

Universidade Federal de Minas Gerais

Faculdade de Medicina

Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Saúde do Adulto

Análise da expressão das proteínas KRAS, BRAF e MEK da via de sinalização intracelular *mitogen activated protein kinases* (MAPK) no carcinoma hepatocelular associado a hepatopatia crônica de diferentes etiologias

SERENA DAFNE DO CARMO SILVA

Belo Horizonte - MG

2018

SERENA DAFNE DO CARMO SILVA

Análise da expressão das proteínas *KRAS*, *BRAF* e *MEK* da via de sinalização intracelular *mitogen activated protein kinases* (MAPK) no carcinoma hepatocelular associado a hepatopatia crônica de diferentes etiologias

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Saúde do Adulto, da Universidade Federal de Minas Gerais, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Saúde do Adulto.

Orientador: Profa. Dra. Teresa Cristina de Abreu Ferrari

Co-orientador: Profa. Dra. Paula Vieira Teixeira Vidigal

**FACULDADE DE MEDICINA
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
BELO HORIZONTE**

2018

SI586 Silva, Serena Dáfne do Carmo.
Análise da expressão das proteínas KRAS, BRAF e MEK da via de sinalização intracelular mitogen activated protein kinases (MAPK) no carcinoma hepatocelular associado a hepatopatia crônica de diferentes etiologias [manuscrito]. / Serena Dáfne do Carmo Silva. - - Belo Horizonte: 2018.
74f.: il.
Orientador (a): Teresa Cristina de Abreu Ferrari.
Coorientador (a): Paula Vieira Teixeira Vidigal.
Área de concentração: Saúde do Adulto.
Dissertação (mestrado): Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina.

1. Carcinoma Hepatocelular. 2. Proteínas. 3. Quinases de Proteína Quinase Ativadas por Mitógeno. 4. Dissertações Acadêmicas. I. Ferrar, Teresa Cristina de Abreu. II. Vidigal, Paula Vieira Teixeira. III. Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina. IV. Título.

NLM: WI 735

Bibliotecário responsável: Fabian Rodrigo dos Santos CRB-6/2697

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Reitora

Profa. Sandra Regina Goulart Almeida

Vice-Reitor

Prof. Alessandro Moreira

Pró-Reitor de Pós-Graduação

Prof. Fábio Alves

Pró-Reitor de Pesquisa

Prof. Mário Campos

Diretor da Faculdade de Medicina

Prof. Humberto José Alves

Vice-Diretora da Faculdade de Medicina

Profa. Alamanda Kfoury Pereira

Coordenador do Centro de Pós-Graduação

Prof. Tarcizo Afonso Nunes

Subcoordenadora do Centro de Pós-Graduação

Profa. Eli Iola Gurgel Andrade

Chefe do Departamento de Clínica Médica

Profa. Valéria Maria Augusto

Coodernador do Programa de Ciências Aplicadas à Saúde do Adulto

Profa. Teresa Cristina de Abreu Ferrari

Subcoordenador do Programa de Ciências Aplicadas à Saúde do Adulto

Profa. Suely Meireles Rezende

Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Saúde do Adulto

Prof. Eduardo Garcia Vilela

Profa. Suely Meireles Rezende

Profa. Gilda Aparecida Ferreira

Profa. Teresa Cristina de Abreu Ferrari

Prof. Paulo Caramelli

Letícia Lemos Jardim (Discente Titular)

Profa. Sarah Teixeira Camargos

Ricardo Mesquita Camelo (Discente
Suplente)

Dedico este trabalho a Deus e a minha família, por ser meu alicerce nesta jornada.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a cada pessoa que ajudou de alguma maneira a tornar esse sonho em realidade:

A Deus pelo amor e cuidado em todos os momentos.

À Profa. Teresa meu muitíssimo obrigado por aceitar a me orientar, por todos os ensinamentos, pelo auxílio e pela paciência. Terei sempre como exemplo de verdadeiro amor e dedicação à sua carreira, não esquecerei jamais.

À Profa. Paula Vidigal e Prof. Marcelo Pascoal pelos ensinamentos e ajuda na elaboração e execução dos experimentos.

Ao colega Paulo pela dedicação no desenvolvimento de nossos projetos e ajuda nos momentos difíceis na elaboração dessa dissertação.

Ao Departamento de Anatomia Patológica e Medicina Legal e funcionários que tornaram possível a realização dos experimentos.

À Fernanda, do Laboratório de Patologia Molecular, pelo auxílio e paciência nas dúvidas em relação aos experimentos.

Ao estatístico do CPG, Fernando, pela disponibilidade e auxílio quando precisei.

Ao Instituto Alfa de Gastroenterologia por disponibilizar seu arquivo para a elaboração dessa pesquisa.

Aos alunos de iniciação científica, pelo apoio e ajuda durante a execução dos experimentos.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Saúde do Adulto, pelos ensinamentos.

À instituição de ensino UFMG e ao Órgão de fomento CAPES pela possibilidade da realização desse trabalho.

A meus pais, Paulo e Margaret, e meu irmão Filipe pelo amor, cuidado, companheirismo, apoio e paciência na realização desse sonho. Compreenderam e respeitaram as horas as quais precisei me ausentar para dedicar-me aos estudos, estando ao meu lado nos momentos mais difíceis. Amo muito vocês.

A todos que me apoiaram e as amigas construídas durante todo esse tempo, sem essas pessoas esse estudo não seria possível.

RESUMO

Introdução: Carcinoma hepatocelular (CHC), neoplasia de comportamento agressivo, comum em adultos é iniciado, mais comumente, pela infecção pelo vírus da hepatite B (VHB) e pelos processos de regeneração do fígado nas hepatopatias crônicas. Apenas 30-40% desses tumores apresentam-se em estádios iniciais, passíveis de tratamentos curativos. Para os casos mais avançados, o tratamento sistêmico está indicado, mas há poucas opções disponíveis, o que reforça a importância do conhecimento dos mecanismos da gênese desse tumor para mudanças nesse cenário. Uma das principais vias de sinalização intracelular que atuam na hepatocarcinogênese é a *mitogen activated protein kinase* (MAPK), formada por alguns componentes que atuam como oncogenes, o que a torna alvo na busca de novos tratamentos. Portanto, o objetivo deste estudo foi caracterizar, semi-quantitativamente, a expressão das proteínas – K-Ras, B-Raf e MEK – da via MAPK no CHC associado a diferentes tipos etiológicos de cirrose hepática. **Métodos:** 40 amostras de CHC decorrentes de hepatopatias de diferentes etiologias – VHB, vírus da hepatite C (VHC), hepatopatia alcoólica e hepatopatia criptogênica (10 amostras de cada) – foram analisadas por imuno-histoquímica, investigando-se a expressão das proteínas K-Ras, B-Raf e MEK da via MAPK no tumor e parênquima cirrótico adjacente. **Resultados:** a maioria dos pacientes (77,5%) era do sexo masculino e a idade mediana foi 58 anos. Não houve diferença significativa entre os grupos etiológicos em relação aos parâmetros clínico-patológicos estudados. Não se observou diferença significativa na frequência de expressão das proteínas alvo quando se comparou o tumor e parênquima cirrótico adjacente. Além disso, não houve diferença estatisticamente significativa em relação à frequência de expressão forte/moderada das proteínas alvo, entre os grupos de cada etiologia da hepatopatia crônica associada ao CHC. Quando os grupos foram analisados considerando-se etiologia viral e não viral, observou-se associação inversa entre expressão de B-Raf e invasão vascular. Essa comparação também evidenciou expressão mais frequente da proteína K-Ras nas amostras do primeiro grupo. **Conclusão:** observou-se associação inversa entre expressão de B-Raf e invasão vascular, bem como expressão mais frequente da proteína K-Ras no grupo de etiologia viral em relação ao grupo não viral. As associações encontradas trazem a reflexão sobre a heterogeneidade e complexidade do CHC, sendo necessários estudos adicionais para maior compreensão e avaliação de tais eventos no desenvolvimento desta neoplasia.

Palavras-chave: carcinoma hepatocelular, via de sinalização intracelular MAPK, etiologias, hepatocarcinogênese.

ABSTRACT

Introduction: hepatocellular carcinoma (HCC), a very aggressive cancer, common in adults, can be initiated by factors like infection with hepatitis B virus (HBV) and regeneration of the liver induced by chronic diseases. Only 30-40% of these tumors are diagnosed at initial stages, when curative treatments are potentially available. For advanced stages, treatments modalities still have poor responses, reinforcing the importance of studying the mechanisms of carcinogenesis of this tumor. Currently, one of the most studied signaling pathways involved in the development of HCC is the mitogen activated protein kinase (MAPK), which has an important activity on the cellular cycle. Studies indicate that some components of this signaling cascade act as oncogenes, which makes MAPK a target for new therapeutic agent development. The aim of this study is to qualitatively describe the expression of the MAPK's proteins – K-Ras, B-Raf and MEK – in HCC associated with hepatopathies of different etiologies. **Methods:** 40 HCC samples from hepatopathies of different etiologies – HBV, hepatitis C virus (HCV) infection, alcoholic and cryptogenic liver diseases (10 samples of each) were analyzed by immunohistochemistry in order to investigate the expression of some MAPK pathway proteins – K-Ras, B-Raf and MEK – in samples of HCC and adjacent cirrhotic parenchyma. **Results:** most patients (77.5%) were male and the median age was 58 years. There was no difference between etiologic groups regarding the clinic and pathologic parameters studies. No difference in the frequency of expression of the target proteins was observed when comparing tumor and adjacent cirrhotic tissue. Comparing each etiologic group individually, there was no statistically difference regarding the frequency of strong/moderate labeling of the target proteins. An inverse association between B-Raf expression and vascular invasion was seen when compared viral and non-viral etiologic group. Moreover, this comparison evidenced more frequent expression of the K-Ras in the samples from the first group. **Conclusion:** an inverse association regarding B-Raf expression and vascular invasion, such as a more frequent K-Ras expression in viral instead of non-viral group, were seen. These findings lead to a reflection about the heterogeneity and complexity of hepatocarcinogenesis. However, further studies are needed to the better comprehension and evaluation of such events in the CHC development.

Keywords: Hepatocellular carcinoma, MAPK signaling pathway, etiologies, hepatocarcinogenesis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Vias de sinalização intracelular.....	22
Figura 2. Via de sinalização intracelular MAPK.....	28
Figura 3. Blocos confeccionados com a técnica <i>tissue microarray</i> para as amostras de CHC e parênquima adjacente não-tumoral referente às etiologias infecção pelo vírus da hepatite C, hepatopatia etanólica e hepatopatia criptogênica	40
Figura 4. Expressão das proteínas no tumor e parênquima cirrótico. (a) K-Ras: tumor e cirrose – marcação fraca. Padrão histológico: sólido; (b) K-Ras: tumor – marcação forte, cirrose – marcação fraca. Padrão histológico: pseudo-acinar.....	52
Figura 5. Expressão das proteínas no tumor e parênquima cirrótico. (c) B-Raf: tumor e cirrose – marcação fraca. Padrão histológico: sólido; (d) B-Raf: tumor – marcação forte, cirrose – marcação fraca. Padrão histológico: pseudo-acinar.....	53
Figura 6 – Expressão das proteínas no tumor e parênquima cirrótico. (e) MEK: tumor e cirrose – sem marcação. Padrão: trabecular; (f) MEK: tumor e cirrose – marcação fraca. Padrão: trabecular; (g) MEK: tumor – marcação forte. Padrão: trabecular.....	54

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Dados clínicos dos pacientes com carcinoma hepatocelular.....	50
Tabela 2. Características anatomopatológicas dos pacientes.....	51
Tabela 3. Classificação histológica dos tumores de acordo com a hepatopatia crônica.....	51
Tabela 4. Comparação da expressão forte/moderada <i>versus</i> fraca/ausente das proteínas K-Ras, B-Raf e MEK no tumor segundo as etiologias virais e não virais.....	55

LISTA DE ABREVIATURAS

- AFP - alfafetoproteína
- AKT – serina treonina quinase
- APC – regulador da via de sinalização intracelular WNT
- ARAF – *A-Raf proto-oncogene, serine/threonine kinase*
- BRAF – *B-Raf proto-oncogene, serine/threonine kinase*
- c-fos – *Fos proto-oncogene, AP-1 transcription factor subunit*
- CHC – carcinoma hepatocelular
- c-jun – *Jun proto-oncogene, AP-1 transcription factor subunit*
- cMet – *tyrosin-protein kinase Met*
- c-Myc - *MYC proto-oncogene, bHLH transcription factor*
- CRAF – *Raf-1 proto-oncogene, serine/threonine kinase*
- CTNNB1 - *catenin beta 1*
- EGF – *epidermal growth factor*
- EGFR – *epidermal growth factor receptor*
- ERK – proteína reguladora extracelular quinase
- FGF – *fibroblast growth factor*
- FGFR – *fibroblast growth factor*
- GPCR – *G-protein-coupled receptor*
- GRB2 – *growth factor receptor bound protein 2*
- GSK3 – *glycogen synthase kinase 3*
- HER – fator de crescimento epidérmico humano
- HGF– *hepatocyte growth factor*
- H-RAS – *HRAS proto-oncogene, GTPase*
- IGF – *insulin-like growth factor*
- IGF1R – *insulin-like growth factor receptor*
- IGFBP – proteína ligante do fator de crescimento semelhante à insulina
- INCA – Instituto Nacional do Câncer
- JAK – *Janus activated kinases*
- JNK – Jun N-terminal quinase
- K-RAS – *KRAS proto-oncogene, GTPase*
- MAPK – *mitogen activated protein kinases*

MEK – proteína extracelular mitógena quinase
MELD – *Model for End-stage Liver Disease*
MPK-1 - *mitogen-activated protein kinase phosphatase 1*
mTOR – *mammalian target of rapamicine*
NS3 – *non-structural protein 3*
NS5A – *non-structural protein 5 A*
N-RAS – *NRAS proto-oncogene, GTPase*
PDGF – *platelet-derived growth factor*
PDGFR – *platelet-derived growth factor receptor*
PI3K – fosfatidilinositol-3-quinase
PIP3b – fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato
PTEN – proteína homóloga da fosfatase e tensina
RAF – *v-raf murine sarcoma viral*
RAS – *rat sarcoma virus*
Rb/p16 – retinoblastoma
ROS - *releasing reactive oxygen*
RTK – *Ras oncogene at 85D*
SHARP – *Sorafenibe Hepatocellular Assessment Randomized Protocol*
SHC – *SHC adaptor protein 1*
SOS – *SOS Ras/Rac guanine nucleotide exchange factor 1*
STAT – *signal transducers and activators of transcription*
TCF – fatores de resposta de célula T
TERT – ribonucleoproteínas da transcriptase reversa da telomerase
TGF – *transforming grown factor*
TGFβ – *Wnt-transforming growth factor-β*
TH – Transplante hepático
VEGF – *vascular endothelial growth factor*
VEGFR – *vascular endothelial growth factor receptor*
VHB – vírus da hepatite B
VHC – vírus da hepatite C
WNT-β-catenina – *Wingless-β-catenina*

SUMÁRIO

1- CONSIDERAÇÕES INICIAIS	16
1.1- Introdução	16
1.2- Antecedentes científicos	17
1.2.1- Carcinoma hepatocelular	17
1.2.2- Hepatocarcinogênese	20
1.2.3- Vias de sinalização intracelular	22
1.2.3.1- Principais vias de sinalização intracelular atuantes no CHC	26
1.3- Referências Bibliográficas	32
2- OBJETIVOS	38
2.1- Objetivo Geral	38
2.2- Objetivos específicos	38
3- MÉTODO	39
3.1- <i>Tissue microarray</i>	39
3.2- Imuno-histoquímica	40
3.3- Escore imuno-histoquímico	41
3.4- Análise estatística	42
4- ARTIGO	43
5- CONSIDERAÇÕES FINAIS	65

APÊNDICES

A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	67
B – Protocolo de abordagem de pacientes a serem incluídos na investigação do estudo “Associação do IGF1R (<i>insulin-like growth factor-1 receptor</i>) e de proteínas das vias MAPK e PI3K/AKT/mTOR aos diferentes tipos etiológicos de carcinoma hepatocelular”	69
C – Protocolo para análise histológica	71
D – Expressão das proteínas K-Ras, B-Raf e MEK no tumor e parênquima hepático adjacente de acordo com a etiologia da hepatopatia crônica	73

ANEXOS

1 – Carta de aprovação do Comitê de Ética	75
2- Declaração de aprovação	76

1- CONSIDERAÇÕES INICIAIS

1.1- INTRODUÇÃO

O carcinoma hepatocelular (CHC), segunda causa de morte por câncer no mundo, resulta de inflamação crônica dos hepatócitos por diversos fatores muito comuns no nosso meio, como o vírus da hepatite B (VHB) e C (VHC), álcool, hepatites auto-imunes, esteatohepatite não alcoólica dentre outros, e representa um desafio para a oncologia (1). Mundialmente, são mais de 750 mil casos diagnosticados por ano, com ampla variação da incidência entre os países (1). O Brasil é considerado um país de incidência intermediária, com cerca de 5.000 casos/ano, mas os dados são considerados subestimados (2).

Em todo o mundo, apenas 30-40% desses tumores apresentaram-se em estádios iniciais da doença, sendo passíveis de tratamentos potencialmente curativos. A terapêutica disponível atualmente compreende: procedimentos cirúrgicos, como o transplante hepático (TH) ou ressecção parcial do órgão, que possuem potencial curativo; procedimentos locorregionais, como a ablação percutânea por radiofrequência, que possui potencial curativo em alguns casos; quimioembolização arterial; e o tratamento medicamentoso, como quimioterapia e drogas alvo (2-4). Pacientes em estádios mais avançados da doença ou que tiveram recidiva do tumor após tratamento locorregional, tem sobrevida mediana entre oito e onze meses e, nos últimos anos, poucos avanços foram conquistados para mudança desse prognóstico sombrio, tendo em vista as poucas opções para o tratamento sistêmico com impacto na sobrevida global (3-7).

Das publicações disponíveis até o presente, nenhum ensaio clínico fase III comprovou benefício da quimioterapia citotóxica convencional na redução da mortalidade por esse tumor. Somente em 2008, o estudo *Sorafenibe Hepatocellular Carcinoma Assessment Roandomized Protocol* (SHARP), controlado e randomizado, que incluiu pacientes com CHC, demonstrou aumento de pouco mais de dois meses da sobrevida global entre os pacientes tratados com o sorafenibe, um inibidor multiquinase, comparados com placebo (7). No último ano, outro estudo fase III foi publicado e mostrou aumento modesto em sobrevida global com o uso de outro inibidor multiquinase, o regorafenibe, desta vez em pacientes em segunda linha de tratamento (8).

Esses inibidores multiquinases atuam no bloqueio e regulação de algumas proteínas de importantes vias de sinalização intracelular que, potencialmente, estariam envolvidas na gênese do CHC (7-10). Uma delas é o *vascular endothelial growth factor* (VEGFR), um receptor transmembrana envolvido no processo de neoangiogênese, fenômeno primordial para o desenvolvimento tumoral. Outro alvo de inibição por essas drogas é a Raf quinase, que pertence à via *mitogen activated protein kinases* (MAPK), uma importante cascata de ativação que pode levar à expressão de fatores proliferativos e antiapoptóticos, consequentemente mudando a vascularização e a proliferação do tumor (10).

Diante das várias etiologias de cirrose hepática que podem levar ao CHC, seja por meio da própria cirrose ou também por lesão direta ao hepatócito, como pode ocorrer no caso do vírus B, existem evidências sugerindo que a oncogênese dessa neoplasia é um processo heterogêneo, e que os agentes podem levar ao câncer por diferentes mecanismos, inclusive com variações geográficas (11). Assim como o vírus B, alguns estudos sugerem a atividade direta do vírus C na hepatocarcinogênese, mesmo sem cirrose.

Tendo em vista a gravidade da doença, os benefícios clínicos apenas modestos das drogas atualmente disponíveis, a complexidade da sinalização intracelular, bem como a heterogeneidade do tumor, torna-se essencial compreender melhor os mecanismos envolvidos na hepatocarcinogênese. Dessa forma, este estudo tem como objetivo caracterizar a atividade das proteínas da via de sinalização MAPK e associar os achados com os diferentes tipos etiológicos de hepatopatias crônicas que podem levar o desenvolvimento do CHC.

1.2- ANTECEDENTES CIENTÍFICOS

1.2.1- Carcinoma hepatocelular

O CHC apresenta alta prevalência e elevada mortalidade, sendo classificado como a sexta neoplasia mais frequente no mundo (1). Em 2015, foram registradas 788.000 mortes ocasionadas pelo CHC no mundo e a maior incidência e prevalência de casos ocorrem em países da Ásia e África (1,12). No Brasil, país cuja incidência é considerada intermediária,

dados do Instituto Nacional do Câncer (INCA) apontam pelo menos 5000 novos casos por ano, mas com possibilidade desses números estarem subestimados.

O diagnóstico geralmente é tardio, cujas causas variam desde as inespecíficas manifestações iniciais da doença, que se confundem com os sintomas das hepatopatias de base, até os desafios envolvidos na implantação dos programas de rastreamentos em pacientes com alguma condição predisponente. Somente cerca de 30% a 40% dos pacientes são diagnosticados em estádios iniciais da doença, quando há intervenções passíveis de cura, como a hepatectomia parcial, o transplante hepático ou mesmo procedimentos locorregionais como a ablação por radiofrequência (4,6,7,13).

O CHC é encontrado frequentemente relacionado à inflamação crônica dos hepatócitos resultante de diferentes etiologias: infecção pelos VHB ou VHC, etilismo, hepatopatias autoimunes, esteatohepatite não-alcoólica, intoxicação por aflatoxinas e hepatopatias metabólicas hereditárias, como a hemocromatose hereditária, doença de Wilson e deficiência de α -1-antitripsina e também em condições ainda não identificadas, chamadas de criptogênicas (1,2,4,14). Na maioria dos casos, a cirrose é a alteração que antecede o CHC, mas também, agentes como o VHB pode levar ao câncer de forma direta (15,16).

Estudos mostram que a infecção pelo VHB é uma das principais etiologias do CHC. Entre os portadores crônicos do vírus, 15% a 40% têm chances de desenvolver o câncer (17,18). O VHB pertence à família *Hepadnaviridae*, e tem como principal característica a capacidade de replicação do seu material genético, originando RNA a partir do seu DNA. O DNA viral possui formato circular, cerca de 3.200 pares de bases e quatro regiões de leitura, nas quais ocorrem os processos de codificação da polimerase da transcriptase reversa, síntese das proteínas de membrana, formação da proteína X e replicação viral (19-21).

Além de ser causa de hepatite crônica e predispor ao desenvolvimento do CHC, como ocorre nas diversas hepatopatias crônicas que evoluem para cirrose, outro mecanismo de associação do CHC pelo VHB é pela interação entre o DNA viral e o DNA dos hepatócitos. Quando isto ocorre, o genoma modificado apresenta instabilidade generalizada em regiões de deleções, translocações e fusão de transcritos. Por fim, as células alteradas se multiplicam originando o tumor (22-24).

Diferentes genótipos do VHB estão envolvidos no desenvolvimento da cirrose e do CHC, e são encontrados em diversas regiões do mundo (25,26). Atualmente tem-se conhecimento de nove tipos (A – I) (27,28) e, dentre eles, o genótipo C apresenta maior tendência em atuar na ocorrência do rearranjo cromossomal e nos danos ao material genético, pela indução da abertura da dupla fita de DNA e acúmulo de espécies reativas do oxigênio, causadoras de estresse oxidativo, contribuindo diretamente para a formação do tumor (16,29).

Outra importante etiologia viral, o VHC, possui uma molécula de RNA senso positivo, contendo cerca 9.500 nucleotídeos (30). Este vírus possui uma diversidade grande, devido à deficiência de reparo da sua enzima RNA polimerase. Essa característica é importante para o conhecimento da patogênese da hepatite crônica pelo VHC e, conseqüentemente, impacta na escolha do melhor tratamento antirretroviral, o qual está associado a redução do risco de CHC ou melhores desfechos na abordagem da doença (31).

Estima-se que cerca de 80% dos infectados pelo VHC, desenvolvem a hepatite crônica, e 20% dos que desenvolvem cirrose apresentarão CHC (24,32). Esse processo se dá pela necroinflamação tecidual e alteração de processos de reparação, como acontece nas outras hepatopatias crônicas. Outro mecanismo sugerido é a interferência de proteínas nucleares do vírus – como NS3 e NS5A –, na ação de proteínas presentes em algumas vias de sinalização intracelular, responsáveis pelo controle da proliferação e morte celular, como a atenuação da atividade do supressor tumoral p53, favorecendo o desenvolvimento do CHC, o que torna o VHC um agente carcinogênico (24).

O CHC desenvolve-se de forma gradativa, sendo encontrado no fígado como uma formação nodular. Inicialmente desenvolve-se pequeno foco displásico monoclonal milimétrico que cresce, vai acumulando mutações que, então, levam ao desenvolvimento do tumor (33). Histologicamente, o CHC pode apresentar diferentes padrões histológicos, sendo classificados estruturalmente como em arranjo trabecular, pseudoacinar, tumor sólido (34,35).

Edmondson e Steiner (34) classificaram as variações estruturais do CHC em quatro grupos de acordo com o grau de diferenciação de determinadas características celulares, como

tamanho do núcleo, formato da célula, relação núcleo-citoplasma e presença de hipercromasia – critério usado atualmente (34,35):

grau 1 – as células, geralmente, apresentam-se com distribuição trabecular, estando enfileiradas ou conjuntas, em forma de haste, com citoplasma abundante e irregularidades nucleares mínimas, assemelhando-se, portanto, ao parênquima hepático normal; geralmente é encontrado em tumores nodulares de células pequenas;

grau 2 – há pleomorfismo nuclear mais intenso e hipercromasia, nucléolos evidentes, citoplasma abundante e eosinofílico;

grau 3 – as alterações nucleares são mais evidentes e acompanhadas de angulação significativa;

grau 4 – há pleomorfismo intenso e presença de células gigantes.

Essas diferenciações podem variar entre os pacientes e até mesmo entre diferentes nódulos encontrados em um único paciente. Isso ocorre devido aos diversos fatores que contribuíram para o desenvolvimento do tumor, como os descritos anteriormente (35).

1.2.2- Hepatocarcinogênese

Quando ocorre lesão dos hepatócitos, cascatas de sinalização imunológicas extracitoplasmáticas são ativadas. Como consequência, há inflamação do parênquima hepático e necrose hepatocelular. Este processo origina um ciclo de proliferação celular e regeneração tecidual, levando à multiplicação dos hepatócitos e à fibrose. Como resultado, o fígado torna-se cirrótico, condição patológica que predispõe o desenvolvimento do CHC. Durante a evolução desse processo, ocorrem importantes alterações moleculares em proteínas envolvidas nas vias de sinalização intracelular, que em linhas gerais vão ativar oncogenes e fatores de transcrição, inativar proteínas supressoras tumorais e outros mecanismo envolvidos no ciclo celular (4,36).

Na medida em que ocorrem os processos repetitivos de tentativa de reparação, as vias de sinalização intracelulares, responsáveis pelos processos de crescimento, proliferação e apoptose necessários para restabelecer o equilíbrio tecidual, podem ser alteradas por modificações em suas proteínas decorrentes das alterações na cadeia de DNA dos hepatócitos. Conseqüentemente, a célula exerce determinado comando repetitivamente, sem que haja resposta dos seus respectivos supressores tumorais, os quais são responsáveis

pelo controle das atividades das proteínas presentes envolvidas no ciclo de vida da célula (36,37).

As vias que controlam o ciclo vital celular são ativadas por meio de fatores de crescimento específicos, que possuem afinidade pelo receptor de membrana existente na superfície da célula. Dados experimentais evidenciam que estes podem ser encontrados em grande quantidade no CHC, como a superexpressão dos fatores de crescimento da família TGF, encontrados em diferentes vias de sinalização intracelular (36).

Além dos fatores de crescimento, existem os supressores tumorais, envolvidos no desenvolvimento do CHC, que teriam sido inativados pelos processos inflamatórios recorrentes, como por exemplo, o retinoblastoma (Rb/p16) e a proteína homóloga da fosfatase e tensina (PTEN), dentre outros (36). Em comparação com os oncogenes, relacionados ao CHC, os supressores tumorais apresentam maior relevância no desenvolvimento tumoral. Estudos mostram inativação dessas proteínas em até 80% dos casos de CHC (38,39).

O telômero é a porção terminal do cromossomo que possui uma sequência de DNA repetitivo a qual tem a função de contribuir para a manutenção da integridade do cromossomo. Quando uma célula se divide com os telômeros alterados, há o risco de que haja perda de informações para a preservação da estabilidade celular. Como citado, a hepatocarcinogênese está diretamente relacionada às hepatopatias crônicas e à cirrose, pela inflamação contínua. Esse dano contínuo desencadeia estresse oxidativo e a tentativa de correção do DNA, sendo que, o constante reparo pode ocasionar erros na replicação e, conseqüentemente, mutações em genes envolvidos no ciclo celular (36).

Da mesma forma que as demais neoplasias, o CHC desenvolve-se por alterações em genes que podem iniciar o crescimento e imortalidade das células tumorais. Caracteriza-se pela ocorrência de diversos processos desencadeados por reparos no DNA pela presença de lesões crônicas, na qual pode alterar estruturas gênicas atuantes nas vias de sinalização intracelular, como as encontradas no telômero, oncogenes e supressores tumorais. Sendo assim, o conhecimento deste processo é fundamental para elucidar as atividades das vias moleculares, pois sua manutenção depende do equilíbrio que pode ser afetado pela hepatocarcinogênese.

1.2.3- Vias de sinalização intracelular associadas à hepatocarcinogênese

Com os avanços da ciência, tem-se conhecimento de que a carcinogênese é ativada por anormalidades nas vias de sinalização intracelulares, e que a sua atividade na regulação do ciclo de vida básico é alterada pela supressão ou hiperexpressão de algumas proteínas importantes para a homeostase celular.

As vias de sinalização encontradas até o presente momento são: via mediada pela *Wingless-β-catenina* (WNT-β-catenina), *Janus activated kinases/signal transducers and activators of transcription* (JAK/STAT), *vascular endothelial growth factor receptor* (VEGF/VEGFR), *platelet-derived growth factor receptor* (PDGF/PDGFR), *epidermal growth factor receptor* (EGF/EGFR), *fibroblast growth factor receptor* (FGF/FGFR), *insulin-like growth factor receptor* (IGF/IGFR), *hepatocyte growth factor/Met* (HGF/cMet), via da *mammalian target of rapamycin* (mTOR) e MAPK (40,41) (Figura 1). As duas últimas citadas são as mais estudadas e a via MAPK será o foco deste estudo.

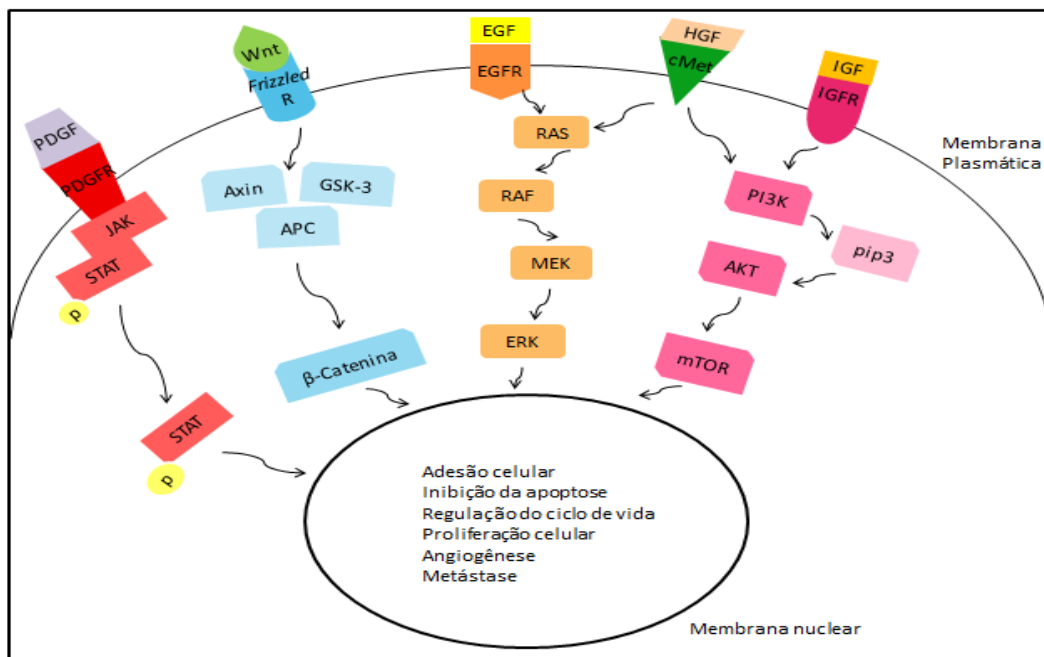


Figura 1 – Vias de sinalização intracelular.

A via mediada pela WNT-β-catenina, encontrada ativa no CHC, é conhecida por atuar no desenvolvimento de diversas neoplasias malignas, como o hepatoblastoma, melanoma e câncer de mama (42-44). Pode ser dividida em dois tipos, WNT-β-catenina canônica e WNT-β-catenina não-canônica. A primeira age no controle da proliferação e morfologia

celulares, adesão às células adjacentes e regeneração tecidual; já a segunda, quando há descontrole do crescimento celular decorrente da atividade exercida pela via anterior, é ativada e desencadeia processos de migração celular, invasão tecidual e metástase (43). No fígado, é uma das vias de sinalização mais ativas e age nas atividades metabólicas dos hepatócitos, principalmente na proliferação celular. Assim, apresenta importante papel no desenvolvimento hepático e na regeneração do órgão (45,46).

É mediada por receptores de membrana pertencentes à família *Frizzled*. Para que a β -catenina entre e inicie a cascata de fosforilação, os receptores precisam da sinalização de outra proteína que regula a sua ação, que é conhecida como *dishwelled*. A β -catenina se liga ao seu respectivo receptor e sinaliza para o interior da célula, agindo como um coativador de fatores promotores de resposta de células T (TCF) (41,46,47). A proteína é fosforilada pelo complexo APC/Axin/GSK3, exerce seu papel no controle homeostático celular e logo após é degradada (41,46).

Quando a β -catenina está em excesso é estocada no citoplasma e no núcleo e pode desencadear desregulação da diferenciação e do ciclo celular. A ação descontrolada dessa via ocorre pelas variações moleculares decorrentes dos processos de cicatrização repetidos e tentativa de reparação do parênquima hepático que são observados no quadro cirrótico (41,46). Estudos mostram que este descontrole, pela via canônica, pode iniciar a atividade de outras vias de sinalização, como a VEGF por exemplo (48).

A via de sinalização JAK/STAT, por sua vez, age na regulação da homeostase celular pela regulação da proliferação, diferenciação e apoptose. Pode ser ativada por inúmeras citocinas e fatores de crescimento envolvidos no ciclo celular; e estes desencadeiam resposta inflamatória tecidual por interleucinas e interferons atuantes nesse processo. As citocinas de ativação induzem fosforilação das proteínas do complexo JAK (Jak1, Jak2, Jak3 e Tyk2), próximas à membrana plasmática, e quando ativadas desencadeiam fosforilação das proteínas do complexo STAT (Stat1, Stat2, Stat3, Stat4, Stat5 e Stat6), que logo após se deslocam para o núcleo, local onde exercem a função de fator de transcrição da expressão gênica (49).

Em fígados com parênquima normal, as atividades da via são encontradas sem alterações das proteínas atuantes, mas quando há anormalidades, são encontradas isoformas que

alteram o ciclo homeostático celular (50). A fosforilação de proteínas análogas da Jak, como Jak1 e Jak2, foi encontrada em quantidades significativas em amostras contendo CHC ou alterações morfológicas não neoplásicas. Isoformas das proteínas Stat também foram encontradas em amostras de CHC, sendo que, em comparação dos parênquimas tumoral e adjacente, estavam mais expressas no tumor; o que caracteriza a presença de alterações gênicas que afetaram o ciclo celular habitual (49).

As vias mediadas pelos receptores VEGFR, PDGFR e FGFR atuam no controle da angiogênese. Este evento é importante não só para o desenvolvimento corporal como na embriogênese, mas também para os processos de crescimento tumoral e disseminação metastática do CHC e outras neoplasias. As alterações ocorrem pela ativação de proteínas como o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), fator de crescimento do fibroblasto (FGF), fatores inibitórios da atividade vascular como a trombospondina, glicoproteína atuante na coagulação, dentre outros (51,52).

Estudos mostram que proteínas envolvidas na angiogênese foram encontradas em grande quantidade em pacientes cirróticos que desenvolveram CHC. Esses receptores podem ser ativados por proteínas das vias de sinalização, que participam de processos como a transdução nuclear. Entre essas vias, destaca-se a MAPK e a PI3K-AKT-mTOR (40). Apesar de haver semelhanças em suas funções, esses receptores exercem ações distintas.

O VEGF é um agente mitogênico, presente no endotélio e atua na angiogênese, agindo na formação, crescimento e desenvolvimento de vasos sanguíneos (51,53). A produção excessiva dessa proteína pode ser estimulada pela baixa oxigenação desencadeada pelo crescimento tumoral, o que leva o organismo a identificar a necessidade da formação de novos vasos sanguíneos para a oferta adequada de oxigênio aos tecidos. Essa mediação ocorre pelo fator de indução de hipóxia 2- α . Além disso, outras formas de inicialização do tumor podem ocorrer pela ativação do EGFR e por meio de fatores de indução da oxigenação tecidual desencadeados pela via de sinalização ciclo-oxigenase 2 (40,53,54).

Outro fator conhecido, o PDGF, é um mitógeno importante que atua em células como as do tecido conjuntivo. Esta proteína é uma molécula dimérica que contém pontes dissulfeto e duas cadeias polipeptídicas – A e B –, estruturalmente similares, que possuem afinidade por estruturas homodímeras e heterodímeras. Tem a função de estimular a quimiotaxia e

reorganizar o sistema de filamentos de actina agindo diretamente nas mudanças da motilidade e do formato das células (55,56). Além disso, atua no crescimento celular e contribui para a ativação das vias de sinalização responsáveis pela angiogênese em tumores sólidos, como a via MAPK no CHC (57).

Já o fator de crescimento fibroblástico (FGF) pertence a um grupo constituído por 19 fatores de crescimento, que possuem papel fundamental na carcinogênese. Tem a função de estimular a proliferação celular por meio das vias MAPK e mTOR além de ter participação nos processos angiogênicos. Neste caso, quando há CHC, o complexo formado pela junção do respectivo fator de crescimento com as vias moleculares apresenta grande resistência aos tratamentos antiangiogênicos e, além disso, tem a capacidade de estimular a formação de células estromais, potencialmente reduzindo a penetração de quimioterápicos, eventos relacionados à resistência do tumor (58).

Além dos fatores citados anteriormente, outro que se destaca é o EGFR, um receptor transmembrana, membro da família de receptores do fator de crescimento epidérmico humano (HER). Tem capacidade de se ligar a diferentes fatores de crescimento e contribui para a diferenciação, adesão e crescimento celulares; além disso, atua no ciclo de sobrevivência da célula. Essas ações acontecem por meio de uma cascata de ativação de proteínas pertencentes a importantes vias como MAPK e PI3K-AKT-mTOR (59). São reconhecidas duas formas de ativação deste receptor: a heterodimerização, na qual o EGFR pode interagir com os outros receptores de sua família (HER2, HER3 e HER4) criando uma ponte de sinalização dupla e a homodimerização, em que ocorre interação de dois receptores EGFR (59).

Outro importante fator de crescimento reconhecido na carcinogênese do CHC é o fator de crescimento semelhante à insulina (IGF). Nesse caso, as duas isoformas, IGF1 e IGF2 podem se ligar ao receptor, o IGFR1 e IGFR2. Além disso, outras seis proteínas de ligação (IGFBP1-6) auxiliam nas etapas iniciais de ativação dessa via. Alguns estudos demonstram que o IGF2 pode se ligar tanto ao seu respectivo receptor, IGFR2, quanto ao IGFR1; mas essa última interação se dá com afinidade menor (60,61).

Evidências apontam expressão gênica aumentada do IGF2 no CHC, o que sugere a participação desse complexo de proteínas na hepatocarcinogênese. A atividade desta via

tem grande importância no desenvolvimento fetal e no ciclo de vida da célula, como, por exemplo, apoptose e diferenciação (60,61). O IGF2 participa da ativação de vias de sinalização intracelular como MAPK e mTOR (40).

HGF/cMet atua tanto no crescimento tumoral, quanto nos processos de angiogênese e invasão tecidual. Essa atividade pode ser encontrada em diversas neoplasias, dentre as quais o CHC (62). O cMet é um receptor de membrana do tipo tirosina quinase que contém em sua composição estruturas químicas específicas que se ligam ao fator de crescimento de hepatócitos (HGF), uma molécula do tipo heterodímero dividida em duas estruturas – cadeia α e cadeia β . Estas trabalham em conjunto para a formação da ponte dissulfeto, necessária para que a partícula se ligue ao receptor e ative a cadeia de fosforilação celular de diversas vias, como ocorre com as proteínas encontradas nas vias mTOR e MAPK (63).

Quando há alguma anormalidade na sinalização celular, podem ocorrer atividades diferenciadas que causam danos ao organismo, como aumento da migração e proliferação celulares, desencadeamento de invasão tecidual, aumento da capacidade de desenvolvimento metastático em células tumorais, dentre outros fatores. Estudos evidenciam presença do receptor cMet ativado mais expresso no tumor em comparação com o parênquima não tumoral adjacente, nos pacientes diagnosticados com CHC; além disso, aumento da expressão deste receptor foi associado a diminuição da sobrevivência dos pacientes (63-65).

1.2.3.1- Principais vias de sinalização intracelular atuantes no CHC

Drogas que atuam em alvos gênicos específicos têm sido desenvolvidas para controlar o crescimento tumoral de forma mais específica, com menor impacto nas funções das células saudáveis. Isso tem ocorrido graças às descobertas das funções das vias de sinalização gênicas. Atualmente sabe-se que as vias encontradas no CHC com alta frequência são a mTOR e MAPK, tornando-se alvos de muitos estudos.

A via mTOR é responsável por diversas funções celulares importantes para o organismo, como a ativação de cascatas que controlam a apoptose e o ciclo de vida celular – crescimento, proliferação e motilidade celular, eventos que são afetados na formação

tumoral (11,59,66,67). Pode ser ativada por vários fatores de crescimento responsáveis por iniciar a fosforilação de proteínas, como citado anteriormente.

Diversos fatores de transição podem deflagrar a atividade dos receptores da fosfatidilinositol-3-quinase (PI3K) ocorrendo, subsequentemente, produção de fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato (PIP3b), um mensageiro lipídico que é responsável por ativar a AKT, uma molécula serina/treonina quinase que atua como regulador metabólico responsável por fosforilar, quando ativada, a proteína mTOR e outras proteínas atuantes em vias moleculares (68).

Tal via de sinalização intracelular está ativada em cerca de 50% dos pacientes portadores de CHC (13) e está associada a comportamento agressivo do tumor (13,69). O descontrole das funções celulares pode levar ao distúrbio do processo de apoptose, crescimento descontrolado das células e formação do tumor. A AKT é um agente controlador de uma proteína importante no ciclo celular e estudos apontam evidências do papel dessa proteína como agente carcinogênico direto (66,67).

MAPK exerce importante papel na homeostase celular, regula e coordena as ações que ocorrem nas fases G1 e S da mitose – onde acontece a duplicação do DNA –, e realiza o controle dos genes atuantes na transcrição intracelular e proliferação celular (59). Além disso, atua diretamente no ciclo de vida das células. A desregulação de algum processo da cadeia de fosforilação pode acarretar sérios distúrbios como transformação maligna da célula afetada e desenvolvimento tumoral (68,70).

A MAPK faz parte de uma grande família, na qual vários membros possuem papéis cruciais na sinalização intracelular, sendo os mais importantes: proteína reguladora extracelular quinase (ERK) 1/2, Jun N-terminal quinase (JNK) 1/2/3, p38 $\alpha/\beta/\gamma/\delta$ e ERK 5. Para que determinada via desse grupo seja ativada é necessária sinalização transducional realizada por receptores de membrana (RTK) ou por receptores *G-protein-coupled* (GPCR), mas a maioria das vias MAPK é ativada por proteínas pertencentes ao segundo grupo de receptores em cascatas de ativação lineares (71).

Após a ativação da via por fatores de crescimento como descrito, ocorre a fosforilação de um complexo de moléculas, denominadas GRB2/SHC/SOS, que ativam a cascata de

sinalização das proteínas pertencentes à via (68). Quando se inicia a atividade desse complexo, a primeira proteína a ser ativada é a GTPase pequena, RAS, e logo após a molécula serina/tirosina quinase RAF. RAF possui três isoformas, A-RAF, B-RAF e C-RAF, sendo que, assim como RAS, também possuem potencial oncogênico. Essas proteínas possuem a função de sinalizar para as demais o início e interrupção das funções celulares exercidas pela via, atuando como reguladores do processo de transcrição (71-73). A proteína RAF migra para a membrana por meio de processos de fosforilação e mudanças enzimáticas, permitindo as próximas proteínas da cascata, MEK e ERK, sejam ativadas. Essa cascata de sinalização está presente nas células somáticas exercendo a atividade regular do ciclo homeostático (71,73) (Figura 2).

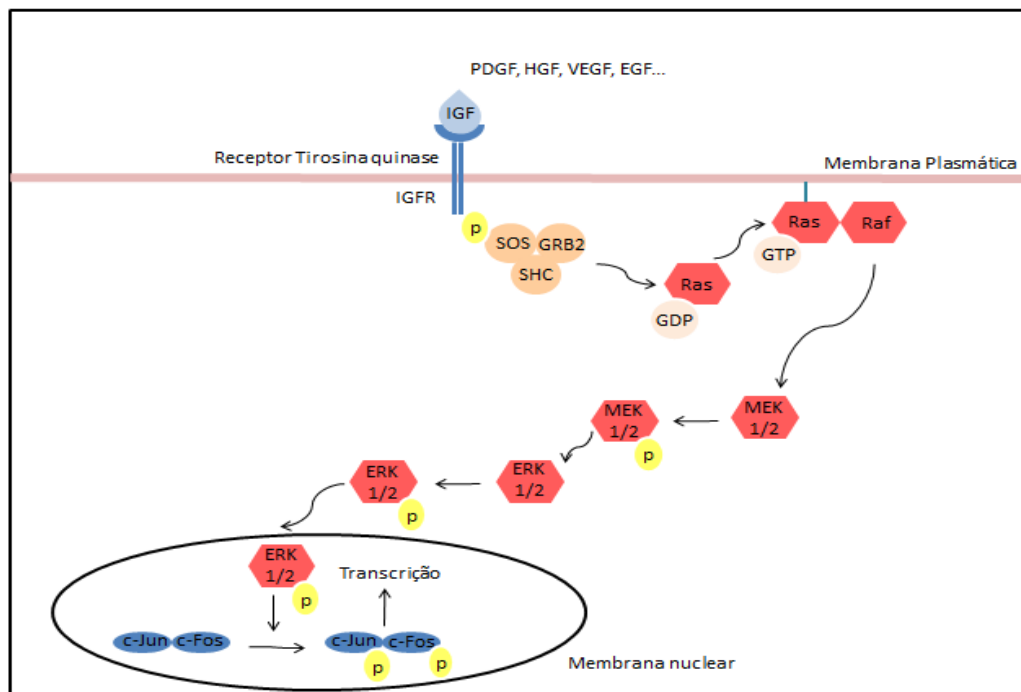


Figura 2 – Via de sinalização intracelular MAPK.

A via possui processos bioquímicos complexos devido ao grande número de componentes e funções distintas realizadas por cada cascata formada. As proteínas pertencentes à via ERK/MAPK possuem diversas isoformas (71,73). A proteína RAS, primeira atuante na mediação intracelular da via ERK 1/2, pertence à família de pequenas GTPases que contém isoformas que atuam na regulação da homeostase celular, como a NRAS, HRAS e KRAS. Sua ação é estimulada por fatores de crescimento do tipo tirosina quinase, citocinas e receptores hormonais que se ligam às suas isoformas acopladas à parte interna da

membrana plasmática e possuem a função de controlar e definir os passos iniciais das cascatas de fosforilação (71,74).

Quando há alterações estruturais, esses genes podem exercer atividade oncogênica, atuando no desenvolvimento tumoral, como já demonstrado no CHC em experimentos com camundongos (67). Além da atuação na via MAPK mediada por ERK 1/2, RAS também pode iniciar e regular as atividades de outras vias por ser ativada por fatores extracelulares distintos, como os fatores de crescimento já descritos neste texto. Um exemplo de sua atuação em outras vias é a ação na via mTOR pela fosforilação da PI3K (75).

Entre as isoformas da RAF, o BRAF é a mais frequente e mais importante – encontrada com frequência em melanomas e câncer do cólon –; entretanto, a presença significativa das mutações no gene RAF no CHC pode apresentar variações geográficas. Enquanto Colombino *et al.* (76) detectaram o gene B-Raf V599E com mutações em 23% dos paciente participantes de seu estudo na Itália, Tannapfel *et al.* (77) não encontraram mutações em amostras de seus 25 pacientes na China (71,76,77).

A proteína extracelular mitógena quinase (MEK) possui duas isoformas, MEK1 e MEK2 que dependendo da ação a ser exercida pela célula, uma delas será a escolhida. MEK é responsável por fosforilar e controlar a ação da ERK, que também possui duas isoformas, ERK1 e ERK2. Ambas são denominadas extracelulares por possuírem atividades que controlam processos fora da respectiva célula na qual se encontram. ERK age no controle de diversos substratos, tanto no citoplasma quanto no núcleo (54,73,78).

Diversos estudos evidenciam que, da mesma forma que RAS apresenta um padrão de expressão elevado, as proteínas MEK 1/2 e ERK 1/2 estão expressas e ativas em maior quantidade no tumor em relação aos parênquimas adjacentes sem neoplasia (71). E um estudo *in vitro*, realizado com cultura celular de quatro linhagens do tumor humano, utilizou-se um inibidor específico para MEK e obteve-se resultado satisfatório – estímulos como inibição do crescimento celular e apoptose foram encontrados com a administração da droga, evidenciando assim, a ação da via MAPK no CHC (79).

No caso do ERK, Lin *et al.* (81) e Lin e Yang (82) demonstraram em seus estudos que a proteína ativada por períodos prolongados ocasiona na inibição de seu supressor *mitogen-*

activated protein kinase phosphatase 1 (MPK-1). Em 2008, um estudo reforçou a atuação de ERK sobre seu supressor e evidenciou a proteína aumentada no CHC, sendo que essa inibição pode diminuir o tempo de sobrevivência dos pacientes (80-82). Diante do exposto, nota-se que a via MAPK exerce grande influência no atual difícil prognóstico dos portadores do CHC.

Como citado nesta pesquisa, diversos estudos têm evidenciado a atividade do VHB e VHC na hepatocarcinogênese. É sabido que a proteína HBx, pertencente ao genoma do VHB, atua diretamente no desenvolvimento tumoral, sem que se desenvolva a cirrose. HBx pode ativar diversas proteínas atuantes nas vias de sinalização intracelular responsáveis pela homeostase celular, como a via JAK/Stat, PI3K, MAPK dentre outras. (83)

Na via MAPK/ERK, esta proteína ativa a proteína RAS que, por sua vez, ativa a cascata de sinalização intracelular, como descrita neste trabalho. ERK 1/2 ativada desloca-se para o núcleo e sinaliza para que haja o início da atividade dos fatores de transcrição participantes dos processos de proliferação e diferenciação celular como, por exemplo, c-fos, c-jus, STAT3 e c-Myc. Além disso, há evidências de que HBx aumenta os níveis de EGFR e, desta forma, também ativa a via MAPK (83).

Já o VHC, alguns estudos indicam a interação de proteínas virais na ativação de distúrbios da homeostase celular, como o estresse oxidativo, alterações no ciclo de ROS (*releasing reactive oxygen*) – processos que ocorrem na inflamação tecidual (4,84). Durante o processo inflamatório, ocorre a formação de tecido fibrótico desencadeado por células hepáticas estreladas (HSC) e, logo após repetitivas lesões e formações fibrosas, há a formação da cirrose. Alguns estudos indicam que a atividade das HSC pode ser realizada por fatores de crescimento responsáveis pela ativação de vias de sinalização intracelular encontradas na hepatocarcinogênese, como PDGF, por exemplo, atuante na via MAPK e mTOR. Além disso, tais cascatas são ativadas e atuam na sinalização para que ocorram processos de apoptose e multiplicação celular, no momento do desenvolvimento cirrótico na tentativa de reparação tecidual (84).

Pesquisas indicam que proteínas nucleares do VHC podem influenciar na sinalização intracelular para que haja crescimento e proliferação celular dos hepatócitos, mediada pela via Raf/MAPK, no momento da inflamação crônica. Um estudo conduzido por Schmitz *et*

al (69) demonstrou níveis elevados da proteína ERK 1/2 em pacientes portadores do VHC acometidos pelo CHC quando comparados a pacientes portadores do VHB acometidos pelo CHC. Além disso, um estudo conduzido por Sato *et al* (85) sugeriu que proteínas virais do VHC poderiam ativar a via de sinalização MAPK/ERK.

Apesar de haver dados que indicam a interação da proteína viral do VHC com o DNA celular e a via MAPK, ainda não se sabe em qual momento do desenvolvimento tumoral essa atividade ocorre, devido ao fato da formação do CHC ocorrer, a priori, pelo processo inflamatório crônico da hepatite C. (86).

Recentemente, a partir dos avanços no conhecimento da assinatura genética e dos mecanismos moleculares envolvidos no câncer, o CHC tem sido classificado em diferentes subgrupos. Um deles é o CHC proliferativo, que pode ser ativado pelas proteínas RAS, mTOR e *insulin-like growth factor* (IGF), estando, também, associado à infecção pelo VHB e a prognósticos pouco favoráveis (4,87).

Alguns estudos sugerem, ainda, que o grupo proliferativo pode ser subdividido entre o mediado pelo *Wnt-transforming growth factor-β* (TGFβ), atuante no desenvolvimento tumoral pelas células hepáticas progenitoras e o outro, estimulado por marcadores que medeiam à atividade celular que apresenta expressão da alfafetoproteína (AFP) (4,87,88).

Diferentemente do proliferativo, o grupo não proliferativo possui características mais complexas em sua divisão, mas possui um subgrupo definido por mutações encontradas no CHC associado à hepatopatia etanólica e à infecção pelo VHC, como a identificada no gene CTNFB1 presente na via Wnt/β-catenina (88). Devido à sua complexidade e heterogeneidade, a classificação molecular do CHC ainda é pouco conhecida e avo de diversos estudos (4).

Tendo em vista as particularidades das vias de sinalização, a multiplicidade de receptores transmembranas e fatores de transcrição possivelmente envolvidos no CHC, percebe-se que a hepatocarcinogênese é um processo complexo, heterogêneo e mal compreendido. Tornam-se necessários ainda mais estudos para tentar esclarecer melhor esses eventos, com implicações terapêuticas importantes.

1.3- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, *et al.* Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int. J. Cancer* 2015; 136: E359-E386.
- 2- Alves RCP, Alves D, Guz B, *et al.* Advanced hepatocellular carcinoma. Review of target molecular drugs. *Ann Hep* 2011; 10: 21-27.
- 3- Bruix J, Sherman M. Management of hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2005; 42: 1208-1236.
- 4- Llovet JM, Zucman-Rossi J, Pikarsky E, *et al.* Hepatocellular carcinoma. *Nat Rev Dis Primers* 2016; 2: 1-23.
- 5- Galle PR, Forner A, Llovet JM, *et al.* European Association for Study of the Liver EASL clinical practice guidelines. *J Hepatol*, 2018; 69: 182-236
- 6- Pimenta JR, Massabki PS. Carcinoma hepatocelular: um panorama clínico. *Rev Bras Clin Med* 2010; 8: 59-67.
- 7- Llovet JM, Ricci S, Mazzaferro V, *et al.* Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med* 2008; 359: 378-390.
- 8- Bruix J, Qin S, Merle P, *et al.* Regorafenib for patients with hepatocellular carcinoma who progressed on sorafenib treatment (RESORCE): a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet* 2017; 389: 56-66.
- 9- Liu L, Cao Y, Chen C, *et al.* Sorafenib blocks the RAF/MEK/ERK pathway, inhibits tumor angiogenesis, and induces tumor cell apoptosis in hepatocellular carcinoma model PLC/PRF/5. *Cancer Res* 2006; 66: 11851-11858.
- 10- Wilhelm SM, Adnane L, Newell P, *et al.* Preclinical overview of sorafenib, a multikinase inhibitor that targets both Raf and VEGF and PDGF receptor tyrosine kinase signaling. *Mol Cancer Ther* 2008; 7: 3129-3140.
- 11- Richard S. Finn, MD. Emerging Targeted Strategies in Advanced Hepatocellular Carcinoma. *Semin Liver Dis* 2013; 33: S11-S19.
- 12- Cancer. World Health Organization. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>. Acessado em: 15/05/2017 às 21:45.
- 13- Villanueva A, Chiang DY, Newell P, *et al.* Pivotal role of mTOR signaling in hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 2008; 135: 1972-1983.
- 14- Gomes MA, Piolli DG, Tralhão JG, Botelho MF. Carcinoma hepatocelular: epidemiologia, biologia, diagnóstico e terapias. *Rev Assoc Med Bras* 2013; 59: 514-524.

- 15- Hemming AW, Berumen J, Mekeel. Hepatitis B and Hepatocellular Carcinoma. *Clin Liver Dis* 2016; 20: 703-720.
- 16- Datta S, Roychoudhury S, Ghosh A, *et al.* Distinct distribution pattern of hepatitis B virus genotype C and D in liver tissue and serum of dual genotype infected liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma patients. *PLoS One* 2014; 9: e102573.
- 17- Fattovich G, Bartolotti F, Donato F. Natural history of chronic hepatitis B: Special emphasis on disease progression and prognostic factors. *J Hepatol.* 2008; 48: 335-352.
- 18- Lok ASF, McMahon BJ. Chronic Hepatitis B. *Hepatology* 2001; 34: 1225-1241.
- 19- Shlomai A, de Jong YP, Rice CM. Virus associated malignancies: the role of viral hepatitis in hepatocellular carcinoma. *Semin Cancer Biol* 2014; 26: 78-88.
- 20- Dandri M, Locarnini S. New insight in the pathobiology of hepatitis B virus infection. *Gut* 2012; 61: i6-i17.
- 21- Torres C, Fernandez MD, Flichman DM, Campos RH, Mbayed VA. Influence of overlapping genes on the evolution of human hepatitis B virus. *Virology* 2013; 441: 40-48.
- 22- Papaiordanou F, Ribeiro-Junior MAF, Saad WA. Prevenção do carcinoma hepatocelular. *ABCD Arq Bras Cir Dig* 2009; 22: 115-119.
- 23- Kew MC. Prevention of hepatocellular carcinoma. *HPB (Oxford)* 2005; 7: 16-25.
- 24- Tan A, Yeh SH, Liu CJ, Cheung C, Chen PJ. Viral hepatocarcinogenesis: from infection to cancer. *Liver Int* 2008; 28: 175-188.
- 25- Pollack HJ, Kwon SC, Wang SH, Wyatt LC, Trinh-Shevrin C. Chronic hepatitis B and liver cancer risks among Asian immigrants in New York City: results from a large, community based screening, evaluation, and treatment program. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2014; 23: 2229-2239.
- 26- Chan HL, Wong ML, Hui AY, Hung LCT, Chan FKL, Sung JY. Hepatitis B virus genotype C takes a more aggressive disease course than hepatitis B virus genotype B in hepatitis B e antigen-positive patients. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 1277-1279.
- 27- Kramvis A. Genotypes and genetic variability of hepatitis B virus. *Intervirology* 2014; 57: 141-150.
- 28- Pourkarim MR, Amini-Bavil-Olyae S, Kurbanov F, Ranst MV, Tacke F. Molecular identification of hepatitis B virus genotypes/subgenotypes: revised classification hurdles and updated resolutions. *World J Gastroenterol* 2014; 20: 7152-7168.
- 29- Wong GL, Chan HL, Yiu KK, *et al.* Meta-analysis: the association of hepatitis B virus genotypes and hepatocellular carcinoma. *Aliment Pharmacol Ther* 2013; 37: 517-526.
- 30- Suzuki T, Aizaki H, Murakami K, Shoji I, Wakita T. Molecular biology of hepatitis C virus. *J Gastroenterol* 2007; 42: 411-423.

- 31- Simmonds P, Alberti A, Alter HJ, *et al.* A proposed system for the nomenclature of hepatitis C viral genotypes (letter). *Hepatology* 1994; 19: 1321-1324.
- 32- Pár A. Prophylaxis and treatment of chronic viral hepatitis as the prevention of hepatocellular carcinoma. *Orv Hetil.* 2009; 150: 19-26.
- 33- Roskams T, Kojiro M. Pathology of Early Hepatocellular Carcinoma: Conventional and Molecular Diagnosis. *Semin Liver Dis.* 2010; 30: 17-25.
- 34- Edmondson HA, Steiner PE. Primary carcinoma of the liver: a study of 100 cases among 48900 necropsis. *Cancer.* 1954; 7: 462-503.
- 35- Schlageter M, Terracciano LM, D'Angelo S, Sorrentino P. Histopathology of hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol.* 2014; 20: 15955-15964.
- 36- Shiraha H, Yamamoto K, Namba M. Human hepatocyte carcinogenesis (Review). *Int J Oncol.* 2013 Apr; 42: 1133-1138.
- 37- Naves MMV, Moreno FS. Diferenciação celular: Importância na hepatocarcinogênese e papel modulador do β -caroteno. *Rev Bras Cancerol*, 2000, 46: 389-399.
- 38- Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000; 100: 57-70.
- 39- Azechi H, Nishida N, Fukuda Y, *et al.* Disruption of the p16/cyclin D1/retinoblastoma protein pathway in the majority of human hepatocellular carcinomas. *Oncology* 2001; 60: 346-354.
- 40- Shin JW, Chung Y-H. Molecular targeted therapy for hepatocellular carcinoma: Current and future. *World J Gastroenterol* 2013; 19: 6144-6155.
- 41- Bronte F, Bronte G, Cusenza S, *et al.* Targeted Therapies in Hepatocellular Carcinoma. *Curr Med Chem* 2014; 21: 966-974.
- 42- Waisberg J, Saba GT. Wnt/- β -catenin pathway signaling in human hepatocellular carcinoma *World J Hepatol* 2015; 7: 2631-2635.
- 43- Li P, Cao Y, Li Y, Zhou L, Liu X, Geng M. Expression of Wnt-5a and β -catenin in primary hepatocellular carcinoma. *Int J Clin Exp Pathol* 2014; 7: 3190-3195.
- 44- Pai SG, Carneiro BA, Mota JM, *et al.* Wnt/beta-catenin pathway: modulating anticancer immune response. *J Hematol Oncol.* 2017; 10: 101.
- 45- Bruix J, Gores G, Mazzaferro V. Hepatocellular carcinoma: clinical frontiers and perspectives *Gut* 2014; 63: 844-855.
- 46- Takigawa Y, Brown AMC. WNT signaling in liver cancer. *Curr Drug Targets* 2008; 9: 1013-1024.
- 47- Villanueva A, Newell P, Chiang DY, Friedman SL, Llovet JM. Genomics and Signaling Pathways in Hepatocellular Carcinoma. *Semin Liver Dis* 2007; 27: 55-76.

- 48- Huang CH, Liu D, Nakano J, *et al.* Wnt5a Expression Is Associated With the Tumor Proliferation and the Stromal Vascular Endothelial Growth Factor - An Expression in Non-Small-Cell Lung Cancer. *J Clin Oncol* 2005; 23: 8765-8773.
- 49- Calvisi DF, Ladu S, Gorden A, *et al.* Ubiquitous activation of Ras and Jak/Stat pathways in human HCC. *Gastroenterology* 2006; 130: 1117-1128.
- 50- Birgani MT, Carloni V. Tumor Microenvironment, a Paradigm in Hepatocellular Carcinoma Progression and Therapy. *Int. J. Mol. Sci.* 2017; 18: 405.
- 51- Ferrara N, Davis-Smyth T: The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr Rev* 1997; 18: 4-25.
- 52- Mas VR, Maluf DG, Archer KJ, Yanek KC, Fisher RA. Angiogenesis soluble factors as hepatocellular carcinoma noninvasive markers for monitoring hepatitis C virus cirrhotic patients awaiting liver transplantation. *Transplantation* 2007; 84: 1262-1271.
- 53- Folkman J. Fundamental concepts of the angiogenic process. *Curr Mol Med* 2003; 3: 643-651.
- 54- Whittaker S, Marais R, Zhu AX. The role of signaling pathways in the development and treatment of hepatocellular carcinoma. *Oncogene* 2010; 29: 4989-5005.
- 55- Heldin CH, Westermark B. Mechanism of Action and In Vivo Role of Platelet-Derived Growth Factor. *Physiol Rev* 1999; 79: 1283-1316.
- 56- Cao Y. Multifarious functions of PDGFs and PDGFRs in tumor growth and metastasis. *Trends Mol Med* 2013; 19: 460-473.
- 57- Hara Y, Yamashita T, Oishi N, *et al.* TSU-68 Ameliorates Hepatocellular Carcinoma Growth by Inhibiting Microenvironmental Platelet-derived Growth Factor Signaling. *Anticancer Res* 2015; 35: 1423-1432.
- 58- Scheller T, Hellerbrand C, Moser C, *et al.* mTOR inhibition improves fibroblast growth factor receptor targeting in hepatocellular carcinoma. *Br J Cancer* 2015; 112: 841-850.
- 59- Ciardiello F, Tortora G. EGFR antagonists in cancer treatment. *N Engl J Med* 2008; 358: 1160-1174.
- 60- Yu H, Rohan T. Role of the insulin-like growth factor family in cancer development and progression. *J Natl Cancer Inst* 2000; 92: 1472-1489.
- 61- Nardone G, Romano M, Calabrò A, *et al.* Activation of fetal promoters of insulin-like growth factors II gene in hepatitis C virus-related chronic hepatitis, cirrhosis, and hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 1996; 23: 1304-1312.
- 62- You WK, McDonald DM. The hepatocyte growth factor/c-Met signaling pathway as a therapeutic target to inhibit angiogenesis. *BMB Rep* 2008; 41: 833-839.

- 63- Comoglio PM, Giordano S, Trusolino L. Drug development of MET inhibitors: targeting oncogene addiction and expedience. *Nat Rev Drug Disc* 2008; 7: 501-516.
- 64- Tavian D, De Petro G, Benetti A, Portolani N, Giulini SM, Barlati S. u-PA and c-MET mRNA expression is co-ordinately enhanced while hepatocyte growth factor mRNA is down-regulated in human hepatocellular carcinoma. *Int J Cancer* 2000; 87: 644-649.
- 65- Ueki T, Fujimoto J, Suzuki T, Yamamoto H, Okamoto E. Expression of hepatocyte growth factor and its receptor, the c-met proto-oncogene, in hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 1997; 25: 619-623.
- 66- Ho C, Wang C, Mattu S, *et al.* AKT and N-Ras co-activation in the mouse liver promotes rapid carcinogenesis via mTORC1, FOXM1/SKP2, and c-Myc pathways. *Hepatology* 2012; 55: 833-845.
- 67- Calvisi DF, Wang C, Ho C, *et al.* Increased lipogenesis, induced by AKT-mTORC1-RPS6 signaling, promotes development of human hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 2011; 140: 1071-1083.
- 68- Avila MA, Berasain C, Sangro B, Pietro J. New therapies for hepatocellular carcinoma. *Oncogene* 2006; 25: 3866-3884.
- 69- Schimtz KJ, Wohlschlaeger J, Lang H, *et al.* Activation of the ERK and AKT signalling pathway predicts poor prognosis in hepatocellular carcinoma and ERK activation in cancer tissue is associated with hepatitis C virus infection. *J Hepatol* 2008; 48: 83-90.
- 70- Llovet JM, Bruix J. Molecular-targeted therapies in hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2008; 48: 1312-1327.
- 71- Delire B, Stärkel P. The Ras/MAPK pathway and hepatocarcinoma: pathogenesis and therapeutic implications. *Eur J Clin Invest* 2015; 45: 609-623.
- 72- Kolch W. Meaningful relationships: the regulation of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway by protein interactions. *Biochem J* 2000; 351: 289-305.
- 73- Roberts PJ, Der CJ. Targeting the Ras-MEK-ERK mitogen-activated protein kinase cascade for the treatment of cancer. *Oncogene* 2007; 26: 3291-3310.
- 74- Galuppo R, Ramaiah D, Ponte OM, Gedaly R. Molecular Therapies in Hepatocellular Carcinoma: What can we target? *Dig Dis Sci* 2014; 59: 1688-1697.
- 75- To MD, Perez-Losada J, Mao JH, Malmain A. Crosstalk between Pten and Ras signaling pathways in tumor development. *Cell Cycle* 2005; 4: 1185-1188.
- 76- Colombino M, Sperlongano P, Izzo F, *et al.* BRAF and PIK3CA genes are somatically mutated in hepatocellular carcinoma among patients from South Italy. *Cell Death Dis* 2012; 3: e259.

- 77- Tannapfel A, Sommerer F, Benicke M, *et al.* Mutations of the BRAF gene in cholangiocarcinoma but not in hepatocellular carcinoma. *Gut* 2003; 52: 706-712.
- 78- Roberts LR, Gores GJ. Hepatocellular carcinoma: molecular pathways and new therapeutic targets. *Semin Liver Dis* 2005; 25: 212-225.
- 79- Klein PJ, Schimdt CM, Wiesenauer CA, *et al.* The Effects of a Novel MEK Inhibitor PD184161 on MEK-ERK Signaling and Growth in Human Liver Cancer. *Neoplasia* 2006; 8: 1-8.
- 80- Calvisi D, Pinna F, Meloni F, *et al.* Dual-Specificity Phosphatase 1 Ubiquitination in Extracellular Signal-Regulated Kinase–Mediated Control of Growth in Human Hepatocellular Carcinoma. *Cancer Res* 2008; 68: 4192-4200.
- 81- Lin YW, Chuang SM, Yang JL. ERK1/2 achieves sustained activation by stimulating MAPK phosphatase-1 degradation via the ubiquitin-proteasome pathway. *J Biol Chem* 2003; 278: 21534-21541.
- 82- Lin YW, Yang JL. Cooperation of ERK and SCFSkp2 for MKP-1 destruction provides a positive feedback regulation of proliferating signaling. *J Biol Chem* 2006; 281: 915-926.
- 83- Park NH, Song IH, Chung Y-H. Chronic hepatitis B in hepatocarcinogenesis. *Postgrad Med J* 2006; 82: 507-515.
- 84- Jeong SW, Jang JY, Chung RT. Hepatitis C virus and hepatocarcinogenesis. *Clin Mol Hepatol* 2012; 18: 347-356.
- 85- Sato Y, Kato J, Takimoto R, *et al.* Hepatitis C virus core protein promotes proliferation of human hepatoma cells through enhancement of transforming growth factor alpha expression via activation of nuclear factor-kappaB. *Gut* 2006; 55: 1801-1808.
- 86- Li L, Zhao GD, Shi Z, Qi LL, Zhou LY, Fu ZX. The Ras/Raf/MEK/ERK signaling pathway its role in the occurrence and development of HCC (Review). *Oncology letters* 2016; 12: 3054-3050.
- 87- Hoshida Y, Nijman SMB, Kobayashi M, *et al.* Integrative Transcriptome Analysis Reveals Common Molecular Subclasses of Human Hepatocellular Carcinoma. *Cancer Res* 2009; 69: 7385-7392.
- 88- Lachenmayer A, Alsinet C, Savic R, *et al.* Wnt-pathway activation in two molecular classes of hepatocellular carcinoma and experimental modulation by sorafenib. *Clin Cancer Res* 2012; 18: 4997-5007.

2- OBJETIVOS

2.1- Objetivo Geral

Caracterizar a expressão histoquímica das proteínas K-Ras, B-Raf e MEK da via MAPK em amostras de CHC associado a cirrose hepática de diferentes etiologias.

2.2- Objetivos específicos

Relacionar as principais características clínicas e patológicas dos casos de CHC.

Avaliar a expressão das proteínas K-Ras, B-Raf e MEK em amostras de CHC associado a hepatopatia de diferentes etiologias e em parênquima hepático cirrótico adjacente.

Comparar a expressão das proteínas K-Ras, B-Raf e MEK em amostras de CHC e de parênquima cirrótico adjacente.

Comparar a expressão das proteínas K-Ras, B-Raf e MEK em amostras de CHC conforme a etiologia da hepatopatia subjacente.

Investigar associação entre os achados moleculares referentes às proteínas K-Ras, B-Raf e MEK e os parâmetros clínicos, etiológicos e epidemiológicos dos pacientes com CHC.

Investigar associação entre os achados moleculares referentes às proteínas K-Ras, B-Raf e MEK e os diferentes tipos histológicos de CHC.

3- MÉTODO

Trata-se de estudo descritivo, exploratório, de delineamento transversal realizado no Departamento de Anatomia Patológica e Medicina Legal da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil. Este estudo faz parte da pesquisa “*Associação do IGF1R (insulin-like growth factor-1 receptor) e de proteínas das vias MAPK e PI3K/AKT/mTOR aos diferentes tipos etiológicos de carcinoma hepatocelular*” aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG com número de registro CAAE-44573615.7.0000.5149 (Anexo 1). Todos os pacientes participantes, ou os responsáveis legais daqueles que já faleceram assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Apêndice A).

Foram estudadas amostras de fígado (tumoral e não-tumoral próximo ao tumor) de 40 pacientes, maiores de 18 anos que receberam o diagnóstico de CHC associado a hepatopatia crônica de diversas etiologias (sendo 10 amostras de cada uma das seguintes etiologias: infecção pelo VHB, VHC, cirrose criptogênica e alcoólica) que foram submetidos a transplante hepático no Grupo de Transplante Hepático do Instituto Alfa de Gastroenterologia do Hospital das Clínicas da UFMG. As amostras selecionadas foram colhidas e arquivadas no Serviço de Anatomia Patológica e Necropsia do Hospital das Clínicas da UFMG, no período de 2002 a 2016. Não foram incluídas amostras inadequadas ou insuficientes, tumores sincrônicos ou metacrônicos e a variante fibrolamelar do CHC.

As informações clínicas foram obtidas dos prontuários e registradas em protocolo desenvolvido para este estudo (Apêndice B).

3.1- *Tissue microarray*

As amostras foram organizadas em blocos parafinados confeccionados com a técnica de arranjo em matriz de amostras teciduais (*tissue microarray*) (1). A técnica consiste em colocar amostras de diferentes pacientes em um bloco parafinado, possibilitando a análise simultânea de diversas amostras. O bloco contém um controle que auxilia na identificação do início da sequência amostral (Figura 3).



Figura 3 - Blocos confeccionados com a técnica *tissue microarray* para as amostras de carcinoma hepatocelular e parênquima hepático adjacente não-tumoral referente à cirrose de etiologias infecção pelo VHC, hepatopatia etanólica e hepatopatia criptogênica.

3.2 – Imuno-histoquímica

As proteínas da via de sinalização foram investigadas por imuno-histoquímica empregando-se kit comercializado (Reveal Biotin-free Polyvalent HRP - Spring Bioscience, Estados Unidos da América) segundo protocolo padronizado pelo Laboratório de Patologia Molecular do Departamento de Anatomia Patológica e Medicina Legal da Faculdade de Medicina da UFMG e as recomendações do fabricante como descrito a seguir.

Lâminas com cortes parafinados de 5µm de espessura foram colocadas *overnight* na estufa a aproximadamente 56°C, desidratadas em xilol e reidratadas em álcool etílico 100% e 80%. A recuperação antigênica foi realizada pelo aquecimento das lâminas a 90°C no vapor por 20 minutos em citrato de sódio 0,01M (pH 6,0).

Para o bloqueio da peroxidase foram adicionados às lâminas aproximadamente 400 µl da solução bloqueadora com posterior lavagem em solução TRIS. Em seguida, foi adicionada a mesma quantidade da solução de bloqueio da proteína repetindo o processo de lavagem da etapa anterior. Foram, então, acrescentados os seguintes anticorpos primários, diluídos

1- Andrade VP, *et al.* Tissue microarrays: high throughput and low cost available for pathologists. J Bras Patol Med Lab 2007; 43: 55-60.

em tampão fosfato-salino (PBS): anticorpos policlonais de coelho anti-KRas (ABCAM, ab180772, Reino Unido) na concentração de 1:100, anticorpos policlonais de coelho Raf-B (Santa Cruz Biotechnology, sc-9002, Estados Unidos da América) na concentração de 1:100 e anticorpos monoclonal de coelho anti-MEK1 (ab32091, Reino Unido) na concentração de 1:100. Após incubação por duas horas, as lâminas incubadas com o anticorpo anti-MEK1 foram lavadas em solução TRIS. Para a recuperação antigênica na análise dos anticorpos anti-Raf-B e anti-KRas foi utilizado o tampão EDTA (pH 8,0). As lâminas foram incubadas *overnight* e lavadas em solução TRIS. Seguiu-se a adição da solução de bloqueio pós-primário e nova lavagem em TRIS.

Para a revelação da reação foram adicionados 400µl da solução do polímero (Reveal Biotin-free Polyvalent HRP - Spring Bioscience, Estados Unidos da América), por 30 minutos e lavadas. As lâminas foram cobertas com aproximadamente 200µl da solução reveladora contendo diamino-benzidina (DAB), cujo preparo foi 1ml do substrato para cada 50µl do DAB, por 10 minutos. Após lavagem, as lâminas foram embebidas em Hematoxilina de Harris por 15 segundos para contra-coloração, lavadas em água corrente por dois minutos, álcool etílico por dois minutos e xilol por um minuto. Em seguida foram avaliadas por microscopia óptica.

3.3 - Escore imuno-histoquímico

Para discriminar as marcações das proteínas, a análise microscópica foi realizada por dois observadores – uma patologista e uma biomédica – em duas etapas: gradação da intensidade da marcação e quantificação do número de células marcadas. Logo em seguida foi realizado cálculo para definição da marcação de forma específica, de acordo com a seguinte fórmula (2, 3, 4):

2- Chen L, Shi Y, Jiang C.Y, Wei LX, Wang YL, Dai GH. Expression and prognostic role of pan-Ras, Raf-1, pMEK1 and pERK1/2 in patients with hepatocellular carcinoma. *EJSO* 2011; 37:513-520.

3- Rakha EA, Abd El Rehim D, Pinder SE, Lewis AS, Ellis IO. E-cadherin expression in invasive non-lobular carcinoma of the breast and its prognostic significance. *Histopathology* 2005; 46:685-693.

4- Lee KH, Min HS, Han SW, *et al.* ERCC1 expression by immunohistochemistry and EGFR mutations in resected non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 2008; 60:401-407.

Escore imuno-histoquímico = graduação da intensidade da marcação x quantificação do número de células marcadas.

A intensidade da marcação vista por microscopia óptica foi categorizada em ausente, fraca e forte, enumeradas de 0 a 4 – sendo que a ausência de marcação foi representada pelo número 0, marcação fraca representada pelos números 1 e 2 e a marcação forte pelos números 3 e 4.

A quantificação do número de células marcadas foi definida pela quantidade encontrada por campo de acordo com a seguinte classificação:

- 1- 00 - 25%
- 2- 26 - 50%
- 3- 51 - 75%
- 4- 76 - 100%

Para graduação do score final, foram definidos intervalos entre 0 e 16 adotando-se os seguintes valores para a referência:

- | | |
|---------|-------------------|
| 0 – 4 | Marcação ausente |
| 5 – 8 | Marcação fraca |
| 9 – 12 | Marcação moderada |
| 13 – 16 | Marcação forte. |

3.4 - Análise estatística

Para a análise estatística, utilizou-se o *software* SPSS (18.0). As variáveis nominais foram expressas como números e percentagens; as variáveis contínuas foram apresentadas como mediana e intervalo interquartilico uma vez que não apresentavam distribuição normal avaliada pelo teste de Shapiro-Wilk. Para comparação das frequências foi usado o teste Z ou teste exato de Fisher, quando pertinente. O teste de Mann Whitney foi usado para comparação de medianas. A correção de Bonferroni foi aplicada quando necessário. Valores de $p < 0.05$ foram considerados significativos.

4- ARTIGO

Análise da expressão das proteínas KRAS, BRAF e MEK da via de sinalização intracelular *mitogen activated protein kinases* (MAPK) no carcinoma hepatocelular associado a hepatopatia crônica de diferentes etiologias

Serena Dáfne do Carmo Silva^I, Paulo Henrique Diniz^{II}, Ana Elisa Moreira Oliveira^{III}, Marcelo Antônio Pascoal Xavier^{IV}, Luciana Costa Faria^V, Paula Vieira Teixeira Vidigal^{IV}, Teresa Cristina de Abreu Ferrari^V.

I- Estudante de Pós-Graduação nível Mestrado, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerias. II- Estudante de Pós-graduação nível Doutorado, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais. III- Estudante de Graduação, Faculdade de Medicina Universidade Federal de Minas Gerais. IV- Departamento de Anatomia Patológica e Medicina Legal, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais. V- Departamento de Clínica Médica, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais.

Autor correspondente: Teresa Cristina de Abreu Ferrari, Departamento de Clínica Médica, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Mnas Gerais, Av. professor Alfredo Balena 190, 30130-100, Belo Horizonte, MG, Brasil. Telefone: +55 31 3409 9746, Fax: + 55 31 3409 9664.

E-mail: tferrari@medicina.ufmg.br

RESUMO

Introdução: Carcinoma hepatocelular (CHC), neoplasia de comportamento agressivo, comum em adultos é iniciado, mais comumente, pela infecção pelo vírus da hepatite B (VHB) e pelos processos de regeneração do fígado nas hepatopatias crônicas. Apenas 30-40% desses tumores apresentam-se em estádios iniciais, passíveis de tratamentos curativos. Para os casos mais avançados, o tratamento sistêmico está indicado, mas há poucas opções disponíveis, o que reforça a importância do conhecimento dos mecanismos da gênese desse tumor para mudanças nesse cenário. Uma das principais vias de sinalização intracelular que atuam na hepatocarcinogênese é a *mitogen activated protein kinase* (MAPK), formada por alguns componentes que atuam como oncogenes, o que a torna alvo na busca de novos tratamentos. Portanto, o objetivo deste estudo foi caracterizar, semi-quantitativamente, a expressão das proteínas – K-Ras, B-Raf e MEK – da via MAPK no CHC associado a diferentes tipos etiológicos de cirrose hepática. **Métodos:** 40 amostras de CHC decorrentes de hepatopatias de diferentes etiologias – VHB, vírus da hepatite C (VHC), hepatopatia alcoólica e hepatopatia criptogênica (10 amostras de cada) – foram analisadas por imuno-histoquímica, investigando-se a expressão das proteínas K-Ras, B-Raf e MEK da via MAPK no tumor e parênquima cirrótico adjacente. **Resultados:** a maioria dos pacientes (77,5%) era do sexo masculino e a idade mediana foi 58 anos. Não houve diferença significativa entre os grupos etiológicos em relação aos parâmetros clínico-patológicos estudados. Não se observou diferença significativa na frequência de expressão das proteínas alvo quando se comparou o tumor e parênquima cirrótico adjacente. Além disso, não houve diferença estatisticamente significativa em relação à frequência de expressão forte/moderada das proteínas alvo, entre os grupos de cada etiologia da hepatopatia crônica associada ao CHC. Quando os grupos foram analisados considerando-se etiologia viral e não viral, observou-se associação inversa entre expressão de B-Raf e invasão vascular. Essa comparação também evidenciou expressão mais frequente da proteína K-Ras nas amostras do primeiro grupo. **Conclusão:** observou-se associação inversa entre expressão de B-Raf e invasão vascular, bem como expressão mais frequente da proteína K-Ras no grupo de etiologia viral em relação ao grupo não viral. As associações encontradas trazem a reflexão sobre a heterogeneidade e complexidade do CHC, sendo necessários estudos adicionais para maior compreensão e avaliação de tais eventos no desenvolvimento desta neoplasia.

Palavras-chave: carcinoma hepatocelular, via de sinalização intracelular MAPK, etiologias, hepatocarcinogênese. (Hepatocellular carcinoma, MAPK signaling pathway, etiologies, hepatocarcinogenesis).

INTRODUÇÃO

O carcinoma hepatocelular (CHC), segunda causa de morte por câncer no mundo, resulta de inflamação crônica dos hepatócitos por diversos fatores muito comuns no nosso meio, como o vírus da hepatite B e da hepatite C, álcool, hepatites auto-imunes e esteatohepatite não alcoólica, dentre outros e representa um desafio para a oncologia (1). Mundialmente, são mais de 750 mil casos diagnosticados por ano, com ampla variação da incidência entre os países (1). O Brasil é considerado um país de incidência intermediária, com cerca de 5.000 casos/ano, mas os dados são considerados subestimados (2).

Em todo o mundo, apenas 30-40% desses tumores apresentaram-se em estádios iniciais da doença, sendo passíveis de tratamento potencialmente curativos. A terapêutica disponível atualmente compreende: procedimentos cirúrgicos, como o transplante hepático (TH) ou ressecção parcial do órgão e procedimentos locorregionais, como a ablação percutânea por radiofrequência, que possuem potencial curativo; e o tratamento medicamentoso, como quimioterapia e drogas alvo (2-4). O tratamento medicamentoso apresenta resultados pouco satisfatórios, sem impacto no atual prognóstico sombrio da neoplasia. Pacientes em estádios mais avançados da doença ou que tiveram recidiva do tumor após tratamento locorregional, tem sobrevida mediana entre oito e onze meses (4,5).

Estudo de fase III, controlado e randomizado em pacientes com CHC (*Sorafenibe Hepatocellular Carcinoma Assessment Roandomized Protocol - SHARP*), publicado em 2008, demonstrou aumento inédito da sobrevida global dos portadores de CHC avançado tratados com o sorafenibe (6). Essa droga é um inibidor multiquinase que atua nas funções celulares primordiais e isso ocorre pela inibição das atividades no núcleo celular, mediadas pela proteína Raf quinase, e também pelo bloqueio de proteínas tirosina-quinases presentes na membrana plasmática. Esse bloqueio permite que ocorram mudanças na vascularização e na proliferação do tumor (7). O sorafenibe tem sido utilizado no tratamento do CHC, mas apresenta apenas benefícios modestos quanto ao prognóstico, uma vez que pacientes tratados com essa medicação têm somente cerca de três meses a mais de sobrevida. As potencialidades terapêuticas desta droga têm instigado à continuidade das pesquisas em relação aos agentes que atuam diretamente em vias de sinalização intracelular para que seja possível o desenvolvimento de drogas que ajam a nível molecular (6,8). No último ano, outro estudo fase III foi publicado e mostrou aumento modesto em sobrevida global com o

uso de outro inibidor multiquinase, o regorafenibe, desta vez em pacientes em segunda linha de tratamento (9).

Atualmente, tem-se conhecimento da existência de várias vias de sinalização intracelular participantes do desenvolvimento tumoral. As vias *mammalian target of rapamycin* (mTOR) e *mitogen activated protein kinases* (MAPK), são encontradas com alta frequência no CHC (10,11). A via MAPK, por participar dos processos de crescimento, proliferação celular e regulação do ciclo vital das células, tem sido amplamente estudada (12-14).

Diante do exposto, o objetivo deste estudo é analisar a expressão das proteínas participantes da via de sinalização intracelular MAPK em CHC associado a hepatopatias de diferentes tipos etiológicos e investigar associação entre a expressão dessas proteínas e os dados relativos à etiologia da hepatopatia e epidemiológicos da amostra estudada.

MÉTODO

Trata-se de estudo observacional, analítico realizado na Faculdade de Medicina e Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil, no qual se analisou 40 amostras de CHC associado a quatro diferentes tipos etiológicos de cirrose hepática – VHB, VHC, criptogênica e etanólica, sendo 10 amostras de cada – em pacientes submetidos a TH e maiores de 18 anos. As amostras selecionadas foram colhidas e arquivadas no período de 2002 a 2016. A presente pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG (CAAE-44573615.7.0000.5149).

As amostras foram organizadas em blocos parafinados confeccionados com a técnica de arranjo em matriz de amostras teciduais (*tissue microarray*) (15).

Imuno-histoquímica

A imuno-histoquímica para identificação das proteínas K-Ras, B-Raf e MEK foi realizada de acordo com o protocolo padronizado no Laboratório de Patologia Molecular da Instituição em consonância com as orientações do fabricante dos *kits* utilizados nos

experimentos (Reveal Biotin-free Polyvalent HRP - Spring Bioscience, Estados Unidos da América).

Lâminas com cortes parafinados de 5µm de espessura foram colocadas *overnight* na estufa a aproximadamente 56°C, desidratadas em xilol e reidratadas em álcool etílico 100% e 80%. A recuperação antigênica foi realizada pelo aquecimento das lâminas a 90°C no vapor por 20 minutos em citrato de sódio 0,01M (pH 6,0).

Para o bloqueio da peroxidase foram adicionados às lâminas aproximadamente 400 µl da solução bloqueadora com posterior lavagem em solução TRIS. Em seguida, foi adicionada a mesma quantidade da solução de bloqueio da proteína repetindo o processo de lavagem da etapa anterior. Foram, então, acrescentados os seguintes anticorpos primários, diluídos em tampão fosfato-salino (PBS): anticorpos policlonais de coelho anti-KRas (ABCAM, ab180772, Reino Unido) na concentração de 1:100, anticorpos policlonais de coelho Raf-B (Santa Cruz Biotechnology, sc-9002, Estados Unidos da América) na concentração de 1:100 e anticorpos monoclonal de coelho anti-MEK1 (ABCAM, ab32091, Reino Unido) na concentração de 1:100. Após incubação por duas horas, as lâminas incubadas com o anticorpo anti-MEK1 foram lavadas em solução TRIS. Para a recuperação antigênica para análise da reação dos anticorpos anti-K-Ras e anti-B-Raf foi utilizado o tampão EDTA (pH 8,0). As lâminas foram incubadas *overnight* e lavadas em solução TRIS. Seguiu-se a adição da solução de bloqueio pós-primário e nova lavagem em TRIS.

Para a amplificação da reação foram adicionados 400µl da solução do polímero (Reveal Biotin-free Polyvalent HRP - Spring Bioscience, Estados Unidos da América), por 30 minutos e lavadas. As lâminas foram cobertas com aproximadamente 200µl da solução reveladora contendo diamino-benzidina (DAB), cujo preparo foi 1ml do substrato para cada 50µl do DAB, por 10 minutos. Após lavagem, as lâminas foram embebidas em Hematoxilina de Harris por 15 segundos para contra-coloração, lavadas em água corrente por dois minutos, álcool etílico por dois minutos e xilol por um minuto. Em seguida foram avaliadas por microscopia óptica.

Score imuno-histoquímico

Para discriminar as marcações das proteínas, a análise microscópica foi realizada por dois observadores – uma patologista e uma biomédica – em duas etapas: classificação da intensidade da marcação e classificação do número de células marcadas. Logo em seguida foi realizado cálculo para definição da marcação de forma específica, de acordo com a seguinte fórmula: score imuno-histoquímico = graduação da intensidade da marcação x quantificação do número de células marcadas. (16-18).

A intensidade da marcação vista por microscopia óptica foi categorizada em ausente, fraca e forte, enumeradas de 0 a 4 – sendo que a ausência de marcação foi representada pelo número 0, marcação fraca representada pelos números 1 e 2 e a marcação forte pelos números 3 e 4.

A quantificação do número de células marcadas foi definida pela quantidade encontrada por campo de acordo com a seguinte classificação: 1(0-25%), 2 (26-50%), 3 (51-75%) e 4 (76-100%).

Para classificação do score final, foram definidos intervalos entre 0 e 16 adotando-se os seguintes valores para a referência: 0 – 4 marcação ausente; 5 – 8 marcação fraca; 9 – 12 marcação moderada; 13 – 16 marcação forte.

Análise estatística

Para a análise estatística, utilizou-se o *software* SPSS (18.0). As variáveis nominais foram expressas como números e percentagens; as variáveis contínuas foram apresentadas como mediana e intervalo interquartilico uma vez que apresentavam distribuição normal avaliada pelo teste de Shapiro-Wilk. Para comparação das frequências foi usado o teste Z ou o teste exato de Fisher, quando pertinente. O teste de Man Whitney foi usado para comparação de medianas. A correção de Bonferroni e foi aplicada quando necessário. Valores de $p < 0.05$ foram considerados significativos.

RESULTADOS

Análise clínico-patológica

A maioria dos pacientes (77,5%) era do sexo masculino. A descrição dos dados clínicos e laboratoriais analisados neste estudo – idade, MELD (*Model for End-stage Liver Disease*) (19), escore CHILD-Pugh (19), níveis séricos de AFP e tamanho dos nódulos – encontra-se na Tabela 1.

Tabela 1- Dados clínicos dos pacientes com carcinoma hepatocelular

	Mínimo	1º Quartil	Mediana	3º Quartil	Máximo
Idade (anos)	36,6	41,8	58,0	66,0	67,1
MELD	9,0	13,0	20,0	29,0	29,0
CHILD-Pugh	5,0	5,0	7,0	11,0	11,0
AFP (ng/mL)	2,2	3,15	8,7	513,0	2089,5
Tamanho dos nódulos (cm)*	1,0	1,3	2,75	5,5	5,58

MELD: *Model for End-stage Liver Disease*; CHILD: escore CHILD-Pugh.

*Determinado por exame macroscópico do fígado explantado.

As demais características anatomopatológicas – número de nódulos, presença de invasão vascular e grau de diferenciação segundo Edmondson e Steiner (20) – encontram-se representadas na Tabela 2.

Tabela 2 – Características anatomopatológicas dos pacientes

Características	N(%)
Número de nódulos	
1	20 (50,0%)
2	8 (20,0%)
3	1 (2,5%)
4	4 (10,0%)
5 ou mais	5 (12,5%)
Invasão vascular	
Sim	8 (20,0%)
Não	31 (77,5%)
Grau de diferenciação*	
Baixo (I – II)	32 (80,0%)
Alto (III – IV)	8 (20,0%)

* Segundo Edmondson e Steiner (20)

A análise referente ao tipo histológico do CHC – trabecular, pseudo-acinar e sólido – está representada na Tabela 3.

Somente três pacientes apresentaram mais de um tipo histológico com as seguintes combinações: trabecular + pseudo-acinar, trabecular + sólido, trabecular + pseudo-acinar + sólido.

Tabela 3 - Classificação histológica dos tumores de acordo com a hepatopatia crônica

	VHB	VHC	Etanólica	Criptogênica	Total*
Tipo histológico	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
Trabecular	8 (66,7%)	4 (40%)	6 (54,5%)	6 (54,5%)	24 (54,5%)
Pseudo-acinar	2 (16,7%)	5 (50,0%)	3 (27,3%)	3 (27,3%)	13 (29,5%)
Sólido	2 (16,7%)	1 (10,0%)	2 (18,2%)	2 (18,2%)	7 (15,9%)
Total*	12 (100,0%)	10 (100,0%)	11 (100,0%)	11 (100,0%)	44 (100,0%)

* Os pacientes que possuíram dois ou mais tipos histológicos foram contabilizados mais de uma vez.

Observou-se o predomínio dos tipos histológicos, trabecular e pseudo-acinar.

Análise imuno-histoquímica

A marcação imuno-histoquímica das proteínas K-Ras, B-Raf e MEK no tumor e parênquima cirrótico adjacente está ilustrada nas Figuras 4-6. Ao se comparar a frequência de expressão forte/moderada das proteínas alvo no tumor e parênquima cirrótico adjacente não se observou diferença ($p = 0,847$). O mesmo ocorreu quando se comparou a expressão forte/moderada das proteínas no tumor segundo a etiologia da hepatopatia crônica associada ao CHC (K-Ras $p = 0,056$, B-Raf $p = 0,987$, MEK $p = 0,891$).

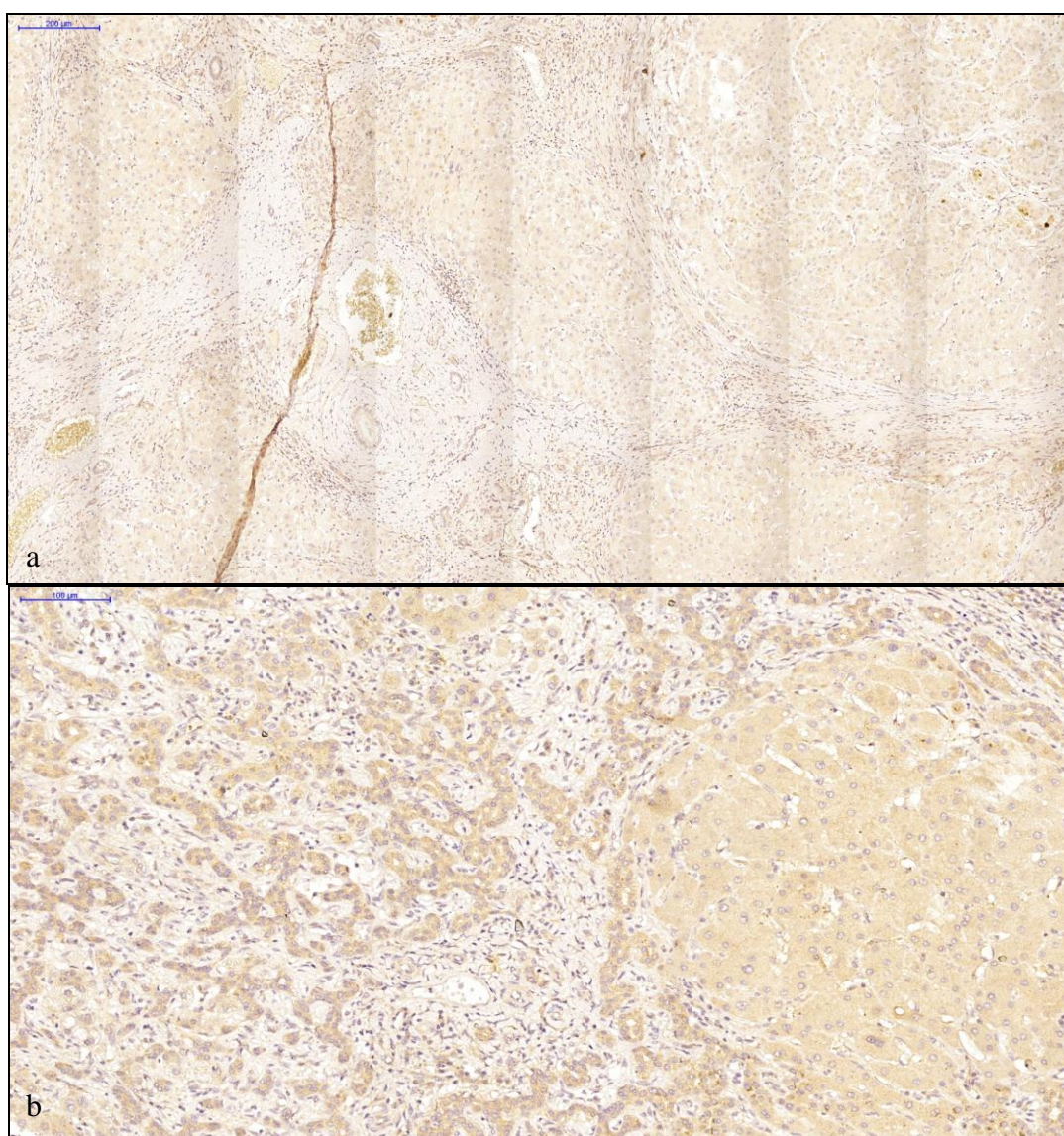


Figura 4 – Expressão das proteínas no tumor e parênquima cirrótico. (a) K-Ras: tumor e cirrose – marcação fraca. Padrão histológico: sólido; (b) K-Ras: tumor – marcação forte, cirrose – marcação fraca. Padrão histológico: pseudo-acinar.

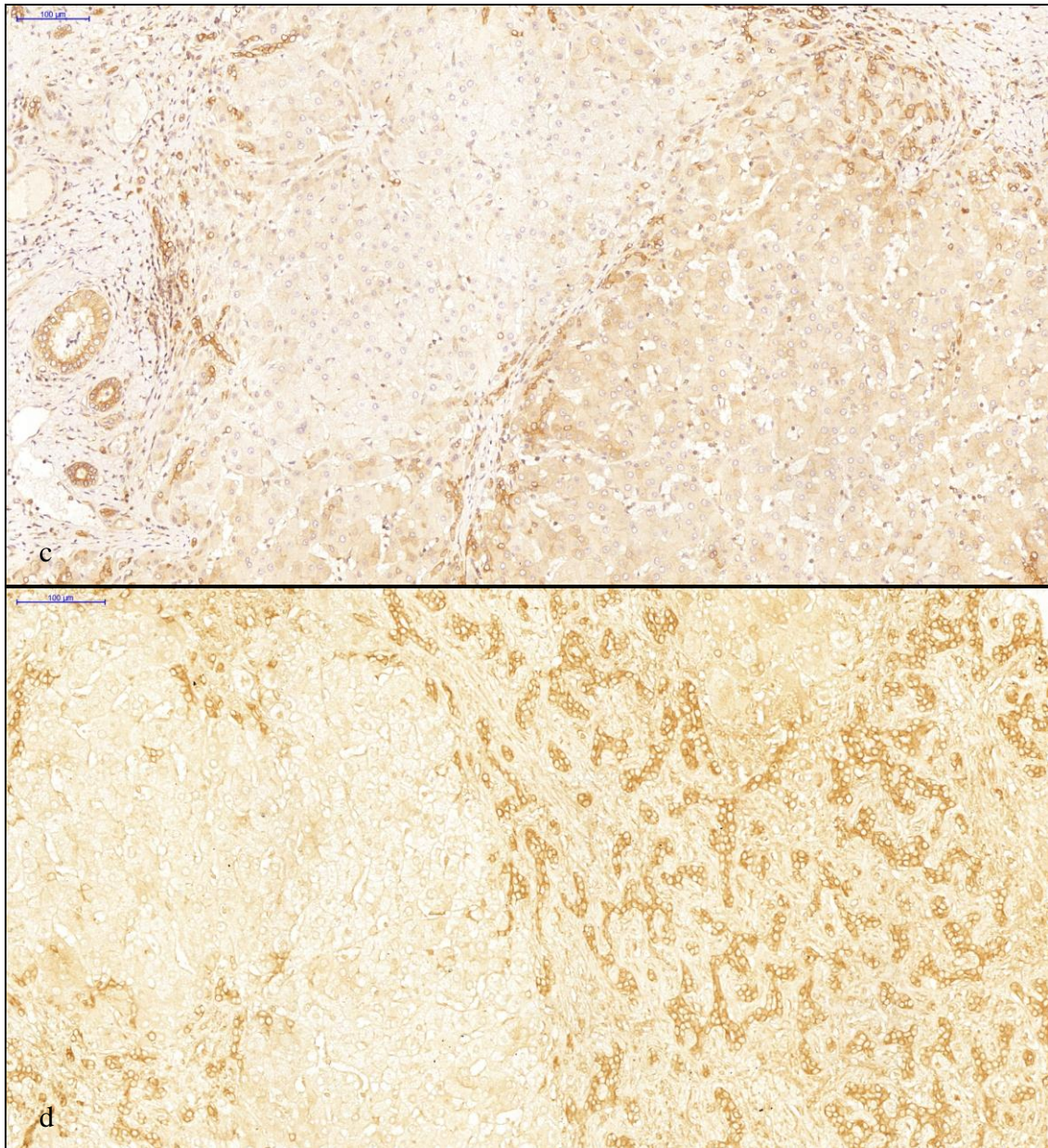


Figura 5 – Expressão das proteínas no tumor e parênquima cirrótico. (c) B-Raf: tumor e cirrose – marcação fraca. Padrão histológico: sólido; (d) B-Raf: tumor – marcação forte, cirrose – marcação fraca. Padrão histológico: pseudo-acinar.

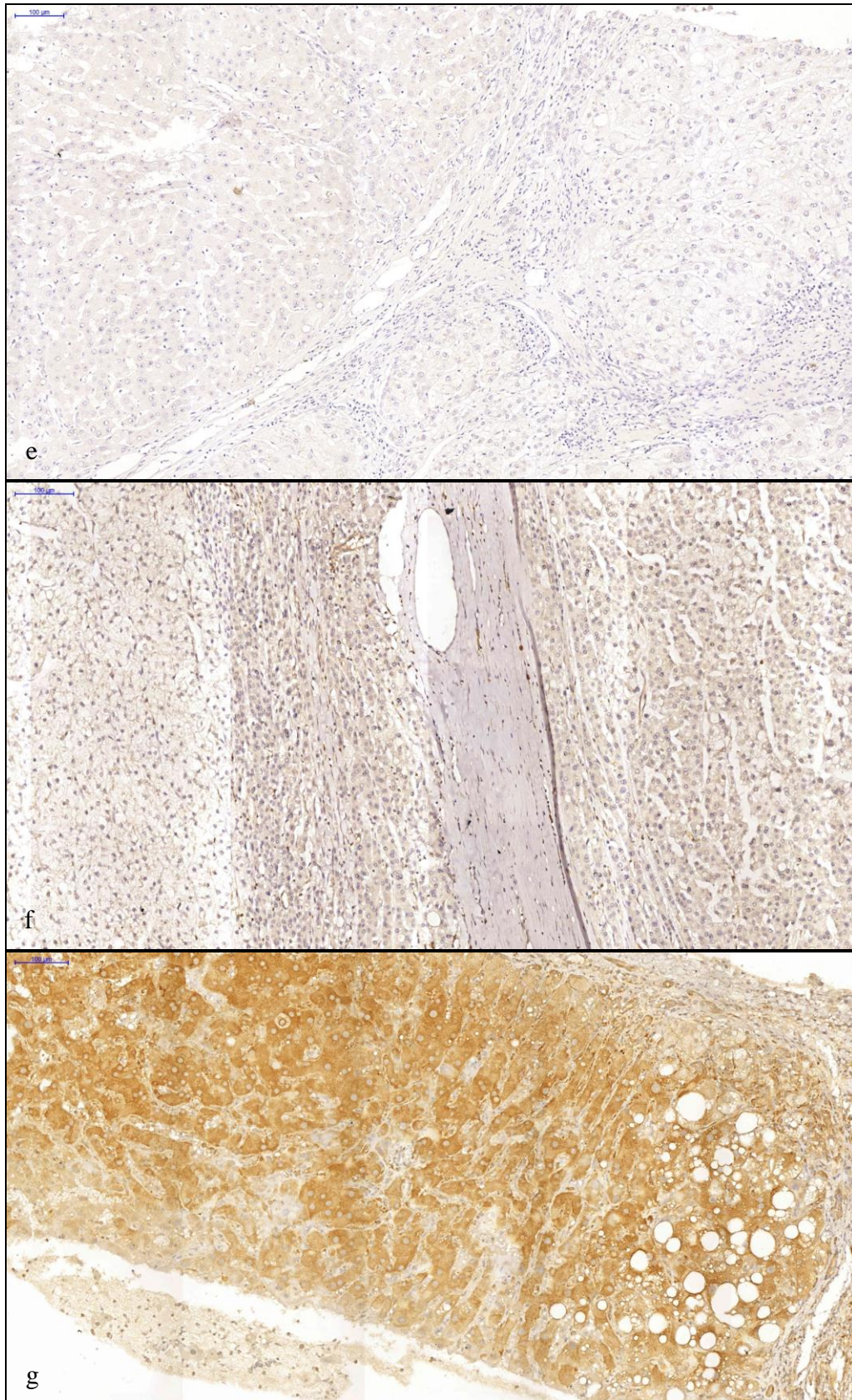


Figura 6 – Expressão das proteínas no tumor e parênquima cirrótico. (e) MEK: tumor e cirrose – sem marcação. Padrão: trabecular; (f) MEK: tumor e cirrose – marcação fraca. Padrão: trabecular; (g) MEK: tumor – marcação forte. Padrão: trabecular.

A seguir, realizou-se a análise considerando-se conjuntamente as etiologias virais (VHB e VHC) e não virais (criptogênica e etanólica) e comparou-se a proporção das marcações forte/moderada *versus* fraca/ausente entre esses dois grupos etiológicos, como apresentado na Tabela 4. Foi observada expressão mais frequente de K-Ras na etiologia virótica em relação ao grupo formado pelas etiologias criptogênica e etanólica. Não se observou diferença em relação à frequência de expressão das outras proteínas.

Tabela 4- Comparação da expressão forte/moderada *versus* fraca/ausente das proteínas K-Ras, B-Raf e MEK no tumor segundo as etiologias virais e não-virais

Etiologia*	K-Ras		B-Raf		MEK	
	Sim n (%)	Não n (%)	Sim n (%)	Não n (%)	Sim n (%)	Não n (%)
Virais	7 (35%)	13 (65%)	5 (25%)	15 (75%)	2 (10%)	18 (90%)
Não-virais	0 (0%)	20 (100%)	6 (30%)	14 (70%)	0 (0%)	20 (100%)
p-valor	0,002		1,000		0,737	

Teste Exato de Fisher. *Virais (VHB e VHC); não virais (etanólica e criptogênica).

A comparação entre os dados clínicos dos pacientes e a expressão forte/moderada das proteínas K-Ras, B-Raf e MEK evidenciou expressão mais frequente da proteína B-Raf em pacientes do sexo masculino ($p = 0,01$). Não se observou diferença em relação à frequência de expressão das outras proteínas. Houve associação entre idade inferior a 47 anos e expressão forte/moderada da proteína K-Ras ($p = 0,012$).

A comparação entre as características histopatológicas e a expressão forte/moderada das proteínas alvo investigadas neste estudo mostrou associação entre a ausência de invasão vascular e expressão da proteína B-Raf ($p = 0,04$). Em relação à comparação entre o tipo histológico e a expressão forte/moderada das proteínas K-Ras e MEK, não se observou diferença significativa.

DISCUSSÃO

O CHC, segunda causa de mortalidade por câncer no mundo, é mais frequente em homens e sua incidência aumenta com a idade, sendo observado pico aos 70 anos. Em apenas 30-40% dos casos, a doença é diagnosticada em estádios mais precoces, passíveis de tratamento local com intenção curativa. Nesse cenário, o TH configura uma dos principais opções terapêuticas. Além disso, como o diagnóstico desta neoplasia pode ser estabelecido por critérios imagiológicos e laboratoriais, ou seja, sem a necessidade de biópsia, o fígado explantado possibilita o estudo de critérios morfológicos, histológicos e moleculares do tumor.

Diante dos diversos fatores etiológicos envolvidos, com ampla distribuição geográfica no mundo, o CHC é considerado uma doença heterogênea, com comportamentos fenotípicos e genotípicos diversos (21). Entre as etiologias mais prevalentes da hepatopatia de base, estão o VHB e VHC, consumo abusivo de álcool e outras causas não definidas, chamadas criptogênicas.

Dessa forma, no presente estudo, foram avaliados parâmetros clínicos e anatomopatológicos de 40 pacientes submetidos a TH como tratamento de CHC no Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais, 10 de cada um dos principais grupos etiológicos, como descrito acima. De forma semelhante à epidemiologia da doença no mundo (1), no presente estudo, a idade mediana foi 58 anos e o sexo masculino correspondeu a 77,5% dos pacientes analisados.

AFP é o marcador tumoral mais utilizado para o estadiamento e rastreamento do CHC. Muitas vezes o aumento desse marcador em paciente portador de hepatopatia crônica pode ser a primeira alteração que permite chegar ao diagnóstico de CHC. Os altos níveis séricos desse marcador também possuem significado prognóstico, especialmente em pacientes candidatos ao TH. Estudos demonstram que AFP elevada está associada a tumores de comportamento mais agressivo, maiores diâmetros dos nódulos, invasão vascular e pior grau de diferenciação histológica (22,23). Entre os 40 pacientes analisados no nosso estudo, o nível sérico mediano da AFP foi de 8,7 ng/mL, o que pode ser considerado baixo, já que em muitos estudos, valores acima de 100 ng/mL são associados a maior risco de recorrência pós TH (24).

No presente estudo, o tamanho mediano dos nódulos tumorais foi aproximadamente 2,8 cm. Em 50% dos pacientes, apenas um nódulo foi identificado no explante hepático. Por outro lado, 12,5% possuía cinco ou mais nódulos. Sabe-se que, classicamente, a indicação do TH obedece aos critérios de Milão, que limita essa opção de tratamento a pacientes com apenas um nódulo até 5 cm ou até três nódulos de até 3 cm. Nossos achados mostram que, apesar desses critérios guiarem a indicação do TH, alguns pacientes estavam fora desses critérios. O que poderia justificar esse fato é que no nosso estudo avaliou-se o tamanho e número dos nódulos no exame anatomopatológico e, em geral, os critérios utilizados para a indicação de THs em nosso serviço são aqueles estabelecidos pelo consenso do *Barcelona Clinic Liver Cancer* (BCLC) (19), que se fundamentam nos exames de imagem na fase pré-TH. Devido às particularidades técnicas, pode haver discrepâncias entre a interpretação do tamanho do nódulo ao exame contrastado e no fígado explantado. Isso justifica até mesmo o fato de nem sempre ser possível identificar todos os nódulos hepáticos por meio de imagens, particularmente os menores.

Em relação aos critérios histopatológicos do CHC, o grau de diferenciação celular, de acordo com os critérios desenvolvidos por Edmondson e Steiner (20), a presença de invasão vascular e o tipo histológico são os principais parâmetros a serem analisados. Os subtipos histológicos trabecular, seguido de pseudo-acinar, são os mais prevalentes no CHC, podendo estar presentes diferentes tipos num mesmo tumor (25,27). O maior grau de diferenciação e a presença de invasão vascular estão associados ao comportamento mais agressivo da doença e maior risco de metástases. Entre os pacientes analisados no presente estudo, 77,5% não apresentaram invasão vascular e a maioria deles (80%) apresentava baixo grau de diferenciação celular. Comparando-se as frequências dos tipos histológicos encontrados, em relação às etiologias da hepatopatia crônica subjacente, o padrão trabecular foi evidenciado em sua maioria nas hepatopatias virais, VHB (66,7%) e VHC (40%), seguidos das hepatopatias críptogênica (54,5%) e etanólica (54,5%).

A gravidade da hepatopatia crônica subjacente traduz o prognóstico do CHC, além disso, define as opções de tratamento para o paciente. Foram analisados os escores MELD e CHILD-Pugh, utilizados pela *European Association for the Study of the Liver* (EASL), e identificado que os pacientes apresentaram valores medianos relativamente baixos desses escores (19). Isso sugere que os nossos pacientes pertencem a um seletivo grupo em que,

além de se apresentarem em fase precoce da neoplasia, não apresentavam doença hepática tão grave, diferentemente do que ocorre na maioria dos casos, para os quais o TH não é uma opção de tratamento. Importante destacar que, para pacientes com CHC, existe um sistema de prioridades para alocação dos candidatos ao TH, em que a presença do tumor já garante 20 pontos no escore de MELD, mesmo sem piora dos critérios laboratoriais que definem esse escore (27).

Todas as características, referentes ao quadro clínico da população estudada, indicam que os pacientes apresentaram dados compatíveis aos estágios iniciais do câncer. Estudos em portadores de CHC em estágios mais avançados, como o realizado por Felipe-Silva *et al* (25), apresentaram resultados diferentes. Nessa publicação, no qual se analisou 80 casos de necropsias de pacientes com CHC, observou-se que em 53,8% havia quatro nódulos ou mais, com tamanho médio de 4 cm. Além disso, foi identificado que 72,6% dos pacientes apresentaram tumores nos estágios III e IV da classificação Edmondson e Steiner (25). As diferenças dos achados daquela investigação em relação à presente, provavelmente estão relacionadas à seleção dos pacientes – transplantados ou não transplantados.

Han *et al* (28) revisaram o prognóstico de pacientes com CHC de acordo com a heterogeneidade da diferenciação histológica, em diversos estudos, e observaram em alguns deles que a histologia é uma importante ferramenta para a definição da gravidade da doença e avaliação da sobrevida a longo prazo. Naquele mesmo estudo, os autores, encontraram evidências de que a invasão vascular está associada ao alto grau de diferenciação celular segundo a classificação Edmondson e Steiner (28).

Apesar de os critérios morfológicos ajudarem na classificação da gravidade da doença, ainda não são precisos a ponto de definirem o possível desenvolvimento metastático e definição do diagnóstico. Várias vias e processos celulares têm sido implicados na gênese e progressão desses tumores (29). O estudo dessas vias pode direcionar melhor o diagnóstico e a definição do prognóstico, além de possibilitar o desenvolvimento de novas formas de tratamento. Uma das principais, a via MAPK, frequentemente ativada no CHC, possui um importante papel no desenvolvimento tumoral. Existem vários pontos em que essa via pode estar desregulada no CHC, seja por alterações genéticas ou mesmo epigenéticas diretamente nas proteínas da via ou por meio de comunicação cruzada com outras cascatas de sinalização (30).

Analisar a expressão das proteínas dessa cascata de sinalização, e descrever a distribuição comparativamente entre as diferentes etiologias são etapas importantes para o entendimento dos mecanismos envolvidos na carcinogênese. No presente estudo, essa expressão foi estudada em amostras de fígado transplantado, organizados em blocos parafinados utilizando-se a técnica de *microarray* e analisadas pela imuno-histoquímica. A associação inversa entre B-Raf e a invasão vascular foi um dos importantes achados deste estudo. Entretanto, outras publicações mostram que essa proteína está associada à presença da invasão vascular (31,32). Além do limitado tamanho amostral, os resultados apontados no nosso estudo podem ser explicados pelo estágio inicial da doença nos pacientes analisados. Isso sinaliza a possibilidade de a expressão dessa proteína ser um evento gradativo no processo da hepatocarcinogênese, e, portanto, ser identificada mais expressa em estádios mais avançados da doença. Algumas pesquisas mostram que a proteína B-Raf está significativamente mais expressa em tumores de pacientes com pior prognóstico (31,32).

Outro achado foi a expressão predominante da proteína B-Raf em pacientes do sexo masculino. É sabido que a ocorrência do CHC em pacientes deste sexo é mais frequente mundialmente e, é interessante notar que, por Raf possuir potencial cancerígeno, B-Raf foi encontrada hiperexpressa nesta população. Colombino *et al* (31) observaram em sua pesquisa, que foram encontradas mutações em B-Raf em 23% de seus pacientes do sexo masculino, sendo que 74% da população de seu estudo é formada por pacientes deste sexo.

Além do B-Raf, outras isoformas dessa proteína podem estar presentes no CHC e contribuir para a carcinogênese. Um estudo retrospectivo realizado por Chen *et al* (16) demonstrou hiperexpressão de RAF-1 em paciente com CHC devido ao VHB e ao VHC, conferindo a esses pacientes pior prognóstico da doença. Entretanto, no nosso estudo foi avaliado apenas o B-Raf, que é o mais prevalente, não tendo sido avaliadas outras isoformas.

Dados da literatura apontam que as etiologias virais possuem papel importante no desenvolvimento tumoral. Diversos estudos mostram que os agentes biológicos em questão, atuam de forma complexa nas interações das proteínas participantes da homeostase celular na hepatocarcinogênese. Nesta pesquisa, os resultados encontrados são compatíveis com aqueles de outros estudos (16,33,34). A expressão da proteína K-Ras,

pertencente à família Ras, foi evidenciada em maior frequência nos tumores de etiologia viral, quando analisadas conjuntamente em relação ao grupo formado pelas etiologias criptogênica e etanólica, o que reforça a necessidade de mais estudos direcionados ao entendimento da interação entre os agentes etiológicos das hepatites virais e a hepatocarcinogênese.

Outro achado que vale destacar é que, nas etiologias virais, observou-se marcação de pelo menos uma proteína da via na maioria dos pacientes ou não houve uma expressão sequencial de acordo com a posição na cascata de sinalização (Apêndice D), como tradicionalmente era considerado. Isso reflete a possibilidade de comunicação cruzada entre as proteínas de vias diferentes ou mesmo influência de fatores externos à via (30). Além disso, a ativação de uma proteína por si só pode modular a atividade da outra e, portanto, a ordem da expressão pode não obedecer a sequência conhecida (30).

Ao se analisar a expressão forte/moderada das proteínas alvo deste estudo comparando-se sua frequência de expressão no tumor e no parênquima hepático adjacente ao tumor, não houve diferença significativa. Da mesma forma, ao se comparar a frequência de expressão dessas proteínas de acordo com as etiologias das hepatopatias crônicas, não se observou marcação diferenciada dentre elas. Embora no nosso estudo a frequência de expressão tumor *versus* cirrose adjacente não tenha apresentado diferença estatisticamente significativa, observou-se tendência de marcação mais intensa das proteínas no tumor nas etiologias virais. Em contrapartida, nas etiologias não virais, evidenciou-se tendência de expressão mais intensa das proteínas no parênquima cirrótico em relação à expressão encontrada no tumor (Apêndice D).

Considerando-se que os fenômenos genéticos ocorrem principalmente nas células tumorais, o que levaria a diferenças na expressão das proteínas envolvidas na carcinogênese, não seria esperado maior marcação dessas proteínas no tecido cirrótico adjacente em relação ao tecido tumoral. Entretanto, é necessário destacar que, nos cortes dos tecidos realizados no nosso estudo, apenas um número limitado de amostras permitiu a avaliação do parênquima adjacente. Mas mesmo se esse achado fosse confirmado ao se analisar o tecido cirrótico das demais amostras, esses dados podem ser explicados. Isso porque, considerando-se a sequência adenoma-carcinoma, o parênquima cirrótico

adjacente ao tumor já pode conter alterações moleculares que antecedem o desenvolvimento do câncer, justificando a marcação no parênquima não tumoral.

Importante destacar que a imuno-histoquímica permite avaliar semi-quantitativamente a expressão de proteínas, que por sua vez é o produto final de eventos genéticos ou epigenéticos. Entretanto, se a proteína está expressa, mas de forma mutada, o anticorpo utilizado para marcação da expressão pode não reconhecer o epítipo da proteína alterada. De qualquer forma, a técnica, que apresenta baixo custo e fácil aplicabilidade e replicabilidade, pode impulsionar o uso de estudos quantitativos específicos e direcionados, como PCR em tempo real, *Western blot*, dentre outros. (35).

A forma com que as amostras foram agrupadas para ser realizada a imuno-histoquímica, descrita como *tissue microarray*, em que pequenos fragmentos de diferentes pacientes foram reunidos num mesmo bloco parafinado, pode ter exercido papel limitante nas análises do estudo (15). Entretanto, essa técnica já é utilizada há alguns anos e é considerada uma boa estratégia de pesquisa por proporcionar economia do material estudado e dos insumos científicos, agilidade no processo técnico, além de ser de fácil acesso e replicabilidade (15,25).

Considerando-se a heterogeneidade no arranjo histológico no CHC, variações nas atividades moleculares podem ocorrer de forma não uniforme ao longo do parênquima hepático. Dessa forma, a representação do tumor e do parênquima hepático amostrados acaba sendo limitada, e é possível ponderar que esta técnica possa não ser adequada para amostras de maiores tamanhos em um mesmo bloco parafinado, devido à limitação da área estudada. Além disso, essa limitação de amostragem pode justificar a perda de material cirrótico analisado levando a resultados falsamente negativos. O número amostral reduzido, associado à perda do parênquima cirrótico adjacente ao tumor na confecção das lâminas e à pequena alíquota coletada para análise são fatores que podem ter interferido nos resultados encontrados.

Em linhas gerais, nosso estudo mostrou que, em pacientes portadores de CHC submetidos a TH, as etiologias VHB e VHC estão associadas a maior expressão do K-Ras em relação aos pacientes com etiologia não viral (cirrose alcoólica e criptogênica), além da expressão difusa das proteínas estudadas, o que sugere a interação diferenciada entre elas. Isso abre

perspectivas para o desenvolvimento de novos tratamentos e sinaliza a importância de individualização da abordagem deste câncer de acordo com a etiologia da hepatopatia crônica de base. Entretanto, são necessários mais estudos para se avaliar se esses achados se mantêm em fases mais avançadas da doença, se essa expressão é secundária a atividades de outras proteínas e se isso confere valor prognóstico.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, *et al.* Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer* 2015; 136: E359-E386.
- 2- Alves RCP, Alves D, Guz B, *et al.* Advanced hepatocellular carcinoma. Review of target molecular drugs. *Ann Hep* 2011; 10: 21-27.
- 3- Bruix J, Sherman M. Management of hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2005, 42:1208-1236.
- 4- Llovet JM, Zucman-Rossi J, Pikarsky E, *et al.* Hepatocellular carcinoma. *Nat Rev Dis Primers* 2016; 2: 1-23.
- 5- Galle PR, Forner A, Llovet JM, *et al.* European Association for Study of the Liver EASL clinical practice guidelines. *J Hepatol* 2018; 69: 182-236.
- 6- Llovet JM, Ricci S, Mazzaferro V, *et al.* Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med* 2008; 359: 378-390.
- 7- Wilhelm SM, Adnane L, Newell P, Villanueva A, Llovet JM, Lynch M. Preclinical overview of sorafenib, a multikinase inhibitor that targets both Raf and VEGF and PDGF receptor tyrosine kinase signaling. *Mol Cancer Ther* 2008; 7: 3129-3140.
- 8- Wilhelm SM, Carter C, Tang LY *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.
- 9- Bruix J, Qin S, Merle P, *et al.* Regorafenib for patients with hepatocellular carcinoma who progressed on sorafenib treatment (RESORCE): a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet* 2017; 389: 56-66.
- 10- Bruix J, Sherman M. Management of hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2005, 42: 1208-1236.
- 11- Bronte F, Bronte G, Cusenza S, *et al.* Targeted Therapies in Hepatocellular Carcinoma. *Curr Med Chem* 2014; 21: 966-974.

- 12- Shin JW, Chung Y-H. Molecular targeted therapy for hepatocellular carcinoma: Current and future. *World J Gastroenterol* 2013; 19: 6144-6155.
- 13- Kudo M. Signaling Pathway and Molecular-Targeted Therapy for Hepatocellular Carcinoma. *Dig Dis* 2011; 29: 289-302.
- 14- Roberts PJ, Der CJ. Targeting the Raf-MEK-ERK mitogen-activated protein kinase cascade for the treatment of cancer. *Oncogene* 2007; 26: 3291-3310.
- 15- Andrade VP, Cunha IW, Silva EM, *et al.* Tissue microarrays: high throughput and low cost available for pathologists. *J Bras Patol Med Lab* 2007; 43: 55-60.
- 16- Chen L, Shi Y, Jiang CY, Wei LX, Wang YL, Dai GH. Expression and prognostic role of pan-Ras, Raf-1, pMEK1 and pERK1/2 in patients with hepatocellular carcinoma. *EJSO* 2011; 37:513-520.
- 17- Rakha EA, Abd El Rehim D, Pinder SE, Lewis AS, Ellis IO. E-cadherin expression in invasive non-lobular carcinoma of the breast and prognostic significance. *Histopathology* 2005; 46: 685-693.
- 18- Lee KH, Min HS, Han SW, *et al.* ERCC1 expression by immunohistochemistry and EGFR mutations in resected non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 2008; 60: 401-407.
- 19- European Association for the Study of the Liver. EASL Clinical Practice Guidelines: Management of hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 2018; 69: 182-236.
- 20- Edmondson HA, Steiner PE. Primary carcinoma of the liver: a study of 100 cases among 48900 necropsis. *Cancer* 1954; 7: 462-503.
- 21- Zucman-Rossi J, Villanueva A, Nault J-C, Llovet JM. Genetic Landscape and Biomarkers of Hepatocellular Carcinoma. *Gastroenterol* 2015; 149: 1226-1239.
- 22- Margarit C, Charco R, Hidalgo E, Allende H, Castells L, Bilbao I. Liver transplantation for malignant diseases: selection and pattern of recurrence. *World J Surg* 2002; 26: 257-263.
- 23- Ataide EC, Machado RR, Ribeiro MBC, *et al.* Correlação do nível de alfafetoproteína, índice de sobrevida e recidiva tumoral em pacientes submetidos a transplante hepático. *Arq Bras Cir Dig* 2011; 24: 43-47.
- 24- Pomfret EA, Washburn K, Wald C, *et al.* Report of a national conference on liver allocation in patients with hepatocellular carcinoma in the United States. *Liver Transpl* 2010; 16: 262-267.
- 25- Felipe-Silva A, Wakamatsu A, Cirqueira S, Alves VAF. Immunohistochemistry panel segregates molecular types of hepatocellular carcinoma in Brazilian autopsy cases. *World J Gastroenterol* 2016; 22: 6246-6256.

- 26- Osório FMF, Vidigal PV, Ferrari TC, Lima AS, GM Lauer, Couto CA. Histologic Grade and Mitotic Index as Predictors of Microvascular Invasion in Hepatocellular Carcinoma. *Exp Clin Transplant* 2015; 13: 421-425.
- 27- Freitas ACT, Shiguihara RS, Monteiro RT, Pazeto TL, Coelho JCU. Estudo comparativo em pacientes cirróticos portadores e não portadores de carcinoma hepatocelular submetidos ao transplante hepático: análise de MELD, do tempo em lista de espera e da sobrevida. *Arq Bras Cir Dig* 2016; 29: 21-25.
- 28- Han DH, Choi GH, Kim KS, *et al.* Prognostic significance of the worst grade in hepatocellular carcinoma with heterogeneous histologic grades of differentiation. *J Gastroenterol Hepatol* 2013; 28: 1384-1390.
- 29- Llovet JM, Zucman-Rossi J, Pikarsky E, *et al.* Hepatocellular carcinoma. *Nat Rev Dis Primers* 2016; 2: 1-23.
- 30- Mendoza MC, Er EE, Blenis J. The Ras-ERK and PI3K-mTOR pathways: cross-talk and compensation. *Trends Biochem Sci* 2011; 36:320-8.
- 31- Colombino M, Sperlongano P, Izzo F, *et al.* BRAF and PIK3CA genes are somatically mutated in hepatocellular carcinoma among patients from South Italy. *Cell Death Dis* 2012; 3: e259.
- 32- Garcia PP. Análise da expressão dos genes FHIT e BRAF no carcinoma hepatocelular em pacientes com hepatite C e cirrose e sua associação com dados anatomopatológicos na sobrevida. [dissertação (Mestrado em Patologia Médica)]. Minas Gerais: Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais; 2014.
- 33- Delire B, Stärkel P. The Ras/MAPK pathway and hepatocarcinoma: pathogenesis and therapeutic implications. *Eur J Clin Invest* 2015; 45: 609-623.
- 34- Dietrich P, Koch A, Fritz V, Hartmann A, Bosserhoff AK, Hellerbrand C. Wild type Kirsten rat sarcoma is a novel microRNA-622-regulated therapeutic target for hepatocellular carcinoma and contributes to sorafenib resistance. *Gut*. 2018; 67: 1328-1341.
- 35- Srivastava S, Wong CW, Huak CY, *et al.* A morpho-molecular prognostic model for hepatocellular carcinoma. *Br J Cancer* 2012; 107: 334-339.

5- CONSIDERAÇÕES FINAIS

O carcinoma hepatocelular é um câncer de comportamento agressivo e, apesar de ser amplamente estudado, possui a gênese heterogênea e complexa, não sendo totalmente compreendida. Atualmente, sabe-se que diversas vias de sinalização intracelular atuam em sua gênese e esse conhecimento possibilitou o estudo e o desenvolvimento de tratamentos mais específicos. Apesar disso, os tratamentos citotóxicos convencionais ainda não possuem eficácia significativa na sobrevida dos pacientes diagnosticados em estádios mais avançados da doença e a melhor compreensão dos mecanismos que a envolvem é importante para o desenvolvimento de novos tratamentos.

No presente estudo analisou-se a expressão das proteínas K-Ras, B-Raf e MEK, pertencentes à via MAPK e atuantes na gênese do CHC, no tumor e no parênquima hepático adjacente de pacientes que possuíam hepatopatias crônicas precursoras do tumor, com o objetivo de caracterizar, semi-quantitativamente, e compreender a ação dessa via no desenvolvimento do CHC.

A proteína K-Ras foi encontrada mais expressa em amostras de hepatopatias virais (VHB e VHC) em relação às hepatopatias não virais (cirrose alcoólica e criptogênica). Esse achado é compatível com os resultados encontrados em outros estudos que apontaram esse vírus como agentes etiológicos com alto potencial carcinogênico.

Além disso, as características clínico-patológicas e histopatológicas dos pacientes foram analisadas e associadas às expressões das proteínas estudadas. Pôde-se notar que as características clínicas dos participantes deste estudo são semelhantes às aquelas observadas nas fases iniciais do CHC, sendo que a maioria dos pacientes era do sexo masculino e com idade mediana de 58 anos. Analisando-se os parâmetros histopatológicos em relação à expressão das proteínas, B-Raf foi associada inversamente à invasão vascular. Considerando-se que há estudos demonstrando associação entre a expressão dessa proteína e invasão vascular, esse achado no nosso estudo pode se dever ao fato de os tumores estarem em fases mais iniciais. Portanto, sugere-se que a relação direta entre expressão de B-Raf e presença de invasão vascular pode ser considerada um evento gradativo, que ocorre durante o desenvolvimento tumoral.

Ainda que as expressões das proteínas K-Ras, B-Raf e MEK não tenham alcançado diferença estatisticamente significativa ao se comparar o tumor e o parênquima hepático adjacente, notou-se visualmente a expressão difusa das proteínas em quase todos os pacientes – no tumor, no parênquima cirrótico ou em ambos –, o que denota a participação ativa da via de sinalização intracelular em questão, mesmo que não esteja ativada em sua totalidade, ou que a sequência de fosforilação das proteínas não seja previsível, apontando uma interação não sequencial entre elas.

Embora, as limitações relativas ao tamanho amostral reduzido e às técnicas utilizadas no experimento possam ter interferido na análise global dos resultados, os achados encontrados abrem perspectivas para o desenvolvimento de novos tratamentos e sinaliza a importância de individualização da abordagem deste câncer de acordo com a etiologia da hepatopatia crônica de base. Entretanto, são necessários mais estudos para se avaliar se esses achados se mantêm em fases mais avançadas da doença, se essa expressão é secundária a atividades de outras proteínas e se isso confere valor prognóstico.

APÊNDICES

APÊNDICE A - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Projeto: Associação do IGF1R (*insulin-like growth factor-1 receptor*) e de proteínas das vias MAPK e PI3K/AKT/mTOR aos diferentes tipos etiológicos de carcinoma hepatocelular

O (A) Sr.(a) _____ está sendo convidado(a) a participar, como voluntário(a), de um estudo científico com o objetivo comparar a presença da proteína mTOR em câncer de fígado (carcinoma hepatocelular) de diferentes causas. O estudo será realizado em pacientes portadores desse tipo de câncer, acompanhados no Hospital das Clínicas da UFMG. O câncer de fígado representa importante problema de saúde em todo o mundo e apesar dos avanços do conhecimento nos últimos anos, a sua origem não está totalmente esclarecida. Este estudo poderá contribuir para o esclarecimento de mecanismos que participam do desenvolvimento do câncer de fígado.

Caso o(a) Sr.(a) concorde em participar da pesquisa, serão coletados dados clínicos constantes no seu prontuário e será feita a pesquisa das proteínas nas amostras desses tumores obtidas durante cirurgia que o(a) Sr.(a) já realizou.

Os pesquisadores manterão em sigilo a identidade dos participantes, inclusive em qualquer publicação resultante do estudo, garantindo-se total anonimato e confidencialidade.

O (A) Sr.(a) poderá recusar-se a participar da pesquisa, ou mesmo desistir de participar da mesma a qualquer momento, sem que isso traga qualquer prejuízo à sua assistência no Hospital das Clínicas. Antes de assinar esse termo, o(a) Sr.(a) deve informar-se plenamente a respeito do estudo, não tendo medo ou timidez ao fazer perguntas sobre qualquer assunto que queira esclarecer.

É importante ter conhecimento das seguintes informações sobre o estudo:

Objetivo do estudo: investigar o padrão de expressão da proteína mTOR em câncer de fígado de diferentes causas.

Procedimentos a serem realizados: se o(a) Sr.(a) for participar do nosso estudo, um pesquisador coletará os dados clínicos e resultados dos exames complementares do seu prontuário e preencherá um protocolo. Serão realizados exames para pesquisa da proteína mTOR no material retirado durante a cirurgia que você realizou e que se encontra armazenado no Departamento de Anatomia Patológica e Medicina Legal da Faculdade de Medicina da UFMG. Você não receberá nenhuma outra intervenção por causa da pesquisa.

Riscos potenciais: não há riscos significativos envolvidos em participar deste estudo, pois só utilizaremos dados já colhidos e pequena parte do material retirado durante a cirurgia que você já realizou como parte do seu acompanhamento médico.

Benefícios: não há benefícios em termos individuais imediatos. No entanto, esperamos contribuir para um maior entendimento do câncer de fígado.

O que devo fazer se tiver dúvidas ou perguntas: se você tiver qualquer pergunta, pode fazê-la na consulta a seu médico ou telefonar para nós. Você pode telefonar para Dra. Teresa Cristina de Abreu Ferrari, no número (31)99984-6725, para biomédica Serena Dáfne do Carmo Silva ou para a Dr. Paulo Henrique Diniz, no número (31)99659-1414. Caso tenha alguma dúvida sobre os seus direitos como paciente da pesquisa, você deverá ligar para o Presidente do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais (COEP/UFMG), no número (31)3409-4592, situado à Av. Antônio Carlos, 6627,

Campus da Pampulha, Unidade Administrativa II - segundo andar, sala 2005. CEP: 31270-901, Belo Horizonte-MG; e-mail: coep@prpq.ufmg.br.

DECLARAÇÃO DE CONSENTIMENTO

Eu li este formulário de consentimento (ou alguém o explicou para mim), todas as minhas perguntas foram respondidas e concordo em participar deste estudo. Estou ciente de que eu posso desistir do estudo a qualquer momento, sem perder o direito de receber cuidados médicos. Não receberei remuneração financeira para participar dessa pesquisa.

Nome do paciente: _____

Assinatura do paciente: _____

Nome do investigador que prestou as informações: _____

Assinatura e CRM do investigador que prestou as informações: _____

Data: ____/____/____

Protocolo de abordagem de pacientes a serem incluídos na investigação do estudo “Associação do IGF1R (*insulin-like growth factor-1 receptor*) e de proteínas das vias MAPK e PI3K/AKT/mTOR aos diferentes tipos etiológicos de carcinoma hepatocelular”

1. IDENTIFICAÇÃO DO PACIENTE

1.1 Nome: _____
1.2 Registro: _____ 1.3 Idade: _____ DN: _____
1.4 Sexo: (M) (F) 1.5 Cor: (1) Branca (2) Parda (3) Negra
1.6 Estado Civil: _____ (1) Casado (2) Solteiro (3) Viúvo (4) Outro
1.7 Ocupação: _____ 1.8 Procedência: _____
1.9 Naturalidade: _____
1.10 Endereço: _____
1.11 Telefone: _____

2. Dados clínicos

2.1 História da moléstia atual (idade ao início dos sintomas e ao diagnóstico de cirrose):

2.2 Cirrose (1) Sim (2) Não Etiologia _____ CHILD-PUG (A) (B) (C)

2.3 Antecedentes Pessoais

2.3.1 Etilismo (1) Sim (2) Não (3) N/I 2.3.1.1 Hábito (1) Atual (2) Progresso (9) N/I

Se progresso, interrompeu há quanto tempo? _____

2.3.1.2 Quantidade _____ (g/dia) 2.3.1.3 Duração _____ (meses)

2.3.1.4 Ingestão diária de álcool durante pelo menos 1 ano (1) Sim (2) Não (9) N/I

2.3.2 Toxicomania (1) Sim (2) Não

2.3.2.1 Tipo de droga (1) Parenteral (2) Não parenteral (3) Intranasal

2.3.2.2 Hábito (1) Atual (2) Progresso (9) N/I 2.3.2.3 Duração _____ (meses)

2.3.3 Transfusão de sangue/hemoderivados (1) Sim (2) Não (9) N/I

Se sim, há quanto tempo? _____

2.3.4 Vida sexual ativa (1) Sim (2) Não (9) N/I Número de parceiros/ano _____ média

2.3.4.1 Heterossexualidade (1) Sim (2) Não (9) N/I

2.3.4.2 Homo/bissexualidade (1) Sim (2) Não (9) N/I

2.3.5 Hepatite prévia (1) Sim (2) Não (9) N/I

2.3.6 Contato com portadores de hepatite viral (1) Sim (2) Não (9) N/I

2.3.7 Tatuagens, piercings (1) Sim (2) Não (9) N/I

2.3.8 Antecedentes cirúrgicos (1) Sim (2) Não (9) N/I

Data: _____ Cirurgia: _____

2.3.9 Contato com águas naturais (1) Sim (2) Não (9) N/I

2.3.10 Exposição ambiental a solventes ou outras hepatotoxinas (1) Sim (2) Não (9) N/I

2.3.11 Outras doenças associadas: (1) Sim (2) Não (9) N/I

Qual(is) _____

2.3.12 Medicamentos em uso (ou uso progresso relevante) _____

2.4 Antecedentes familiares (1) ausente (2) irmão (3) pais (4) filho (5) outros (9) N/I

Qual (is): _____

**3. EXAMES COMPLEMENTARES
SOROLOGIA - HEPATITE B**

Data		
HBsAg		
Anti HBc IgM		
Anti HBc IgG		
HBeAg		
Anti HBs		
Anti HBe		
HBV DNA		

SOROLOGIA - HEPATITE C

DATA		
Anti HVC		
Genótipo		
RNA(PCR)(quantitativo)		
RNA(PCR)(qualitativo)		

Marcadores doença autoimune

Data		
FAN (título)		
FAN (padrão)		
Fator reumatóide		
Antimúsculo liso		
Anti-LKM1		
Anti-SLA		
Outros _____		

Data		
Bilirrubinas (T/D/I)		
Albumina		
RNI		
TGO		
TGO		
Alfafetoproteína		
Outros _____		

EXAMES DE IMAGEM

US abdominal (__ / __ / __) _____

Doppler abdominal (__ / __ / __) _____

TC abdominal (__ / __ / __) _____

RM abdominal (__ / __ / __) _____

ANATOMIA PATOLÓGICA

Exame nº _____ Data ____ / ____ / ____

Presença de metástase em linfonodos: ___ sim ___ não

No de linfonodos: _____

Margens de ressecção: ___ livres ___ comprometidas ___ incerta

Diagnóstico incidental ___ Não ___ Sim

Parênquima hepático não tumoral:

___ Histologicamente dentro dos limites da normalidade

___ Alterações secundárias a processo expansivo intraparenquimatoso

___ Presença de hepatopatias crônicas não cirróticas

___ Cirrose:

- Grau de atividade inflamatória _____
- Marcadores etiológicos _____
- Nódulos displásicos _____

Apêndice D – Expressão das proteínas K-Ras, B-Raf e MEK no tumor e parênquima hepático adjacente de acordo com a etiologia da hepatopatia crônica.

1 - Expressão das proteínas K-Ras, B-Raf e MEK nas etiologias virais

VHB						
Pacientes	Proteínas					
	K-Ras		B-Raf		MEK	
	Tumor	Cirrose	Tumor	Cirrose	Tumor	Cirrose
1	12	4	6	9	8	8
2	12	-	9	-	0	-
3	4	4	6	3	0	0
4	12	-	6	-	2	-
5	4	-	6	-	4	-
6	4	-	4	-	0	-
7	6	4	2	4	0	0
8	4	-	12	-	4	-
9	1	-	0	-	0	-
10	6	2	16	9	16	6
VHC						
Pacientes	Proteínas					
	K-Ras		B-Raf		MEK	
	Tumor	Cirrose	Tumor	Cirrose	Tumor	Cirrose
11	12	3	16	3	1	-
12	12	-	4	-	3	3
13	12	2	0	2	0	1
14	4	4	4	4	9	12
15	8	8	12	12	2	8
16	1	1	8	2	1	-
17	4	4	4	1	1	-
18	8	-	8	-	0	4
19	12	2	3	0	0	0
20	4	4	6	6	0	0

Classificação: 0-4 ausente; 5-8 fraco; 9-12 moderado; 13-16 forte.


2- Expressão das proteínas K-Ras, B-Raf e MEK nas etiologias não virais

Criptogênica						
Pacientes	Proteínas					
	K-Ras		B-Raf		MEK	
	Tumor	Cirrose	Tumor	Cirrose	Tumor	Cirrose
21	4	8	16	12	3	3
22	2	2	1	2	1	0
23	3	2	8	3	0	0
24	1	-	9	-	0	0
25	3	0	3	-	0	0
26	3	4	4	8	0	4
27	3	4	2	4	0	1
28	3	2	12	-	0	-
29	1	0	1	2	1	1
30	8	-	6	-	1	3
Etanólica						
Pacientes	Proteínas					
	K-Ras		B-Raf		MEK	
	Tumor	Cirrose	Tumor	Cirrose	Tumor	Cirrose
31	1	1	9	-	0	-
32	2	1	1	-	0	-
33	1	1	16	6	8	-
34	1	2	8	9	4	4
35	4	-	12	-	1	-
36	4	1	6	-	1	-
37	0	1	4	12	0	0
38	8	4	2	6	0	4
39	1	-	8	-	4	-
40	0	-	6	12	0	0

Classificação: 0-4 ausente; 5-8 fraco; 9-12 moderado; 13-16 forte.

ANEXOS

Anexo 1 – Carta de aprovação do Comitê de Ética



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - COEP

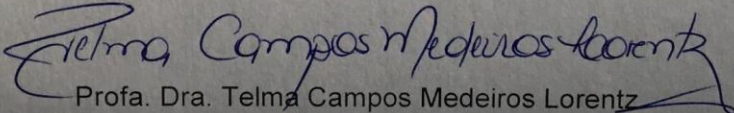
Projeto: CAAE – 44573615.7.0000.5149

Interessado(a): Profa. Paula Vieira Teixeira Vidigal
Depto. de Anatomia Patológica e Medicina Legal
Faculdade de Medicina - UFMG

DECISÃO

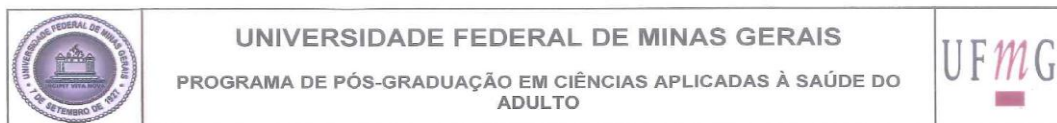
O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP aprovou, no dia 28 de julho de 2015, o projeto de pesquisa intitulado "**Associação do IGF1R (Insulin-Like Growth Factor-1 Receptor) e de proteínas das vias MAPK e PI3K/AKT/MTOR aos diferentes tipos etiológicos de carcinoma hepatocelular**" bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

O relatório final ou parcial deverá ser encaminhado ao COEP um ano após o início do projeto através da Plataforma Brasil.


Prof. Dra. Telma Campos Medeiros Lorentz
Coordenadora do COEP-UFMG

Av. Pres. Antonio Carlos, 6627 – Unidade Administrativa 11 - 2º andar – Sala 2005 – Cep:31270-901 – BH-MG
Telefax: (031) 3409-4592 - e-mail: coep@prpq.ufmg.br

Anexo 2 – Declaração de aprovação



FOLHA DE APROVAÇÃO

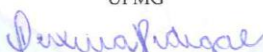
ANÁLISE DA EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS KRAS, BRAF E MEK DA VIA DE SINALIZAÇÃO INTRACELULAR MITOGEN ACTIVATED PROTEIN KINASES (MAPK) NO CARCINOMA HEPATOCELULAR ASSOCIADO A HEPATOPATIA CRÔNICA DE DIFERENTES ETIOLOGIAS


SERENA DÁFNE DO CARMO SILVA

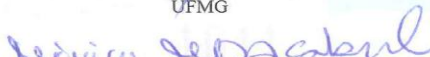
Dissertação submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS APLICADAS À SAÚDE DO ADULTO, como requisito para obtenção do grau de Mestre em CIÊNCIAS APLICADAS À SAÚDE DO ADULTO, área de concentração CIÊNCIAS APLICADAS À SAÚDE DO ADULTO.

Aprovada em 10 de agosto de 2018, pela banca constituída pelos membros:


Prof.ª Teresa Cristina de Abreu Ferrari - Orientadora
UFMG


Prof.ª Paula Vieira Teixeira Vidigal - Coorientadora
UFMG


Prof. Marcelo Dias Sanches
UFMG


Prof.ª Mônica Maria Demas Álvares Cabral
UFMG

Belo Horizonte, 10 de agosto de 2018.