissues analyzed. Aberrant methylation was found not only in cirrhotic samples of patients with HCC, but also in those without HCC, suggesting that the increase of methylation levels in a subset of cirrhotic tissues due to the presence of some tumor cells is unlikely. These findings are in keeping with the notion that aberrant methylation in non-transformed hepatocytes may precede their oncogenic transformation and promote the development of liver cancer.

The potential influence of ethnicity in DNA methylation has not been extensively studied. However, previous reports have described significant differences in global genomic DNA methylation according to ethnicity [22, 23]. It has been suggested that some genetic polymorphisms, such as those of folate metabolizing enzymes, may contribute to the ethnic differences in DNA

methylation [24]. Lambert et al. [10] have shown an association between methylation levels in several genes and geographical area, with HCCs exhibiting *RASSF1A* and *DOK1* methylation levels lower in Thailand than in France. Our study relied on a set of CpGs analyzed previously, and measured DNA methylation levels by the quantitative pyrosequencing methodology [10]. Interestingly, we observed higher *RASSF1A* and *DOK1* methylation levels in Brazilian HCC samples as compared to those from Thailand (2.7 and 3.1 fold) and France (1.9 and 1.8 fold), respectively. These results corroborate the notion that genetic and/or environmental factors may contribute to the ethnic/geographical differences of DNA methylation among HCC cases.

Several studies have investigated potential associations between risk factors (HBV and HCV infections) or clinical features (age, gender, and histology) and DNA methylation in HCC [9, 10, 19–21, 25]. Promoter-associated CpG island methylation has been considered one of the most prominent molecular changes that can be observed in aging [26]. Noteworthy, a previous study has shown that all patients over 40 years had the *RASSF1A* promoter methylated in non-neoplastic cells of the liver [27]. However, we observed higher levels of *RASSF1A* and *DOK1* methylation in HCC tissues of the younger group (<40 years), with a statistically significant difference between *DOK1* methylation and age ( $p = 0.036$ ). Herein, all HCC patients under 40 years of age were chronically infected with HBV, and one may suppose that these patients were infected a long time ago, probably through vertical transmission. Several studies have shown that the HBV X protein (HBx) increases total DNA methyltransferase (DNMT) activities by upregulation of DNMTs, promoting hypermethylation of specific tumor suppressor genes [28]. Therefore, the viral status of the youngest patients may have contributed to the higher methylation levels observed in our study. Nevertheless, previous studies have also found higher levels of *RASSF1A* and *DOK1* methylation in HCC samples in the younger groups, although the differences were not statistically significant [9, 10]. In addition, significantly higher levels of *DOK1* methylation in cirrhotic tissues in the age group <40 years have been previously reported [10]. Finally, we found that levels of *RASSF1A* and *DOK1* methylation were higher in moderately differentiated- than in poorly differentiated HCCs, with a significant difference in *DOK1* ( $p = 0.005$ ). None of the HCC patients included in our study had well differentiated tumors, so that a better comparison between DNA methylation and tumor grade of differentiation could not be achieved. In a previous work, *RASSF1A* methylation was almost equal regardless of HCC differentiation [9], whereas there are no reports about *DOK1* methylation and HCC grade of differentiation to date.

In conclusion, this is the first report on the epigenetic factors associated to HCC in Brazil. Our results confirm that hypermethylation of *RASSF1A* and *DOK1* contributes to hepatocarcinogenesis and is an early event in cancer development, likely associated to clinical characteristics as well as major risk factors. Therefore, *RASSF1A* and *DOK1* aberrant methylation may be a valuable biomarker for early diagnosis of HCC and an attractive molecular target for epigenetic-based therapy. Non-invasive approaches, such as those measuring hypermethylation of the circulating cell-free DNA in serum/plasma, should be encouraged.

### Author Contributions

Conceived and designed the experiments: NMA VP. Performed the experiments: ASR OCA. Analyzed the data: ASR NMA OCA VP. Contributed reagents/materials/analysis tools: AF CAVN CN VP. Wrote the paper: CAVN CN NMA OCA.

### References

1. WHO/IARC. GLOBOCAN 2012: estimated cancer incidence mortality and prevalence worldwide in 2012. 2015. Available: [http://globocan.iarc.fr/Page/fact\\_sheets\\_cancer.aspx](http://globocan.iarc.fr/Page/fact_sheets_cancer.aspx).

2. Perz JF, Armstrong GL, Farrington LA, Hutin YJ, Bell BP. The contributions of hepatitis B virus and hepatitis C virus infections to cirrhosis and primary liver cancer worldwide. *J Hepatol.* 2006; 45:529–38. doi: [10.1016/j.jhep.2006.05.013](https://doi.org/10.1016/j.jhep.2006.05.013) PMID: [16879891](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16879891/).
3. Ascha MS, Hanouneh IA, Lopez R, Tamimi TA, Feldstein AF, Zein NN. The incidence and risk factors of hepatocellular carcinoma in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology.* 2010; 51:1972–8. doi: [10.1002/hep.23527](https://doi.org/10.1002/hep.23527) PMID: [20209604](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20209604/).
4. El-Serag HB. Hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med.* 2011; 365:1118–27. doi: [10.1056/NEJMra1001683](https://doi.org/10.1056/NEJMra1001683) PMID: [21992124](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21992124/).
5. Llovet JM, Burroughs A, Bruix J. Hepatocellular carcinoma. *Lancet.* 2003; 362:1907–17. doi: [10.1016/S0140-6736\(03\)14964-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(03)14964-1) PMID: [14667750](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14667750/).
6. Colombo M, Sangiovanni A. Treatment of hepatocellular carcinoma: beyond international guidelines. *Liver Int.* 2015; 35:129–38. doi: [10.1111/liv.12713](https://doi.org/10.1111/liv.12713) PMID: [25529098](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25529098/).
7. Herceg Z. Epigenetics and cancer: towards an evaluation of the impact of environmental and dietary factors. *Mutagenesis.* 2007; 22:91–103. doi: [10.1093/mutage/ql068](https://doi.org/10.1093/mutage/ql068) PMID: [17284773](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17284773/).
8. Tischoff I, Tannapfe A. DNA methylation in hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol.* 2008; 14:1741–8. PMID: [18350605](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18350605/).
9. Gao W, Kondo Y, Shen L, Shimizu Y, Sano T, Yamao K, et al. Variable DNA methylation patterns associated with progression of disease in hepatocellular carcinomas. *Carcinogenesis.* 2008; 29:1901–10. doi: [10.1093/carcin/bgn170](https://doi.org/10.1093/carcin/bgn170) PMID: [18632756](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18632756/).
10. Lambert MP, Pallwal A, Valsiere T, Chemin I, Zoulim F, Tommasino M, et al. Aberrant DNA methylation distinguishes hepatocellular carcinoma associated with HBV and HCV infection and alcohol intake. *J Hepatol.* 2011; 54:705–15. doi: [10.1016/j.jhep.2010.07.027](https://doi.org/10.1016/j.jhep.2010.07.027) PMID: [21146512](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21146512/).
11. Um TH, Kim H, Oh BK, Kim MS, Kim KS, Jung G, et al. Aberrant CpG island hypermethylation in dysplastic nodules and early HCC of hepatitis B virus-related human multistep hepatocarcinogenesis. *J Hepatol.* 2011; 54:939–47. doi: [10.1016/j.jhep.2010.08.021](https://doi.org/10.1016/j.jhep.2010.08.021) PMID: [21145824](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21145824/).
12. Donniger H, Vos MD, Clark GJ. The RASSF1A tumor suppressor. *J Cell Sci.* 2007; 120:3163–72. doi: [10.1242/jcs.010389](https://doi.org/10.1242/jcs.010389) PMID: [17878233](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17878233/).
13. Saulnier A, Vaissiere T, Yue J, Siouda M, Malfroy M, Accardi R, et al. Inactivation of the putative suppressor gene DOK1 by promoter hypermethylation in primary human cancers. *Int J Cancer.* 2012; 130:2484–94. doi: [10.1002/ijc.26299](https://doi.org/10.1002/ijc.26299) PMID: [21796618](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21796618/).
14. Zhao ZH, Fan YC, Yang Y, Wang K. Association between Ras association domain family 1A promoter methylation and hepatocellular carcinoma: a meta-analysis. *World J Gastroenterol.* 2013; 19:7189–96. doi: [10.3748/wjg.v19.i41.7189](https://doi.org/10.3748/wjg.v19.i41.7189) PMID: [24222965](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24222965/).
15. INCA. Câncer de fígado. Instituto Nacional do Câncer, Ministério da Saúde. 2015. Available: [http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/fo\\_mefigado](http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/fo_mefigado).
16. Camilho FJ, Kikuchi L, Branco F, Goncalves CS, Mattos AA. Brazilian HCCSG. Clinical and epidemiological aspects of hepatocellular carcinoma in Brazil. *Clinics.* 2010; 65:1285–90. PMID: [21340216](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21340216/).
17. Agathangelou A, Cooper WN, Lattif F. Role of the Ras-association domain family 1 tumor suppressor gene in human cancers. *Cancer Res.* 2005; 65:3497–508. doi: [10.1158/0008-5472.CAN-04-4088](https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-4088) PMID: [15867337](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15867337/).
18. Mashima R, Hishida Y, Tezuka T, Yamanashi Y. The roles of Dok family adapters in immunoreceptor signaling. *Immunol Rev.* 2009; 232:273–85. doi: [10.1111/j.1600-065X.2009.00844.x](https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2009.00844.x) PMID: [19909370](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19909370/).
19. Di Gioia S, Bianchi P, Destro A, Grizzi F, Malesci A, Laghi L, et al. Quantitative evaluation of RASSF1A methylation in the non-lesional, regenerative and neoplastic liver. *BMC cancer.* 2006; 6:89. doi: [10.1186/1471-2407-6-89](https://doi.org/10.1186/1471-2407-6-89) PMID: [16606445](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16606445/).
20. Zhang X, Li HM, Liu Z, Zhou G, Zhang Q, Zhang T, et al. Loss of heterozygosity and methylation of multiple tumor suppressor genes on chromosome 3 in hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol.* 2013; 48:132–43. doi: [10.1007/s00535-012-0621-0](https://doi.org/10.1007/s00535-012-0621-0) PMID: [22766745](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22766745/).
21. Zhang YJ, Ahsan H, Chen Y, Lunn RM, Wang LY, Chen SY, et al. High frequency of promoter hypermethylation of RASSF1A and p16 and its relationship to aflatoxin B1-DNA adduct levels in human hepatocellular carcinoma. *Mol Carcinog.* 2002; 35:85–92. doi: [10.1002/mc.10076](https://doi.org/10.1002/mc.10076) PMID: [12325038](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12325038/).
22. Hsiung DT, Marsit CJ, Houseman EA, Eddy K, Furniss CS, McClean MD, et al. Global DNA methylation level in whole blood as a biomarker in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2007; 16:108–14. doi: [10.1158/1055-9965.EPI-06-0638](https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-06-0638) PMID: [17220338](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17220338/).
23. Zhang FF, Cardarelli R, Carroll J, Fulda KG, Kaur M, Gonzalez K, et al. Significant differences in global genomic DNA methylation by gender and race/ethnicity in peripheral blood. *Epigenetics.* 2011; 6:623–9. PMID: [21739720](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21739720/).

24. de Vogel S, Wouters KA, Gottschalk RW, van Schooten FJ, de Goelij AF, de Bruine AP, et al. Genetic variants of methyl metabolizing enzymes and epigenetic regulators: associations with promoter CpG island hypermethylation in colorectal cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2009; 18:3086–96. doi: [10.1158/1055-9965.EPI-09-0289](https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-09-0289) PMID: [19843671](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19843671/).
25. Hernandez-Vargas H, Lambert MP, Le Calvez-Kelm F, Gouysse G, McKay-Chopin S, Tavtigian SV, et al. Hepatocellular carcinoma displays distinct DNA methylation signatures with potential as clinical predictors. *PLoS one.* 2010; 5(3):e9749. doi: [10.1371/journal.pone.0009749](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009749) PMID: [20305825](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20305825/).
26. Issa JP. Aging, DNA methylation and cancer. *Crit Rev Oncol Hematol.* 1999; 32:31–43. PMID: [10586353](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10586353/).
27. Waki T, Tamura G, Sato M, Motoyama T. Age-related methylation of tumor suppressor and tumor-related genes: an analysis of autopsy samples. *Oncogene.* 2003; 22:4128–33. doi: [10.1038/sj.onc.1206651](https://doi.org/10.1038/sj.onc.1206651) PMID: [12821947](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12821947/).
28. Park IY, Sohn BH, Yu E, Suh DJ, Chung YH, Lee JH, et al. Aberrant epigenetic modifications in hepatocarcinogenesis induced by hepatitis B virus X protein. *Gastroenterology.* 2007; 132:1476–94. doi: [10.1053/j.gastro.2007.01.034](https://doi.org/10.1053/j.gastro.2007.01.034) PMID: [17408664](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17408664/).

## Apêndice D - Manuscrito em preparação

### **Genetic polymorphism in GSTT1, GSTM1, TP53 and MDM2 genes associated with liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma development in chronic hepatitis C Brazilian patients**

Oscar C. Araujo<sup>1</sup>, Agatha S. Rosa<sup>1</sup>, Christian Niel<sup>1</sup>, Cristiane A. Villela-Nogueira<sup>2</sup>, Natalia M. Araujo<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Molecular Virology, Oswaldo Cruz Institute, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brazil; <sup>2</sup>Hepatology Division, Clementino Fraga Filho University Hospital, Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil.

\*Corresponding author:

Natalia M. Araujo, Ph.D.

Address: Laboratório de Virologia Molecular, Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Av. Brasil 4365, 21040-360 Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

E-mail: [nmaraujo@ioc.fiocruz.br](mailto:nmaraujo@ioc.fiocruz.br)

#### **Abstract**

*Development of hepatitis C virus (HCV)-induced hepatocellular carcinoma (HCC) is a multistep process influenced by genetic factors. The aim of this study was to determine whether polymorphisms in GSTT1, GSTM1 (null genotypes), TP53 (Pro72Arg), and MDM2 (T309G) genes are associated with the progression of liver disease in Brazilian patients infected with HCV. A total of 190 patients infected with*

*HCV (60 with HCC, 83 with cirrhosis, and 47 with chronic hepatitis) were enrolled in this study. Polymorphism were genotyped by multiplex PCR or PCR followed by restriction fragment length polymorphism (RFLP). GSTT1 null genotype was more frequent among patients with HCC (21.7%) or cirrhosis (20.5%) than chronic hepatitis (6.4%) and was associated with cirrhosis ( $p = 0.032$ ). We also observed that the occurrence of the simultaneous genotypic profile GSTT1 null and TP53 Pro/Pro, the simultaneous genotypic profile GSTM1 null and TP53 Arg/Arg, and the simultaneous genotypic profile GSTM1 null, MDM2 T/T and TP53 Arg/Arg in hepatitis C chronic patients, are associated with HCC development ( $p < 0,050$ ). In conclusion, a statistically significant association was found between polymorphism analyzed and severity of liver disease (cirrhosis with or without HCC). Genetic factors as polymorphism may be predictors of disease progression and therefore useful for the early detection of HCC in HCV chronic patients.*



## Apêndice E - Produção complementar

*Virus Res.* 2017 Oct 15;242:166-172. doi: [10.1016/j.virusres.2017.09.022](https://doi.org/10.1016/j.virusres.2017.09.022). Epub 2017 Sep 29.

### **Prevalence of occult hepatitis B virus infection and Torque teno virus infection and their association with hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis C patients.**

Rosa AS<sup>1</sup>, Araujo OC<sup>1</sup>, Savassi-Ribas F<sup>2</sup>, Fernandes CA<sup>3</sup>, Coelho HS<sup>4</sup>, Niel C<sup>1</sup>, Villela-Noqueira CA<sup>4</sup>, Araujo NM<sup>5</sup>.

[⊕ Author information](#)

[⊕ ReadCube](#)

#### **Abstract**

**BACKGROUND:** The role of occult hepatitis B virus (HBV) infection and Torque teno virus (TTV) infection in the development of hepatocellular carcinoma (HCC) in chronic hepatitis C patients is still uncertain.

**AIM:** The aim of the present study was to investigate the prevalence and significance of OBI and TTV infection, and to examine the genetic diversity of these viruses, in chronic hepatitis C patients with and without HCC.

**METHODS:** Sera from 151 hepatitis C virus (HCV)-infected patients (49 patients with HCC and 102 without HCC) negative for HBV surface antigen (HBsAg) were tested for the presence of OBI and TTV infection by semi-nested and group-specific multiplex PCR assays, respectively. Nucleotide sequencing of HBV S region was further performed.

**RESULTS:** OBI and TTV infection were detected in 5 (3.3%) and 68 (45%) patients, respectively. HBV isolates were classified into genotypes A (4/5, 80%) and D (1/5, 20%), and no HBsAg escape mutation was observed. TTV phylogenetic group 3 was the most prevalent among both HCC and non-HCC patients. OBI and TTV infection were significantly more frequent in patients with HCC than patients without HCC ( $p=0.003$ , and  $p=0.009$ , respectively). Moreover, TTV infection was associated with HCC (OR=2.23, 95%CI=1.04-4.80,  $p=0.040$ ), independently of liver cirrhosis.

**CONCLUSIONS:** A low prevalence of OBI was observed in patients with HCV-related chronic liver disease, and TTV infection was an independent factor associated with the occurrence of HCC. Whether TTV influences the progression of liver disease in chronic hepatitis C patients remains to be elucidated.

Copyright © 2017 Elsevier B.V. All rights reserved.

**KEYWORDS:** Hepatitis C; Hepatocarcinogenesis; Hepatocellular carcinoma; Occult HBV; TTV

PMID: [28966070](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28966070/) DOI: [10.1016/j.virusres.2017.09.022](https://doi.org/10.1016/j.virusres.2017.09.022)