

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE  
PORTO ALEGRE – UFCSPA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA  
SAÚDE**

**Vanessa Dido Baldissera**

**Determinação de polimorfismos dos genes  
*ESR1* e *ESR2* em pacientes com Carcinoma  
Hepatocelular.**

**UFCSPA**  
Universidade Federal de Ciências da Saúde  
de Porto Alegre

Porto Alegre  
2016

**Vanessa Dido Baldissera**

**Determinação de polimorfismos dos genes  
*ESR1* e *ESR2* em pacientes com Carcinoma  
Hepatocelular.**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre como requisito para a obtenção do grau de Doutor

Orientadora: Profa. Dra. Márcia Giovenardi  
Co-orientadora: Profa. Dra. Silvana de Almeida  
Co-orientadora: Profa. Dra. Marilene Porawski Garrido

**Porto Alegre  
2016**

#### Catálogo na Publicação

Baldissera, Vanessa Dido

Determinação de polimorfismos dos genes ESR1 e ESR2 em pacientes com Carcinoma Hepatocelular / Vanessa Dido Baldissera. -- 2016.

91 f. : il., tab. ; 30 cm.

Tese (doutorado) -- Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, 2016.

Orientador(a): Márcia Giovenardi ; coorientador(a): Silvana Almeida, Marilene Porawski Garrido.

1. Carcinoma Hepatocelular. 2. Estrogênio. 3. Polimorfismo. 4. Gene ESR1. 5. Gene ESR2. I. Título.

Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da UFCSPA com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

## **DEDICATÓRIA**

Ao meu irmão, o meu amor para sempre.

## AGRADECIMENTOS

A conclusão deste trabalho tornou-se possível com a colaboração de muitas pessoas, que de alguma forma contribuíram em diferentes etapas deste estudo. Destas, manifesto um agradecimento especial:

A Deus, por tudo.

A professora Dra. Márcia Giovenardi, pela proposta de trabalho, orientação e confiança depositada em mim, o meu sincero respeito e agradecimento.

A professora Dra. Silvana de Almeida, co-orientadora, pela disposição, apoio, críticas e sugestões que muito contribuíram para a realização desta tese.

A professora Dra. Marilene Porawski Garrido, co-orientadora, pelo exemplo de profissionalismo, dedicação à pesquisa e auxílio com o desenvolvimento deste estudo.

Ao Dr. Thadeu Czerski, pelo apoio a pesquisa, seleção dos pacientes e coleta das amostras.

As técnicas do laboratório de Patologia, Terezinha e Rosalva, pela ajuda constante.

As técnicas do laboratório de Biologia Molecular, Magda e Grasiela, pelo auxílio nas atividades laboratoriais.

A minha colega Andressa de Freitas Alves, pela ajuda incansável.

A todos os colegas e amigos, que de alguma forma me ajudaram e contribuíram para o sucesso desta conquista.

Aos Professores da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA) pelos conhecimentos e vivências transmitidos.

A UFCSPA, pelo espaço de aprendizagem e local para a realização desta pesquisa.

Ao Complexo Hospitalar da Santa Casa de Porto Alegre, pelos prontuários utilizados na realização dessa pesquisa.

Ao meu marido, pelo tempo dedicado.

A minha família, por tudo.

## RESUMO

**INTRODUÇÃO:** O carcinoma hepatocelular (CHC) é a neoplasia hepática que representa o sexto tumor maligno mais frequente no mundo. A variabilidade genética tem sido discutida como fator de risco para o desenvolvimento do CHC, sendo os polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) os mais estudados. Diversos estudos destacam o efeito dos hormônios sexuais na função hepática, tendo-se em vista a hipótese de que os mesmos possuem um papel na patogênese da neoplasia hepática. Assim, é importante investigar a influência de polimorfismos dos receptores de estrogênio e o risco para o CHC. **OBJETIVOS:** Avaliar a associação de três SNPs do gene *ESR1* e três SNPs do gene *ESR2* com a suscetibilidade ao CHC em conjunto com fatores etiológicos já estabelecidos; e analisar a expressão do receptor de estrogênio (ER) por imuno-histoquímica em pacientes com e sem CHC. **MÉTODOS:** Foram coletadas amostras de espécimes hepáticos armazenados em blocos de parafina de 92 pacientes com diagnóstico de CHC denominados casos e 103 pacientes controles que foram submetidos à biópsia hepática. Foi utilizada a extração de DNA a partir de espécimes hepáticos e a análise dos SNPs foi realizada por discriminação alélica utilizando sondas de hidrólise (TaqMan®) em termociclador em tempo real. A comparação das frequências genótípicas entre os grupos caso e controle foi realizada pelo teste de Qui-quadrado de Pearson. Para a análise multivariada foi utilizada a regressão logística e as análises foram ajustadas utilizando como covariáveis sexo e a infecção pelo vírus da hepatite C (VHC). A comparação da expressão do ER entre casos e controles foi realizada pelo teste de Qui-quadrado de Pearson. **RESULTADOS E DISCUSSÃO:** O sexo masculino foi o mais prevalente, representando 70,7% dos pacientes no grupo caso e 70,9% no grupo controle. A média de idade foi de 56,7±9,0 anos no grupo caso e 50,9±11,8 anos no grupo controle ( $p<0,001$ ). A presença de cirrose e VHC foi mais frequente no grupo caso do que no controle. Para o gene *ESR1*, o genótipo G/G do rs3020432, portadores do alelo T do rs1643821 e portadores do alelo do C do rs2234693 foram mais frequentes no grupo caso quando comparado ao controle ( $p<0,001$ ,  $p=0,001$  e  $p=0,002$ , respectivamente). A análise multivariada revelou um risco aumentado para o CHC do genótipo G/G do rs3020432 (OR = 4,43; 95% CI 1,91-10,26;  $p=0,001$ ), da presença do alelo T do rs1643821 (OR=2,69; 95% CI 1,18-6,14;  $p=0,018$ ) e da presença do alelo C do rs2234693 (OR=2,41; 95% CI 1,17-4,94;  $p=0,017$ ), controlando para sexo e presença de VHC; neste modelo, a presença de VHC identificou um aumento de risco de 4,99 vezes maior de desenvolver o CHC (OR=4,99; 95% CI 2,50-10,00;  $p<0,001$ ). Para o gene *ESR2*, os genótipos A/A do rs4986938, C/C do

rs4365213 e G/G do rs17179740 foram mais frequentes no grupo caso do que no controle ( $p=0,043$ ,  $p=0,005$  e  $p<0,001$ , respectivamente). A análise multivariada revelou um aumento de risco para o CHC do genótipo A/A do rs4986938 (OR=3,29; 95% CI 1,21-8,97;  $p=0,020$ ) e do genótipo G/G do rs17179740 (OR=3,23; 95% CI 1,68-6,21;  $p<0,001$ ), controlando para sexo e VHC; neste modelo a presença de VHC identificou um aumento de risco de 6 vezes maior de desenvolver o CHC (OR=6,01; 95% CI 3,03-11,94;  $p<0,001$ ). A expressão dos ERs, através da imuno-histoquímica no tecido hepático, não foi diferente entre os grupos estudados ( $p=0,104$ ). **CONCLUSÃO:** Portadores do genótipo e dos alelos com as variantes nos SNPs rs3020432, rs1643821 e/ou rs2234693 do gene *ESR1* e portadores dos genótipos das variantes nos SNPs rs4986938 e rs17179740 no gene *ESR2* foram preditores para desenvolver CHC. A confirmação desses dados pode auxiliar na determinação de marcadores moleculares para predição de risco de CHC em conjunto com outros fatores de risco.

**Palavras chaves:** carcinoma hepatocelular, estrogênio, gene *ESR1*, gene *ESR2*.

## ABSTRACT

**INTRODUCTION:** Hepatocellular carcinoma (HCC) is a liver cancer which is the sixth most common malignancy in the world. Genetic variability has been discussed as a risk factor for the HCC development, being the single nucleotide polymorphisms (SNPs) the most studied. Several studies highlight the sex hormones effects in the liver function, being important to investigate the polymorphisms influence in the estrogen receptors and the risk for HCC. **OBJECTIVES:** To evaluate the SNPs association from ESR1 and ESR2 genes with the susceptibility for HCC in conjunction with etiological factors already established; and to analyze the estrogen receptor (ER) expression by immunohistochemistry in patients with and without HCC. **METHODS:** Liver specimens samples, stored in paraffin blocks, from 92 patients diagnosed with HCC were collected and denominated as cases; and 103 control patients whom underwent liver biopsy. DNA extraction from liver specimens were used and the SNPs analysis were carried out by allelic discrimination using hydrolysis probes (TaqMan<sup>®</sup>) in a real time thermocycler. The genotype frequencies comparison between case and control groups was performed by Pearson's Chi-square test. For the multivariate analysis, logistic regression was used and the analyses were adjusted using sex and diagnosis of hepatitis C virus (HCV) infection as covariables. The ER expression comparisons between cases and controls were performed by Pearson's Chi-square test. **RESULTS AND DISCUSSION:** The male sex was the most prevalent, representing 70.7% of the patients in the case group and 70.9% in the control group. The average age was  $56.7 \pm 9.0$  years in the case group and  $50.9 \pm 11.8$  years in the control group ( $p < 0.001$ ). Cirrhosis and HCV presence were more frequent in the case than in the control group. For the ESR1 gene, the G/G genotype from rs3020432, the T allele from rs1643821 carriers and the C allele from rs2234693 carriers were more frequent in the case group when compared to the control ( $p < 0.001$ ,  $p = 0.001$  and  $p = 0.002$ , respectively). The multivariate analysis showed a higher risk ratio for HCC of G/G genotype from rs3020432 (OR=4.43; 95% CI 1.91-10.26;  $p = 0.001$ ), of the T allele from rs1643821 presence (OR=2.69; 95% CI 1.18-6.14;  $p = 0.018$ ) and of the C allele from rs2234693 presence (OR=2.41; 95% CI 1.17-4.94;  $p = 0.017$ ), controlling for sex and HCV presence; In this model, the HCV presence identified a risk 4.99 times greater to develop HCC (OR=4.99; 95% CI 2.50-10.00,  $p < 0.001$ ). For ESR2 gene, the genotypes A/A from rs4986938, C/C from rs4365213 and G/G from rs17179740 were more frequent in the case group than in the control ( $p = 0.043$ ,  $p = 0.005$  and  $p < 0.001$ , respectively). The multivariate analysis showed a higher risk ratio for HCC of A/A genotype from rs4986938

(OR=3.29; 95% CI 1.21-8.97; p=0.020) and of G/G genotype from rs17179740 (OR=3.23; 95% CI 1.68-6.21; p = <0.001), controlling for sex and HCV; in this model the HCV presence identified a risk 6 timer greater to develop the HCC (OR=6.01; 95% CI 3.03-11.94, p<0.001). The ERs expression, through immunohistochemistry in the liver tissue, was not different between studied groups (p=0.104). **CONCLUSION:** Genotype and alleles carriers with variants in rs3020432, rs1643821 and/or rs2234693 SNPs from the ESR1 gene and genotype of variants in rs4986938 and rs17179740 SNPs from the ESR2 gene were predictors of develop HCC. The confirmation of these data can assist in the determination of molecular markers for HCC risk prediction in conjunction with other risk factors.

**Key words:** hepatocellular carcinoma, estrogen, ESR1 gene, ESR2 gene.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES DA REVISÃO DA LITERATURA

FIGURA 1 – Sequência de lesões celulares culminando no desenvolvimento do CHC (adaptado de Thorgeirsson; Grisham, 2002). .....	24
-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

## LISTA DE TABELAS DO ARTIGO 2

TABELA 1 – Características das amostras .....	62
TABELA 2 – Frequências alélicas dos tag-SNPs estudados, assim como seus tagged-SNPs.	63
TABELA 3 – Frequências genóticas dos SNPs rs3020432, rs1643821e rs2234693 nos grupos caso e controle .....	64
TABELA 4 – Associação dos polimorfismos .....	65

## LISTA DE TABELAS DO ARTIGO 3

TABLE 1 - Samples characteristics.....	85
TABLE 2 - Allele frequencies of the tag-SNPs studied, as well as their tagged-SNPs. ....	86
TABLE 3 - Genotypic frequencies for SNPs (rs4986938, rs4365213 and rs17179740) in the case and control groups. ....	87
TABLE 4 - Polymorphisms association .....	88
TABLE 5 - Immunohistochemistry analysis in the case and control groups. ....	89

## LISTA DE ABREVIATURAS

AEG-1	Gene de astrócito elevado tipo 1
AFB1	Aflatoxina B1
AgHBs	Antígeno de superfície do vírus da hepatite B
AP-1	Proteína ativadora 1
AR	Receptor de androgênio
b-Raf	Proto-oncogene b-Raf
CHC	Carcinoma hepatocelular
DEN	Dietilnitrosamina
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EE	Etinil estradiol
EHNA	Esteato-hepatite não alcoólica
ER	Receptor de estrogênio
ERE	Elementos de resposta ao estrogênio
ESR1 ou ER $\alpha$	Receptor de estrogênio 1 ou alfa
ESR2 ou ER $\beta$	Receptor de estrogênio 2 ou beta
IL-6	Interleucina 6
LD	Desequilíbrio de ligação
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro
NF-kB	Fator nuclear Kappa B
NO	Óxido nítrico
OMS	Organização Mundial da Saúde
PDGFR	Fator de crescimento derivado de plaquetas
P-gp	Glicoproteína-P
SNP	Polimorfismo de nucleotídeo único
SP-1	Proteína de especificidade 1
VEGFR2	Receptor do fator de crescimento endotelial vascular 2
VHB	Vírus da hepatite B
VHC	Vírus da hepatite C
VHD	Vírus da hepatite D

## LISTA DE SÍMBOLOS

®	Marca registrada
cm	Centímetro
ml	Mililitro
°C	Graus centígrados
pH	Potencial hidrogeniônico
$\alpha$	Alfa
$\beta$	Beta
$\chi^2$	Qui-quadrado

## SUMÁRIO

1	REVISÃO DA LITERATURA.....	15
1.1	Epidemiologia do carcinoma hepatocelular .....	15
1.2	Fatores de risco do carcinoma hepatocelular .....	16
1.2.1	Cirrose.....	16
1.2.2	Vírus da Hepatite C.....	17
1.2.3	Vírus da Hepatite B.....	18
1.2.4	Álcool.....	18
1.2.5	Aflatoxinas.....	19
1.2.6	Outros fatores de risco .....	19
1.3	Tratamento do carcinoma hepatocelular .....	20
1.3.1	Tratamentos potencialmente curativos .....	20
1.3.2	Tratamentos Paliativos.....	21
1.4	Prognóstico .....	22
1.5	Patogênese molecular do carcinoma hepatocelular.....	23
1.6	Estrogênios e o carcinoma hepatocelular .....	24
1.7	Polimorfismos .....	26
1.8	Genes <i>ESR1</i> e <i>ESR2</i> .....	27
1.9	Referências bibliográficas .....	30
2	JUSTIFICATIVA.....	39
3	OBJETIVOS.....	40
3.1	Objetivo geral.....	40
3.2	Objetivos específicos.....	40
4	ARTIGOS.....	41
4.1	Artigo 1: <i>Hepatocellular carcinoma and estrogen receptors: Polymorphisms and isoforms relations and implications</i> .....	41
4.2	Artigo 2: Associação de polimorfismos do gene <i>ESR1</i> com Carcinoma Hepatocelular .....	46
4.3	Artigo 3: <i>Association of polymorphisms on the ESR2 gene with Hepatocellular Carcinoma</i> .....	66
5	CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	90
	ANEXO A - PARECER CONSUBSTANCIADO DE PROJETO DE PESQUISA.....	91

# 1 REVISÃO DA LITERATURA

## 1.1 Epidemiologia do carcinoma hepatocelular

Os tumores hepáticos malignos podem ser classificados em tumores primários, que apresentam sua origem no próprio órgão, e tumores secundários ou metastáticos, que são originados em outro órgão e posteriormente atingem o fígado (Inca, 2015). O tumor hepático primário mais comum é o carcinoma hepatocelular (CHC), também conhecido como hepatocarcinoma, derivado das principais células do fígado - os hepatócitos (Inca, 2015). Atualmente, o CHC representa mais de 85% dos tumores que acometem o fígado (Jemal *et al*, 2011). A grande maioria dos casos de CHC, aproximadamente 80% deles, ocorre em países que ainda estão em desenvolvimento, como os do Sudeste Asiático e da África Subsaariana. A incidência de casos de CHC está aumentando nos Estados Unidos e na Europa, sugerindo que a frequência deverá crescer nas próximas décadas, sendo decorrente do alto número de pacientes que foram infectados pelo vírus da hepatite C (VHC) há mais de duas décadas atrás (Iarc, 2016).

O CHC é considerado o sexto tumor maligno mais frequente no mundo (Govaere & Roskams, 2015). De acordo com o INCA, no Brasil, são mais de 8 mil mortes por ano, sendo que ocorrem 5 mil mortes somente no sexo masculino (Inca, 2015). Estima-se que em torno de 743.300 novos casos são diagnosticados por ano, com uma mortalidade quase igual à incidência: 695.000 mil mortes por ano no mundo. É considerado a segunda causa mais frequente de mortes relacionadas ao câncer (Ferlay *et al*, 2015). No Brasil, o CHC apresenta-se como a oitava causa de morte por câncer (Pimenta & Massabki, 2010) e sua incidência varia consideravelmente de acordo com a região geográfica, provavelmente devido às diferenças nos principais fatores etiológicos. No ocidente e no Japão o VHC é o fator de risco mais relevante, enquanto que na Ásia e na África, o vírus da Hepatite B (VHB) é o fator de risco predominante (Llovet *et al*, 2008).

A prevalência é maior no sexo masculino em relação ao feminino, com uma proporção de cerca de 2 a 4 vezes maior (Ferlay *et al*, 2015). Esse resultado representa as diferenças específicas relacionadas ao sexo em relação aos mecanismos regulatórios existentes nos genes, especificamente aqueles que são conduzidos pela resposta a hormônios (Li *et al*, 2012). Dentre as possíveis razões para essa disparidade pode estar a diferença na exposição aos fatores de risco. Sabe-se ainda que os homens são mais comumente infectados pelo VHC e

VHB do que as mulheres, além de apresentarem um consumo maior de bebidas alcoólicas (El-Serag, Rudolph, 2007).

Estudos demonstraram um aumento de 2 a 8 vezes no desenvolvimento de CHC em camundongos machos, o que sustentaria a hipótese de que os hormônios sexuais podem influenciar na progressão do CHC (El-Serag & Rudolph, 2007). Sugere-se também que o estrogênio possa conferir, ao menos parcialmente, um efeito protetor nas mulheres em período fértil, uma vez que a frequência de CHC apresenta-se maior em homens e mulheres pós-menopáusicas. Além disso, alguns estudos mostraram que o estrogênio apresenta capacidade de suprimir a fibrose e estimular o processo de apoptose dos hepatócitos, atuando, dessa maneira, como um agente anticancerígeno (Liu *et al.*, 2014).

Tendo em vista essa característica gênero-específica, percebe-se que é de significativa relevância o estudo do papel dos hormônios sexuais, pois os mecanismos de ação desses hormônios na evolução do CHC ainda são pouco compreendidos (Kalra *et al.*, 2008). A função dos estrogênios no desenvolvimento do CHC, por sua vez, é controversa e existem evidências sugerindo tanto um papel carcinogênico quanto protetor do fígado (Oomoya *et al.*, 2001; Farinati *et al.*, 2002; De Maria *et al.*, 2002).

## **1.2 Fatores de risco do carcinoma hepatocelular**

### **1.2.1 Cirrose**

Os fatores de risco do CHC são conhecidos e qualquer fator que leve a lesões hepáticas crônicas e à cirrose representa um potencial agente oncogênico para o desenvolvimento do CHC. As hepatopatias relacionadas ao VHC, ao VHB e ao álcool são os principais agentes etiológicos. As hepatopatias crônicas subjacentes, em especial de etiologia viral, representam mais de 95% dos pacientes com CHC (Bosch *et al.*, 2004). Outras causas também estão relacionadas, mas apresentam um menor impacto, que são: a esteato-hepatite não alcoólica (EHNA), a hemocromatose, a exposição à aflatoxina B1 (AFB1), a hepatite autoimune, a cirrose biliar primária e certas doenças metabólicas hepáticas (Davis *et al.*, 2008).

Independente da etiologia, a cirrose hepática, pode levar ao desenvolvimento do CHC e ser considerada uma condição pré-maligna (Fattovich *et al.*, 2004). Aproximadamente 80-90% dos pacientes com CHC apresentam cirrose (Caldwell; Parck, 2009). Qualquer que seja o

significado biológico da associação entre a cirrose e o CHC, os pacientes com cirrose hepática devem ser submetidos ao rastreamento para o CHC (Colombo; Sangiovanni, 1997).

### 1.2.2 Vírus da Hepatite C

O VHC provoca infecção em mais de 185 milhões de indivíduos no mundo (Centers for Disease Control and prevention, 2016; Lavanchy, 2011), dado que leva a Organização Mundial da Saúde (OMS) à estimativa de que, no mínimo, 3% da população mundial estejam cronicamente infectadas com VHC (Alter, 2007). O VHC na maioria das vezes está associado com o desenvolvimento do CHC e, atualmente, explica cerca de 30% dos casos em todo o mundo (Bosch *et al*, 2004). O VHC é a causa mais comum de CHC nos Estados Unidos, na Europa e no Japão, respondendo por 49%, 56% e 75% dos casos, respectivamente (Kiyosawa *et al*, 2004). No Brasil, em um estudo realizado pela Sociedade Brasileira de Hepatologia em 2010, foram analisados 1405 casos diagnosticados entre os anos de 2004 e 2009. Identificou-se que a cirrose estava presente em 98% dos casos, sendo que a média de idade era de 59 anos e 78% eram do sexo masculino. A região Sudeste foi responsável por 77% dos casos reportados, e a prevalência do VHC foi de 54%. Nas regiões Norte, Nordeste e Centro Oeste, o VHB foi mais prevalente (25%) do que nas regiões Sul e Sudeste (15%) (Carrilho *et al*, 2010).

A infecção é predominantemente adquirida na idade adulta, como resultado do uso ilícito de drogas endovenosas e através de transfusões sanguíneas ocorridas no passado. Mais de 80% dos pacientes com infecção se tornam portadores crônicos da doença, e aproximadamente 20% evoluem para cirrose (Ozaras; Tahan, 2009; Par, 2009; Tan *et al*, 2008) e 1% a 4% desenvolvem CHC, anualmente (Veldt *et al*, 2007). Em geral, os pacientes com hepatite C crônica permanecem assintomáticos por muitos anos, podendo, contudo, progredir para a cirrose. O tempo médio para o aparecimento do CHC, após a infecção viral, é de 30 anos na maioria dos casos (Ueno *et al*, 2009).

O receptor de estrogênio 1 (*ESR1*) também interage com a proteína NS5B do vírus da hepatite C, facilitando a interação desta proteína com a caveolina 2 e promovendo a formação do complexo de replicação do vírus. O tratamento com tamoxifeno inibe a ação do *ESR1* e suprime a replicação genômica do vírus da hepatite C.

### 1.2.3 Vírus da Hepatite B

A causa mais comum de CHC na China e na África é a infecção pelo VHB, respondendo por 50-55% dos casos. O VHB atinge 400 milhões de pessoas no mundo e é responsável por 320.000 mortes por ano. Aproximadamente, 30-50% das mortes em decorrência do VHB estão relacionados com o CHC. Na Ásia, na África e em alguns países do leste da Europa, o VHB é a principal causa de CHC, superando amplamente o impacto da hepatite C crônica. De acordo com um estudo realizado em Taiwan, o risco estimado de CHC em portadores do antígeno de superfície do vírus da hepatite B (AgHBs) é cerca de cem vezes maior do que nos não portadores (Yang *et al*, 2002). Os fatores que podem influenciar o desenvolvimento do CHC em pacientes com VHB incluem: o sexo, o grau de replicação viral, a co-infecção com o VHC ou com o vírus D (VHD), a exposição à aflatoxina e ao álcool (Yu *et al*, 1997).

A infecção nos países onde a incidência é elevada é predominantemente adquirida na infância ou no período perinatal e, quando adquirida nessas fases, apresenta 80-90% de chance de se tornar crônica. Os indivíduos infectados precocemente são os mais suscetíveis ao desenvolvimento do CHC e, com a presença de cirrose hepática, esse risco aumenta exponencialmente. Em áreas de alta incidência, embora a maior parte dos casos de CHC ocorra em pacientes com cirrose, há casos de pacientes com CHC sem cirrose hepática (Ganzalez *et al*, 2004). A infecção crônica pelo vírus da hepatite B é considerada fator de risco mais frequente para o CHC, sendo responsável por mais de 50% dos casos. Estima-se que o conteúdo de carga viral e a duração da infecção contribua para um risco acumulado de dano oncogênico de efeito prolongado. Não só isso, sua associação com o risco aumentado ao CHC deve-se a indução de dano ao ácido desoxirribonucléico (DNA) realizada pela integração do VHB no mesmo (Forner *et al*, 2012).

Estudos experimentais demonstraram que produtos virais podem contribuir para a transformação maligna dos hepatócitos (Nakashima *et al*, 1995). A proteína HBx do vírus da hepatite B é uma proteína multifuncional que interage com o receptor de estrogênio 1 (*ESR1*), um subtipo de receptor de estrogênio (ER), e inibe sua atividade transcricional.

### 1.2.4 Álcool

A associação entre o consumo de álcool e o CHC tem sido muito estudada. Apesar dos dados epidemiológicos apresentarem que o uso abusivo crônico de álcool e, em particular, a

cirrose induzida pelo álcool são fatores de risco para o CHC, ainda não está completamente esclarecido como se dá este processo (Donato *et al*, 2002), já que o álcool não é um carcinógeno hepático quando administrado em animais (Morgan *et al*, 2004). Embora o etanol não possua propriedades mutagênicas por si próprias, seu consumo crônico está associado ao aumento do risco de câncer. O efeito do álcool parece ser dose-dependente e o desenvolvimento da cirrose parece ser a base para os casos de CHC. O uso de quantidades de álcool superior a 80 mg/dia por mais de dez anos aumenta em mais de cinco vezes o risco de desenvolver CHC (Donato *et al*, 2002).

### 1.2.5 Aflatoxinas

As aflatoxinas são substâncias tóxicas resultantes da atividade metabólica de fungos que se desenvolvem em alimentos e produtos agrícolas, presentes em muitas áreas africanas subsaarianas e áreas do sudeste asiático. Em condições favoráveis, tais como temperatura, umidade e pH, essas substâncias podem intoxicar seres humanos e animais. A intoxicação (aflatoxicose) ocorre com a ingestão de produtos e subprodutos contaminados (principalmente amendoim, milho, castanhas, feijão e sementes oleaginosas). As aflatoxinas são produzidas pelos fungos *Aspergillus flavus* e *Aspergillus paraceticus*. Essas toxinas, em especial a aflatoxina B1 (AFB1), apresentam um elevado potencial cancerígeno (Bennett; Klich, 2003).

Desde sua descoberta, há três décadas, muitos autores estudam a relação entre a AFB1 e o CHC. Os estudos anteriores a 1980 não avaliaram de forma adequada a presença do VHB, enquanto que os estudos anteriores a 1990 não levaram em conta a possibilidade de infecção do VHC. Assim, o papel da aflatoxina na carcinogênese hepática permaneceu pouco claro até o surgimento das técnicas de biologia molecular (Groopman *et al*, 1996).

A mutação genética causada pela AFB-1 no códon 249 no éxon 7 do gene supressor tumoral TP53 (transversão GC para TA) foi identificada e correlacionada positivamente com a exposição à aflatoxina em meta-análises composta por 49 estudos (Hsu *et al*, 1991); (Bressac *et al*, 1991).

### 1.2.6 Outros fatores de risco

Além dos fatores etiológicos mais comuns, outros fatores também podem estar envolvidos no processo de desenvolvimento do CHC, mas com menor frequência. Pacientes com hemocromatose hereditária, uma vez estabelecida a cirrose, possuem um risco em torno

de 20%, no período de 5 anos, de desenvolver o CHC (Fattovich *et al*, 2004). O tumor é raro nos casos de hemocromatose na ausência de cirrose. Uma maior incidência do CHC tem sido descrita em pacientes diabéticos sem história prévia de doença do fígado (El-Serag *et al*, 2004). A doença hepática gordurosa não-alcoólica e a esteato-hepatite não alcoólica podem contribuir para o desenvolvimento de fibrose e cirrose, e, portanto, também podem contribuir para o desenvolvimento do CHC (Farrell; Larter, 2006), sendo atualmente consideradas etiologias de importância.

### **1.3 Tratamento do carcinoma hepatocelular**

#### **1.3.1 Tratamentos potencialmente curativos**

Há limitadas opções de tratamento para o CHC avançado. Dentre as alternativas, com intenção curativa, estão: o transplante de fígado, a ressecção cirúrgica e a ablação por radiofrequência, (Bruix, Sherman, 2011). No entanto, somente cerca de 35% destes pacientes são candidatos aos tratamentos citados acima, sendo possível, no restante dos casos, apenas tratamentos paliativos (Llovet *et al*, 2008). De acordo com esses dados, o conhecimento de indicadores prognósticos é de grande utilidade para uma orientação adequada na escolha do tratamento e na seleção dos pacientes para as terapêuticas propostas.

O transplante hepático, onde as condições para realizá-lo são adequadas, é uma terapia bem-sucedida, pois propicia a substituição do órgão doente por um enxerto “saudável”, tratando a doença de base e reduzindo a possibilidade de recorrência de novos tumores. As taxas de sobrevida observadas em pacientes cirróticos transplantados para o tratamento do CHC são satisfatórias. Em pacientes selecionados com apenas um nódulo tumoral menor que 5 cm ou até 3 nódulos de no máximo 3 cm de diâmetro cada, sem invasão vascular, a sobrevida de 4 anos supera os 70% (Mazzaferro, 1996). Infelizmente, o fator limitante para o emprego dessa terapia é a falta de doadores de órgãos, o que restringe o número de pacientes beneficiados por essa modalidade terapêutica (Bismuth *et al*, 1999).

A ressecção cirúrgica é considerada em muitos estudos a primeira escolha para os pacientes com CHC em fígados não cirróticos, que constituem menos de 5% dos casos de CHC no ocidente (Belghiti *et al*, 2000). Os pacientes eleitos devem apresentar, em regra, um nódulo solitário, função hepática preservada e gradiente de pressão portal pouco elevada. Nos fígados cirróticos, a função hepática diminuída impede, em muitos casos, esse tipo de abordagem terapêutica. A ressecção hepática representa um tratamento de baixa morbi-

mortalidade e cuja taxa de sobrevivência de 5 anos, quando a indicação é adequada, pode atingir 60-70% (Lopez *et al*, 2006). Dois problemas limitam o uso da ressecção hepática: o primeiro refere-se à pequena parcela de pacientes que preenchem os critérios de seleção, já o segundo diz respeito às altas taxas de recorrência do CHC no fígado operado, estimada em mais de 70% em 5 anos (Llovet, 2005).

Os tratamentos de ablação por radiofrequência apresentam respostas satisfatórias para o tratamento do CHC. A alcoolização apresenta boa resposta para a necrose tumoral completa em tumores únicos com até 2 cm de diâmetro. Mais recentemente, a termoablação vem ganhando destaque pela sua eficiência em erradicar tumores maiores e por garantir uma margem de segurança, usualmente não obtida com a alcoolização (Bruix, Sherman, 2011; De Jong; Wertenbroek, 2011). Um estudo de coorte utilizando a termoablação demonstrou que a ablação completa de lesões menores que 2 cm foram possíveis em mais de 90% dos casos, com uma taxa de recidiva local inferior a 1% (Livraghi *et al*, 2008).

### **1.3.2 Tratamentos Paliativos**

A embolização, injeção de substância para tentar bloquear ou diminuir o fluxo de sangue para as células tumorais e o uso de terapia-alvo com o fármaco Sorafenibe são considerados os tratamentos paliativos para o CHC. O procedimento de quimioembolização consiste em injetar um agente embolizante associado a um agente quimioterápico na rede arterial, com o objetivo de liberar o fármaco ao nível do tumor e posteriormente obstruir a vasculatura que nutre a lesão. Foram demonstrados benefícios estatisticamente significativos na sobrevivência de pacientes tratados com a quimioembolização. O aumento da sobrevivência em pacientes tratados varia de 20 a 60% e a dimensão desse benefício está relacionada aos critérios de seleção dos pacientes tratados (Llovet; Bruix, 2003).

O Sorafenibe é uma molécula que inibe a proliferação de células, agindo nos receptores VEGFR2, PDGFR e b-Raf, e atua na angiogênese tumoral, aumentando a taxa de apoptose em uma ampla gama de tumores (Wilhelm *et al*, 2004). Esse é um agente de administração oral que demonstrou um aumento na sobrevivência de pacientes com CHC avançado (Llovet *et al*, 2007). A diferença de sobrevivência foi estatisticamente significativa em relação ao grupo não tratado. Até o momento, sorafenibe é usado como terapia de primeira linha para casos avançados de CHC (Lin *et al*, 2012; Bruix *et al*, 2016).

Um estudo clínico de fase III que envolveu 602 pacientes com carcinoma hepatocelular avançado (sem indicação para tratamento cirúrgico ou quimioembolização) de

diversos centros de pesquisas mundiais, inclusive no Brasil, foi publicado na revista científica *New England Journal of Medicine*. Os resultados demonstraram que os pacientes tratados com o medicamento tiveram aumento da taxa de sobrevida global em 44%, quase três meses a mais do que naqueles que não receberam a substância (Llovet *et al*, 2008). Outro estudo clínico de fase III com desenho metodológico semelhante, porém envolvendo principalmente pacientes com VHB, também comprovou a eficácia da terapia alvo em 226 pacientes da região Ásia-Pacífico. Os resultados demonstraram que o medicamento reduziu em 43% o risco de progressão do carcinoma hepatocelular e em 32% o risco de morte. A sobrevida global dos pacientes tratados com o Sorafenibe foi de 6,5 meses versus 4,2 meses para os que não receberam a substância (Cheng *et al*, 2009).

Recentemente, Ma e colaboradores (2012) realizaram um trabalho em ratos, que identificou uma relação eficaz entre o tratamento com o sorafenibe e a terapia hormonal para tratar os casos de CHC. A combinação descrita acima foi considerada a melhor maneira de tratar os casos avançados de CHC em animais, mas ainda não podemos extrapolar esses resultados para humanos, visto que é necessário um estudo clínico randomizado.

#### **1.4 Prognóstico**

A grande maioria dos casos de CHC apresenta um mau prognóstico. Este quadro decorre principalmente de três fatores: falta de um marcador que permita um diagnóstico precoce do CHC; hepatopatia subjacente, que limita a aplicação eficaz de tratamentos locoregionais; e pouco sucesso dos tratamentos quimioterápicos disponíveis. O desenvolvimento de metástases e a recidiva tumoral são as causas mais comuns de morte em pacientes com CHC.

A capacidade em prever o comportamento biológico do CHC é um dos fatores determinantes do prognóstico. Vários estudos tentam identificar fatores tumorais capazes de prever os resultados após o transplante. O tamanho do tumor, a multiplicidade de nódulos, a diferenciação celular e a invasão vascular demonstraram estar associados a uma maior recidiva e uma pior sobrevida livre de doença (Savaglia *et al*, 2005). Fatores patológicos e biológicos do CHC, em relação ao prognóstico, têm sido muito estudados, devido aos avanços na área da biologia do câncer. As características morfológicas do tumor têm sido associadas significativamente à invasividade, à recidiva tumoral e à sobrevida do paciente, e a análise de marcadores moleculares com significado prognóstico constitui um método complementar, com um importante papel na determinação do fenótipo maligno do tumor.

## 1.5 Patogênese molecular do carcinoma hepatocelular

As variações existentes na sequência genética têm sido discutidas como responsáveis pelo risco de desenvolver CHC. Diversos pacientes que são expostos a fatores de risco ambientais já conhecidos podem nunca desenvolver CHC ao passo que uma significativa minoria de casos de CHC desenvolve a doença sem apresentar qualquer fator de risco (El-Serag, Rudolph, 2007). As alterações genéticas envolvidas no CHC ainda não estão completamente esclarecidas. De qualquer forma, sabe-se que, assim como em outros tumores, o acúmulo de diversas alterações genéticas apresenta um papel importante na carcinogênese do CHC (Brose *et al*, 2000).

A maioria dos casos de CHC ocorre em fígados acometidos por hepatopatia crônica e cirrose - que se caracteriza por inflamação crônica persistente, morte hepatocitária e proliferação ativa dos hepatócitos residuais para recompor o parênquima, gerando um ambiente altamente mitogênico e mutagênico. Esse processo culmina com a formação de tecido cicatricial que engloba nódulos de tecido hepatocitário regenerativo. Dentro desses nódulos regenerativos, distinguem-se subpopulações de células monoclonais que acumulam alterações genéticas que podem progredir para formação de nódulos displásicos e, por fim, formação do CHC (Savaglia *et al*, 2005). Nódulos com displasia de alto grau são lesões pré-neoplásicas e desenvolvem lesões malignas em 30% dos casos, no período de 1-5 anos (Thorgerirsson; Grisham, 2002). (Figura 1).

No estudo de Elroy *et al.*, (2015) foi identificado que o componente hereditário para o risco aumentado em desenvolver o CHC, está intimamente ligado ao VHB. Foi observado que todos os pacientes que desenvolveram CHC apresentavam como fator de risco: o VHB.

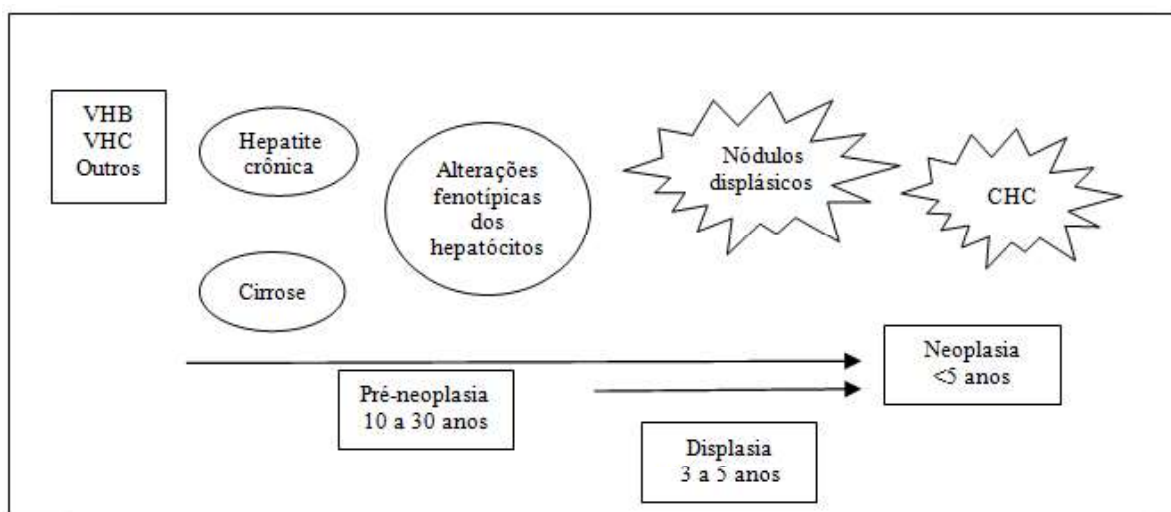


FIGURA 1 – Sequência de lesões celulares culminando no desenvolvimento do CHC (adaptado de Thorgeirsson; Grisham, 2002).

## 1.6 Estrogênios e o carcinoma hepatocelular

Os estrogênios influenciam diversas situações fisiológicas e fisiopatológicas nos mamíferos, como reprodução, sistema cardiovascular, integridade óssea, sistema hepático, cognição e comportamento (Nagasue *et al*, 1986; Numan 2003; Deroo; Korach, 2006). Como as concentrações destes hormônios são diferentes entre homens e mulheres, parte do dimorfismo sexual observado nesses diferentes sistemas pode ser mediada por ação destes esteróides gonadais. Também, já se tem conhecimento de que os padrões de expressão dos receptores de estrogênios diferem entre espécies, sexo e tecidos.

Como o fígado é um órgão hormônio-sensitivo pode sofrer influência dos diversos hormônios presentes no organismo humano, dentre eles, os hormônios sexuais, como o estrogênio (Wang *et al*, 2006). O estrogênio é um hormônio esteroide produzido pelos ovários e placenta e, em menores quantidades, pelos testículos, córtex da supra-renal, cérebro, tecido adiposo, mama, pele, vasos sanguíneos, ossos e cartilagens (Marques, 2011). Embora os estrogênios sejam produzidos em maior concentração em mulheres do que em homens, diversos trabalhos indicam que estes hormônios possuem um papel importante no crescimento, mineralização e fechamento das epífises de ossos longos; possuem efeito vasodilatador no sistema cardiovascular, além de ações em diversos outros tecidos (Sharpe, 1998).

O efeito dos hormônios sexuais na função e morfologia do fígado já foi destacado em vários estudos (Nagasue *et al*, 1986; Kalra *et al*, 2008), tendo-se em vista a hipótese de que os mesmos possuem um papel na patogênese da neoplasia hepática (Paydas *et al*, 1992). A literatura aponta uma importante relação entre o estrogênio e o fígado, porém existem poucos estudos sobre variabilidade genética dos receptores de estrogênio e as hepatopatias. O estudo realizado por (Yuan *et al*, 2008) sugere que não há relação entre os polimorfismos dos genes envolvidos na metabolização do estrogênio e risco de CHC. Fatores hormonais desempenham um papel essencial na carcinogênese através de vias de transdução de sinal, da síntese e metabolismo do estrogênio (Zhao *et al*, 2012; Gingery *et al*, 2014). Nos últimos anos, estudos epidemiológicos e genéticos concentram-se em esclarecer a susceptibilidade hereditária do câncer, tais como as variações em receptores hormonais, considerados os principais para o desenvolvimento de vários tipos de câncer (Streicher *et al*, 2014; Lee *et al*, 2014).

Avanços recentes na pesquisa da biologia molecular revelam que os hormônios sexuais desempenham um papel significativo na fisiologia normal de outros órgãos além dos órgãos do sistema reprodutivo através da regulação da ativação transcricional. Os estrogênios influenciam a ação de várias moléculas envolvidas em processos celulares essenciais como geração de respostas imunes, a proliferação celular e a apoptose através de receptores funcionais localizados nas diversas organelas subcelulares (Kalra *et al*, 2008). Além disso, o estrogênio é capaz de afetar a transcrição de diferentes genes em diversas linhagens e tipos celulares, como já reportado em muitos estudos de DNA *Microarray* (Souza *et al*, 2012).

As ações fisiológicas do estrogênio ocorrem através de alterações celulares, que podem acontecer por dois mecanismos: O mecanismo genômico, no qual o estrogênio, após a entrada na célula, liga-se a um de seus receptores: *ESR1* ou receptor de estrogênio 2 (*ESR2*), localizados no núcleo. E após formação de um dímero com outro receptor de estrogênio (ER), faz o reconhecimento de sequências de DNA na região promotora de genes responsivos ao estrogênio, denominadas elementos de resposta ao estrogênio (ERE), ativando ou reprimindo a transcrição desses genes (Neven, 2002). O ER pode também operar indiretamente por duas maneiras: através da interação proteína-proteína, por meio da proteína ativadora 1 (AP-1) ou da proteína de especificidade 1 (SP-1) na região promotora do gene que responde ao estrogênio; ou através da modulação de atividade de outros fatores de transcrição, como a Proteína NF-kB (Souza *et al*, 2012). A ação fisiológica do estrogênio também pode ocorrer por meio do mecanismo não genômico. Ocorre pela ligação do estrogênio a um ER ou a proteínas de ligação de estrogênio localizadas na membrana plasmática ou adjacente a ela; neste caso, pode envolver tanto sinalização celular como o funcionamento dos canais de cálcio e potássio, com o aumento dos níveis de  $Ca^{+2}$ , de proteínas G e receptores acoplados a elas, aumento do óxido nítrico (NO) e ativação de quinases PI3K e MAPK (Neven, 2002; Souza *et al*, 2012).

Em modelos animais já foi relatado que o estrogênio apresenta o papel de promotor de tumores, podendo induzir a hepatocarcinogênese. Uma relação entre a expressão de ERs e a formação de tumor induzida por estrogênio já foi demonstrada em camundongos transgênicos MT-mESR (Zhai *et al*, 2006). Outro estudo demonstrou que 8% de ratas fêmeas que receberam tratamento de etinil estradiol (EE) por doze meses desenvolveram CHC, revelando, portanto, que o EE causa mutação nos hepatócitos o que leva a formação de adultos de DNA e induz o desenvolvimento do câncer nas células afetadas (Kalra *et al*, 2008).

Os polimorfismos genéticos podem aumentar a suscetibilidade ao câncer em diversos casos. Estudo prévios (Lodish *et al*, 2002; Miceli *et al*, 2011) sugerem que os estrogênios

formados localmente no fígado podem ser importantes na proliferação celular e desta forma estarem associados ao CHC. Além disso, sugerem que uma mudança drástica na expressão de variantes do receptor de estrogênio está associada ao CHC. A literatura identifica uma importante relação entre os estrogênios e o fígado, porém existem poucos estudos sobre variabilidade genética dos receptores de estrogênio e hepatopatias.

### 1.7 Polimorfismos

O desenvolvimento do CHC é um processo complexo, associado ao acúmulo de alterações genéticas e epigenéticas, que passa através dos eventos de iniciação, promoção e progressão (Bralet *et al*, 2002; Cervello; Montalto, 2006). As alterações gênicas irão ocorrer durante ciclos repetidos de divisão celular, como rearranjos cromossômicos e associação com mecanismos de reparo de erros no pareamento de DNA deficientes. Todos esses processos estão relacionados, na maioria das vezes, a uma doença hepática crônica subjacente, e podem resultar em transformação neoplásica dos hepatócitos (Gonzalez *et al*, 2004).

Os polimorfismos, mais especificamente os polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) são uma das variações genéticas mais estudadas. A frequência de alelos variantes para o polimorfismo genético ocorre em mais de 1% da população. Algumas dessas alterações podem ocorrer em sequências não codificadoras do gene, não tendo, na maioria dos casos, efeitos diretos nas sequências de aminoácidos das proteínas; outras são possíveis de ocorrer em sequências codificadoras, podendo levar à produção de proteínas defeituosas. Deste modo, em alguns casos o polimorfismo genético pode aumentar a suscetibilidade ao câncer (Lodish *et al*, 2002; Balasubramanian *et al*, 20014).

Muitos genes contêm variações na sequência no genoma humano. Os genes apresentam localizações específicas ao longo do genoma, sendo essa localização denominada de *locus*. As sequências que ocupam um determinado *locus* são denominadas alelos. Considerando que um indivíduo apresenta um par de cada cromossomo autossômico (um deles de origem paterna e o outro de origem materna), ele apresentará dois alelos em cada *locus*, o que determinará o seu genótipo. Se o indivíduo possui dois alelos distintos, apresenta o genótipo heterozigoto, mas se há ocorrência de dois alelos idênticos, apresenta o genótipo homozigoto. Em geral, a forma mais comum do gene na população é chamada de alelo tipo-selvagem e a sequência menos comum é chamada de alelo-raro ou alelo-polimórfico (Butler, 2005).

Diversos SNPs foram descritos para os genes *ESR1* e *ESR2*. Já foram realizados muitos estudos de associação com diversas situações fisiológicas e patológicas investigando algumas dessas variantes, porém muitas vezes com resultados contraditórios. Uma investigação mais detalhada de polimorfismos nos genes *ESR1* e *ESR2* podem auxiliar na elucidação do papel desses polimorfismos na variabilidade da ação desses receptores.

O conhecimento sobre a influência de diferentes polimorfismos do ER sobre o CHC pode ser um meio para uma melhor compreensão de sua fisiologia e patogênese. Além de possibilitar novos caminhos e estratégias para o desenvolvimento de pesquisas futuras em terapias antitumorais baseadas em antagonistas dos ERs.

### **1.8 Genes *ESR1* e *ESR2***

Existem duas formas descritas para os receptores de estrogênios, *ESR1* e *ESR2*, os quais possuem um padrão de distribuição tecido-específica e são codificados por dois genes distintos localizados em cromossomos diferentes, *ESR1* e *ESR2* respectivamente (Green *et al*, 1986; Kuiper *et al*, 1996; Enmark *et al*, 1997). De acordo com revisão de Gustafsson (1999) e Deroo; Korach (2006), os dois receptores são encontrados simultaneamente no sistema nervoso central, sistema cardiovascular, trato urogenital, tecido mamário, tecido adiposo e no tecido ósseo, enquanto o tecido gastrointestinal expressa apenas o *ESR2* e o fígado expressa principalmente o *ESR1*. Segundo, Lavarone, 2003, ambas formas de receptores de estrogênio, *ESR1* e *ESR2* são expressos nos casos de CHC e podem interagir um como outro (Lavarone *et al*, 2003).

O papel dos estrogênios na modulação das características morfológicas e fisiológicas do fígado tornou-se evidente na década de 1970. Em 1978, Duffy & Duffy foram os primeiros a registrarem a presença de ER no fígado humano normal. Subsequentemente, Molteni *et al*. (1979) registraram a presença de ER em CHC humano. Estudos de hibridização *in situ* utilizando uma sequência de oligonucleotídeos específicos para o ER mostraram a expressão de mRNA para ER em 11 de 15 amostras de tecido com CHC (Pacchioni *et al*, 1993).

Os ERs pertencem a uma família de receptores nucleares que podem regular a expressão de diversos genes (Kalra *et al*, 2008). O ER consiste num fator de transcrição ativado por ligante, composto por um domínio de ligação ao estrogênio e um domínio de ligação de DNA, que pode ser codificado pelos genes distintos *ESR1* e *ESR2*, respectivamente localizados em cromossomos diferentes (Araújo *et al*, 2009; Deroo; Korach, 2006). O gene

*ESR1* está localizado no cromossomo 6q25.1 e é composto de oito éxons separados por sete regiões intrônicas (Casazza *et al*, 2010). Atua como um mediador na via de transdução de sinal, sendo expresso em uma grande variedade de tipos celulares, além de ter um papel vital na resposta de ação do estrogênio (Araújo *et al*, 2009). Já se tem conhecimento de que é responsável por induzir proliferação celular, gerenciar o crescimento celular, programar a morte celular e acumular mutações genéticas durante a divisão celular através da ligação entre hormônios endógenos quanto com exógenos no câncer de mama (Li; Xu, 2012). Sabe-se também que a grande maioria dos efeitos biológicos do estrogênio no fígado é mediado pelo *ESR1* (Yan *et al*, 2011).

Os ERs possuem, assim como outros receptores da superfamília de receptores nucleares, cinco domínios estruturais, os quais são denominados A/B, C, D, E e F. O domínio C (ligação ao DNA) é a região que faz o reconhecimento dos elementos de resposta ao estrogênio na região promotora de genes responsivos ao hormônio e o domínio E é a região onde ocorre a ligação dos hormônios (Zhao *et al*, 2008). Recentemente, Lin *et al*. (2007) identificaram 1.234 sítios de ligação do *ESR1* espalhados no genoma humano. Como o *ESR1* apresenta grande homologia com o *ESR2* em seu domínio de ligação ao DNA (95-97% de identidade) (Bodo; Rissman, 2006; Zhao *et al*, 2008), provavelmente esses sítios de ligação ao *ESR1* também podem propiciar a ligação do *ESR2*. A grande quantidade de elementos de resposta aos estrogênios espalhados no genoma, assim como a ampla distribuição anatômica dos ERs evidenciam que grande parte das ações fisiológicas destes hormônios nos diversos sistemas envolvem os receptores estrogênicos.

Dentre os polimorfismos mais estudados para o gene *ESR1* está o rs2234693, localizado no primeiro íntron do gene *ESR1*, 397 pares de bases a montante do exón 2. O sítio de restrição para a enzima PvuII do polimorfismo rs2234693 local envolve uma substituição de nucleotídeo de timina por citosina (397 T>C) (Araújo *et al*, 2009; Wei *et al*, 2013). Esse polimorfismo está localizado em uma região não codificante do *ESR1* e pode interferir na modulação da transcrição desse gene, pois no primeiro íntron do gene, onde se localiza o SNP rs2234693, usualmente estão localizadas muitas sequências regulatórias. Outro polimorfismo muito estudado e também presente no gene *ESR1* é o rs1643821 cuja substituição de nucleotídeo se dá de citosina por timina.

Variações nas sequências do gene *ESR1* são capazes de alterar a atividade fisiológica e a estrutura do receptor (Araújo *et al*, 2009), alterando a ligação de fatores de transcrição, influenciando o *splicing* diferencial do RNAm do gene (Marques, 2011). Essas modificações podem possibilitar diferenças no efeito do estrogênio sobre o desenvolvimento de inúmeras

doenças. A associação de polimorfismos genéticos do gene *ESR1* com o risco de patologias tem sido o objetivo de alguns estudos (Araújo *et al*, 2009), sendo que já foram associados com fraturas osteoporóticas, doenças cardiovasculares, infecção crônica pelo VHB e vários outros tipos de câncer como mama, retal, endometrial, renal e da próstata (Zhai *et al*, 2006).

A alteração na sequência do *ESR1* em uma neoplasia já foi descrita como um forte preditor negativo de sobrevivência em pacientes com CHC (Kalra *et al*, 2008). Assim como já foi feita a inferência de que anormalidades no *ESR1* podem ser capazes de estimular a proliferação celular, assim como poderia vir a agir como um promotor tumoral (Giantrapani *et al*, 2006). Alguns estudos, foram capazes de demonstrar associação dos polimorfismos do *ESR1* com um aumento para o risco de câncer de mama e endometriose (Souza *et al*, 2012), além de forte associação com o desenvolvimento do câncer de próstata (Zhou *et al*, 2013).

No entanto, Zhai *et al*. (2006) estudaram o polimorfismo rs2234693 do gene do *ESR1* em pacientes com cirrose hepática e hepatite crônica B e sugerem que o mesmo polimorfismo pode conferir maior susceptibilidade para hepatite crônica B. Achados de Liu *et al*. (2014) apontam para que o genótipo CC do polimorfismo rs2234693 possui uma maior associação com o aumento de suscetibilidade à hepatite B crônica, ao risco de cirrose hepática e um aumento de quase 2 vezes do risco do desenvolvimento de CHC quando comparados ao genótipo TT. Yin *et al*. (2004) compararam as frequências de variantes de genes que estão envolvidos na biogênese, hidroxilação e inativação dos metabólitos reativos dos estrogênios em pacientes com CHC, bem como sua relação com o risco no sexo feminino. Os resultados deste estudo sugerem fortemente que o estrogênio desempenha um importante papel na hepatocarcinogênese no sexo feminino.

Diversos SNPs foram descritos nos genes *ESR1* e *ESR2*. Muitos estudos de associação com diversas situações fisiológicas e patológicas, como a doença cardiovascular, já foram realizados investigando algumas dessas variantes, porém muitas vezes com resultados contraditórios (Almeida; Hutz, 2007). As variantes mais comumente estudadas no *ESR1* são o *IVS1-397T>C* e o *IVS1-351A>G* no primeiro íntron e a mutação silenciosa *+261G>C* no éxon 1, enquanto que, no *ESR2*, dois polimorfismos bastante estudados e com possíveis implicações funcionais são o *1082G>A*, uma mutação silenciosa no éxon 5, e o *1730A>G* na região 3' não traduzida do gene. No entanto, como muitas vezes os estudos que visam replicar achados anteriores na associação desses polimorfismos nos genes *ESR1* e *ESR2* têm encontrado associações em direções opostas (Almeida; Hutz, 2007), uma investigação mais detalhada de outros polimorfismos nesses genes pode auxiliar na elucidação do papel desses polimorfismos na variabilidade da ação desses receptores.

Quando estudos de associação de polimorfismos genéticos apresentam resultados contraditórios e em diferentes amostras, pode-se estar evidenciando que diferentes variantes estão agindo em conjunto ou que a verdadeira variante genética que ocasiona alteração na expressão ou na estrutura desses receptores pode estar em desequilíbrio de ligação parcial com a variante estudada. Recentemente, Nilsson *et al.* (2007) investigaram 23 *tag-SNPs* no *ESR1* e 11 *tag-SNPs* no *ESR2*, cobrindo a maior parte da variação haplotípica de cada gene, de acordo com os dados do *HapMap*. Os dados desse estudo e do *HapMap* indicam que o gene *ESR1* possui nove blocos haplotípicos e o gene *ESR2* possui 3 blocos. A investigação de um SNP dentro de cada bloco haplotípico, nos dois genes, pode auxiliar no esclarecimento de em qual ou quais blocos haplotípicos estão localizadas as variantes verdadeiramente funcionais.

## 1.9 Referências bibliográficas

Agência Internacional de Pesquisa sobre câncer. Iarc. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/>>. Acesso em: 20 de Fevereiro de 2016.

Almeida S, Hutz MH. Genetic variation of estrogen metabolism and the risks of cardiovascular disease. *Current Opinion in Investigational Drugs*. 2007;8:814-820.

Alter MJ. Epidemiology of hepatitis C virus infection. *World J Gastroentero*. 2007;113:2436-2441.

Araujo KL, Madeira KP, Daltoé RD, *et al.* O papel dos polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) PvuII e Xba I e das Pequenas Repetições em Tandem (STRs) (TA)<sub>n</sub> e (GT)<sub>n</sub> do Receptor de Estrogênio alfa (ESR1) na Suscetibilidade do Cancer de Mama (BRCA). *Revista Brasileira de Cancerologia*. 2009;55:185-192.

Balasubramanian SP, Cox A, Brown NJ, Reed MW. Candidate gene polymorphisms in solid cancers. *Eur J Surg Onco*. 2004;30:593-601.

Belghiti J, Hiramatsu K, Benoist S. Seven hundred forty-seven hepatectomies in the 1990s: an update to evaluate the actual risk of liver resection. *J Am Coll Surg*. 2000;191:39-46.

Bennett JW, Klich M. Mycotoxins. *Clin Microbiol Rev*. 2003;16:497-516.

Bismuth H, Majno PE, Adam R. Liver transplantation for hepatocellular carcinoma. *Semin Liver Dis*. 1999;19:311-322.

Bodo C, Rissman E. New roles for estrogen receptor  $\beta$  in behavior and neuroendocrinology. *Frontiers in Neuroendocrinology*. 2006;27:217–232.

Bosch FX, Ribes J, Diaz M, *et al*. Primary liver cancer: worldwide incidence and trends. *Gastroenterology*. 2004;127:S5-S16.

Bralet MP, Pichard V, and Ferry N. Demonstration of direct lineage between hepatocytes and hepatocellular carcinoma in diethylnitrosamine-treated rats. *Hepatology*. 2002;36:623-630.

Bressac B, Kew M, Wands J, Ozturk M. Selective G to T mutations of p53 gene in hepatocellular carcinoma from southern Africa. *Nature*. 1991;350:429–431.

Brose MS, Smyrk T, Weber B, *et al*. Genetic predisposition to cancer - cancer etiology. In: Bast RC Jr, Kufe DW, Pollock RE, Weichselbaum RR, Holland JF, Frei E, editors. *Cancer medicine*. 2000;168-184.

Bruix J, Salà M, Llovet JM. Chemoembolization for hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology*. 2004;127:S179-S188.

Bruix J. and Sherman M. Management of hepatocellular carcinoma: An update *Hepatology*. 2011;53:1020-1022.

Bruix J, Reig M, Sherman M. Evidence-Based Diagnosis, Staging, and Treatment of Patients With Hepatocellular Carcinoma. *Gastroenterology*. 2016;150:835-853.

Butler JM. *Forensic DNA typing: biology, technology, and genetics of STR markers*. Elsevier Academic Press. 2005;201-239.

Caldwell S, Park SH. The epidemiology of hepatocellular cancer: from the perspectives of public health problem to tumor biology. *J Gastroenterology*. 2009;44:96-101.

Carrilho FJ, Kikuchi L, Branco F, *et al*. Clinical and epidemiological aspects of hepatocellular carcinoma in Brazil. *Clinics*. 2010;65:1285-1290.

Casazza K, Page GP and Fernandez JR. The Association Between the rs2234693 and rs9340799 Estrogen Receptor alfa Gene Polymorphisms and Risk Factors for Cardiovascular Disease: A Review. *Biological Research for Nursing*. 2010;12: 84-97.

Cervello M & Montalto G. Cyclooxygenases in hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol*. 2006;12:5113-5121.

Centers for Disease Control and prevention. Disponível em: <http://www.cdc.gov>. Acesso em 18 de Fevereiro de 2016.

Cheng A, Kang Y, Chen Z, *et al.* Efficacy and safety of sorafenib in patients in the Asia-Pacific region with advanced hepatocellular carcinoma: a phase III randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet Oncol.* 2009;10:25-34.

Colombo M, Sangiovanni A. Etiology. In: Livraghi T, Makuuchi M, Buscarini L. Diagnosis and treatment of hepatocellular carcinoma. *Medical Media.* 2007;17-26.

Davis GL, Dempster J, Meler JD, *et al.* Hepatocellular carcinoma: management of an increasingly common problem. *Proc.* 2008;21:266–280.

De Jong KP, Wertenbroek MW. Liver resection combined with local ablation: where are the limits? *Dig Surg.* 2011;28:127-133.

De Maria N, Manno M, Villa E. Sex hormones and liver cancer. *Molecular and Cellular Endocrinology.* 2002;193: 59-63.

Deroo BJ, Korach KS. Estrogen receptors and human disease. *The Journal of Clinical Investigation.* 2006;116:561-570.

Donato F, Tagger A, Gelatti U, *et al.* Alcohol and hepatocellular carcinoma: the effect of lifetime intake and hepatitis virus infections in men and women. *Am J Epidemiol.* 2002;155:323-331.

Duffy MJ, Duffy GJ. Estradiol receptors in human liver. *J Steroid Biochem.* 1978;9:233-235.

Elroy PW, Dickson SN, George E, *et al.* Familial hepatocellular carcinoma in a endemic area: two case reports. *BMC Res Notes.* 2015;8:415.

El-Serag HB, Rudolph KL. Hepatocellular carcinoma: epidemiology and molecular carcinogenesis. *Gastroenterology.* 2007;132:2557-2576.

El-Serag HB, Tran T & Everhart JE. Diabetes increases the risk of chronic liver disease and hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology.* 2004;126:460-468.

Enmark E, Peltö-Huikko M, Grandien K, Lagercrantz S, Lagercrantz J, Fried G *et al.* Human estrogen receptor beta-gene structure, chromosomal localization, and expression pattern. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism.* 1997;82:4258-4265.

Farinati F, Cardin R, Bortolami M, Grottola A, Manno M, Olantoni A, Villa E. Estrogens receptors and oxidative damage in the liver. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 2002;193:85-88.

Farrell GC & Larter CZ. Nonalcoholic fatty liver disease: from steatosis to cirrhosis. *Hepatology*. 2006;43:S99-S112.

Fattovich G, Stroffolini T, Zagni I, *et al.* Hepatocellular carcinoma in cirrhosis: incidence and risk factors. *Gastroenterology*. 2004;127:S35-50.

Ferlay J, Parkin DM, Curado MP, *et al.* Cancer incidence in five continents, volumes I to X: IARC CANCER Base No. 10 [Internet]. 2014. Disponível em: <http://ci5.iarc.fr>. Acesso em: 05 de Agosto de 2015.

Forner A, Llivet JM, Bruix J. Hepatocellular Carcinoma. *Lancet*. 2012;379:1245-1255.

Giantrapani L, Soresi M, La Spada E, Cervello M, D'alessandro N, Mmonalto G. Sex hormones and risk of liver tumor. *Annals of New York Academy of Science*. 2006;89:228–236.

Gingery A, Subramaniam M, Pitel KS, Reese JM, Cicek M, Lindenmaier LB, *et al.* The effects of a novel hormonal breast cancer therapy, endoxifen, on the mouse skeleton. *PLoS ONE*. 2014;9:e98219.

Gonzalez MA, Goldenberg A, Triviño T, *et al.* Resultados do tratamento cirúrgico do carcinoma hepatocelular. *Einstein*. 2004;2:292-297.

Govaere O. e Roskams T. Pathogenesis and Prognosis of Hepatocellular Carcinoma at the Cellular and Molecular Levels. *Clinics in Liver Disease*. 2015;19:261–276.

Green S, Walter P, Kumar V, Krust A, Bornert J-M, Argos P *et al.* Human oestrogen receptor cDNA: sequence, expression and homology to v-erb-A. *Nature*. 1986;320:134-139.

Groopman JD, Wang JS, Scholl P. Molecular biomarkers for aflatoxins: from adducts to gene mutations to human liver cancer. *Can J Physiol Pharmacol*. 1996;74:203-209.

Gustafsson JA. New insights in oestrogen receptor (er) research – the ER $\beta$ . *European Journal of Cancer*. 1999;36:S16.

Instituto Nacional de Câncer. Inca. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/>>. Acesso em: 05 de Agosto de 2015.

Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global Cancer Statistics. *A Cancer Journal for Clinicians*. 2011;61:69-90.

Kalra M, Mayes J, Assefa S, Kaul AK, Rashmi K. Role of sex steroid receptors in pathobiology of hepatocellular carcinoma. *World Journal of Gastroenterology*. 2008;14:5945-5961.

Kiyosawa K, Umemura T, Ichijo T, *et al*. Hepatocellular carcinoma: recent trends in Japan. *Gastroenterology*. 2004;127:S17-S26.

Kuiper GGJM, Enmark E, Peltö-Huikko M, Nilsson S, Gustafsson J-A. Cloning of a novel estrogen receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1996;93:5925-5930.

Hsu RA, Metcalf T, Sun JA, Welsh NJ, Wang CC, Harris. Mutational hot spot in the p53 gene in human hepatocellular carcinomas. *Nature*. 1991;350:427-428.

Lavanchy D. Evolving epidemiology of hepatitis C virus. *Clin Microbiol Infect*. 2011;2:107-115.

Lavarone M, Lampertico P, Seletti C, Francesca DM, Ronchi G, Del NE, Colombo M. The clinical and pathogenetic significance of estrogen receptor-beta expression in chronic liver diseases and liver carcinoma. *Cancer*. 2003;98:529-534.

Lee Y, Dominy JE, Choi YJ, Jurczak M, Tolliday N, Camporez JP, *et al*. Cyclin D1-Cdk4 controls glucose metabolism independently of cell cycle progression. *Nature*. 2014;510: 547-551.

Li WL, Xu L. Menopausal Status Modifies Breast Cancer Risk Associated with ESR1 PvuII and XbaI Polymorphisms in Asian Women: a HuGE Review and Meta-analysis. *Asian Pacific journal of cancer prevention*. 2012;13:5105-5112.

Lin CY, Vega VB, Thomsen JS, Zhang T, Kong SL, Xie M, Chiu KP. Whole-Genome Cartography of Estrogen Receptor a Binding Sites. *PLoS Genetics*. 2007;3:867-885.

Lin S, Hoffmann K, Schemmer P. Treatment of hepatocellular carcinoma: a systematic review. *Liver Cancer*. 2012;1:144-158.

Liu Y, Liu Y, Huang X, Sui J, Mo C, Wang J, *et al*. Association of PvuII e XbaI polymorphisms in estrogen receptor alpha gene with the risk of hepatitis B virus infection in the Guangxi Zhuang population. *Infection, Genetics and Evolution*. 2014;27:69-76.

Livraghi T, Meloni F, Di Stasi M, *Et al.* Sustained complete response and complications rates after radiofrequency ablation of very early hepatocellular carcinoma in cirrhosis: Is resection still the treatment of choice? *Hepatology*. 2008;47:82-89.

Llovet JM, Bisceglie AM, Bruix J, *et al.* For the Panel of Experts in HCC-Design Clinical Trials: Design and Endpoints of Clinical Trials in Hepatocellular carcinoma. *J Natl Cancer Inst*. 2008;100:698-711.

Llovet JM, Bruix J. Systematic review of randomized trials for unresectable hepatocellular carcinoma: Chemoembolization improves survival. *Hepatology*. 2003;37: 429-442.

Llovet JM, Ricci S, Mazzaferro V, *et al.* Sorafenib improves survival in advanced hepatocellular carcinoma (HCC): results of a phase III randomized placebo-controlled trial. *J Clin Oncol*. 2007;25:LBA1.

Llovet JM, Ricci S, Mazzaferro, V. *et al.* Sorafenib in Advanced Hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med*. 2008;359:378-390.

Llovet JM. Updated treatment approach to hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol*. 2005;40:225-235.

Lodish H, Berk A, Zipurski SL, Matsudaira P, Baltimore D, Darnel J. Análise genética em biologia molecular. In: Nader HB, editor. *Biologia celular e molecular*. Rio de Janeiro: Revinter, 2002.

Lopez PM, Villanueva A, Llovet JM. Systematic review: evidence-based management of hepatocellular carcinoma--an updated analysis of randomized controlled trials. *Alim Pharmacol Therap*. 2006;23:1535-1547.

Ma WL, Hsu CL, Yeh CC, Wu MH, Huang CK, Jeng LB, *et al.* Hepatic androgen receptor suppresses hepatocellular carcinoma metastasis through modulation of cell migration and anoikis. *Hepatology*. 2012;56:176–185.

Marques JMS. Rastreio dos polimorfismos genéticos XbaI e PvuII dos receptores de estrogênios alfa na consulta de ginecologia oncológica do centro hospitalar Cova de Beira. 2011. 67 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade da Beira Interior, Covilhã – Portugal, 2011.

Mazzaferro V, Regalia E, Doci R, *et al.* Liver transplantation for the treatment of small hepatocellular carcinoma in patients with cirrhosis. *N Engl J Med*. 1996;334:693-699.

- Miceli V, Cocciadiferro L, Fregapane M, Zarcone M, Montalto G, Polito LM, Agostara B, Granata OM, Carruba G. Expression of wild-type and variant estrogen receptor alpha in liver carcinogenesis and tumor progression. *OMICS*. 2011;15:1-5.
- Molteni A, Bahu RM, Battifora HA, Fors EM, Reddy JK, Rao MS, Scarpelli DG. Estradiol receptor assays in normal and neoplastic tissues. A possible diagnostic acid for tumor differentiation. *Ann Clin Lab Sci*. 1979;9:103-108.
- Morgan TR, Mandayam S, Jamal MM. Alcohol and hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology*. 2004;127(5 Suppl 1):S87-96.
- Nagasue N, Ito A, Yukaya H, Ogawa Y. Estrogen receptors in hepatocellular carcinoma. *Cancer*. 1986;57:87-91.
- Nakashima O, *et al*. Pathomorphologic characteristics of small hepatocellular carcinoma: a special reference to small hepatocellular carcinoma with indistinct margins. *Hepatology*. 1995;22:101-105.
- Neven P. The origin of postmenopausal oestrogens. *European Journal of Cancer*. 2002;38:29-30.
- Nilsson M, Dahlman I, Jiao H, Gustafsson J-K, Arner P, Dahlman-Wright K. Impact of estrogen receptor gene polymorphisms and mRNA levels on obesity and lipolysis – a cohort study. *BMC Medical Genetics*. 2007;8:73.
- Numan M, Insel TR. *The Neurobiology of Parental Behavior*. New York: Springer-Verlag. 2003.
- Omoya T, Shimizu I, Zhou Y, Okamura Y, Inoue H, Lu G, *et al*. Effects of idoxifene and estradiol on NFkappaB activation in cultured rat hepatocytes undergoing oxidative stress. *Liver*. 2001;21:183-191.
- Ozaras R, Tahan V. Acute hepatitis C: prevention and treatment. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2009;7:351-361.
- Pacchioni D, Papotti M, Andorno E, Bonino F, Mondardini A, Oliveri F, Brunetto M, Bussolati G, Negro F. Expression of estrogen receptor mRNA in tumorous and non-tumorous liver tissue as detected by in situ hybridization. *J Surg Oncol Suppl*. 1993;3:14-17.
- Pár A. Prophylaxis and treatment of chronic viral hepatitis as the prevention of hepatocellular carcinoma. *Orv Hetil*. 2009;150:19-26.

Paydas S, Ersöz C, Sahin B, Gölnüsün G, Seyrek E, Yilmaz, A. Estrogen and progesterone receptor contents in hepatocellular carcinoma. *Journal of Islamic Academy of Sciences*. 1992;5:300-304.

Pimenta JR, Massabki PS. Carcinoma Hepatocelular: um panorama clínico. *Revista da Sociedade Brasileira de Clínica Médica*. 2010;8:59-67.

Savaglia C, de Carlis L, Alberti AB, *et al*. Predictors of long-term survival after liver transplantation for hepatocellular carcinoma. *Am J Gastroenterol*. 2005;100:2708-2716.

Sharpe RM. The roles of oestrogen in the male. *Trends in Endocrinology and Metabolism*. 1998;9:371-377.

Souza MA, Fonseca AM, Bagnoli VR, Junior JMS, Barros N, Franzlin SOB, *et al*. Polimorfismo do gene do receptor estrogênico como fator de risco do câncer de mama. *FEMINA*. 2012;40:179-186.

Streicher W, Luedeke M, Azoitei A, Zengerling F, Herweg A, Genze F, *et al*. Stilbene induced inhibition of androgen receptor dimerization: implications for AR and ARDeltaLBD-signalling in human prostate cancer cells. *PLoS ONE*. 2014;9:e98566.

Tan A, Yeh SH, Liu CJ, *et al*. Viral hepatocarcinogenesis: from infection to cancer. *Liver Int*. 2008;28:175-188.

The Human Genome. Disponível em: <<http://genome.wellcome.ac.uk/>>. Acesso em: 05 de Agosto de 2015.

Thorgeirsson SS & Grisham JW. Molecular pathogenesis of human hepatocellular carcinoma. *Nat Genet*. 2002;31:339-46.

Ueno Y, Sollano JD, Farrell GC. Prevention of hepatocellular carcinoma complicating chronic hepatitis C. *J Gastroenterol Hepatol*. 2009;24:531-536.

Veldt BJ, Heathcote EJ, Wedemeyer H, *et al*. Sustained virologic response and clinical outcomes in patients with chronic hepatitis C and advanced fibrosis. *Ann Intern Med*. 2007;147:677-684.

Wang AG, Lee Ky, Kim SY, Choi JY, Lee KH, Kim WH, *et al*. The Expression of Estrogen Receptors in Hepatocellular Carcinoma in Korean Patients. *Yonsei Medical Journal*. 2006;47:811-816.

Wei CD, Zheng HY, We W, Dai W, Tong YQ, Wang M, Li Y. Meta- Analysis of the Association of the Rs2234693 and Rs9340799 Polymorphisms of Estrogen Receptor Alpha Gene with Coronary Heart Disease Risk in Chinese Han Population. *International Journal of Medical Sciences*. 2013;10:457-466.

Wilhelm SM, Carter C, Tang L, *et al*. BAY 43-9006 exhibits broad spectrum oral antitumor activity and targets the RAF/MEK/ERK pathway and receptor tyrosine kinases involved in tumor progression and angiogenesis. *Cancer Res*. 2004;64:7099-7109.

Yan Z, Tan W, Xu B, Dan Y, Zhao W, Deng C, *et al*. A cis-acting regulatory variation of the estrogen receptor alpha (ESR1) gene is associated with hepatitis B virus-related liver cirrhosis. *Human Mutation*. 2011;32:1128–1136.

Yang HI, Lu SN, Liaw YF, *et al*. Taiwan Community-Based Cancer Screening Project Group. Hepatitis B e antigen and the risk of hepatocellular carcinoma. *N Eng J Med*. 2002;347:168-74.

Yin PH, Lee HC, Chau GY, Liu TY, Liu HC, Lui WY, *et al*. Polymorphisms of estrogen-metabolizing genes and risk of hepatocellular carcinoma in Taiwan females. *Cancer Letters*. 2004;30:195-201.

Yu MW, Hsu FC, Sheen IS, *et al*. Prospective study of hepatocellular carcinoma and liver cirrhosis in asymptomatic chronic hepatitis B virus carriers. *Am J Epidemiol*. 1997;145:1039-1047.

Yuan X, Zhou G, Zhai Y, Xie W, Cui Y, Cao J, *et al*. Lack of association between the functional polymorphisms in the estrogen metabolizing genes and risk for hepatocellular carcinoma. *Cancer, Epidemiology, Biomarkers & Prevention*. 2008;17:3621-3627.

Zhai Y, Zhou G, Deng G, Xie W, Dong X, Zhang X, *et al*. Estrogen receptor alpha polymorphisms associated with susceptibility to hepatocellular carcinoma in hepatitis B virus carriers. *Gastroenterology*. 2006;130:2001-2009.

Zhao C, Dahlman-Wright K, Gustafsson J-A. Estrogen receptor  $\beta$ : an overview and update. *Nuclear Receptor Signaling*. 2008;6:e003.

Zhao ZY, San M, Duprey JL, arrand JR, Vyle JS, Tucker JH. Detection of single nucleotide polymorphisms within a sequence of a gene associated with prostate cancer using a fluorophore-tagged DNA probe. *Bioorg Med Chem Lett*. 2012;22:129-132.

Zhou X, Gu Y, Wang DN, Ni S, Yan J. Eight Functional Polymorphisms in the Estrogen Receptor 1 Gene and Endometrial Cancer Risk: A Meta-Analysis. *PLoS ONE*. 2013;8:1-10.

## 2 JUSTIFICATIVA

Tendo em vista a elevada prevalência do CHC e o impacto que promove na sobrevida dos pacientes, torna-se fundamental que se busque maior entendimento do comportamento biológico desta doença, pois o conhecimento de sua patogênese molecular ainda é limitado.

Com base nas escassas opções de tratamento com intenções curativas que estão disponíveis para o CHC, estudos moleculares baseados em perfis genéticos podem ser utilizados para prever prognóstico e resposta terapêutica, com potencial benéfico para os pacientes, através da identificação de marcadores que permitam a detecção precoce da doença e que possam informar sobre estratégias de tratamento adequadas. A realização de pesquisas que ajudem na compreensão de fatores que possam atuar no funcionamento do CHC, dentre eles os genéticos, são de extrema importância e interesse para a comunidade científica.

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo geral**

Investigar a associação de polimorfismos dos genes *ESR1* e *ESR2* com a suscetibilidade ao CHC em conjunto com fatores etiológicos já estabelecidos.

#### **3.2 Objetivos específicos**

Analisar a associação dos polimorfismos rs2234693, rs1643821 e rs3020432 do gene *ESR1* com o CHC.

Analisar a associação dos polimorfismos rs4986938, rs4365213 e rs17179740 do gene *ESR2* com o CHC.

Analisar os polimorfismos investigados com parâmetros como idade, gênero, etiologia na suscetibilidade ao CHC.

Comparar a expressão do ER através da técnica de imuno-histoquímica em pacientes caso e controle.

## 4 ARTIGOS

### 4.1 Artigo 1: *Hepatocellular carcinoma and estrogen receptors: Polymorphisms and isoforms relations and implications*

BALDISSERA, V.D.<sup>a</sup>; ALVES, A.F.<sup>a</sup>; ALMEIDA, S.<sup>a</sup>; PORAWSKI, M.<sup>b</sup>; GIOVENARDI, M.<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA), Porto Alegre, Brazil.

<sup>b</sup> Programa de Pós-Graduação em Medicina: Hepatologia, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA), Porto Alegre, Brazil.

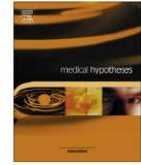
Publicado na Revista: *Medical Hypotheses*

Fator de Impacto 1.136



Contents lists available at ScienceDirect

## Medical Hypotheses

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/mehy](http://www.elsevier.com/locate/mehy)

# Hepatocellular carcinoma and estrogen receptors: Polymorphisms and isoforms relations and implications

V.D. Baldissera<sup>a,1</sup>, A.F. Alves<sup>a,1</sup>, S. Almeida<sup>a</sup>, M. Porawski<sup>b</sup>, M. Giovenardi<sup>a,\*</sup><sup>a</sup>Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA), Porto Alegre, Brazil<sup>b</sup>Programa de Pós-Graduação em Medicina: Hepatologia, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA), Porto Alegre, Brazil

### ARTICLE INFO

Article history:  
Received 17 July 2015  
Accepted 29 November 2015

### ABSTRACT

Hepatocellular carcinoma (HCC) is the most common primary tumor of liver and its incidence continues to increase worldwide. HCC is a disease with multifactorial causes and genetic variability has been discussed as a risk factor for its development. Liver is a hormone-sensitive organ and therefore is influenced by gonadal hormones, such as estrogen. Estrogen is known to participate in various biological functions, but its role in development of HCC, on the other hand, is controversial and presents evidence suggesting a role as both a carcinogen and protective effect in liver. Estrogen way of action is mediated by estrogen receptor alpha (ER $\alpha$ ) and estrogen receptor beta (ER $\beta$ ), that belong to a family of nuclear receptors that may regulate the expression of many genes. The ER subtypes exert a variety of roles in many stages of liver disease and may play a part in the process of signal transduction, according to some studies. However, the many functions of ER subtypes in hepatic diseases, in special of the ER $\beta$ , are yet to be clarified.

The genetic modifications related to HCC are not yet fully clarified and accumulation of multiple genetic alterations appears to have an important role in carcinogenesis of HCC. The presence of some certain single nucleotide polymorphism (SNP) may have a functional repercussion related to final product of a gene, which can be measured and may participate in some alterations related to a pathological condition.

Our hypothesis is based on the fact that liver tissue express ER and its different variants exert multiple functions in various stages of liver disease and participate in an extremely complicated signal transduction process, therefore we believe that the presence of one or more SNPs of *ESR1* and *ESR2* genes may be related with the increase of risk in developing and the severity of HCC, as well as in the response to different treatments. The confirmation of our hypothesis by scientific studies may provide knowledge of markers that act as prognostic factors of this disease, as well as enabling alternatives to development of anti tumoral therapies.

© 2015 Elsevier Ltd. All rights reserved.

### Introduction

#### Hepatocellular carcinoma

Hepatocellular carcinoma (HCC) is the most common primary tumor of liver and its incidence continues to increase worldwide, especially in areas with low incidence [1]. HCC is a disease with multifactorial causes where 95% of patients have underlying chronic liver diseases, particularly of viral etiology [2,3]. The main

etiological agents to HCC are liver diseases related to hepatitis B virus (HBV), hepatitis C virus (HCV) and alcohol intake. Other causes are also related, representing a minor global impact, and are nonalcoholic steatohepatitis (NASH), hemochromatosis, exposure to B1 aflatoxin, autoimmune hepatitis, primary biliary cirrhosis and some hepatic metabolic diseases [4,5].

The incidence of HCC varies considerably according to geographical region. In Asia and Africa, HBV is the predominant risk factor, whereas in the west and in Japan, HCV is the most relevant factor. The age group with the highest prevalence in the United States and Europe is between the 6th and 7th decade, whereas in areas of high incidence, tumor occurs in younger patients, between the 3rd and 5th decades [1,5,6]. In Brazil, annual incidence of HCC is 2.9% and the main causes were associated with HCV, HBV and alcohol [3].

\* Corresponding author at: Rua Sarmento Leite, 245/308, 90050-170 Porto Alegre, RS, Brazil. Tel.: +55 51 3303 8751.

E-mail address: [giovenardi.marcia@gmail.com](mailto:giovenardi.marcia@gmail.com) (M. Giovenardi).

<sup>1</sup> These authors contributed equally to the present study.

Genetic variability has been discussed as a risk factor for development of HCC, since many of patients exposed to known environmental risk factors never develop cirrhosis or HCC, whereas a significant minority of cases of the disease has developed HCC without presenting any risk factor [7].

Epidemiological studies indicate that incidence of HCC is higher in men than in women, and the risk of HCC is 2–7 times higher in men, though this ratio varies between different countries. This is mainly for three reasons: (a) men would be more exposed to hepatic carcinogens (tobacco or alcohol) and hepatitis B virus infections; (b) the effects of estrogen may suppress the inflammatory process mediated by interleukin-6 (IL-6) in women, reducing hepatic injury and the compensatory proliferation of hepatocytes; and (c) the effects of testosterone may increase signaling androgen receptor in men, promoting proliferation of hepatocytes [5,8]. Given this characteristic gender-specific, significantly relevant, study of the role of sex steroids and their relationship with HCC is of great importance, since the mechanisms of action of these hormones in development of HCC are still poorly understood [8].

#### Estrogen receptors

Liver is a hormone-sensitive organ and therefore is influenced by gonadal hormones, such as estrogen [9]. Estrogen is a steroid hormone produced in greater amounts by ovary and placenta, and in lower quantities, by testicles, cortex of the adrenal, brain, adipose tissue, breast, skin, blood vessels, bone and cartilage [10]. It is known to participate in various biological functions such as growth, differentiation and metabolism in mammals [11], reproduction, bone integrity, cardiovascular function and liver function [12–14].

The role of estrogen in development of HCC is controversial and presents evidence suggesting a role as both a carcinogen and protective effect in liver [15–17].

The estrogen way of action is mediated by two receptors: estrogen receptor alpha (ER $\alpha$ ) and estrogen receptor beta (ER $\beta$ ), that belong to a family of nuclear receptors that may regulate the expression of many genes [8]. The estrogen receptor (ER) is a transcription factor activated by ligand, which is composed of one estrogen binding domain and one DNA binding domain. ER $\alpha$  and ER $\beta$  are encoded by distinct genes *ESR1* and *ESR2*, respectively, and are located on different chromosomes [11,14]. Both ER subtypes are expressed in HCC and interact with each other [18]. The ER subtypes exert a variety of roles in many stages of liver disease and may play a part in the process of signal transduction, according to some studies [19]. However, the many functions of ER subtypes in hepatic diseases, in special of the ER $\beta$ , are yet to be clarified and have been object of studies for a long time [19,20]. The majority of biological effects of the estrogen in the liver is also known as mediated by ER $\alpha$  [21] and that it presents different isoforms and their expressions vary depending if tissue is healthy, cirrhotic or with HCC [22]. The process by which ER subtype pattern expression, and its isoforms pattern expression, modifies in hepatocarcinogenesis, though, is yet to be elucidated [19].

#### Estrogen receptors isoforms

As explained above, ER has two subtypes of receptors: ER $\alpha$  and ER $\beta$ . However, due to the splicing mechanism, the two subtypes of receptors may have different isoforms, since modification of pre-mRNA is capable of generating multiple products, diversifying the pattern of proteins produced [23,24]. The role and influence that these isoforms may play in signaling of ERs is still being studied [24].

In humans, more than twenty isoforms to ER $\alpha$  has been described in some tumors. Both ER $\alpha$ 46 and ER $\alpha$ 36 are the most

studied isoforms. ER $\alpha$ 46 isoform appears to be related with cell cycle arrest in the G0/G1 phase and a state of refractor to E2 stimulated growth, which is normally reached at hyperconfluency of cells [24]. It also appears to be involved in the role of inhibiting others transcripts involved in cell cycle control. ER $\alpha$ 36, in turn, appears to be related to an increase of cell proliferation by MAPK-ERK activation [24].

As for ER $\beta$ , at least five isoforms has been described in human tissue, however its functional significance is not yet well understood [24]. Among the isoforms, stands out ER $\beta$ 2 as the best studied. Its role appears to be associated with inhibition of ER $\alpha$ . A possible process suggested by authors is that, by degradation of ER $\alpha$  by ER $\beta$ 2, occur less recruitment of ER $\alpha$  by estrogen-responsive promoters and that could leave to a suppression of genes responsible for ER $\alpha$  regulation [25].

#### Estrogen receptors and genetic variability

The genetic modifications related to HCC are not yet fully clarified. But, such as in others tumors, accumulation of multiple genetic alterations appear to have an important role in carcinogenesis of HCC [26].

Genetic polymorphisms are DNA sequence variations, which the least common allele must have a frequency of 1 per cent or more in the population. One of the most studied types is single nucleotide polymorphism (SNP), which is resulting of a single nucleotide substitution. The presence of some certain polymorphisms may have a functional repercussion related to final product of a gene, which can be measured and may participate in some alterations related to a pathological condition. Thus, in some cases, a genetic polymorphism may increase susceptibility to cancer [27].

Several polymorphisms have been described to *ESR1* and *ESR2* genes and some studies demonstrated a clear association of some polymorphisms, as rs2234693 and rs9340799, with risk of breast and endometriosis cancer development ([28], see review in [18]), and a consistent association with development of prostate cancer (see review in [18]). In these cases, literature indicates that polymorphisms in genes involved with metabolic pathway of sex hormones may alter the exposure of body to exogenous sex hormones and affect the risk of tumor development. In addition, these genetic variations are pointed as possible contributors to aberrant expression of ERs, by modifying its structure and mechanism of action, which may be related to increased risk for such cancers ([28], review in [18]). Nonetheless, just a few studies on genetic variability of ERs and liver diseases were performed, besides, studies that aim to replicate previous findings of these associations, for various reasons, have found contradictory results [29].

In animal model, estrogen has been described as a tumor promoter, having the possibility of inducing hepatocarcinogenesis. A relation between ERs expression and estrogen-induced tumor formation was demonstrated in MT-mFSR transgenic mouse [30]. Another study demonstrated that 8 per cent of female rats that received ethinyl-estradiol (EE) treatment for twelve months developed HCC, therefore revealing that EE causes mutation of hepatocytes that leads to adducts DNA formation and induces development of cancer in affected cells [8].

On the other hand, a genetic variation, such as a SNP, not always will lead to a modification of receptor structure and, consequently, lead to an effect. The lack of association between SNPs and cancer, for example, can be found in some studies that showed rs9340799 polymorphism had no association with the risk to HCC [30,31], as well as rs1801132 polymorphism had no association of cancer risk, in pooled analysis, in another study (see review in [32]). The rs2077647 variant, however, showed association with risk to HCC development, but not for others cancers such as colorectal, breast and prostate cancer (see review in [32]).

A more detailed investigation of polymorphisms of the genes cited above and its relation with HCC are of great importance and clinical relevance since it could help to elucidate the role of these polymorphisms in the variability of these receptors action.

### Hypothesis

ERs polymorphisms may be related to alteration of its receptors activity and expression, by changing sequence of binding of transcription factors or by influencing in the alternative *splicing* of mRNA. Thereby, alternative *splicing* generates stable protein translation with different abilities of binding to estrogen, translocation to nucleus and interaction with DNA [33], which could generate changes in receptor structure and physiologic activity [11].

Therefore, our hypothesis is based on the fact that liver tissue express ERs and its different variants exert multiple functions in various stages of liver disease and participate in an extremely complicated signal transduction process, therefore we believe that the presence of one or more SNPs of *ESR1* and *ESR2* genes may be related with the increase of risk in developing and the severity of HCC, as well as in the response to different treatments.

Thus, more conclusive studies and evidences in this topic become essential since the expression of the ER $\alpha$  variants could serve as a potential prognostic indicator for HCC, providing a novel target for HCC treatment and improving patient response in the already existence therapies.

### Integrating the hypothesis

According to our hypothesis, a modification in important sequences of *ESR1* and *ESR2* genes may increase susceptibility to HCC, since genetics variations can modify proteins expression and/or activity and, consequently, its effect on cellular environment. Besides, it is necessary to consider that the pattern of expression of different ER $\alpha$  variants, changes when we compare healthy hepatic tissue with unhealthy one. Thereby, these differences in expression pattern could be used as a consistent predictor to HCC carrier patient [19]. Previous study [19] showed that individuals with healthy liver have high expression pattern of ER $\alpha$ -36; cirrhotic patients have moderate expression pattern of ER $\alpha$ -66, ER $\alpha$ -46 and ER $\alpha$ -36; patients with HCC don't have expression of ER $\alpha$ -66, but have a moderate expression of ER $\alpha$ -46 and a high expression of ER $\alpha$ -36.

Further, along with genetic variability of the individual, we add other risk factors that participate in the process of carcinogenesis, such as, lifestyle, exposure to viruses, chronic inflammatory processes, among others.

In this context, any agent that leads to a chronic liver injury and, eventually to cirrhosis is a potential oncogenic agent to HCC [34]. HCV, HBV and excessive alcohol intake are some of the factors that can influence in risk of developing HCC, besides NASH and others causes to cirrhosis are considered risk factors to HCC [3]. The most frequent risk factor is HBV, being responsible for more than half of the cases of HCC in the world, taking into account the ability of the virus in inducing DNA damage [35]. In turn, HCV is the leading cause of HCC in occidental countries, including USA and Brazil [3,5,34]. Alcohol, on the other hand, has the main role of accelerating progression of fibrosis in patients with hepatitis B and C, having, so, a synergistic effect [9,34]. Alcoholic disease is the second most important risk factor to HCC in occidental countries, after HCV [5].

The gender influence is another topic to be highlighted in this etiology. An increase in incidence of HCC in men comparing to women seems to consistently exist. Worldwide, incidence rates vary between 1.4 and 3.3 and about 157 registries pointed that

incidence rate of HCC, adjusted by age, to men presents a correlation coefficient of 0.953;  $p < 0.001$  [4]. Similarly, the risk factor for men is higher than to women when incidence rate is adjusted to others risk factors such as smoking, viruses' hepatitis and cirrhosis [1]. In countries with higher HCC incidence, gender disparity tends, even more, to men [4]. Initially, the main thought was that this gender disparity was only behavioral, since men are more exposed to risk factors because they have more alcohol intake and contract more commonly HCV and HBV when compared to women. However, studies [36] performed in animals pointed that an increase of 2–8 times of the risk of developing HCC in male mice appears to exist.

Studies demonstrated molecular evidences of carcinogenic effect of both sexual hormones. Knockout mice to androgen receptor (AR) expression in hepatocytes decreased development of HCC induced by diethylnitrosamine (DEN), suggesting that the activation by androgen receptor increases risk to HCC [37]. In HCC model of treated mice with DEN, a protective effect in hepatocytes, mediated by estrogen, from development of carcinogenesis, by inhibiting the IL-6 clearance by Kupffer cells, was demonstrated. Thus, gender difference in development of HCC may be attributed to both steroids hormones with distinct pathways of action in each gender and, therefore, steroids hormones receptors, and its ligands, may be included in the risk evaluation of developing HCC [37].

### Consequences of the hypothesis and discussion

The literature discuss an important relation between genetic variability and HCC, however, very few studies are about genetic variability of ERs and liver diseases. Some association studies between SNPs with a lot of physiological and pathological situations have been performed investigating some of these variants, although with contradictory results, one time having protector role another time as a risk factor. In order to elucidate this divergence, more detailed investigations of various polymorphisms in *ESR1* and *ESR2* genes and its association with increased risk of developing HCC are necessary.

HCC has a significant relevance in the context of world's health, because is the 5th most common malignancy of world e it is the second cause of death by cancer. In Brazil, HCC is in the 8th place in the list of tumors that more lead to death. Therefore, the performance of studies that may help in comprehension of HCC acting and its variables, as well as genetic susceptibility to HCC, is of great interest and importance.

It is interesting to consider that the if finding of Shi et al. (2014) is a way to predict, if we find polymorphisms related to receptors isoforms, this can become an easier method to evaluate a polymorphism. Thus, it could be turned in an idea to be used as prognostic that could, by this finding, induce behavioral changes in individuals with higher genetic risk.

The confirmation of our hypothesis by scientific studies may provide knowledge of markers that act as prognostic factors of this disease, as well as enabling alternatives to development of anti tumoral therapies based in estrogen receptors antagonists and improving the already existing therapies.

### Conflict of interest statement

None declared.

### Acknowledgment

CAPES – Brazil.

## References

- [1] El-Serag HB. Epidemiology of viral hepatitis and hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 2012;142(6):1264–73.
- [2] Gottesman MM, Fojo T, Bates SE. Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters. *Nat Rev Cancer* 2002;2:48–58.
- [3] 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.
- [4] Bosch FX, Ribes J, Diaz M, Cleries R. Primary liver cancer: worldwide incidence and trends. *Gastroenterology* 2004;127(1):S5–S16.
- [5] Yang JD, Roberts LR. Hepatocellular carcinoma: a global view. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2010;7(8):448–58.
- [6] Llovet JM, Ricci S, Mazzaferro V, et al. Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med* 2008;359:378–90.
- [7] El-Serag HB, Rudolph KL. Hepatocellular carcinoma: epidemiology and molecular carcinogenesis. *Gastroenterology* 2007;132:2557–76.
- [8] Kalra M, Mayes J, Assefa S, Kaul AK, Rahmi K. Role of sex steroid receptors in pathobiology of hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2008;14:5945–61.
- [9] Wang AG, Lee KY, Kim SY, et al. The expression of estrogen receptors in hepatocellular carcinoma in Korean patients. *Yonsei Med J* 2006;47:811–6.
- [10] Czajka-Oraniec I, Simpson ER. Aromatase research and its clinical significance. *Endokrinolog Pol* 2010;61(1):126–34.
- [11] Araujo KL, Madeira KP, Daltoé RD, et al. O papel dos polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) PvuII e Xba I e das pequenas repetições em tandem (STRs) (TA)<sub>n</sub> e (GT)<sub>n</sub> do receptor de estrogênio I $\alpha$  (ESR1) na suscetibilidade do cancer de mama (BRCA). *Rev Bras Cancerologia* 2009;55(2):185–92.
- [12] Nagasue N, Ito A, Yukaya H, Ogawa Y. Estrogen receptors in hepatocellular carcinoma. *Cancer* 1986;1986(57):87–91.
- [13] Numan M, Insel TR. The neurobiology of parental behavior. New York: Springer-Verlag; 2003.
- [14] Deroo BJ, Korach KS. Estrogen receptors and human disease. *J Clin Invest* 2006;116:561–70.
- [15] Omoya T, Shimizu I, Zhou Y, et al. Effects of idoxifene and estradiol on NF $\kappa$ B activation in cultured rat hepatocytes undergoing oxidative stress. *Liver* 2001;21:183–91.
- [16] Farinati F, Cardin R, Bortolami M, et al. Estrogens receptors and oxidative damage in the liver. *Mol Cell Endocrinol* 2002;193:85–8.
- [17] De Maria N, Manno M, Villa E. Sex hormones and liver cancer. *Mol Cell Endocrinol* 2002;193:59–63.
- [18] Zhou X, Gu Y, Wang DN, Ni S, Yan J. Eight functional polymorphisms in the estrogen receptor 1 gene and endometrial cancer risk: a meta-analysis. *PLoS One* 2013;8:1–10.
- [19] Shi L, Feng Y, Lin H, Ma R, Cai X. Role of estrogen in hepatocellular carcinoma: is inflammation the key? *J Transl Med* 2014;12:93.
- [20] Bruix J, Sherman M. Management of hepatocellular carcinoma: an update. *Hepatology* 2011;53:1020–2.
- [21] Yan Z, Tan W, Xu B, et al. A cis-acting regulatory variation of the estrogen receptor alpha (ESR1) gene is associated with hepatitis B virus-related liver cirrhosis. *Hum Mutat* 2011;32:1128–36.
- [22] Gonzalez MA, Goldenberg A, Triviño T, et al. Resultados do tratamento cirúrgico do carcinoma hepatocelular. *Einstein* 2004;2:292–7.
- [23] Taylor SE, Martin-Hirsch PL, Martin FL. Oestrogen receptor splice variants in the pathogenesis of disease. *Cancer Lett* 2010;288:133–48.
- [24] Sotoca AM, Vervoort J, Rietjens IMCM, Gustafsson J. Human ER $\alpha$  and ER $\beta$  splice variants: understanding their domain structure in relation to their biological roles in breast cancer cell proliferation. In: Ekinci Deniz, editor. *Biochemistry*. InTech; 2012. Available from: <<http://www.intechopen.com/books/biochemistry/human-er-and-er-splice-variants-understanding-their-domain-structure-in-relation-to-their-biological>> [accessed June, 2015].
- [25] Haldösen L, Zhao C, Dahlman-Wright K. Estrogen receptor beta in breast cancer. *Mol Cell Endocrinol* 2014;384:665–72.
- [26] Brose MS, Smyrk T, Weber B, et al. Genetic predisposition to cancer – cancer etiology. In: Bast Jr RC, Kufe DW, Pollock RE, Weichselbaum RR, Holland JF, Frei E, editors. *Cancer Medicine*. Ontario, Canada: BC Becker; 2000. p. 168–84.
- [27] The Human Genome. Available from: <<http://genome.wellcome.ac.uk/>> [accessed 02.06.14].
- [28] Souza MA, Fonseca AM, Bagnoli VR, et al. Polimorfismo do gene do receptor estrogênico como fator de risco do câncer de mama. *Femina* 2012;40:179–86.
- [29] Almeida S, Hutz MH. Genetic variation of estrogen metabolism and the risks of cardiovascular disease. *Curr Opin Invest Drugs* 2007;8:814–20.
- [30] Zhai Y, Zhou G, Deng G, et al. Estrogen receptor alpha polymorphisms associated with susceptibility to hepatocellular carcinoma in hepatitis B virus carriers. *Gastroenterology* 2006;130:2001–9.
- [31] Liu Y, Liu Y, Huang X, et al. Association of PvuII and XbaI polymorphisms in estrogen receptor alpha gene with the risk of hepatitis B virus infection in the Guangxi Zhuang population. *Infect Genet Evol* 2014;27:69–76.
- [32] Sun H, Hou J, Shi W, Zhang L. Estrogen Receptor 1 (ESR1) genetic variations in cancer risk: A systematic review and meta-analysis. *Clin Res Hepatol Gastroenterol* 2015;39:127–35.
- [33] Jakimiuk AJ, Nowicka M, Bogusiewicz M, et al. Prevalence of estrogen receptor PvuII and XbaI polymorphism in population of Polish postmenopausal women. *Folia Histochem Cytobiol* 2007;45(4):331–8.
- [34] Davis GL, Dempster J, Meier JD, et al. Hepatocellular carcinoma: management of an increasingly common problem. *Proc (Bayl Univ Med Cent)* 2008;21:266–80.
- [35] Forner A, Llovet JM, Bruix J. Hepatocellular carcinoma. *Lancet* 2012;379:1245–55.
- [36] Rudolph KL, Chang S, Millard M, Schreiber-Agus N, DePinho RA. Inhibition of experimental liver cirrhosis in mice by telomerase gene delivery. *Science* 2000;287:1253–8.
- [37] Yeh SH, Chen PJ. Gender disparity of hepatocellular carcinoma: the roles of sex hormones. *Oncology* 2010;78(1):172–9.

## 4.2 Artigo 2: Associação de polimorfismos do gene *ESR1* com Carcinoma Hepatocelular

Vanessa Dido Baldissera<sup>1</sup>, Andressa de Freitas Alves<sup>1</sup>, Lisiane Smiderle<sup>1</sup>, Carlos Thadeu Schmidt Cerski<sup>2</sup>, Paulo Roberto Ott Fontes<sup>3</sup>, Marilene Porawski Garrido<sup>3,4</sup>, Silvana Almeida<sup>1,4</sup>, Márcia Giovenardi<sup>1,4</sup>.

<sup>1</sup>Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Porto Alegre, Brasil.

<sup>2</sup>Professor Adjunto do Departamento de Patologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil.

<sup>3</sup>Programa de Pós-Graduação em Medicina: Hepatologia da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Porto Alegre, Brasil.

<sup>4</sup>Programa de Pós-Graduação em Biociências, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Porto Alegre, Brasil.

Será submetido à Revista: *World Journal of Gastroenterology*

Fator de Impacto 2.193

## Associação de polimorfismos do gene *ESR1* com Carcinoma Hepatocelular

Vanessa Dido Baldissera<sup>1</sup>, Andressa de Freitas Alves<sup>1</sup>, Lisiane Smiderle<sup>2</sup>, Carlos Thadeu Schmidt Cerski<sup>3</sup>, Paulo Roberto Ott Fontes<sup>4</sup>, Marilene Porawski Garrido<sup>4</sup>, Silvana Almeida<sup>1,5\*</sup>, Márcia Giovenardi<sup>1,5</sup>

<sup>1</sup>Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Porto Alegre, Brasil.

<sup>2</sup>Programa de Iniciação à Docência da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Porto Alegre, Brasil.

<sup>3</sup>Professor Adjunto do Departamento de Patologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil.

<sup>4</sup>Programa de Pós-Graduação em Medicina: Hepatologia da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Porto Alegre, Brasil.

<sup>5</sup>Programa de Pós-Graduação em Biociências, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Porto Alegre, Brasil.

\*Correspondência: Dra. Prof<sup>ª</sup>. Silvana Almeida

Rua: Sarmiento Leite, 245/309

Departamento de Fisiologia, Universidade Federal de Ciências da Saúde,

Porto Alegre, Rio Grande do Sul 90050-170, Brasil

Tel. 51-3303-8763

e-mail: salmeida@ufcspa.edu.br

## RESUMO

**INTRODUÇÃO:** O carcinoma hepatocelular (CHC) é a neoplasia hepática que representa o sexto tumor maligno mais frequente no mundo. A variabilidade genética tem sido discutida como fator de risco para o desenvolvimento do CHC, sendo os polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) os mais estudados. Diversos estudos destacaram o efeito dos hormônios sexuais na função hepática, sendo importante investigar a influência de polimorfismos nos receptores de estrogênio e o risco para o CHC. **OBJETIVOS:** Avaliar a associação de três SNPs do gene *ESR1* (rs3020432, rs1643821, rs2234693) com a suscetibilidade ao CHC em conjunto com fatores etiológicos já estabelecidos. **MÉTODOS:** Foram coletadas amostras de espécimes hepáticos armazenados em blocos de parafina de 92 pacientes casos e 103 pacientes controles, sem a doença e submetidos à biópsia hepática. Foi utilizada a extração de DNA, a quantificação por espectrofotometria e a análise dos SNPs por discriminação alélica utilizando sondas de hidrólise (TaqMan®) em um termociclador em tempo real. A comparação das frequências genotípicas entre os grupos caso e controle foi realizada pelo teste de Qui-quadrado de Pearson. Para a análise multivariada foi utilizada a regressão logística e as análises foram ajustadas utilizando como covariáveis sexo e vírus da hepatite C (VHC). **RESULTADOS E DISCUSSÃO:** O sexo masculino foi o mais prevalente representando 70,7% dos pacientes no grupo caso e 70,9% no grupo controle. A média de idade foi de 56,7±9,0 anos no grupo caso e de 50,9±11,8 anos no grupo controle. A presença de cirrose e VHC foi mais frequente nos casos do que nos controles. O genótipo G/G do rs3020432, os portadores do alelo T do rs1643821 e portadores do alelo do C do rs2234693 foram mais frequentes no grupo caso do que no grupo controle ( $p < 0,001$ ,  $p = 0,001$  e  $p = 0,002$ , respectivamente). A análise multivariada revelou um aumento de risco para o CHC do genótipo G/G do rs3020432 (OR = 4,43; 95% CI 1,91-10,26;  $p = 0,001$ ), da presença do alelo T do rs1643821 (OR = 2,69; 95% CI 1,18-6,14;  $p = 0,018$ ) e da presença do alelo C do rs2234693 (OR = 2,41; 95% CI 1,17-4,94;  $p = 0,017$ ). A presença de VHC identificou um aumento de risco de 4,99 vezes maior de desenvolver o CHC (95% CI 2,50-10,00;  $p < 0,001$ ). **CONCLUSÃO:** Portadores do genótipo G/G do rs3020432, do alelo T do rs1643821 e do alelo C do rs2234693 do gene *ESR1* apresentaram maior risco de desenvolver CHC. **Palavras chaves:** carcinoma hepatocelular, receptor de estrogênio 1, gene *ESR1*.

## INTRODUÇÃO

O Carcinoma Hepatocelular (CHC) é classificado como a neoplasia hepática mais comum, representando de 85 a 90% dos tumores malignos que acometem esse órgão (Govaere & Roskams, 2015). O CHC é o sexto tumor maligno mais frequente no mundo (Govaere & Roskams 2015; El-Serag, 2012), sendo considerado a segunda causa de morte relacionada ao câncer (Ferlay *et al.*, 2015). No Brasil, de acordo com o Instituto Nacional do Câncer (Inca), mais de 8 mil mortes por ano são causadas pelo CHC, sendo mais de 5 mil mortes somente no sexo masculino (Inca, 2015).

As doenças crônicas hepáticas progridem mais rapidamente para cirrose no sexo masculino, sendo que a incidência do CHC é maior em homens do que em mulheres, com uma razão homem/mulher entre 2:1 e 4:1 (Kalra *et al.*, 2008). Essa diferença pode ser justificada pelo fato de que os homens estão mais expostos, do que as mulheres, aos fatores de risco, como a infecção pelos vírus hepáticos (El-Serag & Rudolph, 2007). O fígado é um órgão hormônio-sensitivo, sendo suscetível a hormônios sexuais, como o estrogênio (Lok, 2004). O papel dos estrogênios na modulação das características morfológicas e fisiológicas do fígado tornou-se evidente na década de 1970. Duffy & Duffy (1978) foram os primeiros a registrarem a presença de receptores de estrogênio (ER) no fígado humano normal. Subsequentemente, Molteni *et al.* (1979) registraram a presença de ER em CHC humano.

A função dos estrogênios no desenvolvimento do CHC ainda não está completamente elucidada, e diferentes estudos sugerem tanto um papel prejudicial quanto protetor do fígado (Omoya *et al.*, 2001; Farinati *et al.*, 2002; De Maria *et al.*, 2002). Alguns estudos mostraram que o estrogênio tem capacidade de suprimir a fibrose e estimular o processo de apoptose dos hepatócitos, atuando, dessa maneira, como um agente anticancerígeno (Liu *et al.*, 2014).

Os ERs são conhecidos como alfa ( $\alpha$ ) ou 1 e beta ( $\beta$ ) ou 2, sendo codificados por dois genes diferentes (Snoj *et al.*, 2012). Os ERs são membros de uma família de reguladores de transcrição de genes alvo (Kalra *et al.*, 2008), sendo expressos em uma grande variedade de tipos celulares (Araujo *et al.*, 2009) e sendo capazes de afetar a transcrição de diversos genes em diversas linhagens e tipos celulares, como já reportado em estudos de DNA *Microarray* (Souza *et al.*, 2012). As muitas funções dos subtipos de ERs em doenças hepáticas, ainda não estão totalmente esclarecidas e têm sido objeto de estudos (Shi *et al.*, 2014; Bruix *et al.*, 2014). O gene do receptor de estrogênio  $\alpha$  (*ESR1*) está localizado no cromossomo 6q25.1, é composto de oito éxons separados por sete regiões intrônicas (Casazza *et al.*, 2010). Variações na sequência do gene *ESR1* são capazes de alterar a expressão e/ou a estrutura do

receptor, modificando a atividade fisiológica do mesmo (Araujo *et al.*, 2009) e, consequentemente, estarem associadas com diferença na suscetibilidade ao desenvolvimento de doenças, entre elas o CHC.

A variabilidade genética é discutida como fator de risco, uma vez que, em alguns casos, as variações genéticas podem aumentar a suscetibilidade ao desenvolvimento do câncer (Brose *et al.*, 2000; The Human Genome, 2011). Diversos pacientes que são expostos a fatores de risco ambientais já conhecidos, poderão nunca desenvolver cirrose ou CHC. Ao passo que uma minoria de casos de CHC acaba desenvolvendo a doença sem se expor aos fatores de risco (El-Serag & Rudolph, 2007). A maioria dos casos de CHC ocorre em fígados já acometidos por hepatopatia crônica e cirrose, sendo que o desenvolvimento do CHC é um processo complexo, associado ao acúmulo de alterações genéticas e epigenéticas, que passa através dos eventos de iniciação, promoção e progressão (Bralet *et al.*, 2002; Cervello & Montalto, 2006).

Alguns estudos já descreveram a associação entre os polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) rs2234693 e rs9340799 do *ESR1* e o CHC, mas os resultados são inconsistentes e muitas vezes contraditórios (Kalra *et al.*, 2008; Giannitrapani *et al.*, 2006; Yuan *et al.*, 2008; Zhai *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2014). Trabalhos prévios de Zhai *et al.* (2006) e Liu *et al.* (2014) mostraram que os SNPs rs9340799 e rs1801132 do gene do *ESR1* não estão associados com o risco de CHC. Por outro lado, um estudo analisou o SNP rs2077647 e encontrou associação com o risco para o desenvolvimento de CHC, mas não encontrou associação deste SNP com outros tipos de cânceres, como: colo-rectal, mama e câncer de próstata (Sun *et al.*, 2015).

Devido à alta incidência do CHC, o prognóstico desfavorável e a limitação de tratamentos atualmente existentes, estudos que identifiquem os processos de carcinogênese e marcadores moleculares são necessários para auxiliar na detecção precoce da doença. Como o papel dos estrogênios e das variantes genéticas relacionadas ao seu mecanismo de ação ainda não estão bem estabelecidas em relação à suscetibilidade ao CHC, neste estudo pretendemos avaliar a associação de três SNPs do gene *ESR1* (rs3020432, rs1643821, rs2234693) com a suscetibilidade ao CHC em conjunto com fatores etiológicos já estabelecidos.

## **MÉTODOS**

### **Pacientes**

A amostra foi constituída de 195 pacientes brancos com doenças hepáticas, destes 92 com diagnóstico de CHC (casos) e 103 sem diagnóstico de CHC (controles). As amostras

foram constituídas de espécimes hepáticos armazenados em blocos de parafina de pacientes provenientes da Irmandade Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre. As mesmas estavam estocadas no Laboratório KCM, sob a responsabilidade de um médico patologista. A seleção de pacientes foi limitada entre o período de 2005 a 2013 com o intuito de utilizar material com menos de 10 anos de preservação em parafina e que tenham sido submetidos a processos de fixação mais adequados para o uso em biologia molecular. Os critérios de inclusão para o grupo caso foram: pacientes com o diagnóstico anatomopatológico de CHC. E os critérios de inclusão para o grupo controle, foram: pacientes sem o diagnóstico anatomopatológico de CHC e que realizaram biopsia hepática. Como critério de exclusão teve-se: amostras com excesso de necrose e com uma quantidade insuficiente de tecido hepático para a extração de DNA.

Os sujeitos que concordaram em participar do estudo assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Federal de Saúde Ciências de Porto Alegre com o parecer de número 1785/12.

### **Preparação da Amostra, Extração e Quantificação do DNA**

As amostras parafinadas foram cortadas em fragmentos de 4 µm sendo utilizado micrótomo e navalhas próprias *EasyPath*<sup>®</sup> (Erviagas, São Paulo). O material resultante dos cortes foi armazenado em tubos de 1,5 ml *Eppendorf*<sup>®</sup> (*Eppendorf AG*, Alemanha, DE) e mantido a - 20°C até o momento da extração de DNA.

As amostras foram desparafinadas empregando xilol e etanol e o DNA foi extraído com o Kit de Extração *Bioneer* (*Bioneer Corporation*, EE.UU.) de acordo com estudos já publicados (Shin *et al.*, 2014). Todo o processo de extração de DNA foi realizado conforme a indicação do fabricante. A integridade e a quantidade de DNA de cada amostra foram analisadas por espectrofotometria pelo aparelho *NanoDrop*<sup>®</sup> (*NanoDrop Technologies*, Wilmington, USA). O DNA extraído e quantificado foi armazenado a - 20°C.

### **Análise dos SNPs**

Informações genótípicas do *ESRI* foram visualizadas no Banco de dados *HapMap* em Fevereiro de 2011 (NCBI *International HapMap Project*). Foram selecionados 3 SNPs do gene *ESRI*(rs3020432, rs1643821 e rs2234693) com base nos dados prévios do nosso laboratório e apresentados no estudo de Smiderle *et al.*, (2015). Os SNPs selecionados, apresentaram a distribuição das frequências genótípicas de acordo com esperado para equilíbrio de Hardy-Weinberg. Para a identificação molecular dos polimorfismos foi utilizada

a técnica de PCR em tempo real com sondas de hidrólise utilizando os ensaios *TaqMan*<sup>®</sup> C\_2525155\_10, C\_3163600\_10 e C\_3163590\_10, respectivamente, em termociclador *Step One Plus* (*Applied Biosystems*, Foster City, CA).

### **Análise Estatística**

As variáveis quantitativas foram apresentadas em média e desvio padrão e as variáveis categóricas foram apresentadas em frequência absoluta e relativa. O desequilíbrio de ligação (LD) foi estimado utilizando o algoritmo Haploview, o LD foi considerado forte quando  $D'$  (a magnitude relativa do D comparado ao seu máximo teórico calculado  $D/D_{max}$ )  $\geq 0,9$ . A comparação da idade foi realizada com o teste t para amostras independentes. Foi realizado o teste  $\chi^2$  para verificar se a distribuição das frequências genótípicas estavam de acordo com o esperado para populações em equilíbrio de Hardy-Weinberg. Todas as análises foram realizadas usando software SPSS (versão 18,0, Chicago, IL, USA). Devido ao reduzido tamanho dos grupos gerados pelo diferentes genótipos, os indivíduos foram classificados da seguinte forma: rs3020432 homozigotos G/G versus os portadores do alelo A, rs1643821 homozigotos C/C versus os portadores do alelo T e rs2234693 homozigotos T/T versus os portadores do alelo C. A comparação das frequências genótípicas dos polimorfismos analisados entre os grupos caso e controle foi realizada pelo teste de Qui-quadrado de Pearson, com correção de Yates. Para a análise multivariada utilizamos a regressão logística, pelo método enter, e todas as análises foram ajustadas utilizando como covariáveis sexo e a presença de VHC. Consideraram-se significativos valores de  $p < 0,05$ .

## **RESULTADOS**

### **Caracterização da amostra**

As principais características da amostra estão apresentadas na Tabela 1. A média de idade no grupo caso foi de  $56,7 \pm 9,0$  anos e no grupo controle foi de  $50,9 \pm 11,8$  anos ( $p < 0,001$ ). O sexo masculino foi o mais prevalente representando 70,7% dos pacientes no grupo caso e 70,9% no grupo controle ( $p = 1,00$ ). Para cada paciente encontramos mais de uma comorbidade diagnosticada. As etiologias mais frequentes foram a presença de cirrose em 91,3% pacientes do grupo caso e 75,7% pacientes do grupo controle ( $p = 0,007$ ) e a infecção pelo vírus da hepatite C esteve presente em 79,3% do pacientes do grupo caso e em 40,8% dos pacientes no grupo controle ( $p < 0,001$ ).

### **Frequências dos SNPs e desequilíbrio de ligação**

As frequências alélicas dos tag-SNPs estudados (rs3020432, rs1643821 e rs2234693) são demonstradas na Tabela 2, assim como os seus tagged-SNPs. Não foi detectado desequilíbrio de ligação entre os SNPs estudados, os valores de  $D'$  variaram entre 0,2 e 0,16. A frequência alélica para o SNP rs3020432 foi de 58% para o alelo (G) no grupo caso e de 34% para o alelo (G) no grupo controle. Para o SNP rs1643821 foi de 62% para o alelo (T) o grupo caso no e de 43% para o alelo (T) no grupo controle e, para o SNP rs2234693 foi de 49% para o alelo (C) no grupo caso e de 33% para o alelo (C) no grupo controle. A frequência alélica em Descendentes Europeus para o SNP rs3020432 foi de 34% para o alelo (G), para o SNP rs1643821 foi de 39% para o alelo (T) e, para o SNP rs2234693 foi de 42% para o alelo (C). A frequência alélica em Descendentes Africanos para o SNP rs3020432 foi de 69% para o alelo (G), para o SNP rs1643821 foi de 66% para o alelo (T) e, para o SNP rs2234693 foi de 57% para o alelo (C) (1000 Genomes Project Consortium, *et al.*, 2012).

### **Associação do ESR1**

A tabela 3 apresenta as frequências genotípicas dos SNPs rs3020432, rs1643821 e rs2234693 nos grupos caso e controle. No grupo caso a homozigose G/G para o polimorfismo rs3020432 foi mais frequente do que no grupo controle (37,0% versus 11,7%, respectivamente,  $p < 0,001$ ). Para o polimorfismo rs1643821 os portadores do alelo T foram mais frequentes entre casos (87,0%) do que entre controles (66,0%;  $p = 0,001$ ). Enquanto que para o polimorfismo rs2234693 os portadores do alelo C foram mais frequentes entre os indivíduos do grupo caso (75,0%) do que no grupo controle (53,4%;  $p = 0,002$ ).

Quando estes polimorfismos foram analisados em conjunto, por regressão logística multivariada, ajustando por sexo e VHC, o genótipo G/G do polimorfismo rs3020432 está associado com um aumento de risco ao desenvolvimento do CHC (OR = 4,43; 95% CI 1,91-10,26;  $p = 0,001$ ), as presenças dos alelo T do polimorfismo rs1643821 e C do polimorfismo rs2234693 também demonstraram um aumento do risco para desenvolver a doença (OR = 2,69; 95% CI 1,18-6,14;  $p = 0,018$ ) e (OR = 2,41; 95% CI 1,17-4,94;  $p = 0,017$ ), respectivamente, quando comparados com indivíduos não portadores destes alelos. Quando inseridas no modelo com os preditores, sexo e VHC, apenas a infecção por VHC permaneceu aumentando o risco para o CHC (OR = 4,99; 95% CI 2,50-10,00;  $p < 0,001$ ).

## **DISCUSSÃO**

Nossos resultados mostraram que na amostra analisada encontramos uma predominância do sexo masculino. Conforme já citado anteriormente, de acordo com Kalra *et al.*, (2008) a incidência do CHC é maior em homens do que em mulheres. Uma hipótese que poderia explicar esta prevalência seria a de que o estrogênio apresenta um efeito protetor, uma vez que, a frequência de CHC apresenta-se maior em homens e mulheres pós-menopausa quando comparadas a mulheres pré-menopausa (Shimizu *et al.*, 2007; Wands, 2007). Em outro estudo que avaliou o prognóstico de pacientes cirróticos submetidos à ressecção hepática, também foi encontrada maior prevalência do sexo masculino e idade média de 62,1 anos. Em relação ao parâmetro idade, podemos sugerir que este parece não ter influência direta com o desenvolvimento de CHC. O que podemos identificar é que o desenvolvimento da doença acontece por volta da quinta década de vida, o que já é observado no desenvolvimento de outros tipos de câncer, sendo uma factível explicação o acúmulo de alterações genéticas e exposições aos fatores de risco ao longo da vida do indivíduo.

Diversos estudos corroboram os nossos resultados e mostram que a etiologia do CHC está relacionada principalmente com a cirrose e a infecção pelo VHC (Silvia *et al.*, 2008; Davis *et al.*, 2008; El-Serag & Rudolph, 2007). Fassio *et al.*, (2014), realizaram um estudo prospectivo e multinacional na América Latina e observaram que a etiologia do CHC estava relacionada com a infecção pelo VHC (36,6% dos casos). Um estudo caso-controle, realizado no Oriente, que estudou variáveis demográficas, clínicas e características virológicas em 414 pacientes constatou que as infecções pelo VHB e o VHC são as principais causas do CHC na China e no Japão, respectivamente (Wang *et al.*, 2002). Sabe-se que as infecções pelas hepatites virais podem aumentar o estresse oxidativo nas células hepáticas e resultar em mudanças no DNA, provocando a instabilidade genética, aumentando assim, o risco de cirrose e posteriormente o desenvolvimento do CHC (Mansouri *et al.*, 1997 Merican *et al.*, 2004; Lavanchy *et al.*, 2004). Não só isso, mais especificamente, a contribuição para o aumento do risco também pode ocorrer em função da interação que ocorre entre a proteína NS5B do VHC e o *ESR1* (Kalra *et al.*, 2008).

Os SNPs rs3020432, rs1643821 e rs2234693 analisados neste estudo, apresentaram frequências alélicas semelhantes aos relatados no projeto 1000 genomas para amostras de descendentes de Europeus, mas apresentaram frequências diferentes às encontrados no projeto 1000 genomas para amostras de descendentes Africanos (1000 Genomes Project Consortium, *et al.*, 2012). A ausência de desequilíbrio de ligação encontrada nos dados do nosso estudo já

era esperada, uma vez que os SNPs foram selecionados com base nos resultados do *HapMap* e estavam em diferentes blocos haplotípicos.

As associações entre os polimorfismos do gene *ESRI* e o risco de diversos tipos de cânceres já foram amplamente investigadas em diversos estudos (Zhai *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2002; Li *et al.*, 2014; Liu *et al.*, 2014; Chattopadhyay *et al.*, 2014; Slattery *et al.*, 2005; Zhai *et al.*, 2006), porém, os resultados permanecem inconsistentes e muitas vezes contraditórios para alguns cânceres, entre eles o CHC, pois os resultados indicam tanto um papel protetor como um potencial fator de risco de algumas variantes. Variações presentes no gene *ESRI* podem contribuir para a expressão anormal deste receptor e, provavelmente, possam estar relacionadas com o aumento do risco de cânceres em vários órgãos que expressam este receptor, tais como o câncer de próstata (Li *et al.*, 2014), endométrio (Zhou *et al.*, 2013), mama (Chattopadhyay *et al.*, 2014), ovário (Doherty *et al.*, 2010), leiomioma uterino (Feng *et al.*, 2013), cólon e reto (Slattery *et al.*, 2005).

A primeira associação entre os polimorfismos do gene *ESRI* e o risco de desenvolver CHC foi relatada por Zhai *et al.*, (2006). Eles identificaram um risco aumentado nos portadores do genótipo C/C do SNP rs2234693 para o desenvolvimento de CHC (OR = 2,19; IC 95% 1,27-3,78; p= 0,0048) em comparação com genótipo T/T. Já os portadores do genótipo C/T apresentaram um risco de 1,24 (IC 95% 0,83-1,86; p= 0,29). Esse achado vai ao encontro dos resultados do nosso estudo, pois identificamos que os portadores do alelo C possuem aumento de risco para o CHC. Também corroborando os nossos dados, um estudo prévio que analisou uma amostra de 289 pacientes chineses, mostrou que os indivíduos que carregam o genótipo C/C para o SNP rs2234693 têm 1,9 vezes mais chance de desenvolver CHC quando comparados com os portadores do genótipo T/T (Liu *et al.*, 2014). Uma meta-análise indicou que a variação genética no referido SNP pode ser fator de risco para o desenvolvimento de CHC, câncer de próstata e câncer de vesícula biliar (Sun *et al.*, 2015). Por outro lado, Wang *et al.*, (2012) e Li *et al.*, (2014) não encontraram nenhuma associação significativa entre o polimorfismo rs2234693 com os cânceres da mama, colo-retal e endométrio, e sugerem que este polimorfismo pode ter efeitos diferentes sobre diferentes tipos de cânceres. Para Liu *et al.*, 2014, os resultados indicam que o SNP rs2234693 está associado com o a susceptibilidade para o desenvolvimento de CHC.

O estudo de Herrington *et al.*, (2002) identificou que o SNP rs2234693 está localizado em um íntron. Este mesmo estudo mostrou que a maior expressão de *ESRI* está associada com o alelo C. Tomando junto estes dados, nossos resultados, assim como, os de Zhai *et al.*, (2006), Liu *et al.*, (2014), Sun *et al.*, (2015) é possível sugerir que a maior expressão de *ESRI*

está relacionada ao aumento de risco para CHC. Na análise do SNP rs1643821, nossos resultados mostraram uma diferença significativa quando comparados os grupos caso e controle. Como o genótipo T/T trata-se de uma homozigose para o alelo mutante, podemos relacionar a presença do mesmo com sendo um fator de risco no desenvolvimento de CHC. Uma maior susceptibilidade ao risco de desenvolvimento de CHC também foi encontrado para o SNP rs3020432, mas ambos os SNPs citados anteriormente ainda não apresentam resultados de associação com câncer na literatura.

Os dados dos SNPs rs3020432 e rs1643821 do nosso estudo são inéditos para a associação com o CHC, mas o SNP rs3020432 já foi associado com diabetes mellitus tipo 2 (Keene *et al.*, 2008). O SNP rs1643821 já foi associado com osteoporose (Wang *et al.*, 2012) e hipertensão (Tamura *et al.*, 2008).

Uma das limitações do nosso estudo refere-se ao fato dos SNPs estudados apresentam uma distribuição de frequências genotípicas diferentes de acordo com a etnia. No entanto, no presente estudo, a amostra estudada foi somente de descendentes europeus brancos, pois na nossa amostra tínhamos apenas 4 afrodescendentes e 1 oriental, que foram excluídos da análise. Outro aspecto a ser citado é o tamanho moderado da nossa amostra e o fato de que não estudamos um SNP de cada bloco haplotípico do gene *ESR1*.

Nosso trabalho é relevante, pois pesquisamos a associação dos SNPs rs3020432 e 1643821 em pacientes com CHC, resultados os quais são inéditos na literatura. Outro ponto importante é que tanto os pacientes do grupo caso como do grupo controle apresentaram pequena diferença de idade. Cabe salientar ainda que todos os pacientes do grupo controle incluídos neste estudo são indivíduos sem CHC, que foram submetidos à biopsia hepática e que apresentavam os fatores etiológicos já conhecidos para o CHC.

## CONCLUSÕES

Nosso estudo concluiu que portadores dos alelos com as variantes nos SNPs rs3020432, rs1643821 e/ou rs2234693 do gene *ESR1* foram preditores para desenvolver CHC. A confirmação destes achados em outros estudos pode auxiliar na determinação de marcadores moleculares para predição de risco de CHC em conjunto com outros fatores de risco.

## CONFLITO DE INTERESSES

Os autores declaram que não há nenhum conflito de conflito de interesse.

## AGRADECIMENTOS

Nós agradecemos o Laboratório KCM pela sua assistência na coleta das amostras. Nós também agradecemos o Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq – Brasil), PROAP-CAPES, PRONEX-FAPERGS/CNPq, DECIT/SCTIE-MS/CNPq e FAPERGS pelo seu suporte financeiro.

## REFERÊNCIAS

1000 Genomes Project Consortium; Abecasis, GR; Auton A; *et al.* An integrated map of genetic variation from 1,092 human genomes. *Nature*. 2012;491: 56-65.

Araujo KL, Madeira KP, Daltoé RD, *et al.* O papel dos polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) PvuII e Xba I e das Pequenas Repetições em Tandem (STRs) (TA)<sub>n</sub> e (GT)<sub>n</sub> do Receptor de Estrogênio alfa (ESR1) na Suscetibilidade do Câncer de Mama (BRCA). *Revista Brasileira de Cancerologia*. 2009;55:185-192.

Bralet MP, Pichard V and Ferry N. Demonstration of direct lineage between hepatocytes and hepatocellular carcinoma in diethylnitrosamine-treated rats. *Hepatology*. 2002;36:623-30.

Brose MS, Smyrk T, Weber B, *et al.* Genetic predisposition to cancer - cancer etiology. In: Bast RC Jr, Kufe DW, Pollock RE, Weichselbaum RR, Holland JF, Frei E, editors. *Cancer medicine*. Ontario, Canada: BC Becker. 2000;168-84.

Bruix, J & Sherman, M. Management of hepatocellular carcinoma: An update. *Hepatology*. 2011;53:1020-1022.

Casazza K, Page GP and Fernandez JR. The Association Between the rs2234693 and rs9340799 Estrogen Receptor alfa Gene Polymorphisms and Risk Factors for Cardiovascular Disease: A Review. *Biological Research for Nursing*. 2010;12:84-97.

Cervello M & Montalto G. Cyclooxygenases in hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol*. 2006;12:5113-21.

Chattopadhyay S, Siddiqui S, Akhtar MS, *et al.* Genetic polymorphisms of ESR1, ESR2, CYP17A1, and CYP19A1 and the risk of breast cancer: a case control study from North India. *Tumour Biol.* 2014;35:4517–4527.

Davis GL, Dempster J, Meler JD, *et al.* Hepatocellular carcinoma: management of an increasingly common problem. *Baylor University Medical Center Proceedings.* 2008;2:266–80.

De Maria N, Manno M and Villa E. Sex hormones and liver cancer. *Molecular and Cellular Endocrinology.* 2002;193:59-63.

Doherty JA, Rossing MA, Cushing-Haugen KL, *et al.* Polymorphism and invasive epithelial ovarian cancer risk an ovarian cancer association consortium study. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 2010;19:245–250.

Duffy MJ & Duffy GJ. Estradiol receptors in human liver. *J Steroid Biochem.* 1978;9:233-235.

El-Serag HB & Rudolph KL. Hepatocellular carcinoma: epidemiology and molecular carcinogenesis. *Gastroenterology.* 2007;132:2557–2576.

El-Serag HB. Epidemiology of viral hepatitis and hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology.* 2012;142:1264-1273.

Farinati F, Cardin R, Bortolami M, *et al.* Estrogens receptors and oxidative damage in the liver. *Molecular and Cellular Endocrinology.* 2002;193:85-88.

Fassio E, Díaz S, Santa C, *et al.* Etiology of hepatocellular carcinoma in Latin America: a prospective, multicenter, international study. *Ann Hepatol.* 2010;1:63-69.

Feng Y, Lin X, Zhou S, *et al.* The associations between the polymorphisms of the ER-alpha gene and the risk of uterine leiomyoma (ULM). *Tumour Biol.* 2013;34:3077–3082.

Ferlay J, Parkin DM, Curado MP, *et al.* Cancer incidence in five continents, volumes I to X: IARC CANCERBase No. 10 [Internet]. 2014. Disponível em: <<http://ci5.iarc.fr>>. Acesso em: 05 de Agosto de 2015.

Giannitrapani L, Soreni M, La Spada E, *et al.* Sex hormones and risk of liver tumor. *Annals of New York Academy of Science.* 2006;1089:228–236.

Govaere O & Roskams T. Pathogenesis and Prognosis of Hepatocellular Carcinoma at the Cellular and Molecular Levels. *Clinics in Liver Disease*. 2015;19:261–276.

Herrington DM, Howard TD, Brosnihan KB, *et al.* Common estrogen receptor polymorphism augments effects of hormone replacement therapy on E-selectin but not C-reactive protein. *Circulation*. 2002;105:1879–1882.

Herynk MH & Fuqua SA. Estrogen receptor mutations in human disease. *Endocr Ver*. 2004;25: 869-898.

Instituto Nacional de Câncer. Inca. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/>>. Acesso em: 05 de Agosto de 2015.

Kalra M, Mayes J, Assefa S, *et al.* Role of sex steroid receptors in pathobiology of hepatocellular carcinoma. *World Journal of Gastroenterology*. 2008;14:5945-5961.

Keene KL, Mychaleckyj JC, Smith SG, *et al.* Comprehensive evaluation of the estrogen receptor alpha gene reveals further evidence for association with type 2 diabetes enriched for nephropathy in an African American population. *Hum Genet*. 2008;4:333-341.

Lavanchy D. Hepatitis B, virus epidemiology, disease burden, treatment, and current and emerging prevention and control measures. *J Viral Hepat*. 2004;11:97–107.

Li L, Zhang X, Xia Q, *et al.* Association between estrogen receptor alpha PvuII polymorphism and prostate cancer risk. *Tumour Biol*. 2014;35:4629–4635.

Liu Y, Liu Y, Huang X, *et al.* Association of PvuII and XbaI polymorphisms in estrogen receptor alpha gene with the risk of hepatitis B virus infection in the Guangxi Zhuang population. *Infect Genet Evol*. 2014;27:69-76.

Lok AS. Prevention of hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology*. 2004;5:303-309.

Mansouri A, Fromenty B, Berson A, *et al.* Multiple hepatic mitochondrial DNA deletions suggest premature oxidative aging in alcoholic patients. *J Hepatol*. 1997;27:96–102.

Merican I, Guan R, Amarapuka D, *et al.* Chronic hepatitis B virus infection in Asian countries. *J Gastroenterol Hepatol*. 2000;15:1356–1361.

- Molteni A, Bahu RM, Battifora HA, *et al.* Estradiol receptor assays in normal and neoplastic tissues. A possible diagnostic acid for tumor differentiation. *Ann Clin Lab Sci.* 1979;9:103-108.
- Omoya T, Shimizu I, Zhou, Y, *et al.* Effects of idoxifene and estradiol on NFkappaB activation in cultured rat hepatocytes undergoing oxidative stress. *Liver.* 2001;21:183-191.
- Shi L, Feng Y, Lin H, *et al.* Role of estrogen in hepatocellular carcinoma: is inflammation the key? *J. Transl. Med.* 2014;12:93.
- Shimizu I, Kohno N, Tamaki K, *et al.* Female hepatology: favorable role of estrogen in chronic liver disease with hepatitis B virus infection. *World Journal of Gastroenterology.* 2007;13:4295-4305.
- Shin MH, Choi JS, Rhee JA, *et al.* APOE polymorphism and carotid atherosclerosis in Korean population: the Dong-gu Study and the Namwon Study. *Atherosclerosis.* 2014;232:180-185.
- Silva M, Mattos AA, Fontes PR, *et al.* Evaluation of hepatic resection for hepatocellular carcinoma on cirrhotic livers. *Arq Gastroenterol.* 2008;45:99-105.
- Slattery ML, Sweeney C, Murtaugh M, *et al.* Associations between ERalpha, ERbeta, and AR genotypes and colon and rectal cancer. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 2005;14:2936-2942.
- Smiderle L, Fiegenbaum M, Hutz MH, *et al.* ESR1 Polymorphisms and statin therapy: a sex-specific approach. *The Pharmacogenomics Journal.* 2015;1-7.
- Snoj N, Dinh P and Bedard PS. In: Coleman WB, Tsongalis GJ, eds. *Molecular biology of breast cancer.* Elsevier Pres. 2012;341-349.
- SNP database. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/>>. Acesso em: 08 de Março de 2016.
- Sun H, Hou J, Shi W, *et al.* Estrogen Receptor 1 (ESR1) genetic variations in cancer risk: A systematic review and meta-analysis. *Clin. Res. Hepatol. Gastroenterol.* 2015;39:127-135.
- Tamura M, Nakayama T, Sato I, *et al.* Haplotype-based case-control study of estrogen receptor alpha (ESR1) gene and pregnancy-induced hypertension. *Hypertens Res.* 2008;2:221-8.

The Human Genome. Disponível em: <<http://genome.wellcome.ac.uk/>>. Acesso em: 05 de Agosto de 2011.

Wands J. Hepatocellular carcinoma and sex. *New English Journal of Medicine*. 2007;35:1974–1976.

Wang BE, Ma WM, Sulaiman A, *et al*. Demographic, clinical, and virological characteristics of hepatocellular carcinoma in Asia: survey of 414 patients from four countries. *J Med Virol*. 2002;67:394–400.

Wang C, Zhang Z, Zhang H, *et al*. Susceptibility genes for osteoporotic fracture in postmenopausal Chinese women. *J Bone Miner Res*. 2012;27:2582-91.

Yuan X, Zhou G, Zhai, Y, *et al*. Lack of association between the functional polymorphisms in the estrogen metabolizing genes and risk for hepatocellular carcinoma. *Cancer, Epidemiology, Biomarkers & Prevention*. 2008;17:3621-3627.

Zhai Y, Zhou G, Deng G, *et al*. Estrogen receptor alpha polymorphisms associated with susceptibility to hepatocellular carcinoma in hepatitis B virus carriers. *Gastroenterology*. 2006;130:2001-2009.

Zhou X, Gu Y, Wang DN, *et al*. Eight functional polymorphisms in the estrogen receptor 1 gene and endometrial cancer risk: a meta-analysis. *PLoS ONE* 8. 2013;e60851.

TABELA 1 – Características das amostras

<b>Características</b>	<b>Todos</b>	<b>Casos</b>	<b>Controles</b>	<b>p</b>
<b>Número, N (%)</b>	195	92 (47,2%)	103 (52,8%)	
<b>Idade*</b>	53,6 ± 11,0	56,7 ± 9,0	50,9 ± 11,8	<0,001***
<b>Sexo**</b>				
<b>Masculino</b>	138 (70,8)	65 (70,7)	73 (70,9)	1,00
<b>Feminino</b>	57 (29,2)	27 (29,3)	30 (29,1)	
<b>Comorbidades</b>				
<b>Cirrose</b>	162 (83,1)	84 (91,3)	78 (75,7)	0,007 ***
<b>VHC</b>	115 (58,9)	73 (79,3)	42 (40,8)	<0,001 ***
<b>VHB</b>	17 (8,7)	4 (4,4)	13 (12,6)	<0,041***

Abreviação: VHC, vírus da hepatite C; VHB, vírus da hepatite B.

\* Valores de idade são expressos em média ± desvio padrão.

\*\* Frequência absoluta (Frequência Relativa).

\*\*\* Quando comparado caso e controle.

TABELA 2 – Frequências alélicas dos tag-SNPs estudados, assim como seus tagged-SNPs

Identificação do SNP	Posição no cromossomo	Localização do <i>ESR1</i>	Troca de nucleotídeo	Frequência alélica no grupo caso*	Frequência alélica no grupo controle*	Frequência alélica em descendentes Europeus**	Frequência alélica em descendentes Africanos**	Tagged SNP
<b>rs3020432</b>	152357927	Intron 5	G→A	58% (G)	34% (G)	34% (G)	69% (G)	rs3020411 rs3020422 rs3020433 rs3020364
<b>rs1643821</b>	152183551	Intron 2	T→C	62%(T)	43%(T)	39%(T)	66%(T)	rs3020375 rs750686 rs2474148 rs1709182 rs827419 rs712221
<b>rs2234693</b>	152163335	Intron 1	C→T	49% (C)	33% (C)	42%(C)	57% (C)	rs1514348 rs6902771 rs9479130 rs3853252

Abreviações: SNP, polimorfismo de nucleotídeo único.

\* Frequência alélica observada no nosso estudo.

\*\* Frequência alélica observada em descendentes Europeus e descendentes Africanos encontrada no projeto (1000 Genomes Project Consortium, *et al.*, 2012).

TABELA 3 – Frequências genotípicas dos SNPs rs3020432, rs1643821 e rs2234693 nos grupos caso e controle

SNPs	Casos	Controles	p*
<b>rs3020432</b>			
GA+AA	58 (63,0%)	91 (88,3%)	<0,001
GG	34 (37,0%)	12 (11,7%)	
<b>rs1643821</b>			
CC	12 (13,0%)	35 (34,0%)	0,001
TT+TC	80 (87,0%)	68 (66,0%)	
<b>rs2234693</b>			
TT	23 (25,0%)	48 (46,6%)	0,002
CC+CT	69 (75,0%)	55 (53,4%)	

Abreviação: SNP, polimorfismo de nucleotídeo único.

\* Qui-quadrado de Pearson com correção de Yates, comparando caso e controle.

TABELA 4 – Associação dos polimorfismos

	<b>OR*</b>	<b>95% CI*</b>	<b>p*</b>	<b>OR**</b>	<b>95% CI**</b>	<b>p**</b>
<b>rs3020432 (homozigotos GG)</b>	4,44	2,13-9,28	<0,001	4,43	1,91-10,26	0,001
<b>rs1643821 (portadores do alelo T)</b>	3,43	1,65-7,13	0,001	2,69	1,18-6,14	0,018
<b>rs2234693 (portadores do alelo C)</b>	2,62	1,42-4,82	0,002	2,41	1,17-4,94	0,017
<b>Sexo (masculino)</b>	0,99	0,53-1,84	0,973	0,99	0,47-2,11	0,995
<b>VHC</b>	5,58	2,94-10,58	<0,001	4,99	2,50-10,00	<0,001

\* Valores obtidos nos três modelos separados.

\*\* Valores obtidos no modelo utilizando os três SNPs, sexo e VHC como covariáveis.

### 4.3 Artigo 3: *Association of polymorphisms on the ESR2 gene with Hepatocellular Carcinoma*

Vanessa Dido Baldissera<sup>1</sup>, Andressa de Freitas Alves<sup>1</sup>, Lisiane Smiderle<sup>1</sup>, Carlos Thadeu Schmidt Cerski<sup>2</sup>, Paulo Roberto Ott Fontes<sup>3</sup>, Marilene Porawski Garrido<sup>3,4</sup>, Silvana Almeida<sup>1,4</sup>, Márcia Giovenardi<sup>1,4</sup>.

<sup>1</sup>Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Porto Alegre, Brasil.

<sup>2</sup>Professor Adjunto do Departamento de Patologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil.

<sup>3</sup>Programa de Pós-Graduação em Medicina: Hepatologia da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Porto Alegre, Brasil.

<sup>4</sup>Programa de Pós-Graduação em Biociências, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Porto Alegre, Brasil.

Será submetido à Revista: *Annals of Hepatology*

Fator de Impacto 2.193

## **Association of polymorphisms on the *ESR2* gene with Hepatocellular Carcinoma**

Vanessa Dido Baldissera<sup>1</sup>, Andressa de Freitas Alves<sup>1</sup>, Lisiane Smiderle<sup>1</sup>, Carlos Thadeu Schmidt Cerski<sup>2</sup>, Paulo Roberto Ott Fontes<sup>3</sup>, Marilene Porawski<sup>3,4</sup>, Silvana Almeida<sup>1,4\*</sup>, Márcia Giovenardi<sup>1,4</sup>.

<sup>1</sup>Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Porto Alegre, Brasil.

<sup>2</sup>Professor Adjunto do Departamento de Patologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil.

<sup>3</sup>Programa de Pós-Graduação em Medicina: Hepatologia da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Porto Alegre, Brasil.

<sup>4</sup>Programa de Pós-Graduação em Biociências, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Porto Alegre, Brasil.

\*Correspondência: Dra. Prof<sup>ª</sup>. Silvana Almeida

Rua: Sarmiento Leite, 245/309

Departamento de Fisiologia, Universidade Federal de Ciências da Saúde,

Porto Alegre, Rio Grande do Sul 90050-170, Brasil

Tel. 51-3303-8763

e-mail: salmeida@ufcspa.edu.br

## ABSTRACT

The hepatocellular carcinoma (HCC) is considered the sixth most common malignancy in the world. Genetic variability has been discussed as a risk factor for the HCC development and the Single Nucleotide Polymorphism (SNPs) are variants the most studied. Several studies have highlighted the effect of sex hormones in liver function. It is important to investigate the influence of polymorphisms in estrogen receptor (ER) and the risk to HCC. It was evaluated the association of three SNPs in the *ESR2* gene (rs4986938, rs4365213 and rs17179740) with HCC susceptibility and etiological factors already established in the literature. In addition, we analyzed the ER expression by immunohistochemistry in case and control groups. Liver specimens samples, stored in paraffin blocks, from 92 patients diagnosed with HCC were collected and denominated as cases; and 103 control patients whom underwent liver biopsy. DNA extraction was quantified by spectrophotometry and the SNPs were analyzed by allelic discrimination using hydrolysis probes (TaqMan<sup>®</sup>) in a thermal cycler in real time. The genotypic polymorphisms frequencies and ER expression were compared between the case and control groups by the a chi-square test. For the multivariate analysis, we used logistic regression, by the Enter method, and all analysis were adjusted using as covariates sex, presence of Hepatitis C Virus (HCV). The average age in the case group was 56.7±9.0 years and in the control group was 50.9±11.8 years (p<0.001). The male sex was more prevalent, representing 70.7 % of the patients in the case group and 70.9 % in the control group (p=1.00). The presence of cirrhosis and HCV was more frequent in cases than in controls. The rs4986938 *A/A*, the rs4365213 *C/C* and the rs17179740 *G/G* genotypes were more frequent in the case than in the control group (p<0.043, p<0.005 and p<0.001, respectively). Multivariate analysis showed a higher risk ratio for HCC rs4986938 *A/A* genotype (OR 3.29; 95% CI 1.21-8.97; p=0.020) and the rs17179740 *G/G* genotype (OR=3.23; 95% CI 1.68-6.21; p<0.001) when controlled for sex and HCV. The HCV presence was identified as a risk 6 times greater for HCC development (OR= 6.01; 95% CI 3.03-11.94; p<0.001), when controlled by sex, rs4986938 and rs17179740 polymorphisms. The ERs expression by immunohistochemistry in the liver tissue was not different between the groups case and control (p=0.104). In this work, we conclude that homozigotes rs4986938 *A/A* and rs17179740 *G/G* from the *ESR2* gene had a higher risk of HCC development.

**Key words:** hepatocellular carcinoma, *ESR2* gene, immunohistochemistry ER.

## INTRODUCTION

The hepatocellular carcinoma (HCC) is the most common liver cancer, represents between 85-90% of all malignant tumors that affect the liver (Govaere & Roskams, 2015) and the sixth most common malignancy in the world (Govaere & Roskams 2015; El-Serag, 2012). HCC is considered the second leading cause of cancer-related death (Ferlay *et al.*, 2015). Annually, HCC is diagnosed in more than half million people worldwide. The latest data shows 748,300 new cases of HCC, with a mortality of 695,900. In Brazil, according to the National Cancer Institute (INCA), more than 8,000 deaths per year are caused by HCC and more than 5,000 deaths only in males (INCA, 2015).

The main risk factors for HCC are the infection by Hepatitis B Virus (HBV) and Hepatitis C Virus (HCV), alcoholic liver disease, exposure to aflatoxins and nonalcoholic steatohepatitis (Baffy *et al.*, 2012). The presence of chronic liver diseases accelerates the progression to cirrhosis and HCC (Kalra *et al.*, 2008). The prevalence of HCC in men is 2-4 times higher than in women (Kalra *et al.*, 2008), this difference can be explained by the fact that men are more exposed to risk factors than women, such as infection by hepatic viruses (El-Serag & Rudolph, 2007). However, the liver is considered a hormone-sensitive organ, being susceptible to influences of sex hormones such as estrogen (Lok 2004). The role of estrogens in modulating the physiological and morphological characteristics of the liver became clear in the 1970s. Duffy & Duffy (1978) were the first to register the presence of estrogen receptor (ER) in normal human liver and, subsequently, Molteni *et al.*, (1979) reported the presence of ER in human HCC.

The role of estrogens in the HCC development is not yet fully elucidated and there are various studies that suggest a harmful role while others studies suggested a protector role of estrogens in liver (Omoya *et al.*, 2001; Farinati *et al.*, 2002; De Maria *et al.*, 2002). Some studies have shown that estrogen has the ability to suppress fibrosis and stimulate the process of hepatocytes apoptosis, acting in this way, as an anticancer agent (Liu *et al.*, 2014). Estrogen exerts many of its effects through the nuclear receptors activation which are expressed in multiple tissues (Demissie *et al.*, 2006).

The estrogens biological effects are mediated by ERs  $\alpha$  and  $\beta$ , which belong to the nuclear hormone receptor superfamily and act as ligand-activated transcription factors (Parker *et al.*, 1993). ER $\beta$  is encoded by estrogen receptor 2 (*ESR2*) gene, which

is located at chromosome 14q23.2 and covers a genomic region of 111.5 kb (Yaffe *et al.*, 2002). Several *ESR2* genetic variants have been described and investigated in association studies with estrogen dependent characteristics. The more studied tag single nucleotide polymorphism (tag-SNP) in this gene, is the rs4986938, which is located in 3'UTR (untranslated region) and consists of an exchange of G-A. The SNPs rs4365213 and rs17179740 are located in intron 3 and 8 and consists of an exchange of T-C and G-A, respectively.

Polymorphisms in *ESR2* have been associated with an increased risk for several estrogen dependent disorders, including osteoporosis (Geng *et al.*, 2007; Ichikawa *et al.*, 2005; Kung *et al.*, 2006; Massart *et al.*, 2009; Rivadeneira *et al.*, 2006), polycystic ovarian disease (Kim *et al.*, 2010), prostate cancer (Fu *et al.*, 2014), male infertility (Ge *et al.*, 2014), Parkinson's disease (Gao *et al.*, 2014), osteoarthritis (Kerkhof *et al.*, 2010), and breast cancer (Yu *et al.*, 2011). Given the potential estrogens roles in the HCC and the *ESR2* importance, we hypothesized that endogenous estrogen level and *ESR2* genetic variations may be associated with the risk of HCC.

Due to the high HCC incidence, the poor prognosis and the limitation of currently available treatments, are need studies that seek to clarify the relationship between the hepatocarcinogenesis molecular pathways and the associated risk factors, aiming adequate, personalized and effective HCC treatments. There is no clear understanding whether there is a relationship between genetic variants of the estrogen receptor and the susceptibility to HCC. Therefore, this study evaluated the association of three SNPs in the *ESR2* gene (rs4986938, rs4365213 and rs17179740) with HCC susceptibility and others etiological factors already established in the literature. In addition, we analyzed the estrogen receptor expression by immunohistochemistry in case and control group.

## **MATERIALS & METHODS**

### **Samples**

This work consisted of a study case and control which was analyzed 195 samples of white patients with liver disease, from these, 92 were diagnosed with HCC (cases) and 103 without HCC (controls). The samples were originated from liver specimens stored in paraffin blocks from patients from Irmandade Santa Casa de

Misericórdia de Porto Alegre. By the time of samples collection, they were stored at the KCM Laboratory under the responsibility of a medical pathologist.

The samples collection was limited between the period of 2005-2013 with the intent to use materials with less than 10 years of preservation in paraffin and that have been undergone the most suitable attachment methods for use in molecular biology. The inclusion criteria for the case group studied, were patients with the HCC diagnosis, from both genders, with diverse ages and with several liver diseases. For the control group, the inclusion criteria were patients without the HCC diagnosis, from both genders, with diverse ages and with several liver diseases. As exclusion criteria were used: samples with excess necrosis and an insufficient amount of liver tissue for DNA extraction.

All subjects who agreed to participate in this study provided informed consent. This study was approved by the Univesidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre Ethics Committee under the registration number 1785/12.

### **Sample Preparation, Extraction and DNA Quantification**

Samples of liver specimens stored in paraffin blocks were cut in 4µm fragments with the aid of a microtome and razors produced by the EasyPath® (Erviagas, Ontario). The resultant fragments were used for DNA extraction, and stored in 1.5ml Eppendorf tubes (Eppendorf AG, Germany, DE), which were maintained at - 20° C until the extraction time.

The samples deparaffinization was performed with the use of xylol and ethanol, and the DNA was extracted with Bioneer extraction kit (Bioneer Corporation, USA) according to published studies (Shin *et al.*, 2014). All the DNA extraction process was carried out as indicated by the manufacturer. The integrity and amount of DNA from each sample was spectrophotometry assayed using the NanoDrop® (NanoDrop Technologies, Wilmington, USA). Extracted DNA was quantitated and stored at -20°C.

### **Genomic Analysis**

The rs4986938, rs4365213 and rs17179740 SNPs of *ESR2* gene were selected with base on previous data from our laboratory, for variation on lipid levels, a characteristic estrogen dependent (Smiderle *et al.*, 2015). For the molecular polymorphisms identification was used the real time PCR technic with hydrolysis probes using the TaqMan® assays C\_\_11462726\_10, C\_\_32395442\_20 and

C\_\_34495275\_10 in a thermocycler Step One Plus (Applied Biosystems, Foster City, CA).

### **Immunohistochemistry analysis**

The paraffin embedded slices were first submitted to deparaffinization process that consisted in 30 minutes stay in the stove and xylene bath. After, the slices were rehydrated through graded series of alcohol and distilled water in the end. The slices were then submitted to an antigenic recovery step in a 40 minutes at 92°C bath with pH 6.0 of a sodium citrate solution. After cooling at room temperature, the endogen peroxidase was blocked with 5% hydrogen peroxidase and metanol in two rounds of 10 minutes. Non-specific bindings were blocked with 1h bath in BSA 1% solution.

The slices were then incubated with primary antibody ER– Abcam, in 1:50 dilution in phosphate buffered saline, in a dark-chamber overnight. After, the slides were incubated with secondary and tertiary antibodies (Mach 4 Universal HRP-Polymer – Biocare) for 40 minutes each. The 3,3'-Diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) chromogen was used for the antibody/enzyme complex visualization. Appropriate positive and negative controls were included with each immunohistochemistry (IHC) run.

Immunohistochemistry stained slices were evaluated by two different people for the presence and quantification of positive reaction in the cells' nucleus. Any positive nuclear reaction for ER was recorded as positive. Images of four representative fields (hotspots) were captured using an Optical Microscope Olympus Bx61 with Olympus DP72 camera coupled (using the Pro Plus 3D Suite image capture software) with a 200x magnification. In the end, there were four images with a resolution of 1298x972 pixels and 24 bits color RGB of each patient sample. The positive nucleus counting were made with the software ImageJ 1.46b. The positive and negative nucleus counting were performed with the ImageJ Cell Counter Plugin aid, inside a stipulated area of 500 x 500 pixels in each image center. A plugin was developed to mark the same area and location on each image under analysis. In this marked area, there were two inclusive lines and two exclusive lines where the nucleus which touched the exclusive lines weren't considered in the count. The positive nucleus percentage was calculated for each image and a mean for the sample, considering the four images, performed (Simes *et al*, 2013). Scores were averaged for further comparative evaluation of the ER

expression. Tumor cell proportion was scored as follows: 0 (no positive tumor cells); 1 (0.1-35.0% positive tumor cells); 2 (35.1- 100.0% positive tumor cells).

### **Statistical analysis**

The quantitative variables were presented in terms of mean and standard deviation and categorical variables were presented in absolute and relative frequencies. An age comparison was performed with the t test for independent samples. It was conducted the  $\chi^2$  test to check if the genotypic frequencies distribution were in accordance with a population in Hardy-Weinberg equilibrium. The Linkage Disequilibrium (LD) was estimate using haploview algorithm, LD was considered strong when  $D'$  (the relative magnitude compared to  $D$  at its theoretical maximum calculated  $D/D_{max}$ )  $\geq 0.9$ . Due to the generated groups reduced size from the different genotypes, the groups were classified as follow: rs4986938 homozygous A/A versus G allele carriers, rs4365213 homozygous C/C versus T allele carriers and rs17179740 homozygous G/G versus the A allele carriers. The genotypic frequencies comparison between the case and control groups was performed by the Person chi-square test. For the multivariate analysis, we used logistic regression, by the Enter method, and all analyzes were adjusted using as covariates sex and HCV presence. Also was analyzed by the immunohistochemical technic the ER receptor expression, among case and control groups patients, using Pearson chi-square test. All analyzes were performed using SPSS software (version 18.0, Chicago, IL, USA). Values are considered significant with  $p < 0.05$ .

## **RESULTS**

### **Sample Characterization**

The main sample characteristics are presented in table 1. The average age in the case group was  $56.7 \pm 9.0$  years and in the control group was  $50.9 \pm 11.8$  years ( $p < 0.001$ ). The male sex was more prevalent, representing 70.7 % of the patients in the case group and 70.9 % in the control group ( $p = 1.00$ ). For each patient, we found more than one comorbidity diagnosed. The frequently etiologies were cirrhosis, present in 91.3 % of patients in the case group and 75.7 % of patients in the control group ( $p = 0.007$ ), and infection with hepatitis C virus, present in 79.3 % of patients in the case group and in 40.8 % of patients in the control group ( $p < 0.001$ ).

### **SNPs frequencies and linkage disequilibrium**

The allelic frequencies for the tag-SNPs studied (rs4986938, rs4365213 and rs17179740) are shown in table 2, as well as their tagged-SNPs. There was no detectable linkage disequilibrium (LD) among the SNPs with the  $D'$  values ranging between 0.10 and 0.14, however the  $r^2$  between rs4365213 and rs17179740 was 1. The allelic frequency for the SNP rs4986938 was 47% for the allele (A) in the case group and 35% for in the control group. For the SNP rs4365213 was 35% for the allele (T) in the case group and 47% in the control group. For the SNP rs17179740 was 23% for the allele (G) in the case group and 40% in the control group.

### ***ESR2* association**

Table 3 shows the genotypic frequencies for SNPs rs4986938, rs4365213 and rs17179740 in the case and control groups. In the case group, the homozygous A/A for rs4986938 polymorphism was more frequent than in the control group (18.5% versus 7.8%, respectively,  $p < 0.043$ ). The C/C homozygotes of rs4365213 was more common in the case group (46.7%) than in the control group (26.2%;  $p = 0.005$ ). The G/G homozygotes of rs17179740 variant was more frequent among individuals in the case group (58.7%) than in the control group (32.0%;  $p < 0.001$ ). For analyze the genetic variants adjusting for sex and HCV, we performed multivariate logistic regression, however the rs4365213 and rs17179740, although not in LD, are high correlated between them ( $r^2=1$ ), so we opted to choose the SNP rs17179740 to remain in the logistic regression model. When these polymorphisms were analyzed together by multivariate logistic regression, adjusting for sex and HCV, the genotype A/A polymorphism rs4986938 was associated with an increased risk for the development of HCC (OR=3.29; 95% CI 1.21-8.97;  $p = 0.020$ ) and the G/G genotype rs17179740 polymorphism also showed an increased risk for developing the disease (OR=3.23; 95% CI 1.68-6.21;  $p < 0.001$ ) when compared to individuals not carrying these genotypes. When sex and HCV were inserted into the predictive model, only the HCV infection remained increasing the risk for HCC (OR=6.01; 95% CI 3.03-11.94;  $p < 0.001$ ) (Table 4). The cirrhosis was not included in the model of logistic regression, because cirrhosis and HCV variables have high correlation scores.

### **ER expression immunohistochemistry**

The table 5 showed that there was no significant difference in ER expression when comparing the case (n=42) and control (n=28) group (p=0.104). The immunohistochemistry was not performed in all samples, because there was not enough material.

## DISCUSSION

In the analyzed samples for this study, we found a men predominance and according to Kalra *et al.*, (2008) the HCC incidence is higher in men than in women. Epidemiological reports have pointed out that despite of etiologies, males have a higher HCC incidence than female (Yeh & Chen, 2010). Different lifestyles between men and women can contribute to the differences found in association with sex and HCC. Generally, men are at increased risk of exposure to the liver virus, as well as unhealthy habits: alcoholic and smoke. However, it should be noted that some mechanisms related to sex-linked differences may be based on biological factors, including estrogen-related female sex hormones, such as estradiol, rather than simply gender differences in social environment and lifestyle (Shimizu *et al.*, 2007). The estrogen may to have a protective effect, since the HCC frequency is greater in men and postmenopausal women when compared to premenopausal women (Shimizu *et al.*, 2007; Wands, 2007).

Another study that evaluated the prognosis of cirrhotic patients undergoing liver resection, also found higher prevalence in men with mean age of 62.1 years. Regarding the parameter age, we can infer that this seems to have no direct influence on the HCC development. Although we could identify that the disease development happens around the fifth decade of life, which is already observed in the development of other types of cancer, being a feasible explanation the genetic alterations accumulation and exposures to risk factors over the individual.

Several studies (Silvia *et al.*, 2008; Davis *et al.*, 2008; El-Serag & Rudolph, 2007) confirm our results and show that the HCC etiology is related mainly to cirrhosis and HCV infection. Indeed, Fassio *et al.*, (2014) conducted a prospective study, multinational in Latin America and found that the HCC etiology was related to HCV infection (36.6% of cases). A case-control study conducted in the East, which studied demographic and clinical variables and virological variables in 414 patients found that infection with HBV and HCV are major HCC causes in China and Japan, respectively (Wang *et al.*, 2002). It is known that infections by viral hepatitis can increase oxidative

stress in the liver cells and results in changes in the DNA, causing genetic instability, thus increasing the risk of cirrhosis and later development of HCC (Mansouri *et al.*, 1997 Merican *et al.*, 2004; Lavanchy *et al.*, 2004).

The allelic frequencies observed in the SNPs studied were similar to those found in studies reported in the 1000 Genomes Project Consortium, (2012). The SNP rs4986938, analyzed in this study, presents allele frequencies similar to those reported in the 1000 Genomes Project Consortium, (2012) project for European descendant's samples, but showed different frequencies to those reported for African descendant's samples. However, the SNPs rs4365213 and rs17179740, also analyzed in this study, have lower frequencies than the allele frequencies similar to those reported found in the 1000 Genomes Project Consortium, (2012) project for European descendant samples, as well as frequencies to those reported found for African descendant samples (1000 Genomes Project Consortium, 2012). These differences in frequencies are expected because Brazilian populations are miscegenated. The linkage absence disequilibrium found in our study data was expected, since SNPs were selected based on the HapMap on the different haplotypic blocks.

Associations between the *ESR2* gene polymorphisms and the risk of various diseases have been investigated. In recent years, many meta-analyses have reported associations of these SNPs in the *ESR2* with several diseases, including prostate cancer (Fu *et al.*, 2014), male infertility (Ge *et al.*, 2014), Parkinson's disease (Gao *et al.*, 2014), osteoarthritis (Kerkhof *et al.*, 2010), breast cancer (Yu *et al.*, 2011) osteoporosis (Geng *et al.*, 2007; Ichikawa *et al.*, 2005; Kung *et al.*, 2006; Massart *et al.*, 2009; Rivadeneira *et al.*, 2006), ovarian cancer (Cox *et al.*, 2008; Gallicchio *et al.*, 2006; Tsezou *et al.*, 2008; Treeck *et al.*, 2009) and polycystic ovarian disease (Kim *et al.*, 2010).

It was identified an increase of 2 times on the risk of Alzheimer's disease development among women carrying T allele for the SNP rs4986938 (Lambert *et al.*, 2001; Luckhaus *et al.*, 2006). In previous study of Wu *et al.*, (2012) was observed a significant association between risk genotypes of SNP rs4986938 for the colorectal cancer development. And there is evidence that this SNP could affect *ESR2* gene RNA stability (Maguire *et al.*, 2015)

On the other hand, for the SNPs rs4365213 and rs17179740 there are few studies in the literature. It was found that in women postmenopausal an increase twice to the risk of developing Alzheimer's disease among carriers of the G allele for the SNP

rs4365213 (Qi *et al.*, 2011). Although our study is with HCC, this finding corroborates the importance of this SNP, since we identified an increased risk for the carriers of this allele develop HCC. For the SNP rs17179740, the literature showed only one study related to cancer and not found this SNP relation with endometriosis and infertility (Wang *et al.*, 2013).

Another objective of our study was to evaluate the expression of ER in the liver of patients with HCC. Qasim *et al.*, (2011) evaluated the expression of ER by immunohistochemistry in colorectal adenoma and adenocarcinoma and observed a gradual increase in the expression of ER from control through adenoma to carcinoma. Already, previous studies (Ekem *et al.*, 1992; Slattery, 2000; Cameron *et al.*, 1992) with expression ER in colon and colorectal carcinoma no observed significant difference between cases and controls.

In relation to the HCC, study displayed that expression of ER was significantly down regulated in HCC tissue compared with normal liver tissue. Moreover, its expression level showed a significant negative correlation with disease progression (Qing *et al.*, 2015). For Wang *et al.*, (2006) the expression to ER for immunohistochemistry in HCC samples presents important role in HCC development in Eastern patients. Unlike our study, that found no significant difference in the expression of ERs when compared cases and controls groups. By side other, on the other hand was observed low expression (less than 25 % of cells) this protein was most significant valued when the non-tumor. Discrepancies in the results of studies could stem from several sources, including the source of tissue and methods of detecting ER. Many studies have relied on fresh tissue, while in the present study; tissue was obtained from paraffin blocks.

As already mentioned, two subtypes of ERs have been found to date, ESR1 and ESR2. Both ER subtypes are expressed in HCC and interact with each other (Lavarone *et al.*, 2003). Studies have shown that ER subtypes exert multiple functions in various stages of liver disease. The different roles of the ER subtypes in liver disease, especially ESR2, have yet to be fully clarified (Shi *et al.*, 2014). The ESR1 has been identified for a long time and has been extensively investigated (Kalra *et al.*, 2008). The ESR1 variants have been proven to be strong negative predictors for HCC (Villa *et al.*, 1996; Villa *et al.*, 2000; Villa *et al.*, 2003). Based on further studies, the expression pattern of the ER subtypes could serve as a potential prognostic indicator for HCC and provide a novel target for HCC treatment.

There are certain limitations to our findings. First, our ability to adequately assess risk in other ethnic populations is limited because all patients enrolled in this study were from the white population. Further studies using sufficient numbers of samples from other races and ethnic groups are needed to extend and confirm our findings. Second, only a limited number of candidate SNPs were selected in this study, which is not fully representative for the complexity of genes in the estrogen receptor pathway. Finally, other point to be raised, is the moderate size for our samples and the fact that we didn't study one SNP for each haplotype block from *ESR2* gene.

The results of this study are unprecedented in the literature; it is the first study that associates the SNPs rs4986938, rs4365213 and rs17179740 of *ESR2* with HCC. Another important point is that both patients in the case group as the control group showed little difference in age. It should be noted also that all control patients included in this study are individuals without HCC, who underwent liver biopsy and who had etiological factors already known to the HCC.

## **CONCLUSIONS**

Our study found that polymorphisms in *ESR2* gene rs4986938 and/or rs17179740 SNPs were predictors to develop HCC. Confirmation of these findings in other studies may help to determine molecular markers for HCC risk prediction in conjunction with other risk factors.

## **CONFLICT OF INTERESTS**

The authors declare that there is no conflict of interest.

## **ACKNOWLEDGEMENT**

We thank the KCM Laboratory for their assistance in collecting the samples. We also thank the CNPq, PROAP-CAPES, PRONEX-FAPERGS/CNPq and DECIT/SCTIE-MS/CNPq for their financial support.

## **REFERENCES**

1000 Genomes Project Consortium; Abecasis, GR; Auton A; *et al.* An integrated map of genetic variation from 1,092 human genomes. *Nature*. 2012;491:56-65.

Baffy G, Brunt EM and Caldwell SH. Hepatocellular carcinoma in non-alcoholic fatty liver disease: an emerging menace. *J Hepatol*. 2012;6:1384–1391.

Cameron BL, Butler JA, Rutgers J, Vargas HI, Purtell M, Sheppard B. Immunohistochemistry determination of the estrogen receptor content of gastrointestinal adenocarcinomas. *Am Surg* 1992;58:758-760.

Cox A, Bull E, Cockle-Hearne J, Knibb W, Potter C, Faithfull S. Nurse led telephone follow up in ovarian cancer: a psychosocial perspective. *Eur J Oncol Nurs*. 2008;12:412-7.

Davis GL, Dempster J, Meler JD, *et al.* Hepatocellular carcinoma: management of an increasingly common problem. *Baylor University Medical Center Proceedings*. 2008;2:266–80.

De Maria N, Manno M and Villa E. Sex hormones and liver cancer. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 2002;193:59-63.

Demissie S, Cupples LA, Shearman AM, *et al.* Estrogen receptor-alpha variants are associated with lipoprotein size distribution and particle levels in women: the Framingham Heart Study. *Atherosclerosis*. 2006;185:210–218.

Duffy MJ & Duffy GJ. Estradiol receptors in human liver. *J Steroid Biochem*. 1978;9: 233-235.

Ekem TE, Bahadir B, Gun BD, Bektas S, Kertis G, Yurdakan G, *et al.* Colorectal carcinomas: Clinicopathologic investigation, correlation with expression of estrogen and progesterone receptors. *Turkish Journal of Câncer*. 2008;38:118-122.

El-Serag HB & Rudolph KL. Hepatocellular carcinoma: epidemiology and molecular carcinogenesis. *Gastroenterology*. 2008;132: 2557–2576.

El-Serag HB. Epidemiology of viral hepatitis and hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology*. 2012;142:1264-1273.

Farinati F, Cardin R, Bortolami M, *et al.* Estrogens receptors and oxidative damage in the liver. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 2002;193:85-88.

Fassio E, Díaz S, Santa C, *et al.* Etiology of hepatocellular carcinoma in Latin America: a prospective, multicenter, international study. *Ann Hepatol.* 2010;1:63-69.

Ferlay J, Parkin DM, Curado MP, *et al.* Cancer incidence in five continents, volumes I to X: IARC CANCER Base No. 10 [Internet]. 2014. Disponível em: <<http://ci5.iarc.fr>>. Acesso em: 05 de Agosto de 2015.

Fu C, Dong WQ, Wang A, *et al.* The influence of ESR1 rs9340799 and ESR2 rs1256049 polymorphisms on prostate cancer risk. *Tumour Biol.* 2014;35:8319-8328.

Gallicchio L, Whiteman MK, Tomic D, Miller KP, Langenberg P, Flaws JA. Type of menopause, patterns of hormone therapy use, and hot flashes. *Fertil Steril.* 2006;85:1432–1440.

Gao Z, Fu HJ, Xue JJ, *et al.* Genetic polymorphisms in VDR, ESR1 and ESR2 genes may contribute to susceptibility to Parkinson's disease: a meta-analysis. *Mol Biol Rep.* 2014;41:4463–4474.

Ge YZ, Xu LW, Jia RP, *et al.* Association of polymorphisms in estrogen receptors (ESR1 and ESR2) with male infertility: a meta-analysis and systematic review. *J Assist Reprod Genet.* 2014;31:601–611.

Geng L, Yao Z, Yang H, *et al.* Association of CA repeat polymorphism in estrogen receptor beta gene with postmenopausal osteoporosis in Chinese. *J Genet Genomics.* 2007;34:868–876.

Govaere O & Roskams T. Pathogenesis and Prognosis of Hepatocellular Carcinoma at the Cellular and Molecular Levels. *Clinics in Liver Disease.* 2015;19:261–276.

Ichikawa S, Koller DL, Peacock M, *et al.* Polymorphisms in the estrogen receptor beta (ESR2) gene are associated with bone mineral density in Caucasian men and women. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005;90:5921–5927.

Instituto Nacional de Câncer. Inca. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/>>. Acesso em: 05 de Agosto de 2015.

Kalra M, Mayes J, Assefa S, *et al.* Role of sex steroid receptors in pathobiology of hepatocellular carcinoma. *World Journal of Gastroenterology.* 2008;14:5945-5961.

Kerkhof HJ, Meulenbelt I, Carr A, *et al.* Common genetic variation in the Estrogen Receptor Beta (ESR2) gene and osteoarthritis: results of a meta-analysis. *BMC Med Genet.* 2010;164:10-11.

Kim JJ, Choi YM, Choung SH, *et al.* Estrogen receptor beta gene +1730 G/A polymorphism in women with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril.* 2010;93: 1942–1947.

Kung AW, Lai BM, Ng MY, *et al.* T-1213C polymorphism of estrogen receptor beta is associated with low bone mineral density and osteoporotic fractures. *Boné.* 2006;39: 1097–1106.

Lambert JC, Harris JM, Mann D, *et al.* Are the estrogen receptors involved in Alzheimer's disease? *Neurosci Lett.* 2001. 306:193-97.

Lavarone M, Lampertico P, Seletti C, Francesca DM, Ronchi G, Del NE, *et al.* The clinical and pathogenetic significance of estrogen receptor-beta expression in chronic liver diseases and liver carcinoma. *Cancer.* 2003;98:529–534.

Lavanchy D. Hepatitis B, virus epidemiology, disease burden, treatment, and current and emerging prevention and control measures. *J Viral Hepat.* 2004;11:97–107.

Liu Y, Liu Y, Huang X, *et al.* Association of PvuII and XbaI polymorphisms in estrogen receptor alpha gene with the risk of hepatitis B virus infection in the Guangxi Zhuang population. *Infect Genet Evol.* 2014;27:69-76.

Lok AS. Prevention of hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology.* 2004;5:303-309.

Luckhaus C, Spiegler C, Ibach B, Fischer P, Wichart I, Sterba N, *et al.* Estrogen receptor beta gene (ESRbeta) 3'-UTR variants in Alzheimer disease. *Alzheimer Dis Assoc Disord.* 2006;20:322-333.

Maguire SL, Leonidou A, Wai P, Marchiò C, Ng CK, Sapino A, *ET al.* SF3B1 mutations constitute a novel therapeutic target in breast cancer. *J Pathol.* 2015;235:571-80.

Mansouri A, Fromenty B, Berson A, *et al.* Multiple hepatic mitochondrial DNA deletions suggest premature oxidative aging in alcoholic patients. *J Hepatol.* 1997;27:96–102.

Massart F, Marini F, Bianchi G, *et al.* Age-specific effects of estrogen receptors' polymorphisms on the bone traits in healthy fertile women: the BONTURNO study. *Reprod Biol Endocrinol.* 2009;7:32.

Merican I, Guan R, Amarapuka D, *et al.* Chronic hepatitis B virus infection in Asian countries. *J Gastroenterol Hepatol.* 2000;15:1356–1361.

Molteni A, Bahu RM, Battifora HA, *et al.* Estradiol receptor assays in normal and neoplastic tissues. A possible diagnostic acid for tumor differentiation. *Ann Clin Lab Sci.* 1979;9:103-108.

Omoya T, Shimizu I, Zhou Y, *et al.* Effects of idoxifene and estradiol on NFkappaB activation in cultured rat hepatocytes undergoing oxidative stress. *Liver.* 2001;21:183-191.

Parker MG, Arbuckle N, Dauvois S, *et al.* Structure and unction of the estrogen receptor. *Ann N Y Acad Sci.* 1193;684:119–126.

Qasim BJ, Ali HH, and Hussein AG. Immunohistochemistry Expression of Estrogen and Progesterone Receptors in Human Colorectal Adenoma and Carcinoma Using Specified Automated Cellular Image Analysis System: A Clinicopathological Study *Oman Med J.* 2011;26:307–314.

Qi Zhao, Joseph H L, Deborah Pang, Alexis Temkin, Naeun Park, Sarah CJ, *et al.* Estrogen Receptor-Beta Variants Are Associated with Increased Risk of Alzheimer's Disease in Women with Down Syndrome. *Dement Geriatr Cogn Disord.* 2011;32:241–249.

Qing W, Pengbo G, Kun M, Ying Z, Wei Z, Wanwan H, *et al.* Estrogen suppresses hepatocellular carcinoma cells through ER $\beta$ -mediated upregulation of the NLRP3

Inflammasome. *Laboratory Investigation.* 2015;95:804–816.

Rivadeneira F, Van Meurs JB, Kant J, *et al.* Estrogen receptor beta (ESR2) polymorphisms in interaction with estrogen receptor alpha (ESR1) and insulin-like growth factor I (IGF1) variants influence the risk of fracture in postmenopausal women. *J Bone Miner Res.* 2006;21:1443–1456.

Shin L, Feng Y, Lin H, Ma R, Cai X1. Role of estrogen in hepatocellular carcinoma: is inflammation the key? *J Transl Med.* 2014;8:12:93.

Silva M, Mattos AA, Fontes PR, *et al.* Evaluation of hepatic resection for hepatocellular carcinoma on cirrhotic livers. *Arq Gastroenterol.* 2008;45:99-105.

Slattery ML, Samowitz WS, Holden JA. Estrogen and progesterone receptors in colon tumors. *Am J Clin Pathol.* 2000;113:364-368.

Simes AJ, Eilertsen M, Millar Michael, *et al.* Quantitative analysis of BTF3, HINT1, NDRG1 and ODC1 protein over-expression in human prostate cancer tissue. *PLoS One*. 2013;12:e84295.

Shimizu I, Kohno N, Tamaki K, Shono M, Huang HW, He JH, *et al.* Female hepatology: favorable role of estrogen in chronic liver disease with hepatitis B virus infection. *World Journal of Gastroenterology*. 2007;13:4295–4305.

Smiderle, L; Fiegenbaum, M; Hutz, MH, *et al.* ESR1 Polymorphisms and statin therapy: a sex-specific approach. *The Pharmacogenomics Journal*, 1-7, 2015.

SNP database. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/>>. Acesso em: 23 de Junho de 2016.

Trecek O, Elemenler E, *et al.* Polymorphisms in the promoter region of ESR2 gene and breast cancer susceptibility. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2009;114:207–211.

Tsezou A, Tzetis M, *et al.* Association of repeat polymorphisms in the estrogen receptors alpha, beta (ESR1, ESR2) and androgen receptor (AR) genes with the occurrence of breast cancer. *Breast*. 2008;17:159–166.

Villa E, Dugani A, Fantoni E, Camellini L, Buttafoco P, Grottola A, *et al.* Type of estrogen receptor determines response to antiestrogen therapy. *Cancer*. 1996;56:3883–3885.

Villa E, Moles A, Ferretti I, Buttafoco P, Grottola A, Del BM, *et al.* Natural history of inoperable hepatocellular carcinoma: estrogen receptors' status in the tumor is the strongest prognostic factor for survival. *Hepatology*. 2000;32:233–238.

Villa E, Colantoni A, Camma C, Grottola A, Buttafoco P, Gelmini R, *et al.* F: Estrogen receptor classification for hepatocellular carcinoma: comparison with clinical staging systems. *J Clin Oncol*. 2003;21:441–446.

Wands, J. Hepatocellular carcinoma and sex. *New English Journal of Medicine*. 2007;357:1974–1976.

Wang AG, Lee KY, Kim SY, Choi JY, Lee KH, Kim WH, *et al.* The Expression of Estrogen Receptors in Hepatocellular Carcinoma in Korean Patients. *Yonsei Medical Journal*. 2006;47:811-816.

Wang C, Zhang Z, Zhang H, *et al.* Susceptibility genes for osteoporotic fracture in postmenopausal Chinese women. *J Bone Miner Res*. 2012;27:2582-91.

Wang AG, Lee KY, Kim SY, Choi JY, Lee KH, Kim WH, *et al.* The Expression of Estrogen Receptors in Hepatocellular Carcinoma in Korean Patients. *Yonsei Medical Journal.* 2016;47:811-816.

Wang W, Li Y, Maitituoheti M, Yang R, Wu Z, Wang T, *et al.* Association of an oestrogen receptor gene polymorphism in Chinese Han women with endometriosis and endometriosis-related infertility. 2013;26:93-98.

Wu H, Xu L, Chen J, *et al.* Association oestrogen receptor beta variants and serum levels of estradiol with risk of colorectal cancer: a case control study. *BMC Cancer.* 2012;12:276.

Yaffe K, Lui LY, Grady D, *et al.* Estrogen receptor 1 polymorphisms and risk of cognitive impairment in older women. *Biol Psychiatry.* 2002;51:677–682.

Yeh SH, Chen PJ. Gender disparity of hepatocellular carcinoma: the roles of sex hormones. *Oncology.*2010;78Suppl 1:172-9.

Yu KD, Rao NY, Chen AX, *et al.* A systematic review of the relationship between polymorphic sites in the estrogen receptor-beta (ESR2) gene and breast cancer risk. *Breast Cancer Res Treat.* 2011;126:37–45.

TABLE 1 - Samples characteristics

Characteristics	All	Case	Control	p
<b>Number, N (%)</b>	195	92 (47.2%)	103 (52.8%)	
<b>Age*</b>	53.6 ± 11.0	56.7 ± 9.0	50.9 ± 11.8	<0.001***
<b>Sex**</b>				
<b>Male</b>	138 (70.8)	65 (70.7)	73 (70.9)	1.00
<b>Female</b>	57 (29.2)	27 (29.3)	30 (29.1)	
<b>Comorbidities</b>				
<b>Cirrhosis</b>	162 (83.1)	84 (91.3)	78 (75.7)	0.007 ***
<b>HCV</b>	115 (58.9)	73 (79.3)	42 (40.8)	<0.001 ***
<b>HBV</b>	17 (8,7)	4 (4,4)	13 (12,6)	<0,041***

Abbreviation: HCV, Hepatitis C Virus; HBV, Hepatitis B Virus.

\* Age values are expressed as mean ± standard deviation.

\*\* Absolute frequency (Relative frequency).

\*\*\* When compared case and control groups.

TABLE 2 - Allele frequencies of the tag-SNPs studied, as well as their tagged-SNPs.

SNP	Position in chromosome	Location in ESR2	Nucleotide exchange	Allele frequencies in case group*	Allele frequencies in control group*	Allele frequencies in European descendants**	Allele frequencies in Africans descendants**	Tagged SNP
<b>rs4986938</b>	64699816	UTR-3'	G→A	47% (A)	35% (A)	38% (A)	25% (A)	
<b>rs4365213</b>	64720264	intron 3	T→C	35%(T)	47%(T)	56% (T)	63% (T)	rs12435857
<b>rs17179740</b>	64756751	intron 8	G→A	23% (G)	40% (G)	57%(G)	44% (G)	rs6573549 rs1256061

Abbreviation: SNP, Single Nucleotide Polymorphism.

\* Allele frequencies observed in our study.

\*\* Allele frequencies observed in European and African descendants found in the 1000 Genomes Project Consortium (1000 Genomes Project Consortium, 2012)

TABLE 3 - Genotypic frequencies for SNPs (rs4986938, rs4365213 and rs17179740) in the case and control groups.

SNPs	Case	Control	p*
<b>rs4986938</b>			
AG+GG	75 (81.5%)	95 (92.2%)	0.043
AA	17 (18.5%)	8 (7.8%)	
<b>rs4365213</b>			
CT+TT	49 (53.3%)	76 (73.8%)	0.005
CC	43 (46.7%)	27 (26.2%)	
<b>rs17179740</b>			
GA+AA	38 (41.3%)	70 (68.0%)	<0.001
GG	54 (58.7%)	33 (32.0%)	

Abbreviation: SNP, Single Nucleotide Polymorphism.

\* Chi-Square test with Yates correction, comparing case and control groups.

TABLE 4 - Polymorphisms association

	<b>OR*</b>	<b>95% CI*</b>	<b>p*</b>	<b>OR**</b>	<b>95% CI**</b>	<b>p**</b>
<b>rs4986938 (homozygotes AA)</b>	2.69	1.10-6.58	0.030	3.29	1.21-8.97	0.020
<b>rs17179740 (homozygotes GG)</b>	3.01	1.68-5.42	<0.001	3.23	1.68-6.21	<0.001
<b>Sex (male)</b>	0.99	0.53-1.84	0.973	1.46	0.71-3.00	0.303
<b>HCV</b>	5.58	2.94-10.58	<0.001	6.01	3.03-11.94	<0.001

Abbreviation: HCV, Hepatitis C Virus.

\* Values obtained in two separate models.

\*\* Values obtained in the model using the two SNPs and sex and HVC as covariates.

TABLE 5 - Immunohistochemistry analysis in the case and control groups.

<b>ER expression</b>	<b>Case</b>	<b>Control</b>	<b>p*</b>
without expression (score 0)	6 (14.3%)	10 (35.7%)	0.104
expression between 0.1-35% (score 1)	22 (52.4%)	12 (42.9%)	
expression between 35.1-100% (score 2)	14 (33.3%)	6 (21.4%)	

\* Person chi-square test.

## 5 CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

- Para o gene *ESR1*, o genótipo G/G no SNP rs3020432, portadores do alelo T no SNP rs1643821 e/ou portadores do alelo C do SNP rs2234693 foram preditores para desenvolver CHC;

- Para o gene *ESR2*, o genótipo A/A no SNP rs4986938 e/ou genótipo G/G do SNP rs17179740 foram preditores para desenvolver CHC;

- Na amostra estudada identificamos que o desenvolvimento do CHC ocorre principalmente por volta da quinta década de vida, sendo o sexo masculino o mais prevalente;

- Na nossa amostra as etiologias mais frequentes associadas ao CHC foram à presença de cirrose e a infecção pelo vírus da hepatite C;

- A expressão do ER foi semelhante no grupo caso e no grupo controle.

Nos últimos anos, a relação entre os polimorfismos nos genes *ESR1* e *ESR2* e a suscetibilidade para algumas doenças vem sendo estudada. Os dados da literatura sugerem uma associação entre os polimorfismos dos genes *ESR1* e *ESR2* e a incidência de câncer em humanos. Muitos pesquisadores têm relatado que os polimorfismos dos genes *ESR1* e *ESR2* estão relacionados com um pior prognóstico clínico. No estudo em foco, demonstramos que as variantes dos SNPs rs3020432, rs1643821 e rs2234693 do gene *ESR1* e as variantes dos SNPs rs4986938 e 17179740 do gene *ESR2* apresentaram maior risco de desenvolver CHC.

Estudos mais detalhados sobre esses polimorfismos e com um número amostral maior são necessários devido à diversidade de resultados e a existência de dados, algumas vezes, contraditórios. A realização de estudos funcionais, com o intuito de embasar estes resultados, também é necessária, para que num futuro próximo, permitam a detecção precoce da doença e possam informar sobre estratégias de tratamento adequadas. Sendo assim, acredita-se que este estudo poderá ser útil à população de pacientes com carcinoma hepatocelular, servindo de suporte a futuros estudos clínicos.

## ANEXO A - PARECER CONSUBSTANCIADO DE PROJETO DE PESQUISA

## Parecer Consubstanciado de Projeto de Pesquisa

Título do Projeto: Determinação de polimorfismos e isoformas nos genes ESRA e ESR2 em pacientes com carcinoma hepatocelular

Pesquisador Responsável Márcia Giovenardi

PARECER 1785/12

Data da Versão

Cadastro 031/12

Data do Parecer 11/07/2012

Grupo e Área Temática III - Projeto fora das áreas temáticas especiais

## Objetivos do Projeto

Investigar o papel da variabilidade nos genes dos receptores de estrógenos em pacientes com CHC.

## Sumário do Projeto

Trata-se de um estudo transversal descritivo, no qual serão utilizadas 160 espécimes hepáticos obtidos de pacientes com diagnóstico de CHC e 160 espécimes hepáticos obtidos de pacientes controles, a fim de investigar a variabilidade nos genes dos receptores de estrógenos nestes pacientes

Itens Metodológicos e Éticos	Situação
Título	Adequado
Autores	Adequados
Local de Origem na Instituição	Adequado
Projeto elaborado por patrocinador	Não informado
Aprovação no país de origem	Não necessita
Local de Realização	Própria instituição
Outras instituições envolvidas	Não
Condições para realização	Adequadas

Comentários sobre os itens de Identificação

Introdução	Adequada
------------	----------

Comentários sobre a Introdução

Objetivos	Adequados
-----------	-----------

Comentários sobre os Objetivos

Pacientes e Métodos	
Delineamento	Adequado
Tamanho de amostra	Total 160 Local
Cálculo do tamanho da amostra	Adequado
Participantes pertencentes a grupos especiais	Não
Seleção equitativa dos indivíduos participantes	Adequada
Critérios de inclusão e exclusão	Adequados
Relação risco- benefício	Adequada
Uso de placebo	Não utiliza
Período de suspensão de uso de drogas (wash out)	Não utiliza
Monitoramento da segurança e dados	Adequado
Avaliação dos dados	Adequada - quantitativa
Privacidade e confidencialidade	Adequada
Termo de Consentimento	Adequado
Adequação às Normas e Diretrizes	Sim

Comentários sobre os itens de Pacientes e Métodos

Cronograma	Adequado
Data de início prevista	ago/2012
Data de término prevista	dez/2016

<b>Orçamento</b>	<b>Adequado</b>
<b>Fonte de financiamento externa</b>	<b>Agência de fomento</b>

Comentários sobre o Cronograma e o Orçamento

<b>Referências Bibliográficas</b>	<b>Adequadas</b>
-----------------------------------	------------------

Comentários sobre as Referências Bibliográficas

Recomendação

**Aprovar**

Comentários Gerais sobre o Projeto

**Cronograma: até 2016 (renovação durante o período?)**