



FACULDADE DE MEDICINA
CENTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO
Av. Prof. Alfredo Balena 190/sala 7009
Belo Horizonte – MG - CEP 30.130-100
Fone: (031) 3409.9641 FAX: (31) 3409.9939



UFMG

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA

Análise da expressão dos genes FHIT e BRAF no carcinoma hepatocelular em pacientes com hepatite C e cirrose e sua associação com dados anatomopatológicos que interferem na sobrevida

ALUNA: Paula Piedade Garcia

ORIENTADORA: Profa. Paula Vieira Teixeira Vidigal

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: Patologia Médica

NÍVEL: Mestrado

LINHA DE PESQUISA: Imunopatologia das Doenças Infecciosas

PAULA PIEDADE GARCIA

Análise da expressão dos genes FHIT e BRAF no carcinoma hepatocelular em pacientes com hepatite C e cirrose e sua associação com dados anatomopatológicos que interferem na sobrevida

Dissertação apresentada no Programa de Pós-Graduação em Patologia da UFMG como requisito parcial à obtenção do título de mestre em Patologia

Área de concentração: Patologia Médica

Linha de Pesquisa: Imunopatologia das Doenças Infecciosas

Orientadora: Profa. Paula Vieira Teixeira Vidigal

Belo Horizonte- MG

2014

*A minha família, que é meu maior projeto
de vida*

AGRADECIMENTOS

A Deus, por sempre nortear minhas decisões

Ao Márlinson, exemplo de marido e de pai, pelo amor, companheirismo e apoio constantes.

Às minhas pequenas, Laura e Isabela, filhas queridas que me ensinam diariamente o verdadeiro sentido da vida e a enchem de alegria

Aos meus pais, Dauro e Maria Helena, meus primeiros e sempre mestres, pela constante dedicação e pelos valores ensinados

Aos meus irmãos, Eduardo, Vítor e Lucas, amigos de todas as horas

A minha orientadora, Paula Vieira Teixeira Vidigal, pelo incentivo, pelo comprometimento e pela confiança.

Ao estatístico Fernando Henrique Pereira, pela disponibilidade, boa vontade e paciência

Às técnicas Ivone Marinho e Fernanda Césari pelo trabalho e empenho em ajudar sempre.

A todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

O carcinoma hepatocelular (CHC) constitui a terceira causa de morte por câncer. O conhecimento sobre seus mecanismos de carcinogênese é essencial para o desenvolvimento de novas modalidades terapêuticas, bem como de métodos de prevenção para a doença. De acordo com os estudos sobre o tumor, algumas de suas características histopatológicas podem interferir no prognóstico e na sobrevivência de pacientes com a neoplasia. FHIT é um gene supressor tumoral que participa do desenvolvimento de uma variedade de tumores. A sua alteração parece estar envolvida no processo inicial da carcinogênese e, além disso, associa-se com o prognóstico de muitos carcinomas. BRAF é um oncogene que participa da carcinogênese de aproximadamente 15% dos cânceres em humanos. O objetivo deste estudo é analisar a expressão destes genes no carcinoma hepatocelular e nas áreas de cirrose adjacente em pacientes com hepatite C utilizando a imunohistoquímica (IHQ), além de investigar a existência de associação da sua expressão com dados patológicos que interferem na sobrevivência e no prognóstico. Foram avaliados 36 pacientes (29 homens e sete mulheres) com cirrose causada pelo vírus C e carcinoma hepatocelular que foram submetidos a transplante hepático ou ressecção do tumor no Hospital das Clínicas- Universidade Federal de Minas Gerais, no período de 01/2002 a 01/2010. Foram também obtidos 25 casos de fígados normais do arquivo de necropsia do Departamento de Patologia da Universidade Federal de Minas Gerais, os quais foram usados como controles. Os tumores foram classificados usando-se os seguintes parâmetros: número e diâmetro das lesões tumorais, presença ou ausência de invasão vascular e grau histológico do tumor. A expressão de Fhit e de Braf foi determinada através da IHQ nas áreas de tumor, no parênquima cirrótico adjacente e nos fígados normais. Braf foi fortemente expresso no citoplasma dos hepatócitos de 17,1% das áreas de cirrose e em 62,9% das amostras de CHC ($p < 0,001$), com *odds ratio* (OR) de 8,20 e intervalo de confiança (IC)= 2,68-25,0. Fhit foi fortemente expresso no citoplasma de hepatócitos de 19,4% das áreas de cirrose e em 44,4% das amostras de CHC ($p = 0,04$), com OR de 3,13 (IC= 1,15-9,52). Todos os casos do grupo controle (25) mostraram-se fracamente positivos e/ou negativos para Fhit e Braf. Não houve associação entre a expressão de Fhit e Braf e entre grau histológico tumoral, invasão vascular ou número e diâmetro das lesões. Foi observada associação entre tumores de alto grau

histológico e a presença de invasão vascular, com OR= 7,27 (IC= 1,5-35,71). Os dados sugerem que o gene BRAF pode ter um importante papel na hepatocarcinogênese. Mais estudos são necessários para validar estas observações

Palavras-chave: Carcinoma Hepatocelular; Genes Supressores de Tumor; Proteínas de Neoplasias; Hepacivirus; Marcadores Biológicos de Tumor; Dissertações Acadêmicas.

ABSTRACT

Hepatocellular carcinoma is the third cause of cancer related mortality. To know carcinogenesis mechanisms is essential to develop new treatment modalities and prevention methods. It is well-known that some histopathological features interfere with outcome and prognosis in this neoplasia. FHIT is a tumor suppressor gene that contributes to cancer development in a variety of tumors. FHIT status is linked to prognosis in several malignancies and thought to be involved in early carcinogenesis. BRAF is an oncogene that plays a role in carcinogenesis of at least 15% of human cancers. The aim of this study is to analyze these genes expression in hepatocellular carcinoma and cirrhotic livers with hepatitis C virus infection using immunohistochemistry and to associate their expression with some pathological data that interfere with outcome and prognosis. Thirty six patients (29 male and 7 female) with cirrhosis related to virus C infection and hepatocellular carcinoma that underwent liver transplantation or tumor resection at Hospital das Clínicas - Federal University of Minas Gerais between 01/2002 and 01/2010 and had their liver explant or operatory specimen examined. Twenty five cases of normal livers obtained in the necropsy archives of the Pathology department of the Federal University of Minas Gerais were selected and used as control group. The tumors were classified using some pathological parameters: number and the diameter of tumoral lesions, vascular invasion and histologic tumor grade. The expression of BRAF and FHIT were determined by immunohistochemistry in the tumor, in the adjacent cirrhotic parenchyma and in normal livers. Braf was strongly expressed in the cytoplasm of hepatocytes of 17.1% of the cirrhotic livers and in 62.9% of the HCC samples ($p < 0.001$), with odds ratio (OR) of 8.20 and confidence interval (CI)=2.68-25.0. Fhit was strongly expressed in the cytoplasm of hepatocytes of 19.4% of the cirrhotic livers and in 44.4% of the HCC samples ($p = 0.04$), with OR of 3.13 (CI=1.15-9.52). All cases in the control group were negative or weakly positive for both Fhit and Braf. There was no association between FHIT and BRAF scores and tumor grade, microvascular invasion and tumoral lesions diameter and number. It was observed an association between high grade tumors and the presence of vascular invasion, (OR= 7.27; CI=1.5-35.71). This data suggests that BRAF may play an important role in HCC carcinogenesis. Larger studies are needed to validate these observations.

Keywords: hepatocellular carcinoma, tumor suppressor genes, oncogene proteins, hepacivirus; biological markers; academic dissertations

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1: vírus da hepatite C | 4 |
| Figura 2: fígados normais, nas áreas de cirrose e de hepatocarcinoma: imunoistoquímica para Fhit e Braf..... | 30 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1: Anticorpos utilizados no estudo imunoistoquímico | 20 |
| Tabela 2: Distribuição dos casos de CHC e cirrose quanto às variáveis demográficas e dados anatomopatológicos | 25 |
| Tabela 3: Intensidade de marcação imunoistoquímica para as proteínas Fhit e Braf em fígados normais e nas áreas de cirrose e CHC associados à infecção pelo vírus da hepatite C | 27 |
| Tabela 4: Porcentagem de marcação imunoistoquímica para as proteínas Fhit e Braf em fígados normais e nas áreas de cirrose e CHC associados à infecção pelo vírus da hepatite C | 27 |
| Tabela 5: Escore/índice da imunoistoquímica para as proteínas Fhit e Braf em fígados normais e nas áreas de cirrose e CHC associados à infecção pelo vírus da hepatite C. Comparação entre os casos com escores/índices fortemente positivos (9-12) de Fhit e Braf no CHC, na cirrose e em fígados normais | 28 |
| Tabela 6: Comparação entre a embolização vascular e o grau histológico tumoral do CHC..... | 31 |

LISTA DE ABREVIATURAS E DE SIGLAS

IHQ- imunistoquímica
VHC- vírus da hepatite C
CHC- carcinoma hepatocelular
RNA- ácido ribonucléico
E- proteína estrutural
NS- proteína não estrutural
p7- proteína 7
CD81- cluster of differentiation 81
OMS- Organização Mundial de Saúde
INCA- Instituto Nacional do Câncer
DNA- ácido desoxirribonucléico
cDNA- DNA complementar
p53- proteína 53
p73- proteína 73
pRb- proteína do retinoblastoma
RAF- gene que codifica a proteína quinase raf
MAPK- mitogen-activated protein kinase
Wnt- wingless-related integration
TGF- β - transforming growth factor- β
p21- proteína 21
FHIT- fragile histidine triad
BRAF- v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1
3p- braço curto do cromossomo 3
FRA3B- sítio de fragilidade 3B
Mb- megabase
mRNA- RNA mensageiro
Kb- quilobase
Kd- quilodalton
7q- braço longo do cromossomo 7
RAS- gene que codifica a proteína ras
ERK-extracellular-signal regulated protein kinase
MEK- mitogen and extracellular-regulated protein kinase

V600E- mutação causada pela substituição de ácido glutâmico por valina na posição 600 do gene BRAF

MHC- complexo maior de histocompatibilidade

cm- centímetro

UFMG- Universidade Federal de Minas Gerais

PCR- reação em cadeia de polimerase

COEP- Comitê de Ética e Pesquisa

HE- hematoxilina e eosina

µm- micrômetro

EDTA- ácido etilenodiamino tetra-acético

TRIS-HCl- hidróclorido de (hidroximetil)aminometano

BSA- albumina de soro bovino

LSAB- labeled streptavidin biotin

USA- United States of America

SSPS- Statistical Package for the Social Sciences

mm- milímetro

n- número

OR- odds ratio

IC- intervalo de confiança

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| 1. INTRODUÇÃO | 1 |
| 2. REVISÃO DA LITERATURA | 3 |
| 2.1 O vírus da hepatite C | 3 |
| 2.2 Epidemiologia | 5 |
| 2.3 Hepatocarcinogênese e vírus da hepatite C | 6 |
| 2.4 FHIT, BRAF e carcinogênese | 9 |
| 2.4.1 FHIT | 9 |
| 2.4.2 BRAF | 12 |
| 2.5 Tratamento e fatores prognósticos do hepatocarcinoma..... | 15 |
| 2.6 Justificativa | 17 |
| 3. OBJETIVOS | 18 |
| 3.1. Objetivo Geral | 18 |
| 3.2. Objetivos Específicos | 18 |
| 4. METODOLOGIA (MATERIAL E MÉTODOS) | 19 |
| 4.1. Material | 19 |
| 4.2. Imunoistoquímica | 20 |
| 4.3. Determinação e quantificação da expressão dos genes | 21 |
| 4.4. Análise estatística | 23 |
| 5.0. RESULTADOS | 24 |
| 5.1. Dados demográficos | 24 |
| 5.2. Dados macroscópicos e histológicos dos casos de CHC | 24 |
| 5.3. Expressão das proteínas Fhit e Braf pela imunoistoquímica | 25 |
| 5.4. Comparação da expressão das proteínas Fhit e Braf no carcinoma hepatocelular, na cirrose e em fígados sem alterações histopatológicas | 28 |
| 5.5. Comparação da expressão das proteínas Fhit e Braf no carcinoma hepatocelular e na cirrose com dados anatomopatológicos | 31 |
| 6.0 DISCUSSÃO | 32 |
| 7.0. CONCLUSÕES | 39 |
| 8.0. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 40 |
| 9.0. ANEXOS..... | 45 |