

1. INTRODUÇÃO

Em todo o mundo, existem milhões de pessoas portadoras crônicas do vírus da hepatite C (VHC). A infecção pelo vírus geralmente é assintomática. Estudos mostram que uma proporção significativa dos pacientes infectados poderá desenvolver cirrose dentro de aproximadamente 20 anos após a exposição e infecção pelo vírus. (1). A hepatite crônica pelo VHC é um fator de risco já bem estabelecido para o desenvolvimento do carcinoma hepatocelular (CHC). O CHC é, no contexto da infecção pelo VHC, geralmente diagnosticado após o desenvolvimento de cirrose (2) e cerca de duas ou três décadas após a infecção pelo VHC (1).

O CHC é uma das neoplasias malignas mais comuns e mais fatais em todo o mundo (3). A sua incidência tem crescido em índices alarmantes, tornando-o um grande problema clínico e de saúde pública em todo o mundo (2,4). Este fato pode estar associado com o avanço no tratamento da cirrose e de suas complicações, o que contribuiu para a redução dos óbitos associados à doença hepática. Isto teria levado a um aumento da sobrevida dos pacientes e, conseqüentemente, a um maior risco de desenvolvimento de CHC (1). Aliado a este fato, o avanço nos métodos diagnósticos e terapêuticos tem permitido o tratamento de um número maior de pacientes com CHC, melhorando a sua sobrevida (1).

A retirada cirúrgica do tumor constitui, geralmente, a modalidade terapêutica primária para o CHC. Infelizmente, a minoria dos pacientes (cerca de 30% ou menos) é candidata à ressecção cirúrgica, devido ao tamanho ou à localização do tumor, à doença multifocal ou à escassez da reserva hepática. Nos últimos anos, o transplante hepático no tratamento do CHC tem sido bem aceito. Entretanto, as indicações específicas são ainda controversas, especialmente nos casos de tumores avançados (2).

Apesar de já bem estabelecidos muitos fatores de risco para o desenvolvimento de CHC e do constante crescimento do conhecimento a respeito dos mecanismos moleculares que induzem à hepatocarcinogênese, os mecanismos reais que levam ao desenvolvimento desta neoplasia ainda não foram completamente esclarecidos (5).

Diante deste quadro, faz-se necessário aprimorar os conhecimentos sobre a hepatocarcinogênese, incluindo os mecanismos moleculares e as alterações

genéticas envolvidas neste processo. Além disso, é também importante o estudo e a identificação de fatores prognósticos associados à doença (1, 5). Estudos desta natureza podem contribuir para o desenvolvimento de novos métodos terapêuticos para o CHC, para a seleção apropriada da terapia para determinado paciente, bem como para a avaliação crítica dos resultados de sua utilização (1).

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 O vírus da hepatite C

A contaminação pelo VHC tipicamente envolve a via parenteral, como transfusão de sangue ou produtos do sangue de doadores não triados e uso de drogas injetáveis, podendo ser transmitido também por meio de acidente de trabalho com objetos perfurocortantes contaminados, hemodiálise, tatuagem e tratamento dentário. Entretanto, pelo menos 50% dos pacientes infectados não têm história de transfusão de sangue ou exposição a quaisquer outros fatores de risco de origem parenteral (6).

O VHC é um vírus RNA hepatotrópico da família *Flaviviridae*, com aproximadamente 9600 nucleotídeos em extensão. Ele pode causar hepatites aguda e crônica em chimpanzés e em humanos, havendo uma alta propensão da infecção à cronicidade. Se não tratada, a hepatite C crônica pode progredir para a cirrose e hepatocarcinoma (7).

Existem 6 principais genótipos de VHC (numerados de 1 a 6), os quais variam de um para outro em cerca de 30% em sua sequência nucleotídica (7). Estes genótipos, por sua vez, são subdivididos em mais de 100 subtipos. O genótipo do VHC é importante não só pela sua diferença quanto à distribuição geográfica, como também é para determinar a resposta à terapia instituída em determinado paciente (8).

A fase de leitura aberta (*open reading frame*) do VHC contém entre 9024 e 9111 nucleotídeos, dependendo do subtipo. Ela codifica uma poliproteína única que, por sua vez, é clivada pelas proteases virais e do hospedeiro em 10 proteínas virais. Dentre elas, estão 3 proteínas estruturais (proteína do core, E1 e E2) e 7 proteínas não estruturais (p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A e NS5B), (7,8,9,10).

A proteína do core é uma proteína do nucleocapsídeo viral com muitas funções, destacando-se dentre elas: ligação do RNA, modulação imune, sinalização celular e potencial oncogênico. As proteínas E1/E2 são glicoproteínas do envelope que circundam as partículas virais (7). As proteínas do envelope promovem a entrada do vírus na célula através da ligação com determinados receptores da superfície celular (receptor da lipoproteína de baixa densidade, CD81, dentre outros) (8). As proteínas não estruturais do VHC contribuem, conjuntamente, de

várias formas para o ciclo de vida do vírus, incluindo a sua ligação, fusão e entrada na célula, a tradução do seu RNA, o processo de pós-tradução, sua replicação, montagem e liberação. Algumas delas são, conseqüentemente, alvos chave para o desenvolvimento de determinadas drogas antivirais, como a NS3, NS5A e NS5B (7).

A cada ciclo de replicação, o VHC sofre mutação em aproximadamente um nucleotídeo, devido à falta da função de correção da polimerase viral NS5B. Este fato associado à curta meia vida do vírus e o seu rápido *turnover*, de apenas algumas horas, resulta em uma grande variabilidade genética e representa um grande desafio no desenvolvimento de uma vacina contra o vírus que seja eficaz (8).

A estrutura simplificada do VHC está representada na figura 1

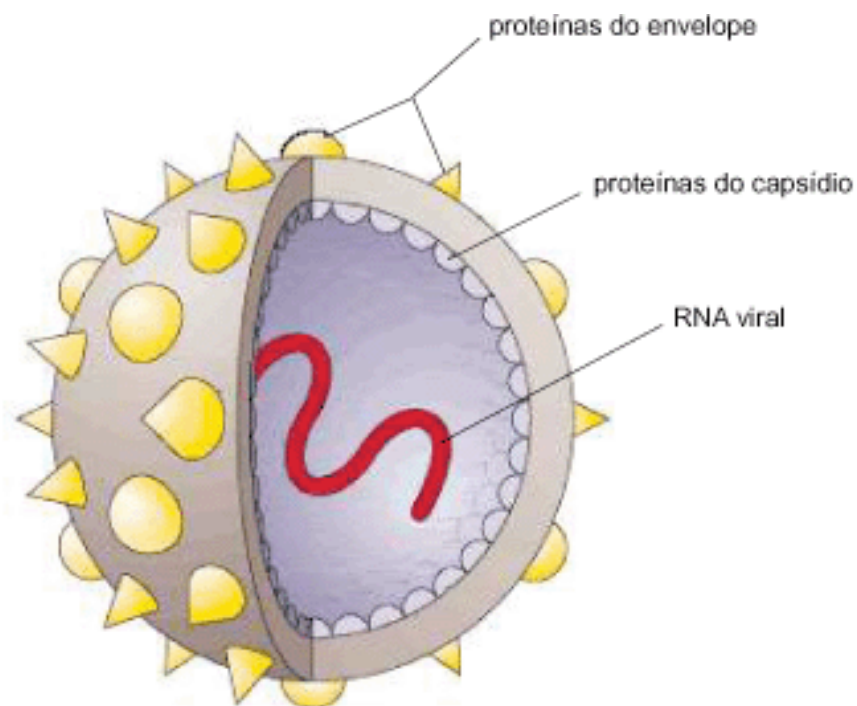


Figura 1: vírus da hepatite C. **Fonte: STRAUSS, 2001**

2.2 Epidemiologia

A infecção pelo VHC é um problema de saúde pública. A Organização Mundial de Saúde (OMS) estima que aproximadamente 180 milhões de pessoas, cerca de 3% da população mundial, sejam infectadas pelo vírus. Destas, cerca de 130 milhões são portadoras crônicas da doença. A prevalência é baixa (menor que 1%) na Austrália, no Canadá e norte da Europa. A prevalência é mediana (1%) nos Estados Unidos e na maior parte da Europa, porém é alta (maior que 2%) em algumas regiões da África, América Latina e Ásia (6).

A infecção crônica pelo VHC é fator de risco para o CHC (6), que geralmente se estabelece após o desenvolvimento de cirrose nos indivíduos infectados pelo vírus. Em pacientes com infecção pelo VHC e cirrose, a taxa anual de desenvolvimento de CHC varia entre 1 e 7% (9).

O CHC é dos tumores malignos mais frequentes no sistema digestivo e, mundialmente, apresenta-se como o terceiro tipo de câncer mais letal (3, 5). Nos últimos anos, este tipo de neoplasia tem recebido bastante atenção, dado o rápido crescimento de sua incidência, a qual varia de acordo com a região geográfica considerada. A maioria dos casos ocorre em determinadas regiões da África e da Ásia, sendo baixa na América do Norte e Europa. Entretanto, tem sido relatado um crescimento da incidência em alguns países desenvolvidos, como Japão, França, Reino Unido e Estados Unidos (5,11).

No Brasil, dados do Ministério da Saúde estimam que 1,5 milhão de pessoas sejam infectadas pelo VHC (12). Em relação ao CHC, estudos indicam que o Brasil é um país de baixa prevalência da doença, não estando este entre os dez tumores mais incidentes no país, de acordo com dados do Instituto Nacional do Câncer (INCA), (13,14,15).

2.3 Hepatocarcinogênese e vírus da hepatite C

Alguns fatores de risco para o desenvolvimento do CHC são bem conhecidos e, dentre eles, estão a exposição à aflatoxina, micotoxina produzida pelo fungo *Aspergillus*, que contamina produtos agrícolas e está presente especialmente em determinadas regiões da Ásia e África. A aflatoxina pode participar do processo de hepatocarcinogênese devido a sua capacidade de causar danos no DNA dos hepatócitos, levando a alterações genéticas nas células-alvo (4).

Além da aflatoxina, o consumo excessivo de álcool e as hepatites crônicas pelos vírus B e C se destacam como fatores de risco para o desenvolvimento do CHC (4, 5, 9,11). A infecção viral crônica pelos vírus das hepatites B e C, por sua vez, parece ser um dos fatores de risco mais importantes para o desenvolvimento do CHC, pois é capaz de provocar inflamação crônica e regeneração dos hepatócitos. A inflamação contínua pode levar a danos no DNA dos hepatócitos em regeneração, aumentando, assim, as chances de alterações de genes associados à carcinogênese (5).

A hepatite causada pela infecção pelo VHC é a principal causa de doença crônica do fígado (2). Milhões de pessoas em todo o mundo são portadores crônicos de hepatite C e estudos estimam que uma proporção significativa destes pacientes desenvolverá cirrose em um período de aproximadamente 20 anos após a exposição ao vírus. A maioria dos casos de CHC (70 a 80%) ocorrem em fígados com cirrose (3), sendo ela um dos principais fatores de risco para o desenvolvimento de hepatocarcinoma, inclusive em pacientes com hepatite C (1). Entretanto, apesar de ser clara a relação entre a infecção pelo VHC e o CHC, a prevalência de infecção pelo VHC em pacientes com CHC difere notavelmente de acordo com a região geográfica considerada. A infecção pelo VHC é encontrada em até 80% dos casos de CHC no Japão, em 40 a 50% na Itália e Espanha, em 20% nos Estados Unidos e Coreia e em menos de 10% na China (9).

Estudos recentes sugerem que o curso natural da infecção pelo VHC pode ser modificado pelo *background* genético do hospedeiro. Assim, tanto fatores ligados ao hospedeiro como ao vírus são capazes de afetar o processo da hepatocarcinogênese de uma maneira complexa (9).

Em relação aos fatores ligados ao VHC, estudos de *arrays* de cDNA mostraram a expressão de diferentes genes quando foram comparados fígados normais e com CHC (16) e quando foram comparados CHCs relacionados com hepatite B e C (17), sugerindo diferentes mecanismos de hepatocarcinogênese.

A proteína do core do VHC pode estar associada a um importante passo, dentre os vários, no desenvolvimento do CHC, estando relacionada à indução de estresse oxidativo, esteatose e crescimento celular contínuo, levando à imortalização dos hepatócitos (5). Esta proteína é capaz de se ligar a diversas proteínas supressoras tumorais, dentre elas p53, p73 e pRb, alterando o controle do ciclo celular. A proteína do core também pode influenciar o crescimento e a diferenciação das células do hospedeiro através da ativação de vias de sinalização como Raf/MAPK, Wnt/ β -catenin, TGF- β (9).

Além da proteína do core, outras oncoproteínas produzidas pelo VHC, dentre elas NS3 e NS5A teriam importante papel na hepatocarcinogênese. A participação destas proteínas na oncogênese estaria relacionada com o controle do ciclo celular, através de sua interação com proteínas chave (p53, p21 e ciclinas), fatores de transcrição, proto-oncogenes, fatores de crescimento e seus receptores e proteínas envolvidas na apoptose (9,18). A proteína viral NS3, por exemplo, inibe a atividade da p21 e a função da p53. Já a proteína NS5A parece interagir com várias vias de sinalização envolvendo ciclo celular/apoptose e metabolismo lipídico nas células do hospedeiro e compartilha alguns alvos de sinalização com a proteína do core (9).

Já está bem estabelecido que os tumores se originam de células normais através de alterações genéticas e epigenéticas. Estas alterações afetam vias de sinalização, levando as células a divisão, crescimento e migração descontrolados (9).

Assim como para a maior parte dos tumores, o desenvolvimento do CHC também envolve múltiplos passos, sendo o resultado de um acúmulo de alterações genéticas e epigenéticas em determinados genes. (9,11) Dentre as alterações genéticas e suas consequências biológicas no CHC, podem ser destacadas as seguintes: inativação ou perda de genes supressores tumorais, ativação de oncogenes, ativação de determinados fatores de crescimento e de seus receptores, reativação de algumas vias do desenvolvimento (5).

Diante do exposto, é possível observar que alguns agentes, dentre eles o VHC, poderiam interferir na patogênese molecular do CHC através da ação direta

sobre os genes que controlam o crescimento e a proliferação dos hepatócitos. Existem diversos estudos sobre o papel de muitos destes genes na hepatocarcinogênese. O presente estudo se propõe a estudar os possíveis papéis dos genes FHIT e BRAF na hepatocarcinogênese.

2.4 FHIT, BRAF e carcinogênese

2.4.1 FHIT

O FHIT (*fragile histidine triad*) é um gene supressor tumoral localizado no braço curto do cromossomo 3 (3p14.2), em uma região que contém múltiplos genes supressores tumorais, o sítio de fragilidade FRA3B. Existem alguns sítios de fragilidade descritos no genoma humano, que são regiões conhecidas como áreas que são alvo de alterações genéticas em tumores humanos. Dentre eles, existem os sítios raros e os sítios de fragilidade comuns ou constitucionais (19, 20, 21).

Os sítios de fragilidade comuns são regiões observadas nos cromossomos em metáfise de células cultivadas sob estresse replicativo e que são mais susceptíveis a rupturas, rearranjos e deleções que outras áreas do genoma. Eles são localizados em posições específicas dos cromossomos de todos os indivíduos e mais frequentemente observados depois do tratamento das células em cultura com doses baixas de afidicolina, um inibidor da DNA polimerase (20, 21). Há, também, evidências de integração de vírus nestas regiões. Entretanto, ainda faltam estudos sobre a relação entre a replicação viral contínua e a alteração na expressão de genes localizados nos sítios de fragilidade (19).

Em um dos sítios de alta fragilidade, FRA3B, situa-se o gene FHIT, localizado no 3p14.2. Este gene abrange mais de 1,5 megabase (Mb) e é o segundo maior gene humano, depois do gene da distrofina. Apesar de seu grande tamanho, ele codifica um RNA mensageiro (mRNA) que é de apenas 1,1 kb. Este mRNA codifica uma proteína de 17kD, contendo 147 aminoácidos (22). A proteína fhit é uma hidrolase envolvida na clivagem de trifosfato de diadenosina (20, 22, 23).

Em diversos tipos de tumores foram encontradas formas aberrantes da proteína fhit, devido a alterações estruturais e funcionais do gene, como rearranjos ou deleções na região do locus do FHIT (19, 24). As deleções no gene frequentemente envolvem os introns 4 e 5, como consequência de rupturas no FRA3B (19, 25). Análise de sequências do locus FRA3B/FHIT e determinadas deleções em células tumorais demonstraram que este locus é susceptível a recombinações entre longas sequências nucleares, resultando em deleções internas do FHIT (mais provavelmente causados por carcinógenos) (19).

O FHIT é considerado um gene supressor tumoral, através da inibição do crescimento celular e do aumento dos níveis de apoptose (21). A indução da apoptose se daria pela ativação da cascata das caspases, como a caspase 8 (22, 24, 26). Estudos mostram que alterações no FHIT e sua proteína poderiam, além de inibir a apoptose, interagir com algumas proteínas-chave envolvidas na progressão do câncer, incluindo a p53. A co-expressão do FHIT e da p53 inibe sinergisticamente a proliferação de células de uma variedade de tumores (27). Além da p53, a inibição do crescimento celular também poderia estar relacionada com o aumento da p21, uma proteína que inibe o ciclo celular (26).

As anormalidades no gene FHIT são observadas em uma variedade de tumores, como os do trato gastrointestinal alto, do cólon, do pulmão, do colo uterino e da mama (20). Um denominador comum aos tumores associados a alterações deste gene é a sua origem epitelial e a sua associação com carcinógenos ambientais (19, 20, 25), assim como ocorre em outros sítios de fragilidade (21). Além da exposição a carcinógenos, a inativação do FHIT também pode se correlacionar com alterações epigenéticas, como metilação do DNA (hipermetilação do DNA de regiões promotoras do gene, reduzindo a sua expressão) e modificação de histonas (20).

Estudos prévios também têm demonstrado a redução da expressão do FHIT em lesões pré-invasoras, o que levanta a hipótese de que as alterações neste gene ocorrem nas etapas iniciais da carcinogênese (20, 21, 25, 28). Outros estudos demonstraram, ainda, que alterações no gene poderiam ocorrer mesmo em tecidos normais de pulmões e fígados de pessoas expostas a carcinógenos, reforçando a ideia do dano precoce que eles poderiam causar no sítio de fragilidade FRA3B (25, 27).

Em relação ao hepatocarcinoma, alguns autores observaram forte expressão do gene em amostras de fígado normais e redução ou ausência de expressão no CHC (29). Através de estudos citogenéticos e de hibridização, algumas células do CHC demonstraram translocações desbalanceadas recorrentes envolvendo 3p14-21 e perda de número de cópias de DNA nas regiões 3p12-14, ambas alterações coincidindo com a localização do gene FHIT (19, 25). Cópias aberrantes de FHIT, com deleções de exons e fusão de exons remanescentes e perda de heterozigose foram observados em tecidos de CHC, em comparação com tecidos não tumorais e

levaram à falta de expressão da proteína fhit (24). Assim, alterações neste gene parecem estar envolvidas na hepatocarcinogênese (19).

Além da sua participação no complexo processo da gênese do CHC, outros autores encontraram associação entre alterações na expressão de fhit e taxas mais altas de proliferação celular, o que está também de acordo com uma maior agressividade do tumor (26). Outros autores também descreveram a associação entre a redução/ausência de expressão de fhit e tamanho do tumor/estadiamento do CHC e também com menor sobrevida, fatores que influenciariam no prognóstico dos pacientes (29, 30). Estes dados poderiam indicar um possível papel da alteração na expressão do FHIT na avaliação do prognóstico dos pacientes.

Estudos associaram a transdução do FHIT com a inibição do crescimento de células do CHC e a indução da apoptose *in vivo* e *in vitro* (31). Além disto, a “re-expressão” de FHIT em células tumorais (mediada por adenovírus ou por plasmídeos) foi capaz de inibir a tumorigênese, tornando-o, assim, uma estratégia promissora para o tratamento de diversos tipos de tumores (22, 26, 30).

2.4.2 BRAF

O BRAF (*v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1*) é um proto-oncogene situado no cromossomo 7 (7q24) que codifica uma serina/treonina quinase (cujo nível de expressão varia de acordo com diferentes tecidos) e que participa de vias que atuam na proliferação e na sobrevivência celulares. O gene é expresso em alguns tecidos normais, como tecido nervoso e células hematopoéticas, nos quais desempenha funções especializadas. Camundongos que possuem deficiência de BRAF exibem defeitos que envolvem a diferenciação neuroepitelial e a maturação endotelial, como por exemplo indução de apoptose de células endoteliais, levando à morte destes animais no meio da gestação (32, 34, 37). Por outro lado, mutações neste gene provocam uma ativação aberrante destas vias, levando a um aumento de sua atividade, o que poderia gerar, como consequência, a imortalização celular, o crescimento independente do estímulo de fatores de crescimento, a insensibilidade aos sinais inibidores do crescimento, a habilidade de invadir e de metastatizar, a capacidade de estimular angiogênese e de inibir a apoptose e a alteração na resposta a determinadas drogas quimioterápicas (33).

A via pela qual o BRAF age é chamada RAS/ERK (extracellular-signal regulated protein kinase) MAPK (mitogen-activated protein kinase). Esta via compreende uma proteína chamada RAS e as proteínas-quinase RAF-MEK (mitogen and extracellular-regulated protein kinase) e ERK. A proteína RAS está ligada na face interna da membrana plasmática da célula e é ativada por fatores de crescimento, citocinas e receptores hormonais. Esta proteína, quando ativada, recruta RAF para a membrana para a ativação de outras proteínas através de um processo que envolve mudanças na fosforilação e se liga a outras enzimas e proteínas estruturais. RAF causa fosforilação e ativação de MEK, que fosforila e ativa ERK. Esta cascata de sinais está envolvida na regulação da proliferação, diferenciação e sobrevivência celulares (35,36) e sua complexidade está associada a sua multiplicidade de componentes. Há três tipos de RAS (HRAS, NRAS e KRAS), três tipos de RAF (ARAF, BRAF e CRAF), dois tipos de MEK (MEK1 e MEK2) e dois tipos de ERK (ERK1 e ERK2), genes que codificam proteínas que não possuem funções redundantes. Assim, a via deve ser cuidadosamente controlada para assegurar respostas apropriadas aos estímulos ambientais. Nas células

normais, o resultado da via inclui sobrevivência, proliferação, senescência e diferenciação celulares, mas em células do câncer a ativação da via favorece a proliferação e a sobrevivência celulares (35).

O BRAF é mais potente ativador das MAPK/ERK quinases (36), sendo, dos três tipos de RAF, o que mais avidamente se liga a RAS e também o mais ativo para fosforilar a quinase MEK. A mutação de BRAF é vista em uma variedade de tumores (cerca de 7 a 8% de todos os cânceres), como cólon, ovário, fígado, estômago e carcinoma de pulmão não-pequenas células (37), tendo sido descritos mais de 100 tipos de mutação do gene (35). Entretanto, a alteração na via da qual o gene participa é particularmente descrita nos casos de melanoma, sendo a mutação do BRAF encontrada em cerca de 40 a 60% dos casos deste último tumor (38).

Mais de 90% das mutações em BRAF ocorre no nucleotídeo 1796, no exon 15 do gene, levando à substituição de ácido glutâmico por valina na posição 600, a mutação V600E, o que estimula a ativação de MEK/ERK na ausência de estímulos extracelulares (35, 36, 38). A mutação em BRAF pode estar associada tanto com a iniciação da transformação maligna quanto com a progressão do câncer (37, 39). Além disso, de acordo com alguns autores, a mutação V600E reduziria a quantidade de moléculas de MHC na superfície da célula neoplásica, o que dificultaria o seu reconhecimento por células T citotóxicas (36).

Outros estudos mostram também a associação da mutação de BRAF com uma maior tendência a metástase (no caso do melanoma, tanto para o fígado como para outros órgãos), pior prognóstico e menor sobrevida (39). Outros autores também descrevem a mutação do gene como fator prognóstico em pacientes com câncer de cólon e metástases hepáticas (40).

Com relação à hepatocarcinogênese e sua relação com BRAF, os dados da literatura são controversos. Alguns autores encontraram uma hiperexpressão do BRAF no hepatocarcinoma (41, 42), enquanto outros não encontraram mutações do gene nesta neoplasia (33, 43). COLOMBINO et al, 2012 detectaram a mutação V600E de BRAF em 23% dos casos de hepatocarcinoma do seu estudo, não sendo esta alteração observada nas áreas normais adjacentes ao tumor (42). Entretanto, a ativação anormal da via RAF/MAPK/ERK é relatada como um fenômeno comum no caso do CHC, sendo esta ativação aberrante associada com o estadió do tumor (43). Estes dados são importantes porque mostram a possibilidade de associação

do *status* de BRAF com o prognóstico e também o uso de drogas anti-BRAF no tratamento de pacientes com CHC.

O tratamento com drogas anti-BRAF tem sido descrito especialmente nos casos de melanoma, nos quais elas são capazes de aumentar a sobrevida global do paciente (44). Algumas delas podem, inclusive, levar à regressão completa ou parcial do tumor, sendo este efeito observado em melanomas com a mutação V600E de BRAF, mas não em tecidos normais ou em células tumorais que não apresentem a mutação de BRAF (38). Existem, ainda, outras drogas igualmente promissoras, algumas inclusive testadas nos casos de CHC, que atuam na inibição de MEK (44, 45, 46).

2.5 Tratamento e fatores prognósticos do hepatocarcinoma

Existe uma variedade de opções terapêuticas disponíveis para o CHC. Entretanto, até o momento, os melhores resultados são obtidos através da ressecção do tumor ou do transplante hepático. Infelizmente, 30% ou menos dos pacientes se beneficiam deste tipo de tratamento, devido ao tamanho do tumor ou sua localização, à doença multifocal, à escassa reserva hepática, enfim, devido à descoberta da doença já em fase avançada (2, 13, 47). A seleção de pacientes para o tratamento cirúrgico baseia-se em vários critérios, como a ausência de doença extra-hepática, o grau de disfunção hepática e considerações técnicas (47). Estes critérios podem ser diferentes, de acordo com o centro em consideração. Entretanto, apesar das diferenças, eles levam em conta fatores que se associam com o prognóstico e com a sobrevida.

A maioria dos centros de transplante hepático adota os critérios de Milão, que consistem na indicação de transplante hepático para pacientes cirróticos que apresentem o máximo de três nódulos de até 3 cm de diâmetro, ou nódulo solitário que não ultrapasse 5 cm e que não apresentem invasão macrovascular. A sobrevida após o transplante, nesses casos, é semelhante à de pacientes com doenças hepáticas não associadas à neoplasia (47, 48, 49).

No entanto, com o tempo, surgiram questionamentos em relação às restrições desses critérios, os quais levam à exclusão de grande número de pacientes que ainda poderiam se beneficiar de terapia curativa. Alguns centros de transplante propuseram critérios ampliados para a indicação ao transplante e obtiveram resultados semelhantes aos obtidos pelos grupos que utilizam os critérios de Milão (50, 51).

Alguns autores sugerem que além do tamanho e número de lesões tumorais, a histologia dos nódulos também está relacionada com a sobrevida após o tratamento (51, 52), mostrando, neste caso, a importância da biópsia hepática no planejamento terapêutico dos pacientes. Foi demonstrado que o grau de diferenciação tumoral se correlaciona com invasão microvascular e esta representa um marcador de recorrência do CHC após o transplante hepático. O grupo de transplante da Universidade de Toronto leva em consideração os achados de biópsia do tumor para indicar o transplante hepático e criaram os “critérios de Toronto” que incluem pacientes com tumores avançados, com doença restrita ao

figado e que não sejam tumores pouco diferenciados. A sobrevida dos pacientes selecionados para transplante pelos critérios de Toronto mostrou-se semelhante ou melhor do que a maioria das séries que utilizaram critérios mais restritos de indicação ao transplante (51, 53).

Estudos também correlacionam a presença de invasão vascular com redução da sobrevida após o transplante hepático por estarem relacionadas a aumento da recorrência do CHC (54). PARFITTI et al, 2007 desenvolveram um escore histológico para prever recorrência do CHC e, dentre as variáveis estudadas, a microinvasão vascular foi o preditor mais forte de recorrência tumoral, sendo outras características referentes ao tumor, dentre elas tamanho maior ou igual a 3cm e grau nuclear, também fatores preditivos de recorrência do tumor (55).

No subgrupo específico de pacientes com hepatite C, SHIMODA et al, 2004 encontraram correlação do estadiamento avançado do tumor e da invasão vascular com o pior prognóstico e a recorrência da neoplasia (2).

Estes dados reforçam a ideia de que o estudo histológico do tumor teria importância no CHC, contribuindo para avaliação do prognóstico, da chance de recorrência e também para o planejamento terapêutico dos pacientes com este tumor.

2.6 Justificativa

A hepatite C é uma doença que afeta milhões de pessoas em todo o mundo e que se comporta muitas vezes de forma silenciosa e com longa evolução, levando ao desenvolvimento de cirrose após décadas da infecção pelo vírus. A cirrose, por sua vez, mostra-se como um dos principais fatores de risco para o desenvolvimento de CHC em pacientes com hepatite C (1). O foco do presente estudo em pacientes com hepatite C deve-se, assim, à importância deste subgrupo na etiologia do CHC.

O benefício deste estudo seria a maior elucidação sobre a expressão de determinados genes relacionados à hepatocarcinogênese em pacientes com hepatite C e cirrose em nosso meio e sua associação com dados anatomopatológicos que interferem na sobrevida/prognóstico dos pacientes. A identificação e o grau de expressão destes genes poderiam se revelar como ferramentas adicionais na identificação de fatores relacionados com o prognóstico e com a sobrevida após o tratamento de ressecção tumoral ou transplante. Isto poderia influenciar na escolha da melhor opção terapêutica para os pacientes.

Soma-se a isto o fato de que algumas terapias imunogenéticas envolvendo os genes FHIT e BRAF já têm sido utilizadas em determinados tipos de câncer, incluindo o CHC. Estudos sobre a expressão destes genes no CHC podem abrir a discussão sobre o uso destas drogas em determinados casos desta neoplasia em nosso meio.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Estudar a expressão dos genes FHIT e BRAF no CHC em pacientes com hepatite C e cirrose, através da utilização de marcadores imunoistoquímicos e associar a expressão destes com as características anatomopatológicas das lesões que interferem na sobrevida.

3.2. Objetivos Específicos

3.2.1 – Determinar a expressão dos genes FHIT e BRAF no CHC em pacientes com hepatite C e cirrose e em fígados normais, marcados pelo método imunoistoquímico.

3.2.2 – Avaliar e analisar comparativamente os diferentes graus de expressão (produto da intensidade pela porcentagem de células marcadas) dos genes FHIT e BRAF no CHC, na cirrose e em fígados sem alterações histopatológicas.

3.2.3 – Investigar a existência de associação entre a expressão dos genes FHIT e BRAF e algumas características anatomopatológicas das lesões tumorais (tamanho do tumor, número de nódulos tumorais, grau histológico tumoral, invasão vascular).

4. METODOLOGIA (MATERIAL E MÉTODOS)

4.1. Material

Trata-se de estudo observacional, analítico, com grupo controle, no qual foram incluídos pacientes adultos, com diagnóstico de hepatite C, cirrose e CHC, e que foram submetidos a transplante hepático ou ressecção cirúrgica do CHC no Instituto Alfa de Gastroenterologia do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) entre janeiro de 2002 e dezembro de 2010. Os critérios utilizados para a seleção dos casos foram: 1) diagnóstico da infecção pelo VHC por PCR; 2) amostras de explante hepático ou de hepatectomia disponíveis para revisão e 3) confirmação histológica de CHC e de cirrose. O critério de exclusão foi a presença de qualquer outra forma de doença hepática. Os blocos de parafina dos casos (fígados com CHC e cirrose adjacente) foram obtidos do arquivo do Laboratório de Pesquisa e Rotina em Hepatologia do Serviço de Anatomia Patológica do Hospital das Clínicas da UFMG, sendo estudados 36 casos. Os blocos de parafina dos controles (fígados sem alterações histopatológicas relevantes) foram obtidos de 25 casos do arquivo de necropsias do mesmo serviço.

A utilização do material foi aprovada pelo Comitê de Ética e Pesquisa (COEP) da UFMG (COEP ETIC 278/08.- anexo 1)

As lâminas obtidas a partir dos blocos de parafina foram coradas em HE e revistas por um patologista que reclassificou o CHC de acordo com protocolo desenvolvido no serviço de Anatomia Patológica do Hospital das Clínicas da UFMG (anexo 2). As informações de interesse para o presente estudo (obtidas por meio da revisão da microscopia das lâminas coradas em HE) foram: grau histológico tumoral (segundo Edmondson Steiner- modificado) (56) e presença ou ausência de microinvasão vascular pelo método convencional (HE). A partir da análise da descrição macroscópica dos laudos anatomopatológicos dos casos foi possível também classificá-los quanto ao número e tamanho das lesões tumorais.

Posteriormente, quando toda a informação colhida a partir das lâminas coradas em HE foi obtida, foram preparadas novas lâminas a partir do material guardado em bloco de parafina e realizada IHQ para visualização das proteínas Fhit e Braf.

Os prontuários médicos foram revistos para coleta de informações clínicas (dados demográficos). Não foi realizada entrevista com os pacientes.

4.2. Imunoistoquímica

Os casos foram processados rotineiramente para inclusão das amostras em parafina e obtenção dos cortes histológicos. A seleção dos blocos para o estudo imunoistoquímico foi feita após a revisão histopatológica dos casos. As reações de IHQ foram realizadas pela técnica da streptavidina-biotina-peroxidase.

A partir dos blocos de parafina selecionados, foram realizados cortes histológicos de 4 µm de espessura, desparafinizados em três banhos de xilol e reidratados em cadeia descendente de etanol. Para a remoção do pigmento formólico que se deposita nos cortes de tecido, os cortes foram imersos por 10 minutos em solução de hidróxido de amônio a 10% em etanol a 95% e em seguida, lavados em sete banhos de água destilada. A recuperação antigênica foi realizada com o tampão 1.0mM EDTA pH 8.0 por 30 minutos em uma panela de vapor (Cuisinart). Para a inibição da peroxidase endógena, os cortes passaram por dois banhos de 5 minutos em solução de peróxido de hidrogênio a 3%, sendo posteriormente lavados em cinco banhos de água destilada.

Cada um dos procedimentos a seguir foi precedido por 3 lavagens de 5 minutos em solução tampão de TRIS-HCl: Os cortes foram incubados com anticorpos primários (discriminados na tabela 1) em BSA 1% (Sigma, USA) por 18 horas a 4°C. Foram utilizados o anticorpo secundário e o complexo terciário pertencentes do Kit LSAB Plus Peroxidase (Dako Corporation, Carpinteria, USA).

Tabela 1: Anticorpos utilizados no estudo imunoistoquímico*

ANTICORPO	DILUIÇÃO TRABALHO	PROCEDÊNCIA
FHIT	1/500	Invitrogen, USA
BRAF	1/100	Santa Cruz Biotechnology Inc.

FHIT: *fragile histidine triad*

BRAF: *v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1*

* foi utilizado também o anticorpo anti-WWox. Porém, por motivos técnicos, o mesmo foi excluído do estudo

A reação foi revelada pelo emprego de solução cromógena diaminobenzidina líquida (Dako Corporation, Carpinteria, USA). Os cortes foram incubados por 6 minutos, sendo então lavados por 5 banhos de água destilada. A contracoloração

foi realizada em solução de hematoxilina de Mayer por 1 minuto. As lâminas foram então lavadas por 5 minutos em água corrente. Posteriormente, os cortes foram desidratados em soluções com concentrações crescentes de etanol, diafanizados em xilol e montados em Permount (Fisher Scientific, Fair Lawn, USA).

O controle positivo da reação foi feito em amostras de tecido cerebral obtidas de necropsias realizadas pelo serviço tanto para FHIT como para BRAF

A análise das lâminas imunocoradas foi realizada por um patologista, utilizando-se um microscópio de luz (Modelo Nikon, Eclipse E 200), sob aumento de 400x.

4.3. Determinação e quantificação da expressão dos genes

A determinação e a quantificação da expressão dos genes foram realizadas nas 25 amostras de fígados normais e nas 36 amostras de fígados com CHC (nas áreas de tumor e de cirrose), como realizado por ZHAO et al, 2003 (57), KANNANGAI et al, 2004 (58) e ZUO et al, 2012 (43).

Inicialmente, foram detectadas as áreas de maior expressão dos genes em menor aumento (40x ou 100x) e selecionadas em cada uma das lâminas coradas pelos marcadores. Então, em dez campos de grande aumento (400x) consecutivos foi feita a quantificação da expressão dos genes. Em cada campo, foram contados o número total de células e o número de células positivas para as proteínas Fhit e Braf, assim como a intensidade de expressão. Foram consideradas positivas as células que apresentaram citoplasma com coloração castanha, como resultado da precipitação do cromógeno diaminobenzidina.

A porcentagem de marcação foi determinada da seguinte forma: em cada campo avaliado, foi quantificado o número total de células epiteliais e o número de células positivas. A partir dos dados obtidos pela avaliação de dez campos, foi calculada a porcentagem de marcação através da fórmula:

$$\text{Porcentagem de marcação} = \frac{\text{soma do número de células positivas nos campos} \times 100}{\text{soma do número total de células nos campos}}$$

Os casos foram então classificados com diferentes notas, de acordo com a porcentagem de células imunopositivas para as proteínas Fhit e Braf em:

- 0 < 5% de células imunopositivas
- 1 : 5 a 25% de células imunopositivas;
- 2 : 26 a 50% de células imunopositivas;
- 3: 51 a 75% de células imunopositivas;
- 4> 75% de células imunopositivas

Em cada campo avaliado, foi estimada também a intensidade da reação nas células positivas. A partir dos dados obtidos pela avaliação dos campos, foi calculada a intensidade de marcação e os casos foram classificados em diferentes notas, de acordo com ZUO et al, 2012 (43) da seguinte forma:

- 0= negativo (ausência de coloração)
- 1= fracamente positiva (coloração pálida)
- 2= moderadamente positiva (amarelo escuro)
- 3= fortemente positiva (marrom)

A partir da multiplicação dos valores obtidos na porcentagem de marcação e na intensidade de marcação, foi obtido um escore/índice final, como se segue:

- Escore/índice 1- notas 0 a 4= marcadamente reduzido ou negativo
- Escore/índice 2- notas 6 a 8= fracamente positivo
- Escore/índice 3- notas 9 a 12= fortemente positivo ou positividade preservada

Os casos foram, então, agrupados de acordo com o índice de marcação/escore, que indica a multiplicação da nota dada à porcentagem de células positivas pela nota dada à intensidade de imunomarcação.

Para fins de análise estatística, dado o número total de casos da amostra, bem como o número de casos encontrados em cada categoria de escore/índice, os casos com escore/índice negativos (1) e fracamente positivos (2) foram avaliados e comparados em conjunto, constituindo um único grupo e os fortemente positivos (3) constituindo o outro grupo.

4.4. Análise estatística

Os dados obtidos foram analisados utilizando-se o programa SPSS 18 Inc Software. Para comparar a associação entre as variáveis categóricas dos grupos, foram utilizados o teste qui-quadrado de tendência linear e o teste exato de Fisher. As variáveis contínuas com distribuição normal foram comparadas pelo teste t-student. O teste Mann Whitney foi utilizado para comparar dados sem distribuição normal. O teste Z de comparação de proporções foi usado para comparar diferentes incidências entre os grupos. Um valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

5.0. RESULTADOS

5.1. Dados demográficos

Dos 36 casos de CHC e cirrose estudados, 29 eram pacientes do sexo masculino (80,6%) e 7 do sexo feminino (19,4%), com idade no momento da cirurgia entre 32 e 79 anos, média de 56,4 anos. Nos 25 casos do grupo controle, 13 eram do sexo masculino (52,0%) e 12 do sexo feminino (48,0%), com idade entre 11 e 73 anos, média de 42,5 anos. Do total de casos de CHC e cirrose, 3 (8,3%) eram peças de hepatectomia e 33 (91,7%) de transplante hepático. (tabela 2). Os grupos de CHC/cirrose e controle se diferiram com relação à distribuição do sexo, havendo mais homens no primeiro grupo ($p= 0,021$) e também com relação à média de idade, sendo esta média maior no primeiro grupo que no segundo ($p= 0,002$)

5.2. Dados macroscópicos e histológicos dos casos de CHC

Em relação aos dados macroscópicos obtidos através da consulta no laudo anatomopatológico, 8 dos 36 casos não continham a informação sobre o número de nódulos. Dos 28 casos restantes, 14 mostravam nódulo único (50,0%), oito mostravam dois nódulos (28,6%) e seis mostravam três ou mais nódulos (21,4%). O tamanho dos nódulos de CHC variou de 11 a 90 milímetros (mm), com mediana de 25 mm.

Na análise dos dados histológicos, 24 tumores foram classificados como de baixo grau (66,7%) e 12 como de alto grau (33,3%). A embolização vascular foi histologicamente detectada em 16 casos (44,4%) e estava ausente em 20 casos (55,6%) (tabela 2).

Tabela 2: Distribuição dos casos de CHC e cirrose quanto às variáveis demográficas e dados anatomopatológicos

Variáveis demográficas e dados anatomopatológicos	Número de casos de CHC/cirrose (n)	Porcentagem dos casos de CHC/cirrose (%)	Número de controles (n)	Porcentagem dos controles (%)
SEXO				
Masculino	29	80,6	13	52,0
Feminino	7	19,4	12	48,0
<i>Total</i>	36	100,0	25	100,0
TIPO DE CIRURGIA				
Hepatectomia	3	8,3		
Transplante hepático	33	91,7		
<i>Total</i>	36	100,0		
NÚMERO DE NÓDULOS^a				
Nódulo único	14	50,0		
Dois nódulos	8	28,6		
Três ou mais nódulos	6	21,4		
<i>Total</i>	28	100,0		
GRAU HISTOLÓGICO				
Baixo grau	24	66,7		
Alto grau	12	33,3		
<i>Total</i>	36	100,0		
EMBOLOGIAÇÃO VASCULAR				
Presente	16	44,4		
Ausente	20	55,6		
<i>Total</i>	36	100,0		

^a 8 casos sem informação quanto ao número de nódulos
CHC: carcinoma hepatocelular

5.3. Expressão das proteínas Fhit e Braf pela imunohistoquímica

Na avaliação IHQ, o escore/índice nos controles, tanto para a expressão da proteína Fhit como para a proteína Braf, foi negativo/fracamente positivo (escores/índices 0-4/ 6-8) em todos os casos normais (25 casos, 100% da amostra). Nos tumores, o escore/índice de Fhit foi fortemente positivo (escore/índice 9-12) em

16 casos (44,4%) e negativo/fracamente positivo (escores/índices 0-4/6-8) em 20 casos (55,6%). A maior parte dos tumores mostrou positividade para Fhit em mais de 75% das células (30 casos, 83,3%) e intensidade forte ou moderada em 34 casos (17casos cada, 47,2% cada). Nas áreas de cirrose, o escore/índice de Fhit foi fortemente positivo em sete casos (19,4%) e negativo/fracamente positivo em 29 casos (80,6%). A maior parte das áreas de cirrose mostrou positividade para a proteína Fhit em mais de 75% das células (24 casos, 66,7%) e a intensidade foi fraca ou moderada em 15 (41,7%) e 14 (38,9%) casos, respectivamente, e foi forte em sete casos (19,4%) (tabelas 3, 4 e 5).

Na avaliação IHQ para a expressão da proteína Braf, um caso dos 36 da amostra não foi processado, devido extravio do material. Nos 35 tumores estudados, o escore/índice de Braf foi fortemente positivo (escore 9-12) em 22 casos (62,9%) e negativo/fracamente positivo (escores/índices 0-4/6-8) em 13 casos (37,1%). Todos os tumores mostraram positividade para proteína Braf em mais de 75% das células e intensidade forte ou moderada em 34 casos (22 e 12 casos, respectivamente; 62,9% e 34,3%, respectivamente), sendo a intensidade fraca em um caso (2,9%). Nas áreas de cirrose, o escore/índice de Braf foi fortemente positivo em seis casos (17,1%) e negativo/fracamente positivo em 29 casos (82,9%). A maior parte das áreas de cirrose mostrou positividade para BRAF em mais de 75% das células (29 casos, 82,9%) e a intensidade foi fraca ou moderada em cinco (14,3%) e 24 (68,6%) casos, respectivamente e foi forte em seis casos (17,1%) (tabelas 3, 4 e 5).

No projeto inicial, haveria também a análise da expressão do gene WWOX. Entretanto, devido a problemas de ordem técnica, a avaliação das lâminas tornou-se muito difícil e, dada a impossibilidade de repetir a IHQ (o anticorpo esgotou), optamos por excluí-lo do estudo.

Tabela 3: Intensidade de marcação imunoistoquímica para as proteínas Fhit e Braf em fígados normais e nas áreas de cirrose e de CHC associados à infecção pelo VHC

INTENSIDADE DE MARCAÇÃO					
	0 (Negativa) n (%)	1(Fraca) n (%)	2(Moderada) n (%)	3(Forte) n (%)	Total n(%)
Fhit					
Normal	5(20,0)	20(80,0)	0(0,0)	0(0,0)	25(100,0)
Cirrose	0(0,0)	15(41,7)	14(38,9)	7(19,4)	36(100,0)
CHC	0(0,0)	2(5,6)	17(47,2)	17(47,2)	36(100,0)
Braf					
Normal	0(0,0)	15(60,0)	10(40,0)	0(0,0)	25(100,0)
Cirrose	0(0,0)	5(14,3)	24(68,6)	6(17,1)	35(100,0)
CHC	0(0,0)	1(2,9)	12(34,3)	22(62,9)	35(100,0)

Fhit: *fragile histidine triad*

Braf: *v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1*

CHC: carcinoma hepatocelular

VHC: vírus da hepatite C

Tabela 4: Porcentagem de marcação imunoistoquímica para as proteínas Fhit e Braf em fígados normais e nas áreas de cirrose e de CHC associados à infecção pelo VHC

PORCENTAGEM DE CÉLULAS IMUNOPOSITIVAS						
	0(<5%) n (%)	1(5-25%) n (%)	2(26-50%) n (%)	3(51-75%) n (%)	4(>75%) n(%)	Total n(%)
Fhit						
Normal	0(0,0)	0(0,0)	2(8,0)	7(28,0)	16(64,0)	25(100,0)
Cirrose	0(0,0)	0(0,0)	5(13,9)	7(19,4)	24(66,7)	36(100,0)
CHC	0(0,0)	0(0,0)	1(2,8)	5(13,9)	30(83,3)	36(100,0)
Braf						
Normal	0(0,0)	1(4,0)	4(16,0)	9(36,0)	11(44,0)	25(100,0)
Cirrose	0(0,0)	0(0,0)	2(5,7)	4(11,4)	29(82,9)	35(100,0)
CHC	0(0,0)	0(0,0)	0(0,0)	0(0,0)	35(100,0)	35(100,0)

Fhit: *fragile histidine triad*

Braf: *v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1*

CHC: carcinoma hepatocelular

VHC: vírus da hepatite C

Tabela 5: Escore/índice da imunoistoquímica para as proteínas Fhit e Braf em fígados normais e nas áreas de cirrose e de CHC associados à infecção pelo VHC. Comparação entre os casos com escores/índices fortemente positivos (9-12) de Fhit e Braf no CHC, na cirrose e em fígados normais

	Fortemente positivo Escore/índice (9-12) n (%)	Negativo/fracamente positivo Escore/índices (0-4/6-8) n (%)	Total n (%)	p
Fhit				
Normal	0(0,0)	25(100,0)	25(100,0)	
Cirrose	7(19,4)	29(80,6)	36(100,0)	<0,001 ^a
CHC	16(44,4)	20(55,6)	36(100,0)	
Braf				
Normal	0(0,0)	25(100,0)	25(100,0)	
Cirrose	6(17,1)	29(82,9)	35(100,0)	<0,001 ^b
CHC	22(62,9)	13(37,1)	35(100,0)	

^a Fhit fortemente positivo
normal x cirrose x CHC p<0,001
normal x cirrose p=0,053
normal x CHC p<0,001
cirrose x CHC p=0,04 (OR=3,13; IC= 1,15-9,52)

^b Braf fortemente positivo
normal x cirrose x CHC p<0,001
normal x cirrose p=0,08
normal x CHC p<0,001
cirrose x CHC p<0,001 (OR= 8,20; IC= 2,68-25,0)

Fhit: *fragile histidine triad*
Braf: *v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1*
CHC: carcinoma hepatocelular
VHC: vírus da hepatite C
OR: *odds ratio*
IC: intervalo de confiança

5.4. Comparação da expressão das proteínas Fhit e Braf no CHC, na cirrose e em fígados sem alterações histopatológicas

O escore/índice da proteína Fhit em fígados nas áreas de cirrose e de CHC mostrou-se fortemente positivo (9-12) em sete casos de fígado com cirrose (19,4%) e em 16 casos de fígado com hepatocarcinoma (44,4%). A expressão de Fhit obteve escore/índice negativo/fracamente positivo (0-4/6-8) em 29 casos de fígado com cirrose (80,6%) e em 20 casos de fígado com CHC (55,6%). Todos os casos do grupo controle (25) mostraram expressão de Fhit com escore/índice negativo/fracamente positivo.

Quando comparados os escores/índices fortemente positivos (9-12) da proteína Fhit em fígados normais, nas áreas de cirrose e de CHC, houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos (p< 0,001).

Quando comparados os escores/índices fortemente positivos (9-12) da proteína Fhit em fígados nas áreas de cirrose e de CHC, houve diferença

estatisticamente significativa entre os grupos ($p=0,04$), com *odds ratio* (OR) de 3,13 e intervalo de confiança (IC) de 1,15-9,52.

Os dados também foram estatisticamente significativos quando comparados os escores/índices fortemente positivos (9-12) da proteína Fhit em fígados normais e com CHC ($p < 0,001$) e não mostraram diferença estatística quando comparados os escores/índices fortemente positivos (9-12) da proteína Fhit nas áreas de cirrose com fígados normais ($p=0,053$). (tabela 5)

O escore/índice da proteína Braf em fígados nas áreas de cirrose e de CHC mostrou-se fortemente positivo (9-12) em seis casos de fígado com cirrose (17,1%) e em 22 casos de fígado com hepatocarcinoma (62,9%). A expressão de Braf obteve escore/índice negativo/fracamente positivo (0-4/6-8) em 29 casos de fígado com cirrose (82,9%) e em 13 casos de fígado com hepatocarcinoma (37,1%). Todos os casos do grupo controle (25) mostraram expressão de Braf com escore/índice negativo/fracamente positivo.

Quando comparados os escores/índices fortemente positivos (9-12) da proteína Braf em fígados normais, nas áreas de cirrose e de CHC, houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p < 0,001$).

Quando comparados os escores/índices fortemente positivos (9-12) da proteína Braf em fígados nas áreas de cirrose e de CHC, houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p < 0,001$), com OR= 8,20 e IC= 2,68-25,0.

Os dados também foram estatisticamente significativos quando comparados os escores/índices fortemente positivos (9-12) da proteína Braf em fígados normais e com CHC ($p < 0,001$) e não mostraram diferença estatística quando comparados os escores/índices fortemente positivos (9-12) da proteína Braf nas áreas de cirrose com fígados normais ($p=0,08$). (tabela 5)

As figuras 2A, 2B, 2C e 2D ilustram o padrão de expressão pela IHQ das proteínas Fhit e Braf nos fígados normais, nas áreas de cirrose e de CHC.

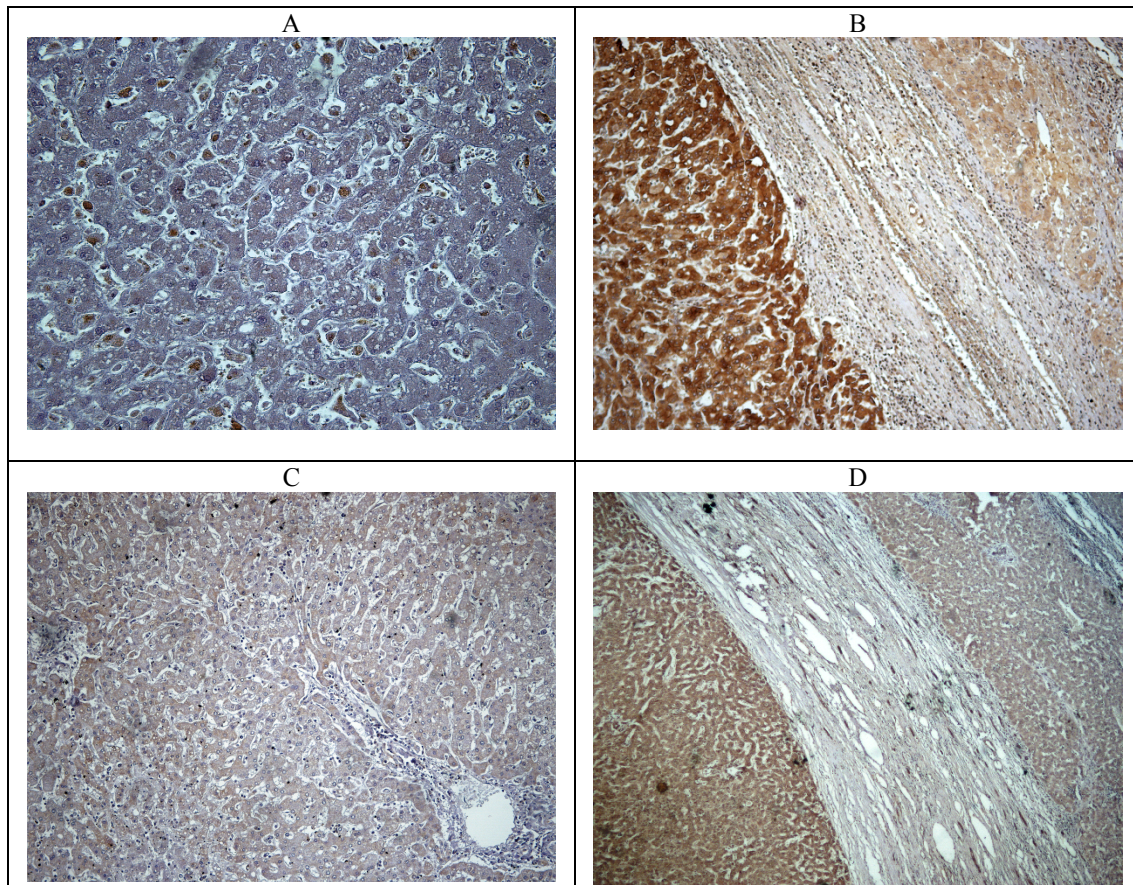


Figura 2 A: Fígado normal: imunomarcção para a proteína Braf (100x) ; B: Fígado na área de hepatocarcinoma (esquerda) e de cirrose (direita): imunomarcção para a proteína Braf (100x); C Fígado normal: imunomarcção para a proteína Fhit (100x) ; D Fígado na área de hepatocarcinoma (esquerda) e de cirrose (direita): imunomarcção para a proteína Fhit (50x)

5.5. Comparação da expressão das proteínas Fhit e Braf no CHC e na cirrose com dados anatomopatológicos

Quando comparados os escores/índices da expressão das proteínas Fhit e Braf no tumor com alguns dados anatomopatológicos, não houve associação entre a expressão das proteínas com o grau histológico tumoral ($p=0,081$ para Fhit and $p=1,00$ para Braf), com a invasão vascular ($p=0,74$ para Fhit and $p=0,31$ para Braf), com o diâmetro ($p=0,40$ para Fhit e $p=0,15$ para Braf) ou número das lesões tumorais ($p=0,46$ para Fhit e $p=0,60$ para Braf)

Com relação ao grau histológico dos tumores, 24 deles foram classificados como de baixo grau e 12 como de alto grau. A embolização vascular foi histologicamente detectada em 16 casos e estava ausente em 20 casos. Quando comparada a presença ou ausência de embolização vascular com o grau histológico dos tumores, a invasão vascular estava presente em sete (29,2%) dos 24 casos de CHC de baixo grau e ausente em 17 (70,8%) dos casos. Nos tumores de alto grau, a invasão vascular foi observada em 9 (75,0%) dos 12 casos e foi ausente em 3 (25,0%) dos casos ($p=0,014$), com OR de 7,27 e IC de 1,5-35,71 (tabela 6)

Tabela 6: Comparação entre a embolização vascular e o grau histológico tumoral do CHC

Grau histológico tumoral	Embolização vascular			p*
	Presente n(%)	Ausente n(%)	Total n(%)	
Baixo grau	7 (29,2)	17 (70,8)	24 (100,0)	0,014
Alto grau	9(75,0)	3 (25,0)	12 (100,0)	
Total n(%)	16 (44,4)	20 (55,6)	36 (100,0)	

CHC: carcinoma hepatocelular

*odds ratio (OR)=7,27

Intervalo de confiança (IC)=1,5-35,71

6.0 DISCUSSÃO

O CHC está entre as cinco principais causas de câncer mundialmente e terceira maior causa de morte por câncer (59). Apesar da sua importância global, o câncer de fígado ainda é relativamente pouco estudado, quando comparado com outros tipos de cânceres de alta letalidade e as informações sobre as alterações genômicas associadas à iniciação e à progressão do CHC parecem ser ainda fragmentadas.

Alguns estudos mostram ativação aberrante de vias sinalizadoras envolvendo proliferação, sobrevivência, diferenciação celulares e angiogênese, processos que estão presentes de forma heterogênea nos CHCs (60). Na tentativa de contribuir para o conhecimento de algumas destas alterações genômicas no CHC, o presente estudo foca na expressão de BRAF e FHIT.

O BRAF é um proto-oncogene associado ao desenvolvimento de alguns tipos de câncer, especialmente melanomas (33) e o FHIT é um gene supressor tumoral que, uma vez localizado em um sítio de fragilidade cromossômica, está susceptível a alterações genômicas que se associam ao desenvolvimento de alguns tipos de câncer (27). Segundo alguns autores, alterações em ambos genes podem participar do complexo processo da hepatocarcinogênese (19, 41, 42). A importância do estudo da expressão destes genes em pacientes com CHC e infecção pelo VHC justifica-se pela possibilidade de contribuição para o melhor entendimento sobre o desenvolvimento desta neoplasia. Isto, por sua vez, pode dar informações adicionais sobre prognóstico/sobrevida dos pacientes e, conseqüentemente, sobre seu planejamento terapêutico, já que têm sido descritas algumas opções terapêuticas para o CHC envolvendo drogas que atuam em ambos genes ou em elementos de suas vias (22, 30, 44, 45, 46).

Em relação aos dados demográficos do presente estudo, dos 36 casos de CHC e cirrose estudados, a maioria era constituída por pacientes do sexo masculino, com idade média no momento da cirurgia de 56,4 anos. Alguns autores descreveram perfil epidemiológico semelhante em seus estudos, predominando o CHC em pacientes do sexo masculino e com idade superior a 45 anos (2, 14, 43). Entretanto, ZUO et al, 2012 encontraram associação entre o sexo e a idade dos pacientes com o prognóstico (sendo este pior em homens e em pacientes com mais

de 45 anos) (43), enquanto SHIMODA et al, 2004 ao tentarem associar o gênero dos pacientes com a sobrevida, não encontraram associação (2).

Em relação aos dados macroscópicos do tumor, dos 28 casos avaliados, a metade mostrava nódulo único, oito mostravam dois nódulos e seis mostravam três ou mais nódulos

O tamanho dos nódulos de CHC obteve mediana de 25 mm. CARRILHO et al, 2010 obtiveram características semelhantes quanto ao número de nódulos tumorais (53% dos pacientes com nódulo único), mas a mediana do tamanho tumoral de sua amostra foi maior (34 mm) (14).

Dentre os dados histológicos descritos no nosso estudo, a maioria dos tumores foi classificada como de baixo grau, o que difere dos dados apresentados por ZUO et al, 2012 em que a maioria dos tumores foi de alto grau (43). A embolização vascular foi histologicamente detectada em 44,4% dos nossos casos da nossa amostra, resultado semelhante ao de SAKAI et al, 2012 em que a maioria dos tumores não mostrou invasão vascular histológica (62). Com relação à associação entre as variáveis histológicas, houve uma maior proporção de tumores de alto grau com invasão vascular do que tumores de baixo grau com invasão vascular, sendo que a chance de os tumores de alto grau apresentar invasão vascular foi 7,27 vezes a chance de um tumor de baixo grau apresentar invasão vascular, variando esta chance entre 1,5 e 35,71 vezes. Isto está de acordo com dados da literatura, que relacionam a presença de invasão vascular e o alto grau do CHC com um pior prognóstico (2, 51, 53, 54, 55).

A análise dos dados macroscópicos e microscópicos citados acima se justifica pelo fato de que são apontados por alguns autores como importantes preditores do prognóstico/sobrevida dos pacientes (2, 43, 47, 48, 49, 51, 54, 55). Optou-se, assim, pelo estudo da expressão dos genes FHIT e BRAF, como também da associação de sua expressão com estes dados anatomopatológicos.

Quando comparados os escores/índices fortemente positivos da proteína Fhit em fígados normais, nas áreas de cirrose e de CHC, houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos, o que indica que há uma diferença entre os três grupos (normais, cirrose e tumor).

Na tentativa de refinar a análise dos dados, os fígados normais, na área de cirrose e na área de tumor foram comparados entre si. Quando comparados os escores/índices fortemente positivos da proteína Fhit em fígados nas áreas de

cirrose e de CHC, houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos. A chance de a expressão de Fhit ser fortemente positiva nas áreas de tumor é 3,13 vezes a chance de a proteína ser fortemente positiva na área de cirrose, variando esta chance entre 1,15 e 9,52. Os dados também foram estatisticamente significativos quando comparados os escores/índices fortemente positivos da proteína Fhit em fígados normais e com CHC, sendo o escore/índice fortemente positivo encontrado predominantemente nas áreas de tumor. Apesar de não haver diferença estatisticamente significativa quando comparados os escores/índices fortemente positivos da proteína Fhit nas áreas de cirrose com fígados normais, o valor de p encontrado ($p=0,053$) pode indicar que há uma tendência para que estes dois grupos sejam diferentes quanto à expressão de Fhit. De acordo com nossos dados, pode-se concluir que a expressão fortemente positiva da proteína Fhit predominou nas áreas de tumor, quando comparadas com as áreas de cirrose e de fígados normais.

Ao confrontar os achados do nosso estudo com alguns dados da literatura, a imonmarcação para a proteína Fhit fracamente positiva/negativa, assim como anormalidades no RNAm foram relatados em estudos sobre CHC na China, Taiwan e Alemanha (57, 61). Nos Estados Unidos e na Coreia do Sul uma frequência muito menor da perda de expressão/negatividade da proteína Fhit foi relatada, o que está de acordo com os nossos resultados (27, 58). Esta importante diferença na expressão da proteína Fhit pode estar associada à influência de carcinógenos ambientais. As duas características comuns aos tumores associados a alterações de Fhit são a origem epitelial e a associação com carcinógenos ambientais (19, 20, 25) e países como Coreia do Sul, Estados Unidos e Brasil têm baixa prevalência de exposição à aflatoxina B1. Associado a isto, a população do nosso estudo inclui apenas pacientes com cirrose e CHC pela infecção pelo VHC.

Estudos prévios também têm demonstrado, ainda, a redução da expressão do FHIT em lesões pré-invasoras (20, 21, 25, 28) ou mesmo em tecidos normais de pulmões e fígados de pessoas expostas a carcinógenos, reforçando a ideia do dano precoce que eles poderiam causar no sítio de fragilidade FRA3B (25, 27). Estes achados não foram reproduzidos em nosso estudo, já que a expressão fortemente positiva da proteína Fhit ocorreu predominantemente nas áreas de tumor, quando comparadas com as áreas de cirrose (que seria considerada lesão pré-neoplásica) e de fígados normais. Estes achados contrariam a ideia inicial de que haveria, na

nossa população, uma perda progressiva da expressão de FHIT à medida que a transformação maligna ocorresse nos hepatócitos.

Embora o aumento da expressão de um gene supressor tumoral em uma neoplasia possa parecer um resultado contraditório, este achado já foi detectado em outros estudos realizados com FHIT e com outros genes supressores tumorais, como o SMAD4 (58). Este dado pode refletir a interrupção de uma via sinalizadora/metabólica que regularia a produção da proteína Fhit (permitindo que ela seja produzida em excesso) ou uma alteração de RNAm que cause uma produção aumentada da proteína Fhit, porém como uma proteína alterada, não necessariamente funcionante (58). Outro dado interessante é que os fígados normais de nossa amostra expressaram a proteína Fhit de forma fraca (escore/índice negativo/fracamente positivo). Entretanto, já foram descritas alterações do FHIT em altas porcentagens em fígados normais, o que poderia sugerir que a presença de formas aberrantes de Fhit não estaria relacionada com ou seria necessária para a hepatocarcinogênese (19).

Diante dos dados apresentados, não se pode afirmar que o gene FHIT teria papel relevante na hepatocarcinogênese em pacientes com hepatite C e cirrose em nosso meio.

Em relação à expressão de BRAF, quando comparados os escores/índices fortemente positivos da proteína Braf em fígados normais, nas áreas de cirrose e de CHC, houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos, o que indica que há uma diferença entre os três grupos (normais, cirrose e tumor).

Na tentativa de refinar a análise dos dados, os fígados normais, na área de cirrose e na área de tumor foram comparados entre si. Quando comparados os escores/índices fortemente positivo da proteína Braf em fígados nas áreas de cirrose e de hepatocarcinoma, houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos. A chance de a expressão de Braf ser fortemente positiva nas áreas de tumor é 8,20 vezes a chance de a proteína ser fortemente positiva na área de cirrose, variando esta chance entre 2,68 e 25,0. Os dados também foram estatisticamente significativos quando comparados os escores/índices fortemente positivos da proteína Braf em fígados normais e com CHC, sendo o escore/índice fortemente positivo encontrado predominantemente nas áreas de tumor. Apesar de não haver diferença estatisticamente significativa quando comparados os escores/índices fortemente positivos da proteína Braf nas áreas de cirrose com

fígados normais, o valor de p encontrado ($p=0,08$) pode indicar que há uma tendência para que estes dois grupos sejam diferentes quanto à expressão de Braf. De acordo com nossos dados, pode-se concluir que a expressão fortemente positiva da proteína Braf predominou nas áreas de tumor, quando comparadas com as áreas de cirrose e de fígados normais. Estes dados sugerem que o BRAF pode representar um papel importante na hepatocarcinogênese nesta população.

Alguns estudos prévios sobre BRAF examinaram a frequência de sua mutação em amostras de CHC, havendo resultados controversos. Nossos resultados estão, em parte, de acordo com COLOMBINO et al, 2012 que em uma coorte na Itália demonstraram mutações somáticas de BRAF em 23% das amostras de CHC (a mutação V600E) e uma correlação positiva desta mutação tanto com a presença de múltiplos nódulos de CHC como também com os altos índices de proliferação celular. Estes mesmos autores não observaram esta alteração nas áreas normais adjacentes ao tumor (42). NEWELL et al, 2009 também encontraram uma hiperexpressão do BRAF no CHC (41). Por outro lado, TANNAPFEL et al, 2003 e ZUO et al, 2012 não observaram mutação de BRAF em seus estudos que analisaram pacientes com CHC (33, 43). Estes resultados podem indicar que populações com diferenças genéticas podem apresentar também diferenças nos mecanismos e nas vias da hepatocarcinogênese.

Apesar de a mutação no gene BRAF não ser encontrada em alguns estudos (33, 43), a alteração com consequente ativação anormal da via RAF/MAPK/ERK (via da qual a proteína Braf participa) é relatada como um fenômeno comum no caso do CHC, sendo esta ativação aberrante associada com o estadió do tumor (43). Estes dados levantam a discussão sobre tratamentos alternativos para o CHC, que podem incluir não só as drogas anti-BRAF em pacientes selecionados, como também o uso de outras drogas que atuam na via RAF/MAPK/ERK.

De acordo com os nossos achados, as alterações no gene BRAF podem apresentar um papel relevante na hepatocarcinogênese em pacientes com hepatite C e cirrose em nosso meio. Pode-se sugerir, assim, a incorporação do estudo imunoistoquímico de BRAF no protocolo de avaliação do CHC em casos selecionados.

Quando comparados os escores/índices da expressão das proteínas Fhit e Braf no tumor com determinados parâmetros macro e microscópicos, não houve

associação entre a expressão das proteínas com o grau histológico tumoral, com a invasão vascular, com o diâmetro ou número das lesões tumorais.

De acordo com dados da literatura, KANNANGAI et al, 2004 (58), ao estudarem a relação entre FHIT e sua associação com tamanho do tumor e grau tumoral também mostraram resultados semelhantes aos do presente estudo. ZHAO et al, 2003 (57) também não encontraram resultados estatisticamente significativos quando tentaram associar a expressão de FHIT com grau tumoral, mas encontraram expressão reduzida da proteína Fhit em casos de doença com estadió clínico avançado e também em tumores de maiores dimensões (>50,0 mm). Já NAM et al, 2008 ao compararem a presença de formas aberrantes de FHIT com determinados parâmetros do tumor (dentre eles grau tumoral, tamanho do tumor e invasão vascular microscópica), não encontraram associação entre as variáveis (27). Em relação ao BRAF, COLOMBINO et al, 2012 (42) demonstraram associação entre a mutação do gene e a presença de múltiplos nódulos tumorais, o que difere dos nossos achados. Entretanto, os mesmos autores não verificaram associação estatisticamente significativa quando compararam a mutação do gene com o grau ou tamanho do tumor, o que está de acordo com os nossos achados.

O fato de não ter sido encontrada associação entre a expressão das proteínas Fhit e Braf com os dados anatomopatológicos na nossa amostra pode ser decorrente do tamanho da amostra e do tipo de população do estudo, que inclui exclusivamente pacientes com cirrose e hepatocarcinoma associados à infecção pelo VHC. Outros estudos podem ser realizados na tentativa de verificar esta associação.

A análise de alterações genéticas e epigenéticas, bem como das diferentes vias moleculares envolvidas no desenvolvimento do CHC é uma etapa crítica para a identificação de novas terapias potenciais para este tipo de câncer, como também uma forma de classificar, com base em dados genéticos/moleculares, alguns dos fatores de risco para seu desenvolvimento, bem como prognóstico.

No presente estudo, foi utilizado o método de IHQ, uma técnica relativamente rápida e que pode ser realizada em um serviço simples de patologia cirúrgica.

O fato de não ter sido realizado o sequenciamento dos genes e também a amostra constituída somente por pacientes com CHC e cirrose associados ao VHC (o que reduz o tamanho da amostra) são os principais fatores limitantes do presente estudo. Os problemas técnicos que impossibilitaram a avaliação do gene WWOX

também limitaram a proposta inicial deste trabalho, já que um dos nossos objetivos seria também avaliar a expressão deste gene no CHC. Outra proposta inicial era também a avaliação da sobrevida dos pacientes que constituíram a amostra. Entretanto, muitos deles haviam perdido o seguimento e, entre aqueles pacientes que tinham dados a respeito da sobrevida, a maioria havia falecido logo após o transplante hepático. Assim, o óbito destes pacientes estaria associado a complicações cirúrgicas e não às características do tumor. Por estes motivos, a avaliação da sobrevida dos pacientes foi outro dado que teve de ser excluído do estudo.

Outros estudos são necessários para avaliar o papel dos genes FHIT e BRAF na hepatocarcinogênese, em um grupo maior de pacientes, com diferentes etiologias de cirrose e com exposições a diferentes fatores ambientais.

7.0. CONCLUSÕES:

Com base nos resultados deste estudo, pode-se concluir que:

1. O perfil epidemiológico dos pacientes da nossa amostra, quando se leva em consideração a idade e o gênero dos pacientes, é semelhante ao de outros estudos, predominando o CHC em pacientes do sexo masculino e em pacientes com mais de 45 anos

2. Em relação aos dados microscópicos de interesse para o estudo, houve uma maior proporção de tumores de alto grau com invasão vascular do que tumores de baixo grau com invasão vascular

3. Alterações no gene FHIT parecem não ter influência na hepatocarcinogênese em pacientes com hepatite C e cirrose em nosso meio, já que a expressão fortemente positiva da proteína Fhit predominou nas áreas de tumor, quando comparadas com as áreas de cirrose e de fígados normais

4. A expressão da proteína Fhit não parece ter associação com dados anatomopatológicos do CHC relacionados com a sobrevida (número e tamanho das lesões tumorais, grau histológico tumoral e invasão vascular microscópica) em pacientes do nosso meio

5. Alterações no gene BRAF parecem ter influência na hepatocarcinogênese em pacientes com hepatite C e cirrose em nosso meio, já que a expressão fortemente positiva da proteína Braf predominou nas áreas de tumor, quando comparadas com as áreas de cirrose e de fígados normais

6. A expressão da proteína Braf não parece ter associação com dados anatomopatológicos do CHC relacionados com a sobrevida (número e tamanho das lesões tumorais, grau histológico tumoral e invasão vascular microscópica) em pacientes do nosso meio

7. Outros estudos são necessários para avaliar o papel dos genes FHIT e BRAF na hepatocarcinogênese, em um grupo maior de pacientes, com diferentes etiologias de cirrose e com exposições a diferentes fatores ambientais para validar os achados deste estudo.

8.0. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

1. GIANNINI E, RISSO D, BOTTA F, *et al.* Prognosis of hepatocellular carcinoma in anti-HCV positive cirrhotic patients: a single-centre comparison amongst four different staging systems. *Journal of Internal Medicine*, 2004; 255: 399-408
2. SHIMODA M, GHOBRIAL RM, CARMODY IC, *et al.* Predictors of survival after liver transplantation for hepatocellular carcinoma associated with hepatitis C. *Liver transplantation*, 2004; 10: 1478-1486
3. FORMEISTER EJ, TSUCHIYA M, FUJII H, *et al.* Comparative analysis of promoter methylation and gene expression endpoints between tumorous and non-tumorous tissues from HVC-positive patients with hepatocellular carcinoma. *Mutat Res*, 2010; 692 (1-2):26-33
4. HAMID AS, TESHAMARIAM, IG, ZHANG, Y *et al.* Aflatoxin B1-induced hepatocellular carcinoma in developing countries: Geographical distribution, mechanism of action and prevention (Review). *Oncology Letters*, 2013; 5:1087-1092
5. SHIRAHA H, YAMAMOTO K, NAMBA M. Human hepatocyte carcinogenesis. *International Journal of Oncology*, 2013; 42: 1133-1138
6. TORRE GL, GUALANO MR, SEMYONOV L, *et al.* Hepatitis C virus infection trends in Italy, 1996-2006. *Hepatitis Monthly*, 2011; 11(11): 895-900
7. KIM CW, CHANG KM. Hepatitis C virus: virology and life cycle. *Clinical and Molecular Hepatology*, 2013; 19: 17-25
8. HALLIDAY J, KLENERMAN P, BARNES E. Vaccination for hepatitis C virus: closing in on an evasive target. *Expert Rev Vaccines*, 2011; 10 (5):659-672
9. JEONG SW, JANG JY, CHUNG RT. Hepatitis C virus and hepatocarcinogenesis. *Clinical and Molecular Hepatology*, 2012; 18: 347-356.
10. STRAUSS E. Hepatite C. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 2001; 34(1): 69-82
11. TISCHOFF I, TANNAPFEL A. DNA methylation in hepatocellular carcinoma. *World Journal of Gastroenterology*, 2008; 14(11): 1741-1748
12. BRASIL. Ministério da Saúde. Disponível em portal.saude.gov.br. Acesso em 25 de novembro de 2013.
13. OSÓRIO FMF, LAUAR GM, LIMA AG *et al.* Epidemiological Aspects of Hepatocellular Carcinoma in a Referral Center of Minas Gerais, Brazil. *Arquivos of Gastroenterology*, 2013; 50(2): 97-100.

14. CARRILHO FJ, KIKUCHI L, BRANCO F et al. Clinical and epidemiological aspects of hepatocellular carcinoma in Brazil. *Clinics*, 2010; 65(12): 1285-1290.
15. BRASIL. Ministério da Saúde, Instituto Nacional do Câncer (INCA). Disponível em www.inca.gov.br. Acesso em 25 de novembro de 2013.
16. XU XR, HUANGJ, XU ZG, et al. Insight into hepatocellular carcinogenesis at transcriptome level by comparing gene expression profiles of hepatocellular carcinoma with those of corresponding noncancerous liver. *PNAS* 2001;98:15089-94.
17. IIZUKA N, OKA M, YAMADA-OKABE H, et al. Comparison of gene expression between hepatitis B virus and hepatitis C virus-infected hepatocellular carcinoma by oligonucleotide microarray data on the basis of a supervised learning method. *Cancer Res* 2002; 62:3939-44.
18. KASPRZAK A, ADAMEK A. Role of hepatitis C virus proteins (C, NS3, NS5A) in hepatic oncogenesis. *Hepatology Research* 2008; 38:1-26.
19. ZERKI ARN, BAHNASSY AA, HAFEZ M, et al. Alterations of the fragile histidine triad gene in hepatitis C virus-associated hepatocellular carcinoma. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 2005; 20:87-94.
20. ILIOPOULOS D, GULER G, HAN SY, et al. Roles of FHIT and WWOX fragile genes in cancer. *Cancer Letters*, 2006; 232: 27-36
21. O'KEEFE LV, RICHARDS RI. Common chromosomal fragile sites and cancer: focus on FRA16D. *Cancer Letters*, 2006; 232: 37-47
22. PEKARSKY Y, PALAMARCHUK A, HUEBNER K, CROCE CM. FHIT as tumor suppressor: mechanisms and therapeutic opportunities. *Cancer Biology & Therapy*, 2002; 1:3: 232-236
23. CORBIN S, NEILLY ME, ESPINOSA III R et al. Identification of unstable sequences within the common fragile site 3p14.2: implications for the mechanism of deletions within fragile histidine triad gene/common fragile site at 3p14.2 in tumors. *Cancer Research*, 2002; 62:3477-3484
24. MARTIN J, DUFOUR JF. Tumor suppressor and hepatocellular carcinoma. *World Journal of Gastroenterology*, 2008; 14(11): 1720-1733
25. YUAN BZ, KECK-WAGGONER C, ZIMONJIC DB et al. Alterations of the FHIT gene in human hepatocellular carcinoma. *Cancer Research*, 2000; 60: 1049-1053
26. TOLEDO G, SOLA JJ, LOZANO MD et al. Loss of FHIT protein expression is related to high proliferations, low apoptosis and worse prognosis in non-small-cell lung cancer. *Modern Pathology*, 2004; 17: 440-448

27. NAM CW, SHIN JW, PARK NH. Fragile histidine triad gene alterations are not essential for hepatocellular carcinoma development in South Korea. *World J Gastroenterol* 2008; 14(22): 3526-3533
28. HAO XP, *et al.* Loss of fragile histidine triad expression in colorectal carcinomas and premalignant lesions. *Cancer Research*, 2000; 18
29. NAN KJ, RUAN ZP, JING Z, *et al.* Expression of fragile histidine triad in primary hepatocellular carcinoma and its relation with cell proliferation and apoptosis. *World J. Gastroenterol*, 2005; 11(2):228-31
30. YU GR, QIN WW, LI JP *et al.* HIV-TAT-fused FHIT protein functions as a potential pro-apoptotic molecule in hepatocellular carcinoma cells. *Bioscience Reports*, 2012; 32: 271-279
31. XU RH, ZHENG LY, HE DL, *et al.* Effect of fragile histidine triad gene transduction on proliferation and apoptosis of human hepatocellular carcinoma cells. *World J. Gastroenterol*, 2008; 14(23):3754-3758
32. .LIN J, WANG B, HUANG AM, WANG XJ. The relationship between FHIT and WWOX expression and clinicopathological features in hepatocellular carcinoma. *Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi*, 2010; 18(5): 357-60
32. KONDO T, NAKAZAWA T, MURATA S, *et al.* Enhanced B-Raf protein expression in independent of V600E mutant status in thyroid carcinomas. *Human Pathology*, 2007
33. TANNAPFEL A, SOMERER F, BENICKE M, *et al.* Mutations of the BRAF gene in cholangiocarcinoma but not in hepatocellular carcinoma. *Gut*, 2003; 52: 706-712
34. WOJNOWSKI L, ZIMMER AM, BECK TW *et al.* endothelial apoptosis in Braf-deficient mice. *Nat. Genet.*, 1997; 16(3):293-297.
35. HEIDORN SJ, MILAGRE C, WHITTAKER S *et al.* Kinase-dead BRAF and oncogenic RAS cooperate to drive tumor progression through CRAF. *Cell*, 2010; 140(2): 209-221
36. IMPROTA G, PELOSI G, TAMBORINI E *et al.* Biological insights into BRAF v600 mutations in melanoma patient. *Oncoimmunology*, 2013; 2:8, e25594
37. HONG SW, JIN DH, SHIN JS *et al.* Ring finger protein 149 is an E3 ubiquitin ligase active on wild-type v-Raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1 (BRAF). *J Biol Chem.*, 2012; 287(28): 24017-24025
38. FLAHERTY KT, *et al.* Inhibition of mutated, activated BRAF in metastatic melanoma. *The New England Journal of Medicine*, 2010; 363: 809-19

39. CHANG DZ, PANAGEAS KS, OSMAN I et al. Clinical significance of BRAF mutations in metastatic melanoma. *J Transl Med.*, 2004; 2:46
40. HUANG CJ, TENG HW, CHIEN CC et al. Prognostic Significance of C-Reactive Protein Polymorphism and KRAS/BRAF in synchronous liver metastasis from colorectal cancer. *Plos One*, 2013; 8(6): e65117
41. NEWELL P, TOFFANIN S, VILLANUEVA A, et al. Ras pathway activation in hepatocellular carcinoma and anti-tumoral effect of combined sorafenib and rapamycin *in vivo*. *J Hepatol*, 2009; 51(4):725-733
42. 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 and Disease*, 2012; 3: e259
43. ZUO Q, HUANG H, SHI M et al. Multivariate analysis of several molecular markers and clinicopathological features in postoperative prognosis of hepatocellular carcinoma. *The Anatomical Record*, 2012; 295: 423-431
44. GIROTTI MR, MARAIS R. Déjà vu: EGF receptors drive resistance to BRAF inhibitors. *Cancer Discov.*, 2013; 3(5): 487-490
45. COLLISSON EA. An uphill battle downstream of RAF. *Journal of Clinical Oncology*, 2011; 2298-2300
46. BOSE S, SAKHUJA P, BEZAWADA L et al. Hepatocellular carcinoma with persistent hepatitis B virus infection shows unusual downregulation of Ras expression and differential response to Ras mediated signaling. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 2011; 26: 135-144
47. THOMAS MB, JAFFE D, CHOTI MM et al. Hepatocellular carcinoma: consensus recommendations of the Nacional Cancer Institute Clinical Trials Planning Meeting. *Journal of Clinical Oncology*, 2010; 28:3994-4005
48. ADAM R, HOTI E. Liver transplantation: the current situation. *Semin Liver Dis* 2009; 29:3-18
49. STUCLIFFE R, MAGUIRE D, PORTMANN B et al. Selection of patients with hepatocelular carcinoma for liver transplantation. *British Journal of Surgery*, 2006; 93 (1);11-18
50. YAO FY, FERRELL L, BASS NM et al. Liver transplantation for hepatocellular carcinoma: Expansion of the tumor size limits does not adversely impact survival. *Hepatology* 2001;33:1394-1403

51. CHEAH YL, CHOW PKH. Liver transplantation for hepatocellular carcinoma: an appraisal of current controversies. *Liver Cancer*, 2012; 1:183-189
52. COLECCHIA A, SCAIOLI E, MONTRONE L et al. Pre-operative liver biopsy in cirrhotic patients with early hepatocellular carcinoma represents a safe and accurate diagnostic tool for tumor grading assessment. *Journal of Hepatology*, 2011; 54:300-305
53. DUBAY D, SANDROUSSI C, SANDHU L et al. Liver transplantation for advanced hepatocellular carcinoma using poor tumor differentiation as an exclusion criterion. *Annals of Surgery*, 2011; 253:166-172
54. JONAS S, BECHSTEIN WO, STEINMULLER T et al. Vascular invasion and histopathologic grading determine outcome after liver transplantation for hepatocellular carcinoma in cirrhosis. *Hepatology*, 2001; 33: 1080-1086
55. PARFITTI JR, MAROTTA P, ALGHAMDI M et al. Recurrent hepatocellular carcinoma after transplantation: use of a pathological score on explanted livers to predict recurrence. *Liver Transpl*, 2007; 13(4): 543-551
56. EDMONDSON H, STEINER P. Primary carcinoma of the liver: a study of 100 cases among necropsies. *Cancer* 1954; 1: 462-503
57. ZHAO P, SONG X, NIN YY, et al. Loss of fragile histidine triad protein in human hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2003; 9(6): 1216-1219
58. KANNANGAI R, SAHIN F, ADEGBOLA O, et al. FHIT mRNA and protein expression in hepatocellular carcinoma. *Mod Pathol* 2004; 17(6): 653-659
59. PARKIN DM. Global cancer statistics in the year 2000. *Lancet Oncol* 2001; 2(9): 533-543
60. HOSHIDA Y, TOFFANIN S, LACHENMAYER A, et al. Molecular classification and novel targets in hepatocellular carcinoma: recent advancements. *Semin Liver Dis* 2010; 30(1): 35-51
61. CHEN YJ, CHEN PH, CHANG JG. Aberrant FHIT transcripts in hepatocellular carcinomas. *Br J Cancer* 1998; 77(3): 417-420
62. SAKAI K, OKAJIMA H, KOSHINO K, et al. Investigation of histological vascular invasion from preoperative evaluation in patients with hepatocellular carcinoma who underwent living donor liver transplantation. *Transplant Proc.*, 2012; 44(2): 409-411

Anexo 1

Aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG [com seres humanos (COEP) e em animais (CETEA)]: projeto de pesquisa aprovado pelo COEP (COEP ETIC 278/08.)



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

Parecer nº. ETIC 278/08

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

DECISÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP aprovou, no dia 25 de agosto de 2008, após atendidas as solicitações de diligência, o projeto de pesquisa intitulado **"Estudo molecular do gene *wwox* em 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.

Profa. Maria Teresa Marques Amaral
Coordenadora do COEP-UFMG

Anexo 2

Protocolo de avaliação anatomopatológica de peças de fígado- carcinoma hepatocelular- Serviço de Patologia do Hospital das Clínicas da UFMG (página 1)

Paciente: _____ N° Exame: _____ Registro: _____

Tipo histológico

Carcinoma hepatocelular: _____

Número de nódulos neoplásicos: _____

Distribuição dos nódulos neoplásicos: unilobar: _____ bilobar: _____

- Padrão histológico:**
- padrão trabecular
 - padrão pseudoacinar
 - padrão sólido/esquiroso
 - padrão fibrolamelar

Fibrose: _____

Inflamação tumoral (>5 células inflamatórias/campo de grande aumento ou agregado de células inflamatórias):

sim não

Necrose: sim não

- Padrão citológico:**
- hepatocítico
 - oncocítico
 - células gigantes
 - células claras
 - células fusiformes
 - pleomórfico

Mitoses: _____

Características intracelulares: (leve moderada acentuada)

- esteatose
- corpúsculo de Mallory
- glóbulos hialinos
- pigmento biliar
- vidro fosco
- degeneração baloniforme

Outras: _____

Grau histológico (Edmondson-Steiner modificado): baixo grau(graus I/II)
 alto grau(graus III/IV)

Anexo 2

Protocolo de avaliação anatomopatológica de peças de fígado- carcinoma hepatocelular- Serviço de Patologia do Hospital das Clínicas da UFMG (página 2)

Paciente: _____ N° Exame: _____ Registro: _____

Extensão da neoplasia:

Cápsula: livre invadida focalmente
 invadida difusamente pseudocápsula

Presença de embolização venosa e/ou linfática em HE: sim não

Presença de embolização venosa e/ou linfática na imunoistoquímica:

CD 34: sim não

DII40: sim não

Presença de invasão de elementos hilares: sim não

Presença de metástases em linfonodos: sim- n° de linfonodos ____ não

Margens de ressecção: livres comprometidas incerta

Diagnóstico incidental: sim não

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: _____

Anexo 3 Tabelas

Tabela 1: Anticorpos utilizados no estudo imunoistoquímico*

ANTICORPO	DILUIÇÃO TRABALHO	PROCEDÊNCIA
FHIT	1/500	Invitrogen, USA
BRAF	1/100	Santa Cruz Biotechnology Inc.

FHIT: *fragile histidine triad*

BRAF: *v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1*

* foi utilizado também o anticorpo anti-WWox. Porém, por motivos técnicos, o mesmo foi excluído do estudo

Tabela 2: Distribuição dos casos de CHC e cirrose quanto às variáveis demográficas e dados anatomopatológicos

Variáveis demográficas e dados anatomopatológicos	Número de casos de CHC/cirrose (n)	Porcentagem dos casos de CHC/cirrose (%)	Número de controles (n)	Porcentagem dos controles (%)
SEXO				
Masculino	29	80,6	13	52,0
Feminino	7	19,4	12	48,0
<i>Total</i>	36	100,0	25	100,0
TIPO DE CIRURGIA				
Hepatectomia	3	8,3		
Transplante hepático	33	91,7		
<i>Total</i>	36	100,0		
NÚMERO DE NÓDULOS^a				
Nódulo único	14	50,0		
Dois nódulos	8	28,6		
Três ou mais nódulos	6	21,4		
<i>Total</i>	28	100,0		
GRAU HISTOLÓGICO				
Baixo grau	24	66,7		
Alto grau	12	33,3		
<i>Total</i>	36	100,0		
EMBOLIZAÇÃO VASCULAR				
Presente	16	44,4		
Ausente	20	55,6		
<i>Total</i>	36	100,0		

^a 8 casos sem informação quanto ao número de nódulos

CHC: carcinoma hepatocelular

Anexo 3 Tabelas

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 VHC

INTENSIDADE DE MARCAÇÃO					
	0 (Negativa) n (%)	1(Fraca) n (%)	2(Moderada) n (%)	3(Forte) n (%)	Total n(%)
Fhit					
Normal	5(20,0) 0(0,0)	20(80,0) 15(41,7)	0(0,0) 14(38,9)	0(0,0) 7(19,4)	25(100,0) 36(100,0)
Cirrose					
CHC	0(0,0)	2(5,6)	17(47,2)	17(47,2)	36(100,0)
Braf					
Normal	0(0,0) 0(0,0)	15(60,0) 5(14,3)	10(40,0) 24(68,6)	0(0,0) 6(17,1)	25(100,0) 35(100,0)
Cirrose					
CHC	0(0,0)	1(2,9)	12(34,3)	22(62,9)	35(100,0)

Fhit: *fragile histidine triad*

Braf: *v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1*

CHC: carcinoma hepatocelular

VHC: vírus da hepatite C

Tabela 4: Porcentagem de marcação imunoistoquímica para as proteínas Fhit e Braf em fígados normais e nas áreas de cirrose e de CHC associados à infecção pelo VHC

PORCENTAGEM DE CÉLULAS IMUNOPOSITIVAS						
	0(<5%) n (%)	1(5-25%) n (%)	2(26-50%) n (%)	3(51-75%) n (%)	4(>75%) n(%)	Total n(%)
Fhit						
Normal	0(0,0)	0(0,0)	2(8,0)	7(28,0)	16(64,0)	25(100,0)
Cirrose						
CHC	0(0,0)	0(0,0)	1(2,8)	5(13,9)	30(83,3)	36(100,0)
Braf						
Normal	0(0,0)	1(4,0)	4(16,0)	9(36,0)	11(44,0)	25(100,0)
Cirrose						
CHC	0(0,0)	0(0,0)	0(0,0)	0(0,0)	35(100,0)	35(100,0)

Fhit: *fragile histidine triad*

Braf: *v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1*

CHC: carcinoma hepatocelular

VHC: vírus da hepatite C

Anexo 3 Tabelas

Tabela 5: Escore/índice da imunoistoquímica para as proteínas Fhit e Braf em fígados normais e nas áreas de cirrose e de CHC associados à infecção pelo VHC. Comparação entre os casos com escores/índices fortemente positivos (9-12) de Fhit e Braf no CHC, na cirrose e em fígados normais

	Fortemente positivo Escore/índice (9-12) n (%)	Negativo/fracamente positivo Escore/índices (0-4/6-8) n (%)	Total n (%)	p
Fhit				
Normal	0(0,0)	25(100,0)	25(100,0)	<0,001 ^a
Cirrose	7(19,4)	29(80,6)	36(100,0)	
CHC	16(44,4)	20(55,6)	36(100,0)	
Braf				
Normal	0(0,0)	25(100,0)	25(100,0)	<0,001 ^b
Cirrose	6(17,1)	29(82,9)	35(100,0)	
CHC	22(62,9)	13(37,1)	35(100,0)	

^a *Fhit fortemente positivo*
normal x cirrose x CHC p<0,001
normal x cirrose p=0,053
normal x CHC p<0,001
cirrose x CHC p=0,04 (OR=3,13; IC= 1,15-9,52)

^b *Braf fortemente positivo*
normal x cirrose x CHC p<0,001
normal x cirrose p=0,08
normal x CHC p<0,001
cirrose x CHC p<0,001 (OR= 8,20; IC= 2,68-25,0)

Fhit: *fragile histidine triad*
Braf: *v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1*
CHC: carcinoma hepatocelular
VHC: vírus da hepatite C
OR: *odds ratio*
IC: intervalo de confiança

Tabela 6: Comparação entre a embolização vascular e o grau histológico tumoral do CHC

Grau histológico tumoral	Embolização vascular			p*
	Presente n(%)	Ausente n(%)	Total n(%)	
Baixo grau	7 (29,2)	17 (70,8)	24 (100,0)	0,014
Alto grau	9(75,0)	3 (25,0)	12 (100,0)	
Total n(%)	16 (44,4)	20 (55,6)	36 (100,0)	

CHC: carcinoma hepatocelular
**odds ratio (OR)=7,27*
Intervalo de confiança (IC)=1,5-35,71

Anexo 4

Artigo

Comprovante de submissão

Para: "Paula Vieira Teixeira Vidigal" <pvidigal@medicina.ufmg.br>

De: "PORE"

Enviado por: em.pore.0.382646.f69540dc@editorialmanager.com

Data: 30/12/2013 10:16PM

Assunto: Submission Confirmation

Dear Dr Paula Vieira Teixeira Vidigal,

Thank you for submitting your manuscript, "BRAF and FHIT expression in HCV related cirrhosis and hepatocellular carcinoma and their association with prognostic anatomopathological features", to Pathology & Oncology Research

During the review process, you can keep track of the status of your manuscript by accessing the following web site:

<http://pore.edmgr.com/>

Anexo 4

Artigo

BRAF and FHIT expression in HCV related cirrhosis and hepatocellular carcinoma and their association with prognostic anatomopathological features

Garcia P.P.¹, Osório F.M.F.², do Carmo P.A.S.¹, Couto C.A.², Zwetkoff B.F.¹, De Marco L.A.C.³, Vidigal P.V.T.¹

1 Pathology Division, School of Medicine; Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil.

2 Internal Medicine Division, School of Medicine and Alfa Gastroenterology Institute, Clinical Hospital; Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil.

3 Surgical Division, School of Medicine, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil.

Corresponding author:

Paula Vieira Teixeira Vidigal MD, PhD

Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil.

Pathology Division, School of Medicine.

Av Alfredo Balena 190

Belo Horizonte, Santa Efigênia

Zip Code: 30130100

Phone: (55)3134099755

e-mail: pvidigal@medicina.ufmg.br

Abstract

Background and aims: Hepatocarcinogenesis is a multistep process that lead to genetic changes in hepatocytes resulting in neoplasia. However, the mechanisms of malignant transformation seem to differ widely. To know carcinogenesis mechanisms is essential to develop new treatment and prevention methods. The aim of this study is to analyze BRAF and FHIT imunoexpression in hepatitis C virus (HCV) related cirrhosis and hepatocellular carcinoma (HCC) and to associate their expression with some prognostic anatomopathological features.

Methods: 36 patients with HCV related cirrhosis and HCC that underwent liver transplantation at Clinical Hospital – UFMG and 25 normal livers from the Hospital necropsy archives. Tumors were classified according to: number and diameter of nodules, vascular invasion and histological grade. BRAF and FHIT expression were determined by immunohistochemistry in tumor and their cirrhotic adjacent parenchyma and in normal livers.

Results: Braf was strongly expressed in the cytoplasm of hepatocytes of 17,1% of the cirrhotic livers and in 62,9% of the HCC samples ($p < 0.001$; OR= 8.20; 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 ($p = 0.04$; OR=3.13; CI=1.15-9.52). All normal livers showed weak or negative expression for both Braf and Fhit. There was no significant association among FHIT and BRAF scores and tumor histological grade, number or size nor with microvascular invasion. There was an association between high grade tumors and the presence of vascular invasion ($p = 0.014$; OR = 7.27; CI=1.5 e 35.71).

Conclusions: This data suggests that BRAF may play an important role in HCC carcinogenesis. Larger studies are needed to validate these observations.

Keywords: hepatocellular carcinoma, FHIT, BRAF, hepatitis C virus

Introduction

Primary liver cancer is one of the five most common cancers worldwide and the third main cause of death from cancer^[1]. Hepatocellular carcinoma (HCC) accounts for 85 to 90% of primary liver cancers^[2]. The prominent agents associated with HCC include chronic hepatitis B and hepatitis C virus infection (HCV), chronic alcohol consumption, dietary exposure to aflatoxin-B1 and virtually all cirrhosis-inducing diseases^[3].

The contributions of HCV to hepatocarcinogenesis are mediated by viral proteins, including core, NS3 and NS5A proteins. HCV core protein can promote apoptosis or cell proliferation through p53 or up regulation of Wnt-1 at the transcriptional level^[4,5]. NS4A and NS4B proteins mediate translational inhibition and degradation of various cellular proteins^[6].

BRAF is a proto-oncogene situated on chromosome 7q24 and encodes a serine/threonine kinase that transduces regulatory signals through Ras/Raf/MEK/ERK cascade^[7]. This pathway mediates cellular response to growth signals. Somatic mutations of BRAF provide an alternative mode of aberrant activation of the MAPK signaling pathway which is implicated in many human cancers^[8]. Up regulation of this signaling pathway has been well documented in HCC and correlates with advanced stage^[9].

The fragile histidine triad (FHIT) gene is a tumor suppressor gene located on chromosome 3p14.2, a region of high chromosomal fragility (FRA3B), involved in regulation of cell proliferative and apoptotic process, frequently altered in many cancers^[10]. Aberrant FHIT transcripts have been described in HCC and normal adjacent tissues, suggesting that it might represent one of the early changes in the genetic cascade of hepatocarcinogenesis^[11].

Some studies suggest that pathological parameters as the number and diameter of tumoral lesions, as well as vascular invasion and tumor histological grade interfere with prognosis and outcomes^[12,13,14,15]. It is believed that simultaneous evaluation of multiple genes and regulatory pathways in HCC should help to identify causative factors, markers for early detection and prognosis prediction, as well as new therapeutic approaches^[16].

Therefore, the aim of this study is to analyze the immune expression of BRAF and FHIT proteins in normal livers and in both HCC and HCV adjacent cirrhotic parenchyma, and the association of their expression with anatomopathological data that interfere in tumor outcome and prognosis.

Materials and Methods

Study population

Medical records and liver specimens from all subjects with the diagnosis of HCC at Pathology Department of Medicine School of Federal University of Minas Gerais from January/2002 to December/2010 were reviewed in order to select patients with the following inclusion criteria: 1) definite diagnosis of HCV infection by PCR, 2) liver specimens from liver explant or tumor resection available for review and 3) confirmation of histological features of HCC and cirrhosis. Exclusion criteria included any other form of liver disease. Thirty six cases were selected as case group. Twenty five cases of normal livers obtained in the necropsy archives of Pathology Department of the Federal University of Minas Gerais were selected and used as control group. Appropriate institutional review board approved the study.

Preparation of tissues and histological analysis

Sections of 4µm thickness were performed in paraffin blocks. These sections were fixed later on slides, deparaffinized and stained with Hematoxylin & Eosin technique to choose the most representatives specimens of HCC and cirrhosis.

Immunohistochemistry

Additional paraffin sections were made and submitted to immunohistochemical technique to investigate protein expression of Braf and Fhit in HCC, normal and cirrhotic hepatocytes. For the application of the technique, the sections were dewaxed in xylene and hydrated with graded ethanol. They were then immersed in a solution of 1mM EDTA (pH 8.0) and heated to 96°C in vaporizer steamer to antigen retrieval. After cooling and washing the samples with buffer TRIS, 0.05 M Tris-HCL (pH 7.6), endogenous peroxidase activity was blocked with 3% H₂O₂ in water for 10 minutes. Another washing with TRIS was made. Then, the sections were incubated with primary antibodies: anti-Braf (Santa Cruz Biotechnology Inc., USA) at a 1:100 dilution and anti-Fhit (Invitrogen, USA) at a 1:500 dilution. This was followed by incubation with the labeled streptavidin–biotin (LSAB) Kit (DakoCytomation California, Carpinteria, CA). Peroxidase activity was developed with 3.3 diaminobenzidine (DAB) (Sigma, St. Louis, MO) with timed monitoring using a positive control sample. The sections were then counterstained with hematoxylin, dehydrated, and mounted. The positive control was assessed in each reaction with brain tissue for Braf and Fhit.

Histological analysis

Histological evaluation of all samples was performed by a single liver pathologist of Pathology Department of Medicine School of Federal University of Minas Gerais. HCC was characterized according the following histological features: Predominant Edmonson and Steiner's [17] grade was classified and grouped, I and II as low grade, and III and IV as high grade and the presence of microvascular invasion, defined as the presence of tumor emboli within the central vein, the portal vein, or large capsular vessels. Number and diameter of tumoral lesions were obtained from medical records.

Protein immunoexpression in normal livers, in hepatocellular carcinoma and adjacent cirrhotic areas was classified as Zhao P et al and R. Kannangai et al. [18, 19]. Immunostaining was evaluated on a scale of 0-3 for intensity (0:negative; 1:weak; 2:moderate; 3:strong as in normal tissues) and 0-4 for the extent of positive staining among hepatocytes (0:<5%; 1:6-25%; 2:26-50%; 3:51-75%; 4:>75%). Final score was obtained by multiplying the two individual scores, yielding a range from 0 to 12. Scores of 9-12 were considered strong staining, 6-8 as weak staining and 0-4 as markedly reduced or negative expression. For the purpose of statistical analyses scores 9-12 was considered as one group and scores 0-4 and 6-8 were considered together as another group.

Statistical analyses

χ^2 test or exact Fisher test were used for univariate comparisons among dichotomous variables, whereas unpaired t test or Mann-Whitney test were used to compare continuous variables as appropriate. Z test was used to compare different incidences between groups. The level of significance was set to a value of $p < 0.05$. All statistical analyses were performed using the computer software SPSS version 18.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA)

Results

Pathological data

This study included 36 patients (29 male and 7 female) with mean age of 56.4 years (32 to 79 years). The control group included 25 patients (13 male and 12 female) with mean age of 42.5 (11 to 73 years). Groups were different considering gender ($p=0.021$) and age ($p=0.002$). Tumor diameter varied from 11.0mm to 90.0mm, median 25.0mm. Demographic and pathological data are summarized in table 1.

Table 1: Clinical and pathological data from case (HCC and cirrhosis) and control group

	Cases HCC/cirrhosis N(%)	Controls N(%)
Gender		
Male	29 (80.6)	13 (52)
Female	7(19.4)	12 (48)
Surgery		
Hepatectomy	3 (8.3)	
Liver Transplant	33 (91.7)	
Nodules (number)		
One	14 (50.0)	
Two	8 (28.6)	
Three or more	6 (21.4)	
Total*	28 (100.0)	
Tumor grade		
Low grade	24 (66.7)	
High grade	12 (33.3)	
Vascular Embolization		
Present	16 (44.4)	
Absent	20 (55.6)	

*8 missed cases

Fhit and Braf expression in normal, cirrhotic liver and HCC

Fhit was strongly expressed in the cytoplasm of hepatocytes of 19,4% of the cirrhotic livers and in 44,4% of the HCC samples ($p=0.04$; OR=3.13; CI=1.15-9.52). Braf was strongly expressed in the cytoplasm of hepatocytes of 17.1% of the cirrhotic livers and in 62,9% of the HCC samples ($p<0.001$; OR= 8.20; CI=2.68-25.0). All normal livers showed weak or negative expression for both Braf and Fhit. Fhit and Braf expression is summarized in table 2 and can be seen in figure 1.

Table 2: Immunostaining score of Fhit and Braf expression in normal, cirrhotic liver and HCC.

	Strong staining score (9-12) n (%)	Weak or negative staining score (0-4/6-8) n (%)	Total n (%)	<i>p</i>
Fhit				
Normal	0 (0)	25(100)	25(100)	<0.001 ^a
Cirrhosis	7(19.4)	29(80.6)	36(100)	
HCC	16(44.4)	20(55.6)	36(100)	
Braf				
Normal	0(0)	25(100)	25(100)	<0.001 ^b
Cirrhosis	6(17.1)	29(82.9)	35(100)	
HCC	22(62.9)	13(37.1)	35(100)	

^a *Fhit-strong staining*
normal x cirrhosis x HCC $p<0.001$
normal x cirrhosis $p=0.053$
normal x HCC $p<0.001$
cirrhosis x HCC $p=0.04$ (OR=3.13; CI=1.15-9.52)

^b *Braf- strong staining*
normal x cirrhosis x HCC $p<0.001$
normal x cirrhosis $p=0.08$
normal x HCC $p<0.001$
cirrhosis x HCC $p<0.001$ (OR= 8.20; CI=2.68-25.0)

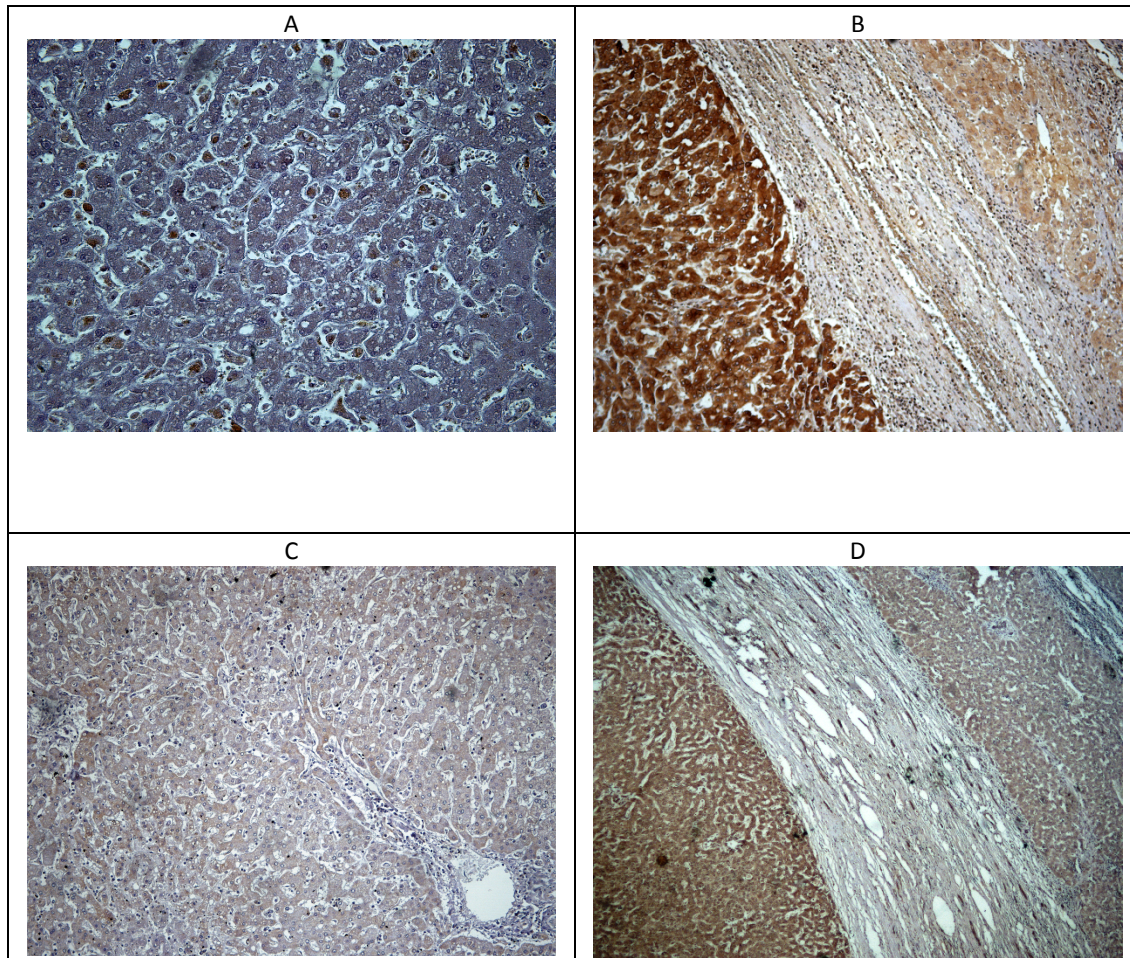


Figure 1 BraF weak/negative expression in normal liver (A) and cirrhosis (right B), BraF strong expression in HCC (left B); Fhit weak/negative expression in normal liver(C) and cirrhosis (right D), Fhit strong expression in HCC (left D).

Association among BraF and Fhit expression and anatomopathological data

There was no significant association between FHIT and BRAF scores and tumor grade, ($p=0.081$ and $p=1.00$, respectively), tumor diameter ($p=0.40$ for FHIT and $p=0.15$ for BRAF), number of tumoral lesions ($p=0.46$ for FHIT and $p=0.60$ for BRAF). No association with vascular invasion either ($p=0.74$ for FHIT and $p=0.31$ for BRAF),

Association among histopathological data

Among low grade tumors vascular invasion was present in 29.2% of the cases and was absent in 70,8%. High grade tumors have shown 75.0% of vascular invasion ($p=0.014$, OR = 7.27, CI=1.5-35.1) (table 3).

Table 3: Association between tumor differentiation grade and vascular invasion

Tumor grade	Vascular invasion			p
	Present n(%)	Absent n(%)	Total n(%)	
Low grade	7 (19.5)	17 (47.2)	24 (66.7)	0.014*
High grade	9(25.0)	3 (8.3)	12 (33.3)	
Total n(%)	16 (44.5)	20 (55.5)	36 (100.0)	

*OR:7.27 (CI:1.5-35.71)

Discussion

Hepatocarcinogenesis is a multistep process initiated by external stimuli that lead to genetic changes in hepatocytes or stem cells, resulting in proliferation, apoptosis, dysplasia and neoplasia. There are many aetiological factors. However the mechanism by which each of them induces malignant transformation seems to differ.

Our study shows that in Brazilian patients with HCC and HCV induced liver cirrhosis FHIT was strongly expressed in the cytoplasm of hepatocytes of tumoral and cirrhotic liver. While marked reduction or absence of FHIT staining or mRNA abnormalities have been reported in HCC in China, Taiwan and Germany^[18-20], in the United States and in South Korea a much lower frequency of FHIT protein loss was seen, in agreement to our results^[21,22]. Such an important difference in HCC FHIT expression may be influenced by environmental carcinogens, as South Korea, United States and Brazil have low prevalence of aflatoxin B1 exposure. While overexpression of a tumor suppressor gene may be somewhat counterintuitive, such a finding has been reported for other tumor suppressor genes and may reflect interruption of a signaling/metabolic pathway downstream from the target gene or a truncate protein^[23].

The oncogene BRAF had a 8.20 chance of being strongly expressed in HCC hepatocytes than in cirrhotic areas. Nevertheless, there was no significant association between this protein expression and pathological data that interfere in prognosis outcome such as tumor grade, microvascular invasion and tumoral lesions diameter and number. This data suggest that BRAF may play an important role in HCC carcinogenesis in this population.

Previous studies addressing BRAF examined the frequency of activating mutations in HCC samples and showed controversial results. Our results are in agreement with Colombino *et al* who, in a Italian cohort, demonstrated somatic BRAF mutations in 23% of the HCC samples and a positive correlation of those mutations with the presence of either multiple HCC nodules or higher proliferation rates^[24,9]. On the other hand, studies demonstrated no BRAF mutations associated to HCC in a small subset of German^[25] and Chinese patients^[26]. These contradicting results may indicate that populations with different genetic background also have differences in tumor carcinogenesis. We have shown a progressive enhance of maximum and moderate Braf expression from normal liver to HCC samples, suggesting that BRAF may be more important in tumor initiation. Which is in agreement with the lack of association of Braf expression and anatomopathological markers of tumor progression such as tumor grade, nodule size or vascular invasion.

We have also observed a chance 7.27 higher of vascular invasion among the group of high grade tumors than in the group of low grade tumors, according to some other authors^[27,28].

Analyzing genetic and epigenetic alteration as well as different molecular pathways involved in the development of HCC is a critical process toward identifying potential new therapies^[29] and also making a genome-based classification of risk factors and prognosis.

In our study we used immunohistochemistry, a fast, inexpensive technique that can be used in simple surgical pathology services. No genetic sequencing of gene transcript was made and this along with the fact that it included solely HCV related cirrhosis are the main limitations of this study.

Future studies are needed to validate the role of FHIT and BRAF in liver carcinogenesis in a larger group of patients with different cirrhosis etiologies and environmental exposures.

Acknowledgments

The authors express sincere thanks to Fernando Henrique Pereira, Ivone Marinho and Fernanda Césari. This work was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG).

References

- 1 Parkin DM (2001) Global cancer statistics in the year 2000 *Lancet Oncol* 2(9): 533-543
- 2 El-Serag HB, Rudolph KL (2007) Hepatocellular carcinoma: epidemiology and molecular carcinogenesis. *Gastroenterology* 132(7): 2557-2576
- 3 Sua H, Zhaoa J, Xiong Y, Xua T, Zhoua F, b YY, Zhang Y, Zhuang S-M (2008) Large-scale analysis of the genetic and epigenetic alterations in hepatocellular carcinoma from Southeast China. *Mutat Res* 641 (1-2): 27-35
- 4 Yamanaka T, Kodoma T, Doi T (2002) Subcellular localization of HCV core protein regulates its ability for p53 activation and p21 suppression. *Biochem Biophys Res Commun* 294:528-534
- 5 Florese RH, Nagano-Fujii M, Iwanaga Y, Hidajat R, Hotta H (2002) Inhibition of protein synthesis by the nonstructural proteins NS4A and NS4B of hepatitis C virus. *Virus Res* 90: 119-131.
- 6 Fukutomi T, Zhou Y, Kawai S, Eguchi H, Wands JR, Li J (2005) Hepatitis C virus core protein stimulates hepatocyte growth: correlation with upregulation of Wnt-1 expression. *Hepatology* 41:1096-1105
- 7 Kolch W (2000) Meaningful relationships: the regulation of the Ras/Raf/Mek/Erk pathway by protein interactions. *Biochem J* 351:298-305.

- 8 Davies H, Bignell GR, Cox C, Stephens P, Edkins S, Clegg S, Teague J, Woffendin H, Garnett MJ, Bottomley W, Davis N, Dicks E, Ewing R, Floyd Y, Gray K, Hall S, Hawes R, Hughes J, Kosmidou V, Menzies A, Mould C, Parker A, Stevens C, Watt S, Hooper S, Wilson R, Jayatilake H, Gusterson BA, Cooper C, Shipley J, Hargrave D, Pritchard-Jones K, Maitland N, Chenevix-Trench G, Riggins GJ, Bigner DD, Palmieri G, Cossu A, Flanagan A, Nicholson A, Ho JW, Leung SY, Yuen ST, Weber BL, Seigler HF, Darrow TL, Paterson H, Marais R, Marshall CJ, Wooster R, Stratton MR, Futreal PA (2002) Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature* 417(6892): 949-954
- 9 Huynh H, Nguyen TT, Chow KH, Tan PH, Soo KC, Tran E (2003) Over-expression of the mitogen-activated protein kinase (MAPK) kinase (MEK)-MAPK in hepatocellular carcinoma: its role in tumor progression and apoptosis. *BMC Gastroenterol* 3:19
- 10 Ohta M, Inoue H, Cotticelli MG, Kastury K, Baffa R, Palazzo J, Siprashvili Z, Mori M, McCue P, Druck T, Croce CM, Huebner K (1996) The FHIT gene, spanning the chromosome 3p14.2 fragile site and renal carcinoma-associated t(3;8) breakpoint, is abnormal in digestive tract cancers. *Cell* 84(4): 587-597
- 11 Zekri ARN, Bahnassy AA, Hafez M, El-Sheraby AMR, Sherif GM, Khaled HM, Zakhary N (2005) Alterations of the fragile histidine triad gene in hepatitis C virus-associated hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol and Hepatol* 20:87-94
- 12 Parfitt JR, Marotta P, Alghamdi M, Wall W, Khakhar A, Suskin NG, et al (2007) Recurrent hepatocellular carcinoma after transplantation: use of a pathological score on explanted livers to predict recurrence. *Liver Transpl* 13(4):543-51.
- 13 Coelho GR, Vasconcelos KF, Vasconcelos JB, Barros MA, Costa PE, Borges GC, et al (2009) Orthotopic liver transplantation for hepatocellular carcinoma: one center's experience in the Northeast of Brazil. *Transplant Proc* 41(5):1740-2.
- 14 Cillo U, Vitale A, Bassanello M, Boccagni P, Brolese A, Zanusi G, et al (2004) Liver transplantation for the treatment of moderately or well-differentiated hepatocellular carcinoma. *Ann Surg* 239(2):150-9.
- 15 Pawlik TM, Delman KA, Vauthey JN, Nagorney DM, Ng IO, Ikai I, et al (2005) Tumor size predicts vascular invasion and histologic grade: Implications for selection of surgical treatment for hepatocellular carcinoma. *Liver Transpl* 11(9): 1086-92.
- 16 Villanueva A, Newell P, Chiang DY, Friedman SL, Llovet JM (2007) Genomics and signaling pathways in hepatocellular carcinoma. *Semin Liver Dis* 27(1): 55-76
- 17 Edmondson HA, Steiner PE (1954) Primary carcinoma of the liver: a study of 100 cases among 48,900 necropsies. *Cancer* 7(3): 462-503.
- 18 Zhao P, Song X, Nin YY, Lu YL, Li XH (2003) Loss of fragile histidine triad protein in human hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 9(6): 1216-1219
- 19 Kannangai R, Sahin F, Adegbola O, Ashfaq R, Su GH, Torbenson M (2004) FHIT mRNA and protein expression in hepatocellular carcinoma. *Mod Pathol* 17(6): 653-659
- 20 Chen YJ, Chen PH, Chang JG (1998) Aberrant FHIT transcripts in hepatocellular carcinomas. *Br J Cancer* 77(3): 417-420
- 21 Yuan BZ, Keck-Waggoner C, Zimonjic DB, Thorgeirsson SS, Popescu NC (2000) Alterations of the FHIT gene in human hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* 60(4): 1049-1053
- 22 Nam CW, Shin JW, Park NH (2008) Fragile histidine triad gene alterations are not essential for hepatocellular carcinoma development in South Korea. *World J Gastroenterol* 14(22): 3526-3533
- 23 Kannangai R, Sahin F, Adegbola O, et al (2004) FHIT mRNA and protein expression in hepatocellular carcinoma. *Mod Pathol* 17(6): 653-659
- 24 Colombino M, Sperlongano P, Izzo F, Tatangelo F, Botti G, Lombardi A, Accardo M, Tarantino L, Sordelli I, Agresti M, Abbruzzese A, Caraglia M, Palmieri G (2012) BRAF and PIK3CA genes are somatically mutated in hepatocellular carcinoma among patients from South Italy. *Cell Death Dis* 3: e259
- 25 Tannapfel A, Sommerer F, Benicke M, Katalinic A, Uhlmann D, Witzigmann H, Hauss J, Wittekind C (2003) Mutations of the BRAF gene in cholangiocarcinoma but not in hepatocellular carcinoma. *Gut* 52(5): 706-712
- 26 Zuo Q, Huang H, Shi M, Zhang F, Sun J, Bin J, Liao Y, Liao W (2012) Multivariate Analysis of Several Molecular Markers and Clinicopathological Features in Postoperative Prognosis of Hepatocellular Carcinoma. *The Anatomical Record* 295:423-431.
- 27 Vauthey JN, Klimstra D, Franceschi D, Tao Y, Fortner J, Blumgart L, et al (1995) Factors affecting long-term outcome after hepatic resection for hepatocellular carcinoma. *Am J Surg* 169(1):28-34
- 28 Thuluvath PJ (2009) Vascular invasion is the most important predictor of survival in HCC, but how do we find it? *J Clin Gastroenterol* 43(2):101-2.
- 29 Llovet JM, Ricci S, Mazzaferro V, Hilgard P, Gane E, Blanc JF, de Oliveira AC, Santoro A, Raoul JL, Forner A, Schwartz M, Porta C, Zeuzem S, Bolondi L, Greten TF, Galle PR, Seitz JF, Borbath I, Häussinger D, Giannaris T, Shan M, Moscovici M, Voliotis D, Bruix J, Group SIS (2008) Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med* 359(4): 378-390

Anexo 5

Folha de aprovação



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA

UFMG

FOLHA DE APROVAÇÃO

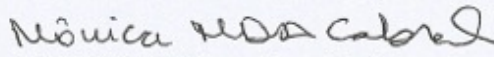
Análise da expressão dos genes FHIT e BRAF no carcinoma hepatocelular em pacientes com hepatite C e cirrose e sua associação com dados anatomopatológicos que interferem na sobrevida

PAULA PIEDADE GARCIA

Dissertação submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em PATOLOGIA, como requisito para obtenção do grau de Mestre em PATOLOGIA, área de concentração PATOLOGIA INVESTIGATIVA.

Aprovada em 15 de janeiro de 2014, pela banca constituída pelos membros:


Prof(a). Paula Vieira Teixeira Vidigal - Orientador
UFMG




Prof(a). Mônica Maria Demas Alvares Cabral
UFMG


Prof(a). Teresa Cristina de Abreu Ferrari
UFMG

Belo Horizonte, 15 de janeiro de 2014.

Anexo 6

Ata de defesa de dissertação

	<p>UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS</p> <p>PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA</p>	
---	---	---

ATA DA DEFESA DA DISSERTAÇÃO DA ALUNA PAULA PIEDADE GARCIA

Realizou-se, no dia 15 de janeiro de 2014, às 08:00 horas, faculdade de medicina ufmg, da Universidade Federal de Minas Gerais, a defesa de dissertação, intitulada *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*, apresentada por PAULA PIEDADE GARCIA, número de registro 2012652357, graduada no curso de MEDICINA, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em PATOLOGIA, à seguinte Comissão Examinadora: Prof(a). Paula Vieira Teixeira Vidigal - Orientador (UFMG), Prof(a). Mônica Maria Demas Alvares Cabral (UFMG), Prof(a). Teresa Cristina de Abreu Ferrari (UFMG).

A Comissão considerou a dissertação:


Aprovada

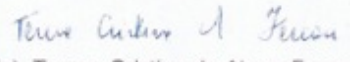
Reprovada

Finalizados os trabalhos, lavrei a presente ata que, lida e aprovada, vai ser assinada pelos membros da Comissão.

Belo Horizonte, 15 de janeiro de 2014.


Prof(a). Paula Vieira Teixeira Vidigal (Doutora)


Prof(a). Mônica Maria Demas Alvares Cabral (Doutora)


Prof(a). Teresa Cristina de Abreu Ferrari (Doutora)

CONFERE COM ORIGINAL
Centro de Pós-Graduação
Faculdade de Medicina - UFMG