Rodrigo Albergaria Réssio

Avaliação da imuno-expressão de proteínas da via da apoptose mediadas pela proteína p53 no Carcinoma Hepatocelular

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Área de concentração: Fisiopatologia Experimental

Orientador: Prof. Dr. Venâncio Avancini Ferreira Alves

São Paulo
2010

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Réssio, Rodrigo Albergaria
Avaliação da imuno-expressão de proteínas da via da apoptose mediadas pela proteína p53 no carcinoma hepatocelular / Rodrigo Albergaria Réssio. -- São Paulo, 2010.
Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Programa de Fisiopatologia Experimental.
Orientador: Venâncio Avancini Ferreira Alves.

Descritores: 1.Carcinoma hepatocelular 2.Imunoistoquímica 3.Apoptose 4.Genes p53 5.Citocromo C 6.Caspase-3 clivada

USP/FM/DBD-354/10

DEDICATÓRIA

A meus queridos pais, pelos conselhos, ajuda, carinho e amor ao longo destes três anos de pós-graduação e mais 28 anos anteriores.

À minha família, meus irmãos e cunhados Caio & Carol e Cíntia & Sandro, a meu sobrinho que chegou irrigando de alegria nossa família.

Á minha avó Cida, que não entende o sentido deste trabalho, mas mesmo debilitada, entende e valoriza o amor recíproco dos netos.

AGRADECIMENTOS

Ao professor Doutor Venâncio Avancini Ferreira Alves, meu orientador, por projetar seu amor à pesquisa científica em meus olhos.

Ao Doutor Iberê C Soares pela valiosa ajuda, paciência e profissionalismo no laboratório. Sempre prestativo e empenhado em melhorar cada vez mais nosso grupo de pesquisa.

Ao Doutor Kléber Simões do Espírito Santo, pela amizade, ajuda estatística e entusiasmo à pesquisa.

Aos Doutores Roberto Antônio Pinto Paes, Roberto Souza Camargo e Evandro Sobroza de Mello, pelas importantes sugestões no exame de qualificação.

Á doutora Alda Wakamatsu, principal incentivadora deste trabalho, pela ajuda cientifica e moral com palavras inteligentes e confortáveis.
Á doutora Marta Privato, pela paciente ajuda metodológica científica.

À amiga Cinthya dos Santos Cirqueira, que desde a época do Instituto Adolfo Lutz me ensinou a ser mais compreensivo e atencioso em certas situações.

Ao amigo Paulo D. Nasser, companheiro dos estudos bitolados, sempre prestativo e genial. Aos amigos dos laboratórios LIM-14 e LIM-07, Camila da Silva Ferreira, Marcelo Moreira Tavares de Souza, Melissa Ratz e Jerônimo de Alencar Nogueira pela exagerada ajuda nos momentos difíceis. Aos amigos de pós-graduação Eduardo Anselmo Garcia , Helena Scavone Paschoale e Júlia Pires.

As amigas do Instituto Adolfo Lutz, Cristina Takami Kanamura, Suely Nonogaki, Maria Regina Catarino, Raimunda Telma de Macedo, Mônica Conte Bela e Vera Lúcia dos Santos que me apresentaram à vida científica sempre sendo receptivas e atenciosas.

Ao Departamento de Patologia do Instituto Adolfo Lutz e HCFMUSP, pela ajuda e atenção. Ao todos do Departamento de Anatomia-Patológica do Instituto do Câncer do Estado de São Paulo (ICESP), meu lar profissional.

A todos que participaram diretamente ou indiretamente deste trabalho.

EPÍGRAFES

“Quando aprendi todas as respostas da vida, mudaram as perguntas”.
Charles Chaplin

Quem escreve constrói um castelo e quem lê passa a habitá-lo.
Não encontrado autor

Esta dissertação ou tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver)

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 2a ed. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2005.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

página

LISTA DE ABREVIATURAS

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE GRÁFICOS

1. INTRODUÇÃO.....01

1.1. Epidemiologia e fatores etiológicos.....02

1.2. Classificação histológica do Carcinoma hepatocelular 04

1.3. Aspectos histopatológicos na progressão para o CHC.....06

1.4 A proteína p53..... 07

1.5 O gene p53 no Carcinoma Hepatocelular.....08

1.6 Apoptose 09

1.6.1 Apoptose mediada pela p53.....10

1.6.2 A família Bcl-2 e a proteína Bax na apoptose..... 10

1.6.3 Caspases.....12

1.6.4 Avaliação de proteínas no processo apoptótico por imuno-histoquímica.....14

2. OBJETIVOS.....18

3. MÉTODOS..... 20

3.1. Amostras.....21

3.2. Técnica histológica..... 22

3.3. Classificação histológica.....23

3.4. Construção das micromatrizes teciduais (tissue microarray –TMA).....24

3.4.1 Técnica..... 24

3.4.2 Corte dos blocos TMAs..... 26

3.5. Ensaios imuno- histoquímicos.....27

3.5.1 Anticorpos primários – Padronização dos ensaios.....27

3.5.2 Técnica.....27

3.5.3 Controles positivos e negativos utilizados durante os ensaios imuno-histoquímicos.....30

3.5.4 Avaliação da imunoreatividade imuno-histoquímica.....30

3.6. Índice de células em fase final da apoptose ("índice apoptótico") mediante imunodetecção de caspase 3 clivada.....31

3.7 Análises empreendidas e testes estatísticos.....32

4. RESULTADOS..... 33

4.1 Descrição dos aspectos clínicos e anátomo-patológicos.....34

4.2 Descrição dos achados de imuno-histoquímicos de proteínas relacionadas à apoptose.....35

4.2.1 Imuno-expressão da proteína caspase 3 clivada\apoptose.....35

4.2.2 Imuno-expressão da proteína p53.....36

4.2.3 Imuno-expressão da proteína Bax.....38

4.2.4 Imuno-expressão da proteína citocromo c.....40

4.3 Relação entre as variáveis imuno-histoquímicas e clinicopatológicas....42

4.3.1 Parâmetros clínicopatológicos e Apoptose.....42

4.3.1.1 Avaliação da associação entre apoptose e gênero.....42

4.3.1.2 Comparação da apoptose na neoplasia e em tecido não neoplásico.....43

4.3.1.3 Avaliação da associação ente apoptose nas amostas de CHC conforme presença ou não de cirose no tecido hepático não-tumoral.....44

4.3.1.4 Avaliação da associação entre apoptose e invasão vascular.....45

4.3.1.5 Avaliação da associação entre apoptose e grau de Edmondson-Steiner.....46

4.3.1.6 Avaliação da associação entre apoptose e tamanho do tumor.....47

4.3.2 Parâmetros clínicopatológicos e p53.....48

4.3.2.1 Avaliação da associação entre a imuno-expressão da proteína p53 e gênero.....48

4.3.2.2 Avaliação da associação entre a imuno-expressão da proteína p53 no CHC e presença de cirrose.....49

4.3.2.3 Avaliação da associação entre a imuno-expressão da proteína p53 e invasão vascular.....50

4.3.2.4 Avaliação da associação entre a imuno-expressão da proteína p53 e grau de Edmondson-Steiner.....51

4.3.2.5 Avaliação da associação entre a imuno-expressão da proteína p53 e tamanho do tumor.....52

4.3.3 Parâmetros clínicopatológicos e Bax.....53

4.3.3.1 Avaliação da associação entre a imuno-expressão da proteína Bax e gênero..... 53

4.3.3.2 Avaliação da associação entre a imuno-expressão da proteína Bax no CHC e presença de cirrose.....53

4.3.3.3 Avaliação da associação entre a imuno-expressão da proteína Bax e invasão vascular.....54

4.3.3.4 Avaliação da associação entre a imuno-expressão da proteína Bax e grau de Edmondson-Steiner.....55

4.3.3.5 Avaliação da associação entre a imuno-expressão da proteína Bax e tamanho do tumor.....,.....56

4.3.4 Parâmetros clínicopatológicos e Citocromo c.....57

4.3.4.1 Avaliação da associação entre a imuno-expressão da proteína citocromo c e gênero.....57

4.3.4.2 Avaliação da associação entre a imuno-expressão da proteína citocromo c no CHC e presença de cirrose.....58

4.3.4.3 Avaliação da associação entre a imuno-expressão da proteína citocromo c e invasão vascular..... 59

4.3.4.4 Avaliação da associação entre a imuno-expressão da proteína citocromo c e grau de Edmondson-Steiner.....60

4.3.4.5 Avaliação da associação entre a imuno-expressão da proteína citocromo c e tamanho do tumor.....61

4.4 Relação entre as distribuições das variáveis imuno-histoquímicas.....62

4.4.1 Avaliação da associação entre apoptose e a imuno-expressão da proteína p53.....62

4.4.2 Avaliação da associação entre apoptose e a imuno-expressão da proteína Bax.....63

4.4.3 Avaliação da associação entre apoptose e a imuno-expressão da proteína citocromo c.....64

4.4.4 Avaliação da associação entre a imuno-expressão das proteínas Bax e p53.....65

4.4.5 Avaliação da associação entre a imuno-expressão das proteínas p53 e citocromo c.....66

4.4.6. Avaliação da associação entre a imuno-expressão das Proteínas Bax e citocromo c.....67

5.DISCUSSÃO.....68

5.1. P53 no carcinoma Hepatocelular e em condições relacionadas.....70

5.2. A importãncia da via mitocondrial da apoptose no Carcinoma hepatocelular.....73

5.3. Apoptose em Carcinoma Hepatocelular e em condições relacionadas.....77

6. CONCLUSÕES.....83

7. **ANEXOS**.....86

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....99

LISTAS

LISTA DE ABREVIATURAS

AFB1: Aflatoxina B1

AFP: alfa-fetoproteína

agHBs: Antígeno de superfície do vírus da hepatite B

anti-HVC: anticorpo contra Vírus da Hepatite C

BSA: Albumina sérica bovina

CAPPesq: Comissão de ética para Análise de Projetos de Pesquisa

CHC: Carcinoma Hepatocelular

CHC-C: Fígado cirrótico

CICAP: Centro de Imuno-histoquímica, Citopatologia e Anatomia Patológica

FMUSP: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

DAB: Tetrahidrocloreto de diaminobenzidina

DAP: Divisão de Anatomia Patológica

DMSO: Dimetilsulfóxido

DNA: Ácido desoxirribonucléico

DP: desvio padrão

EUA: Estados Unidos da América

H_2O_2: Peróxido de Hidrogênio

HAOC:Hospital Alemão Oswaldo Cruz

HC: Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

IA: índice apoptótico

HE: Coloração histológica de Eosina-Hematoxilina

IAP: Proteína inibidora de apoptose

IC95%: Intervalo de confiança 95%

IHQ: Imuno-histoquímica

INCA: Instituto Nacional do Câncer

KDa: Kilo daltons unidade de peso molecular

Ki67: antígeno nuclear de proliferação

LIM: Laboratório de Investigação Médica

M: unidade de concentração molar

m**C**:Micrômetro

mM:Micromolar

mg: miligrama

mm: milímetro

mM: unidade de concentração milimolar

NaN_3: Azida sódica

ng: Nano-gramas

NS3: proteína não estrutural 3 do vírus da Hepatite C

^oC: Graus Celcius

PBS: Solução salina tamponada com fosfatos

PCNA: Proliferating cell nuclear antigen

PCR: Reação em cadeia da polimerase

p: nível de significância estatística

pH: potencial hidrogeniônico

RFLP: Restriction Fragment Lenght Polymorphism

SAME: Serviço de Arquivo Médico e Estatístico

SVO: Sistema de Verificação de Óbito

TP53: Gene p53

TUNEL: Terminal deoxyribonucleotidyl transferase mediated nick end labelling

VHB: Vírus da Hepatite B

VHC: Vírus da Hepatite C

VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor

v/v: volume/volume

LISTA DE FIGURAS

Figura 01: Grau histológico de Edmondson-Steiner.....05

Figura 02: Fígado cirrótico não neoplásico.....06

Figura 03: Vias extrínseca e intrínseca nos eventos apoptóticos.....14

Figura 04: Sequência para elaboração de micromatriz tecidual.....26

Figura 05: Padrões de imuno-expressão da proteína Caspase 3 clivada....36

Figura 06: Padrão de imuno-expressão negativa em amostras de tecido não-neoplásico para proteína p53 37

Figura 07: Padrões de imuno-expressão para proteína p53.....38

Figura 08: Padrão de imuno-expressão negativa para proteína Bax em casos de CHC.....39

Figura 09: Padrões de imuno-expressão para proteína Bax.....40

Figura 10:Padrão de imuno-expressão negativa para proteína citocromo c41

Figura 11: Padrões de imuno-expressão para proteína citocromo c.....42

LISTA DE TABELAS

Tabela 01: Condições padronizadas para anticorpos p53, Bax, Caspase 3 clivada e Citocromo c.....27

Tabela 02: Grau de Edmondson-Steiner.....35

Tabela 03: Distribuição da imuno-expressão da caspase 3 clivada gerando o índice apoptótico nas amostras de CHC 36

Tabela 04: Imuno-expressão de p53.....37

Tabela 05: Imuno-expressão de Bax.....39

Tabela 06: Imuno-expressão de Citocromo c.....41

Tabela 07: Apoptose e Gênero.....43

Tabela 08: Apoptose no tumor e amostra não-neoplásica.....43

Tabela 09: Apoptose e presença de cirrose.....44

Tabela 10: Apoptose e invasão vascular.....45

Tabela 11: Apoptose e graus de Edmondson-Steiner.....46

Tabela 12: Imuno-expressão de p53 e gênero.....48

Tabela 13: Imuno-expressão de p53 e presença de cirrose.....49

Tabela 14: imuno-expressão de p53 e invasão vascular.....50

Tabela 15: Imuno-expressão de p53 e graus de Edmondson-Steiner.....51

Tabela 16: Imuno-expressão de p53 e tamanho do tumor.....52

Tabela 17: Imuno-expressão de Bax e gênero.....53

Tabela 18: Imuno-expressão de Bax e presença de cirrose.....53

Tabela 19: Imuno-expressão de Bax e invasão vascular 54

Tabela 20: Imuno-expressão de Bax e graus de Edmondson-Steiner.....55

Tabela 21: Imuno-expressão de Bax e tamanho do tumor ….....56

Tabela 22: Imuno-expressão de Citocromo c e Gênero.....57

Tabela 23: Imuno-expressão de Citocromo c e presença de cirrose.....58

Tabela 24: Imuno-expressão de Citocromo c e invasão vascular.....59

Tabela 25: Imuino-expressãode Citocromo c e graus de Edmondson-Steiner.....60

Tabela 26: Imuno-expressão de Citocromo c e tamanho do tumor.....61

Tabela 27: Apoptose e imuno-expresão de p53.....62

Tabela 28: Apoptose e imuno-expresão de Bax.....63

Tabela 29: Apoptose e imuno-expresão de Citocromo c.....64

Tabela 30: Imuno-expressão de Bax e p53.....65

Tabela 31: Imuno-expressão de p53 e Citocromo c.....66

Tabela 32: Imuno-expressão de Bax e Citocromo c.....67

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 01: Apoptose e presença de cirrose.....45

Gráfico 02: Apoptose e invasão vascular.....46

Gráfico 03: Apoptose e grau de Edmondson-Steiner.....47

Gráfico 04: Apoptose e tamanho do tumor.....48

Gráfico 05: Imuno-expressão de p53 e presença de cirrose.....49

Gráfico 06: Imuno-expressão de p53 e invasão vascular.....50

Gráfico 07: Imuno-expressão de p53 e grau de Edmondson-Steiner 51

Gráfico 08: Imuno-expressão de p53 e tamanho do tumor.....52

Gráfico 09: Imuno-expressão de Bax e presença de cirrose.....54

Gráfico 10: Imuno-expressão de Bax e invasão vascular.....55

Gráfico 11: Imuno-expressão de Bax e grau de Edmondson-Steiner.....56

Gráfico 12: Imuno-expressão de Bax e tamanho do tumor.....57

Gráfico 13: Imuno-expressão de Citocromo c e presença de cirrose 58

Gráfico 14: Imuno-expressão de Citocromo c e invasão vascular.....59

Gráfico 15: Imuno-expressão de Citocromo c e grau de Edmondson-Steiner.....60

Gráfico 16: Imuno-expressão de Citocromo c e tamanho do tumor.....61

Gráfico 17: Apoptose e Imuno-expressão de p53.....62

Gráfico 18: Apoptose e imuno-expressão de Bax.....63

Gráfico 19: Apoptose e imuno-expressão de Citocromo c.....64

Gráfico 20: Imuno-expressão de Bax e p53.....65

Gráfico 21: Imuno-expressão de p53 e Citocromo c.....66

Gráfico 22: Imuno-expressão de Bax e Citocromo c.....67

RESUMO

Réssio RA. Avaliação da imuno-expressão de proteínas da via da apoptose mediadas pela proteína p53 no Carcinoma Hepatocelular [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2010. 122p.

O presente estudo teve por objetivo estudar a participação da apoptose na carcinogênese hepatocelular, quantificando os corpos apoptóticos imunomarcados por caspase-3 clivada em amostras de carcinoma hepatocelular (CHC) em pacientes com ou sem cirrose, comparando também estes achados com amostras correspondentes de fígado não tumoral. Visou também à análise semi-quantitativa da imuno-expressão da proteína p53, Bax e Citocromo-C, relacionadas à via mitocondrial da apoptose em busca de eventuais relações com as variáveis clínico-patológicas dos carcinomas hepatocelulares. A análise comparativa da distribuição das diversas proteínas aqui estudadas foi ainda efetuada, com vistas à possível demonstração de sua interação no processo de apoptose em CHC. Amostras selecionadas de 79 casos de CHC foram distribuídas em micromatriz tecidual e submetidas a pesquisa imuno-histoquímica com amplificação por polímeros curtos de dextran ligados a peroxidase. IA foi maior nos CHC que nas amostras não-neoplásicas, mostrando ainda tendência a associação com o grau histológico do CHC .A imuno-expressão de p53 foi maior nos CHC em fígado cirrótico (CHC-C), em casos com invasão vascular, e nos graus histológicos altos. Houve maior imuno-expressão de citocromo c em CHC-C, sendo importante sua associação com p53. Bax mostrou apenas tendência a associação com o tamanho do CHC. Essas evidências contribuem para a compreensão da importância da via mitocondrial da apoptose mediada pela proteína p53 no CHC, destacando também prováveis diferenças do mecanismo carcinogenético na presença ou não de cirrose.

Descritores: 1. Carcinoma hepatocelular 2.Imunoistoquímica 3.Apoptose 4.Genes p53 5.Citocromo C 6.Caspase-3 clivada

Réssio RA. Immunohistochemical assessment of the expression of proteins of the apoptosis pathway mediated by p53 in hepatocellular carcinoma [thesis]. University of São Paulo School of Medicine, 2010. 122p.

This study aimed at the assesment of aspects of the role of apoptosis in hepatocellular carcinogenesis, quantifying apoptotic bodies immunomarked by cleaved caspase-3 in samples of hepatocellular carcinoma (HCC) in patients with or without cirrhosis, further comparing these findings to those from samples in non-tumoral areas of these livers. We also aimed herein to semiquantitate the immunoexpression of p53, Bax, Cytochrome-C, participants of the mitochondrial pathway of apoptosis, searching for possible relations with clinico-pathological variables in HCC. Samples from 79 cases of HCC were arranged in tissue microarrays were and submitted to immunohistochemical reaction with signal amplification achieved by the short-polymer-peroxidase system. Apoptotic index measured by immunoexpression of cleaved-caspase 3 was higher in HCC than in samples from non-neoplastic areas. p53 immunoexpression was higher in HCC occurring in cirrhotic livers, (HCC-C), in cases with vascular invasion and in higher histological grades. Cytochrome-c immunoexpression was also higher in HCC-C and, interestingly, was directly related to p53. Bax immunoreactivity showed only a trend for a relation with the size of HCC. The evidences from the present study further demonstrate the importance of p53-mediated pathway of apoptosis in HCC, and also point for possible differences in carcinogenesis in cirrhotic versus non-cirrhotic livers.

Descriptors: 1.hepatocellular carcinoma 2.immunohistochemistry
3.Apoptosis 4.p53 gene 5.Cytochrome C 6.cleaved caspase-3

1- INTRODUÇÃO

1.1 Epidemiologia e Fatores Etiológicos

O carcinoma hepatocelular (CHC) é uma neoplasia para a qual ainda não se dispõe de uma terapia efetiva para as formas avançadas da doença (Ponomarkoo *et al.,*1976).

Do ponto de vista da epidemiologia mundial, o CHC ocupa as primeiras colocações em neoplasia mais freqüente entre os seres humanos, e é a terceira causa de óbitos relacionados ao câncer, levando a 500 mil mortes por ano (Llovet *et al.,* 2004; Emedicine, 2008).

No Brasil, no município de São Paulo, SP, segundo dados divulgados pelo Sistema Unificado de Saúde - SUS, quanto à morbidade hospitalar em 1997, a incidência do Carcinoma hepatocelular foi de 2/100.000 habitantes. (Conte, 2000).

O Brasil é considerado um país de baixa incidência de CHC, sendo maior nas regiões norte, nordeste e sudeste do que no Sul do país (Conte, 2000).

No Fórum Nacional sobre CHC, realizado em Florianópolis em 1995, foram analisados 287 casos diagnosticados de CHC entre os anos de 1992 a 1994, em oito estados brasileiros, com os seguintes dados principais: média de idade 54,7 anos; relação masculino/feminino de 3,4:1, positividade agHBs 41,6%; positividade anti-HVC 26,9%; presença de alcoolismo crônico 37%; presença de cirrose 71,2% (Gonçalves *et al.,* 1997). Possui variação de 100 casos por 100.000 pessoas/ano, em certas regiões do sub-Sahara africano e

Ásia, sendo estas as populações mais atingidas pela doença. Em algumas regiões da Europa e da América do Norte, a incidência cai para menos de quatro casos por 100.000 pessoas/ano (Sorensen *et al.,* 1998).

O tempo de vida após o diagnóstico de um paciente com o hepatocarcinoma clinicamente detectável pode ser curto. Assim considerando, o índice de incidência passa a ser equivalente ao de mortalidade. Cerca de 50% - 90% dos pacientes com carcinoma hepatocelular apresentam cirrose hepática, que pode estar associada ao alcoolismo ou hepatite crônica, cujo fator etiológico predominante é a infecção pelo vírus da hepatite c, ou pelo vírus da Hepatite b. O álcool pode ter efeito sinérgico à infecção por VHB e VHC quanto ao risco de desenvolvimento de CHC (INCA, 2008).

Carcinógenos químicos (esteróides anabólicos em altas doses), uso prolongado de hormônios anticoncepcionais e fatores genéticos (hemocromatose, deficiência de alfa-1 antitripsina, tirosinemia) são considerados fatores de risco menores ao desenvolvimento do CHC (Brechot, 1998).

A cirrose é decorrente da atividade regenerativa extensa (nódulos macrorregenerativos) no parênquima hepático, favorecendo aumento da seleção de clones de células mutantes sendo caracterizada como uma doença parenquimatosa necroinflamatória contribuindo na evolução do tumor. Assim, a transformação neoplásica decorrente de ciclos contínuos ou recorrentes de necrose e regeneração do hepatócito pode causar alterações no DNA, levando ao surgimento do CHC (Tabor, *et al.,* 1999).

Pelo fato de a incidência ser muito variável segundo as diferentes áreas geográficas, o Hepatocarcinoma tem sido instrumento de identificação de muitos fatores de risco (Alves *et al.*, 2004). Atenção especial deve ser dada à ingestão de grãos e cereais que quando armazenados em locais inadequados e úmidos, podem ser contaminados pelo fungo *Aspergillus flavus.* Este fungo produz a micotoxina aflatoxina B1, substância cancerígena ligada ao hepatocarcinoma, além de doenças relacionadas com o depósito de ferro no fígado (Navas *et* al., 2005).

I.2 Classificação histológica do CHC

O CHC é um dos tumores morfologicamente mais heterogênios. Geralmente pode-se identificar uma arquitetura trabecular delimitadas por espaços semelhantes a sinusóides hepáticos.

A graduação histológica proposta por Edmondson & Steiner, em 1954, ainda é a mais usada. Nela o CHC é dividido em:

Grau 1: Tumores bem diferenciados com trabeculação delicada.

Grau 2: Estrutura trabecular básica mantida, com aparecimento de estruturas acinares ou glanduliformes e eventualmente áreas papilares. Os núcleos apresentam um grau maior de atipia quando comparados ao grau 1.

Grau 3: Aumento da atipia nuclear, com presença de múltiplos nucléolos, áreas com perda do arranjo trabecular e presença de células gigantes.

Grau 4: Padrão sólido ou medular de crescimento, as células não são coesas, mostrando formas bizarras e a situação mais freqüente é que haja dificuldade em firmar a linhagem hepatocelular da neoplasia.

Microscopia óptica de tecidos hepáticos corados por HE, aumento de 400x, representando grau I, grau II, grau III e grau IV do Carcinoma hepatocelular (figura 1).

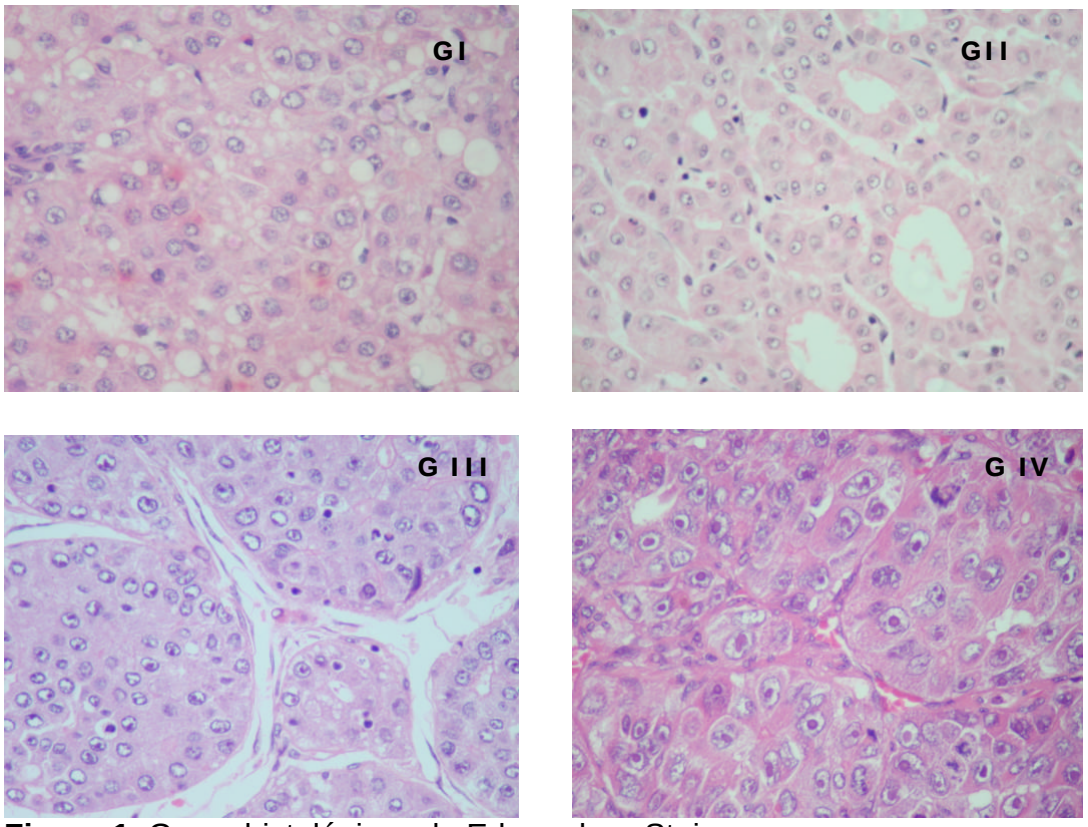

Figura 1: Graus histológicos de Edmondson-Steiner

Microscopia óptica de tecidos hepáticos corados por HE, aumento de 400X, representando fígado cirrótico não-neoplásico (figura 2).

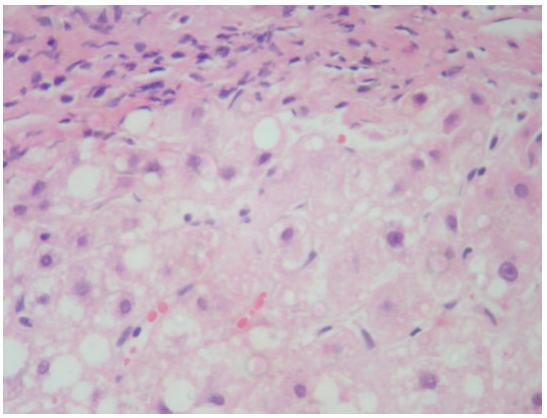

Figura 2: Fígado cirrótico não-neoplásico

I.3 Aspectos histopatológicos na progressão para o CHC

A cirrose hepática, caracterizada pela substituição difusa da estrutura hepática normal por nódulos de estrutura anormal circundados por fibrose, é o estádio final comum de uma série de processos patológicos hepáticos de diferentes etiologias (Iida ,2005).

O hepatocarcinoma é uma complicação comum nos doentes com cirrose hepática. Em média, cerca de 10% dos pacientes com cirrose desenvolvem hepatocarcinoma e mais de 90% dos pacientes com o tumor são portadores de hepatopatia crônica (D'Ippolito *et al.,* 2006; Parolin *et al*., 2006).

O CHC mostra-se mais agressivo quando caracteriza-se por comportamento diferenciado na histologia, a falta de cápsula fibrosa, tumor ser de grande dimensão com presença de invasão vascular e elevados níveis séricos de alfa-fetoproteína (AFP) (But *et al.,* 2008). Estes fatores são

identificados como importantes indicadores de recurrência tumoral (Parolin *et al*., 2006).

I.4 A proteína p53

A fosfoproteína nuclear p53 possui peso 53kDa (Kilodaltons) e deriva de um gene supressor de tumor localizado no cromossomo 17p13.1 o qual se encontra alterado em mais da metade das neoplasias humanas (Yu, 2006). Sua função está relacionada a fatores de transcrição nuclear que atuam no controle da proliferação celular, apoptose e manutenção da estabilidade genética. Em condições fisiológicas, esta proteína apresenta meia-vida relativamente curta (aproximadamente 20 minutos) e apresenta-se com baixos níveis celulares, pois é rapidamente degradada (Kubbutat *et al.*, 1998).

Em situações de estresse celular que levam a um dano do DNA, como por exemplo a radiação UV, a proteína p53 age no bloqueio do ciclo celular induzindo a célula a entrar em apoptose até que haja o reparo do DNA. Por outro lado, células com mutações ou outro tipo de inativação do gene p53 (TP53), não têm o ciclo celular bloqueado e continuam a se dividir, perpetuando a mutação nas futuras células filhas (Vogelstein *et al.*, 1992; Alberts *et al*., 2002). A inativação do gene p53 pode decorrer de uma série de alterações, como deleções cromossômicas, mutações *frameshit* ou *missense*, entre outras, sendo descritas em vários tipos de câncer, como

cólon, cérebro, pulmão, fígado, bexiga e estômago (Vogelstein *et al.*, 1992; Tolbert *et al.*, 1999; Alves *et al.*, 2004; Soussi *et al.,* 2006).

I.5 O gene p53 no Carcinoma Hepatocelular

No CHC, o TP53 encontra-se mutado em até 61% dos casos (Hsia *et al*., 2000). A imuno-expressão do gene p53 alterado foi associada a pior prognóstico para pacientes com CHC. Cânceres que expressam p53 mutado são mais agressivos e resistentes à quimioterapia comparado a outros cânceres em tecidos expressando p53 em sua variante normal (selvagem) (Lunn *et al.*, 1997; Sung *et al.*,2005).

Na população de CHCs brasileiros, 35,2% apresentaram imuno-expressão de proteína p53. Há diferença na taxa de casos mutados segundo a graduação da neoplasia (Alves *et al*., 2004). Particularmente há uma mutação específica do códon 249 do gene p53 relacionada a aflatoxina, principalmente caracterizada em regiões da China e África do Sul, áreas com alto índice de infecções virais e abundante concentração de aflatoxinas provenientes da dieta local (Yu, 2006; Alves *et al.,*2004). No Brasil, Nogueira e colaboradores estudaram a presença desta mesma mutação em pacientes diagnosticados com CHC (Nogueira *et al,* 2009).

Mutações no gene p53 representam o evento chave na transformação e progressão da maioria das neoplasias. A proteína p53 pode prevenir a

formação de tumores por reduzir o acúmulo de danos genéticos que contribuem para a tumorigênese (Braithwaite e Prives, 2006).

I.6 Apoptose

A homeostase de um ser vivo está fortemente regulada, não somente pela diferenciação e proliferação de células, mas também pela morte celular, que ocorre muitas vezes através da apoptose, uma forma programada de morte celular. Podemos diferenciar apoptose de necrose, pois possuem morfologia distintas, sendo a necrose uma forma patológica de morte celular na qual o conteúdo intracelular é liberado no meio após o rompimento da membrana plasmática. É causada por agentes físicos e químicos, tais como infecções virais e toxinas (Siegel *et al.,* 1999).

Na apoptose, ocorre a destruição ordenada da célula. Primeiro, há condensação do citoplasma, enquanto o núcleo, além de se condensar, tem o DNA fragmentado em oligômeros. No estágio final desse processo, as células se fragmentam por inteiro, e seus produtos são empacotados formando os chamados “corpos apoptóticos”, que são rapidamente reconhecidos e fagocitados por células do sistema retículo-endotelial (Siegel *et al.,*1999).

I.6.1 Apoptose mediada pela p53

Existem duas vias pelas quais a célula é induzida à apoptose, a via intrínseca, relacionada principalmente à atividade mitocondrial e liberação do citocromo c, e a via extrínseca, desencadeada pelo estímulo de receptores na superfície da membrana celular (Kumar *et al.*, 2005).

As vias apoptóticas dependentes da p53 levam a uma disfunção mitocondrial (Levine *et al*., 2006; Uo *et al*., 2007; Wang *et al*., 2007) após evento estressor que cause dano ao DNA. Desta forma o gene p53 induz a apoptose através da transcrição dos genes pró-apoptóticos que produzem suas proteínas, sendo as principais Bax (*Bcl-2-associated X protein*), PUMA (*p53-upregulated modulator of apoptosis*) e Noxa (Haupt S *et al*.,2003).

I.6.2 A família Bcl-2 e proteína Bax na apoptose

O gene Bcl-2 foi descrito em linfomas de células B como resultado de uma translocação t(14;18). Bcl-2 codifica uma proteína mitocondrial de 24 kDa que se localiza no retículo endoplasmático, no envelope nuclear e na membrana mitocondrial de vários tecidos normais e neoplásicos, exceto tecidos muscular e hepático (Derossi *et al.,* 2003). Este gene atua através de suas proteínas seqüestrando os membros pró-apoptóticos de sua família, ligando-se a seus domínios BH3 (Bcl-2 homólogos) prevenindo sua oligomerização e consequentemente, inibindo

os eventos para aumento da permeabilidade mitocondrial e liberação do citocromo c (Gewies, 2003).

Alguns membros desta família, como a proteína Bcl-2 e Bcl-XL inibem a apoptose, enquanto outros, como a Bad (inibidora de proteínas que impedem a apoptose), a Bax e a Bak são promotores da apoptose (Albert *et al.*, 2002)

Bax é uma proteína homóloga ao Bcl-2, com 21 kDa. Está localizada no citoplasma, estando às vezes ligada à membrana celular. Bax é encontrada na forma de homodímeros ou heterodímeros, estes últimos na presença de Bcl-2 (Oltvai *et al.,* 1993; Mullauer *et al.*, 2001) mostraram um modelo no qual a razão Bcl-2/Bax determina a morte ou sobrevivência da célula, ocorrendo ou não, um estímulo apoptótico.

Após ter sua transcrição ativada pela proteína p53, Bax funciona como um antagonista de proteínas inibidoras da apoptose, como a bcl-2 (*B cels lymphoms 2*) deslocando-se do citoplasma celular para a mitocôndria, promovendo a permeabilização da membrana externa nesta organela e subsequente liberação de proteínas pró-apoptóticos no citosol (Adams *et al*., 1998.; Levine *et al*., 2006).

Há liberação do citocromo *c* e da proteína Smac/DIABLO (segundo ativador das caspases derivados da mitocôndria / proteínas diretamente ligadas a IAP / *Second mitochondria-derived activator of caspase / direct inhibitor of apoptosis-binding protein with low pI*) que, uma vez no citoplasma, funcionam como co-fatores da APAF-1 (Proteína citosólica envolvida na morte celular ou apoptose / *Apoptotic Protease*

Activating Factor 1) promotores da clivagem da pró-caspase 9, formando o complexo apoptossoma (citocromo C + APAF 1+ procaspase 9 e ATP) com clivagem subsequente das caspases efetoras 3 e 7, levando à formação do corpúsculo apoptótico. (Jin *et al*., 2001.;Haupt *et al*.,2003.;Levine *et al*., 2006; Amaral *et al*., 2007; Sabah *et al*., 2007; Uo *et al*., 2007; Wang et al., 2007).

A cascata das caspases e o mecanismo apoptótico sofrem regulação de algumas proteínas denominadas IAPs (proteínas inibidoras da apoptose), que foram originalmente identificadas no proteoma do *baculovirus* e que no ser humano inibem diretamente as caspases 3, 7 e 9. Acredita-se que a função das IAPs é a prevenção da ativação espontânea das caspases. Este fato é corroborado pela presença das proteínas pró-apoptóticas na mitocôndria Smac e Diablo, que antagonizam a função das IAPs permitindo a continuidade da apoptose (Hengartner *,* 2000; Ferreira *et al.,* 2002; Gewis *et al*., 2003).

Smac/DIABLO promove a ativação da caspase 9 pela ligação ao inibidor de proteínas de apoptose IAPs e por remoção de suas atividades de inibição. A hiper expressão de smac diablo aumenta a sensibilidade da célula para estímulos apoptótico (Chai *et al.*, 2000).

I.6.3 Caspases

Caspases são um grupo de proteases que possuem centro ativo de cisteína e estão presentes no citosol sob a forma de pró-enzimas

inativas, tornado-se ativas após clivagem proteolítica de resíduos do ácido aspártico. Em muitos modelos de lesão hepática, a inibição das caspases frequentemente impede a apoptose, o que as torna alvos atraentes para uma estratégia farmacológica, quando, na patogênese da doença, o processo de apoptose esteja envolvido (Thompson, 1999). Algumas caspases também são necessárias no sistema imune, para a maturação das citocinas (Hengartner, 2000, Amarante-Mendes *et al*., 1999).

A caspase-3-clivada é uma proteína clivada que surge por ação tanto da caspase-8 ativa (via extrínseca) quanto da caspase-9-ativa sobre a caspase-3 (via intrínseca). (Riedl *et al,* 2004). A caspase 3 clivada é considerada a mais prevalente nas células, caracteriza-se como responsável pela maioria dos efeitos apoptóticos, como a quebra de muitas proteínas importantes. No entanto, recebe suporte de outras, como a caspase-6 e 7. Juntas, referidas como as caspases de execução, possuem importante função na coordenação da morte celular (Zimmermann e Green, 2001). A marcação da caspase-3, em imuno-histoquímica, tem sido utilizada para identificar células em apoptose, revelando fácil aplicabilidade e alta sensibilidade (Loro *et al*., 2003).

A regulação da morte celular programada pelas vias extrínseca e intrínseca pode ser vista na figura 3.

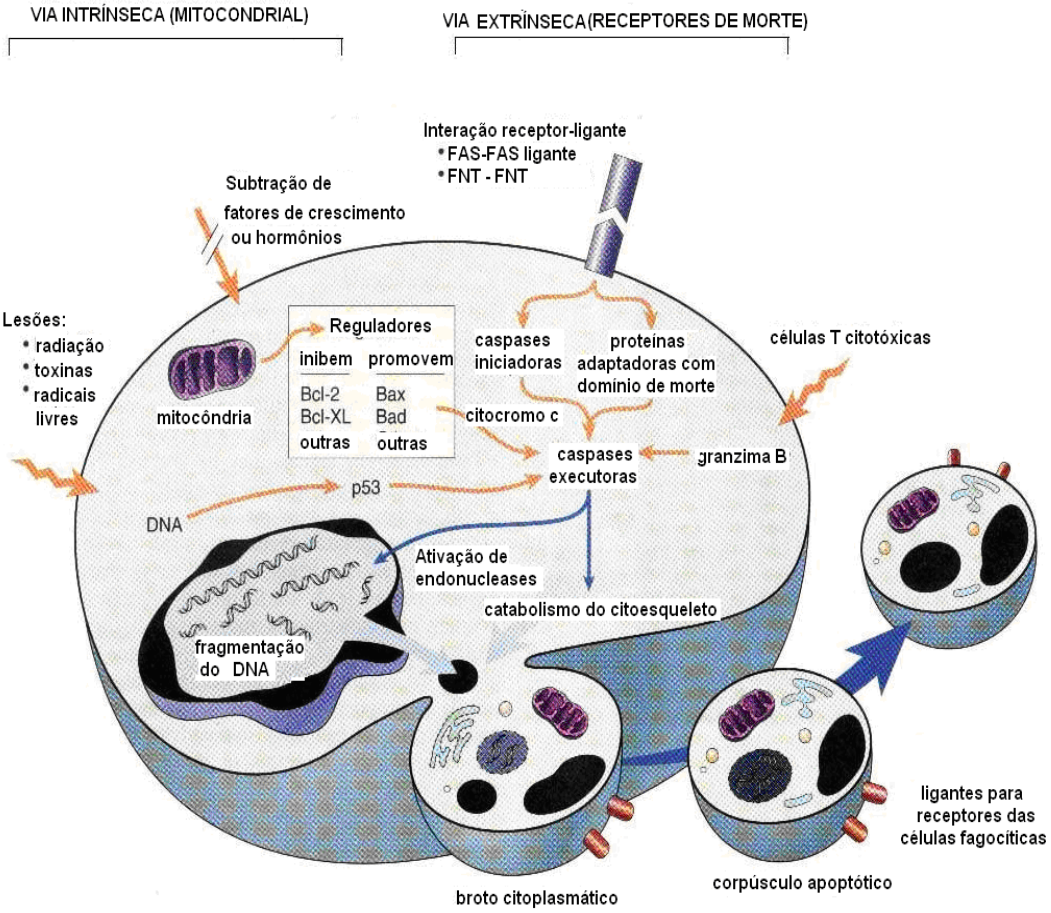

Figura 3. Vias extrínseca e intrínseca nos eventos apoptóticos

Fonte: Contran RS, Kumar V, Collins T. Robbins Pathologic basic of disease. 7ºedition. Ed.Guanabara Koogan; 2006

I.6.4 Avaliação de proteínas no processo apoptótico por imuno-histoquímica

A desregulação da apoptose e aceleração da atividade proliferativa em células hepáticas pode significar fatores de progressão no

hepatocarcinoma. Um grande número de fatores moleculares tem se mostrado associado à invasão do CHC, com potencial valor prognóstico.

Um aspecto importante é a análise de marcadores moleculares para o fenótipo da célula maligna. Estes incluem alterações no DNA, marcadores de proliferação celular, marcadores como a proteína p53, as proteínas Bax e citocromo c e a caspase efetora 3 clivada além de outros reguladores do ciclo celular, oncogenes e seus receptores, fatores relacionados à apoptose, bem como a atividade da telomerase (Qin *et al.,* 2002).

O método da imuno-histoquímica é utilizado para detecção nuclear da proteína p53 constituindo-se uma ferramenta prática e acessível (Soussi *et al.,* 2006). Pelo fato da forma mutante dessa proteína ter uma meia-vida longa quando comparada à sua forma selvagem, essa técnica quase exclusivamente detecta a primeira forma, ou seja, a mutante (Newcomb *et al.,* 1993). A imuno-marcação, mediante uso de anticorpo com epítopos contra a proteína p53, será positiva nas células neoplásicas, em que as formas selvagem ou mutante estiverem acumuladas, existindo forte correlação de sua superexpressão com mutações no TP53 (gene p53) (Hall *et al*., 1994).

A técnica de imuno-histoquímica se baseia na capacidade que têm os anticorpos específicos de se ligarem aos antígenos correspondentes. A reação de ligação não é visível a menos que o anticorpo esteja marcado com uma substância que absorva ou emita luz e que, assim produza um contrate ou cor. O complexo enzima-anticorpo é capaz de se ligar ao

antígeno específico no tecido e alterar a cor do cromógeno apropriado. A peroxidase e a fosfatase alcalina são as enzimas mais utilizadas, sendo a peroxidase o marcador de preferência na maior parte das técnicas de diagnóstico imuno-histoquímico.

Muitas variáveis como quantidade do antígeno, afinidade com o anticorpo, concentração do anticorpo, duração das incubações, sensibilidade do sistema de detecção e fixação influenciam na detecção do antígeno na técnica de imuno-histoquímica (Hall *et al.,* 1994).

Este método tem revolucionado a pesquisa diagnóstica das neoplasias, pois os anticorpos reconhecem antígenos que são expressos por células neoplásicas específicas, desta forma permite que se conheça melhor a biologia do câncer (Zuccari *et al.,* 2001).

No CHC, embora os corpos apoptóticos possam ser vistos sob microscopia óptica convencional pela coloração de hematoxilina e eosina, a visualização e quantificação dos mesmos pode ser melhorada com a detecção de proteínas clivadas durante o processo de apoptose através da imuno-histoquímica. Dentre estas, a caspase-3-clivada é uma das mais importantes pois, estando no final da cascata das caspases sua detecção pode ser usada como um indicador indireto da própria conclusão do caminho da apoptose (Gown *et al*., 2002; Karamitopoulou *et al.,* 2007)

A importância prática da correta quantificação da taxa de atividade apoptótica para estudos envolvendo hepatocarcinomas reside no fato de que estudos recentes demonstram que drogas anti-neoplásicas eliminam as células cancerosas por ativação de vias de apoptose sugerindo

que a supressão da apoptose possa associar-se com resistência às drogas quimioterápicas (Marsoni *et al.,* 2004; Yu, 2006).

O estudo da apoptose sustenta, assim, um elevado potencial terapêutico objetivando a identificação de moléculas alvo para posterior aplicabilidade na terapia oncológica (Garcia *et al*., 2002).

2. OBJETIVOS

1. Estudar a participação da apoptose na carcinogênese hepatocelular, quantificando os corpos apoptóticos imunomarcados por caspase-3 clivada em amostras de carcinoma hepatocelular em pacientes com ou sem cirrose, comparando também estes achados com amostras correspondentes de fígado não tumoral

2. Estudar a imuno-expressão da proteína p53 em carcinoma hepatocelular , buscando análise de sua possível relação com o índice apoptótico.

3. Estudar a imuno-expressão de proteínas Bax e Citocromo C relacionadas à via mitocondrial da apoptose em busca de eventuais relações com as variáveis clínico-patológicas dos carcinomas hepatocelulares e com a imuno-expressão do p53

3. MÉTODOS

3.1 Amostras

O universo do presente estudo é o conjunto de 79 casos de CHC aqui analisados quanto à imuno-expressão de caspase 3 clivada , p53, bax e citocromo c.

Blocos de tecido hepático parafinados e suas respectivas lâminas contendo cortes histológicos (coloração HE) de pacientes portadores do diagnóstico de carcinoma hepatocelular foram retrospectivamente selecionados para este estudo.

Os blocos foram provenientes da Divisão de Anatomia Patológica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP (DAP– HC - FMUSP) e do Centro de Imuno-histoquímica, Citopatologia e Anatomia Patológica (Hospital Alemão Oswaldo Cruz – HAOC-CICAP). Dentre os setenta e nove pacientes selecionados, cinqüenta foram oriundos do HC-FMUSP e vinte e nove do HAOC-CICAP. As amostras utilizadas tinham como etiologia: infecção pelos VHC (28), infecção pelos VHB (14), VHB + VHC (03), alcoolismo (03) e outros (31).

Das amostras coletadas, 59 (74,7%) foram do gênero masculino e 20 (25,3%) do gênero feminino, com idade média de 53,3 e extremos de 7 a 80 anos.

Critério de inclusão: Foram utilizadas peças parafinadas de tumores hepáticos primários ressecados entre 1997-2005 que se encontram arquivadas no Departamento de Anatomia Patológica do HC-FMUSP e no

CICAP do Hospital Alemão Oswaldo Cruz. Todas as peças foram diagnosticadas como sendo CHC por métodos anatomo-patológicos.

Critério de exclusão: Os hepatocarcinomas do tipo fibrolamelar foram excluídos deste estudo.

Os achados imuno-histoquímicos de índice apoptótico marcado por caspase 3 clivada, e de proteínas Bax, p53 e citocromo c foram comparados com as seguintes variáveis clínico-patológicas :

Gênero
Presença ou não de cirrose
Tamanho do tumor primário
Presença ou não de invasão vascular
Grau histológico do CHC segundo Edmonson-Steiner

Além dos blocos de parafina dos espécimes cirúrgicos e lâminas (HE), também foram avaliados os laudos anátomo-patológicos originais. Sempre que disponível, o tecido hepático não-neoplásico também foi motivo de estudo.

Este projeto de pesquisa foi aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (Cappesq) do Hospital das Clínicas – USP sob o número 2010/70.

3.2.Técnica Histológica

Dos blocos de parafina originais, novas secções histológicas de 3 µM

de espessura foram obtidas em micrótomo Leica e submetidas a protocolo de coloração pela hematoxilina e eosina conforme a seguir:

- Desparafinização em xilol a 60ºC por 10 min e xilol em temperatura ambiente por 10 min;
- Hidratação em 3 passagens em álcool absoluto, álcool 95% e álcool 80%, respectivamente;
- Hidratação em água corrente e água destilada;
- Hematoxilina de Harris por 3 min;
- Lavagem em água corrente e água destilada;
- Oito imersões em solução de hidróxido de amônio 0,5%;
- Lavagem em água corrente e água destilada;
- Passagens sucessivas em álcool 50%, álcool 80% e álcool absoluto;
- Eosina por 2 min;
- Quatro passagens em álcool absoluto para desidratação;
- Diafanização em xilol (4 vezes);
- Montagem em Entellan (Merck, EUA).

3.3. Classificação Histológica

Procedeu-se a revisão dos laudos anátomo-patológicos originais para obtenção de informes sobre a graduação histológica de Edmondson – Steiner (I – IV). Para a realização dos testes estatísticos, os graus foram agrupados (0 com 1 e 2 e 3 com 4), quando apropriado.

Quando áreas de graduação diferente encontraram-se presentes na mesma neoplasia, a área de maior grau histológico foi a escolhida para representar o caso.

3.4. Construção das micromatrizes teciduais (Tissue microarray TMA)

Os procedimentos de confecção do bloco TMA bem como as reações imuno-histoquímicas e contagem de células foram realizados no LIM14-Patologia hepática – FMUSP e no Laboratório de Imuno-histoquímica da Divisão de Patologia do Instituto Adolfo Lutz.

3.4.1 Técnica

Das lâminas obtidas com cortes histológicos coradas pelo método HE - hematoxilina-eosina foram apontadas áreas de interesse para posterior confecção dos blocos de TMA. Pontos com cores diferentes discriminaram o tumor primário e o tecido não neoplásico, com ou sem cirrose.

Conforme metodologia descrita por Konnonen *et al*, e utilizando equipamento MTA1 (Manual *Tissue Microarrayer*, Beecher Instruments, EUA), foram confeccionados blocos de TMA com agulhas de 1,0 milímetro de diâmetro para extração dos cilindros teciduais dos blocos doadores os quais foram dispostos nos blocos receptores com espaçamento de 0,3 milímetro (Konnonen *et al.,* 1998).

Para efeito de orientação de posição, na primeira linha horizontal foram dispostos tecidos controles obtidos de necropsia (rim ou pulmão) e na última linha abstiveram-se dois cilindros visando garantir assimetria geométrica e posicional para determinação inequívoca do começo do bloco.

Os blocos receptores foram confeccionados com parafina Histosec em pastilhas (Merck, EUA) de elevada pureza a qual garante a execução de cortes histológicos delgados e homogêneos, além de evitar possíveis rachaduras no ato da perfuração da agulha.

Cada caso foi representado em duplicata tanto em relação ao cilindro correspondente de uma amostra quanto para o bloco de TMA, processo realizado simultaneamente na confecção do bloco TMA.

Por tratar-se de sistema de orientação matricial, previamente à confecção dos blocos elaborou-se planilha em Excel (planilha “mapa”) (Microsoft Office 2003, EUA) contendo os números correspondentes dos blocos designando para cada posição o respectivo caso contido com a finalidade de posterior registro dos resultados.

Visando a evitar perdas inerentes à necessidade de se aparar o bloco de parafina, foi efetuada sessão única de microtomia, na qual foi obtida, por bloco de TMA, média de 50 a 70 secções. Estas foram dispostas em lâminas silanizadas, submetidas a banho de parafina e arquivadas em caixa escura em freezer -20 ºC visando a preservação da antigenicidade das amostras (DiVito *et al*.,2004) para posterior utilização no momento da execução das reações imuno-histoquímicas.

3.4.2 Corte dos blocos TMAs

Os blocos foram cortados em micrótomo com espessura de 3 µM, 50 a 70 lâminas numeradas consecutivamente. As lâminas de número 11, 26 e 41 foram coradas pela hematoxilina e eosina (HE), e avaliadas quanto ao percentual de posições não informativas (aquelas em que o material de interesse não aparece representado), possibilitando a escolha das lâminas mais representativas, as quais foram submetidas às técnicas de imuno-histoquímica (IHQ).

O processo histológico para confecção de bloco TMA está resumido na figura 4.

Figura 4: Sequência para elaboração de micromatriz tecidual

3.5. Ensaios Imuno-Histoquímicos

3.5.1 Anticorpos primários - Padronização dos ensaios

Foram utilizados anticorpos primários monoclonais e policlonais dirigidos contra antígenos específicos em condições ideais do ensaio para cada um dos antígenos pesquisados. Foram avaliadas diversas combinações de variáveis envolvidas na execução das reações imuno-histoquímicas, tais como; título dos anticorpos primários, recuperação antigênica e sistema de detecção.

Tabela 1. Condições padronizadas para os anticorpos p53, Bax, citocromo c e Caspase 3 clivada.

Anticorpo	***Clone***	***Fabricante***	***Código***	***Título***	***Rec Antigênica***	**Detecção**
P53	DO7	Dako	M7001	1:1000	Pv pH:6,0	Novolink
Bax	N20	Santa Cruz	SC 493	1:300	Pv pH:6,0	Novolink
Caspase 3 clivada	SP175	Cell signaling	96614	1:100	Pv pH:6,0	Novolink
Citocromo c	(A8)mono	Santa Cruz	SC12156	1:20000	Pv pH:6,0	Novolink

PV: Panela a vapor
Mono: monoclonal

3.5.2. Técnica

Em linhas gerais, este método compreende as seguintes etapas;

Desparafinização das lâminas de TMA

- Xilol a 60º C por 20 min;

- Xilol a temperatura ambiente por 20 min;

- Etanol 100% 3 vezes 30 segundos;

Hidratação dos cortes

- Etanol 95% 30 seg;

- Etanol 80% 30 seg;

- Etanol 70% 30 seg;

- Lavar as lâminas em água corrente e destilada;

Recuperação Antigênica

Incubação das lâminas em solução de ácido cítrico 10 mM pH 6,0 (Merck, E.U.A.) fervente em panela a vapor, por 40 min. Esfriar sob água corrente, abrir a tampa da panela e deixar esfriar a temperatura ambiente por 20 min. Lavagens em água corrente e água destilada.

Bloqueio de peroxidase endógena

- Mergulhar as lâminas em H_2O_2 6% e metanol v/v com 3 trocas de 10 min;

- Lavar em água corrente e destilada;

- Lavar com solução salina tamponada com fosfatos (PBS) 10 mM, pH= 7,4 por 5 min.

Anticorpos primários

- Diluídos os anticorpos primários em tampão PBS contendo albumina bovina 1% (BSA) (Sigma, A9647, EUA) e azida sódica (NaN3) 0,1%, nos títulos previamente estabelecidos;

- Incubação por 30 min à 37°C e por 18 hs à 4ºC em câmara úmida;

- Lavagem em tampão PBS com 3 trocas de 3 min.

Anticorpos secundários/Sistema de amplificação do Sinal

- Incubação com o bloqueador pós-primário (*Post Primary Block, NovoLink Max Polymer Detection System*, Newcastle, Reino Unido), por 30 min a 37º C;

- Lavar em tampão PBS com 3 trocas de 3 min;

- Incubar com polímero Novolink (Novocastra), por 30 min à 37°C;

- Lavar em tampão PBS com 3 trocas de 3 min.

Revelação com cromógeno

- Incubar as lâminas, por 5 min, a 37°C e ao abrigo da luz, em solução contendo substrato cromógeno assim preparada: 100 mg% de 3,3' tetrahidrocloreto de diaminobenzidina (DAB) (Sigma, D-5637, EUA), 1 ml dimetilsulfóxido (DMSO), 1 ml de H_2O_2 6%, 100 ml de PBS;

Contra-coloração

- Mergulhar as lâminas em solução de Hematoxilina de Harris por 30 seg;

- Lavar em água corrente e destilada;

- Imergir por 2 vezes em solução de hidróxido de amônio 0,5%, lavando em seguida em água corrente e destilada;

- Desidratar as lâminas em sequência de concentrações crescentes de etanol (50%, 80%, 95%, 100%, 3 vezes de 30 seg cada) e xilol (4 vezes de 30 seg cada);

- Montagem das lâminas com lamínula e Entellan (Merck, 1.07961, Alemanha).

3.5.3 Controles positivos e negativos utilizados durante os ensaios imuno-histoquímicos

Os controles utilizados na reação imuno-histoquímica para as proteínas estudadas compreenderam um controle positivo e um controle negativo. As condições de ensaio dos anticorpos foram as mesmas previamente descritas, exceto para o controle negativo, para o qual se omitiu a etapa do anticorpo primário, sendo efetuados todos os demais procedimentos imuno-histoquímicos

Foram utilizados como controles positivo os seguintes tecidos: adenocarcinoma mamário para a proteína p53, tonsila palatina para as proteínas Bax , Caspase 3 clivada e citocromo c.

3.5.4 Avaliação da imunorreatividade imuno-histoquímica

As análises de todas as reações imuno-histoquímicas foram realizadas conjuntamente pelo autor e pelo Dr. Iberê Cauduro Soares, LIM 14 , Patologia Hepática, HC-FMUSP.

Nas células neoplásicas das amostras de carcinoma hepatocelular, foi considerada como relevante a coloração acastanhada nuclear para a

proteína p53, citoplasmática para a proteína Bax e Citocromo c. Estas foram avaliadas de forma semiquantitativa, seguindo a seguinte escala:

- 0 = ausência de imunorreatividade
- 1 = imunorreatividade entre 1 e 10% das células neoplásicas;
- 2+ = imunorreatividade entre 11 e 25% das células neoplásicas;
- 3+ = imunorreatividade entre 26 e 50% das células neoplásicas;
- 4+ = imunorreatividade entre 51 e 100% das células neoplásicas.

Quando apropriado, durante a realização dos testes estatísticos, as classes de imuno-expressão foram agrupadas: 0 com 1 e com 2 (até 25%), considerados " negativos ou de baixa expressão" versus 3 com 4 (>25%) ,considerados "positivos ou de alta expressão".

3.6. Índice de células em fase final da apoptose ("índice apoptótico") mediante imunodetecção de caspase-3-clivada

O estudo do índice apoptótico pela reatividade da caspase teve diversas peculiaridades :

Procedeu-se a contagem de células e fragmentos celulares em lâminas coradas pela imuno-histoquímica para anticorpo anti-caspase 3 clivada através da contagem global de cada cilindro em aumento de 200X.

Foram também contados o número total de células neoplásicas de cada cilindro em fotos cobrindo a área total dos cilindros,(aumento de 400X).

O índice apoptótico (apoptose), representando a fração de células em fase final da apoptose marcadas por sua imunorreatividade para caspase 3 clivada foi obtido da razão entre o número de células e fragmentos celulares imunorreativos para caspase 3 clivada e o número total de células neoplásicas de cada cilindro, o qual foi normalizado para 1000 células pela multiplicação por 1000.

Adicionalmente, apenas para a apoptose, analisamos também as amostras de fígado não-tumoral, disponíveis em 52 dos casos de carcinoma hepatocelular aqui estudados, dezessete em casos sem cirrose e 35 em casos com cirrose.

3.7 Análises empreendidas e testes estatísticos

A comparação entre as variáveis foram realizadas pelos testes não paramétricos de distribuições de variáveis contínuas (apoptose e tamanho do tumor primário) através dos modelos de Mann Whitney, Krushkal Wallis e Wilcoxon, pelo método de qui-quadrado de Pearson e pelo teste exato de Fisher quando apropriado.

Os testes estatísticos foram realizados sob supervisão do Dr. Kléber Simões do Espírito Santo - LIM-14, HC-FMUSP, com o software SPSS versão 13.0 (SPSS Inc., Chicago, IL) e os resultados foram considerados significativos ao nível de $p<0,05$.

4- RESULTADOS

4.1 Descrição dos aspectos clínicos e anátomo-patológicos

Cinqüenta e nove (74,7%) amostras foram obtidas de pacientes portadores de CHC do gênero masculino e 20 (25,3%) do gênero feminino, com idade ao diagnóstico de 53,3 ± 17,38865 (média + D.P.) e extremos de 7 a 80 anos.

Cinqüenta e uma (66,3%) amostras demonstravam presença de cirrose hepática e 26 (33,7%) não. Em dois casos não foi possível obter informação quanto a presença ou não de cirrose hepática.

O exame anatomopatológico macro e microscópico continha informes sobre invasão vascular em 76 casos. A invasão foi identificada em 37 (48,7%) amostras, não havendo tal invasão em 39 (51,3%) amostras.

O tamanho do tumor variou de 0,5 cm a 24 cm com média 8,87cm± 6,77 e mediana 6,5 cm. Em 9 casos não foi possível obter informação quanto ao tamanho do tumor.

De acordo com a classificação de Edmondson-Steiner, a presente série apresentou: 1 caso (1,4%) grau I, 16 (20,6%) grau II, 57 (71,5%) grau III e 5 (6,5%) grau IV. O agrupamento dos casos resultou, então, em 17 casos bem/moderadamente diferenciados (graus I e II) e 62 casos pouco diferenciados (graus III e IV).

Tabela 2 – Grau de Edmondson-Steiner

Grau Edmondson-Steiner.	Nº	%
1	1	1,4
2	16	20,6
3	57	71,5
4	5	6,5
Total	79	100,0

Grau 1: Tumores bem diferenciados com trabeculação delicada. Grau 2: Estrutura trabecular básica mantida, com aparecimento de estruturas acinares ou glanduliformes e eventualmente áreas papilares. Os núcleos apresentam um grau maior de atipia quando comparados ao grau 1. Grau 3: Aumento da atipia nuclear, com presença de múltiplos nucléolos, áreas com perda do arranjo trabecular e presença de células gigantes. Grau 4: Padrão sólido ou medular de crescimento, as células não são coesas, mostrando formas bizarras e a situação mais freqüente é que haja dificuldade em firmar a linhagem hepatocelular da neoplasia.

4.2 Descrição dos achados imuno-histoquímicos de proteínas relacionadas à apoptose

4.2.1 Imuno-expressão da proteína Caspase 3 clivada/ Ìndice apoptótico

A imuno-expressão de caspase 3 clivada nas amostras de CHC gerou o índice apoptótico (apoptose) que variou de 0 a 209 com média 3,6 e desvio padrão 8,3 por 1000 células. Destaque-se o fato de 36 casos existirem, no máximo, apenas 1 corpo apoptótico marcado pela caspase 3 clivada a cada mil células neoplásicas e no outro extremo um caso ter apresentado 209 corpos apoptóticos por 1000 células.

Tabela 3. Distribuição da imuno-expressão da caspase 3 clivada gerando o índice apoptótico nas amostras de CHC

Nº corpos /1000 células	Nº de casos	%
0 -1	36	47,4
2-10	07	9,1
>10	33	43,5
Total	76	100,0

A imuno-expressão de Caspase 3 clivada avaliada no presente estudo pode ser vista na figura 5.

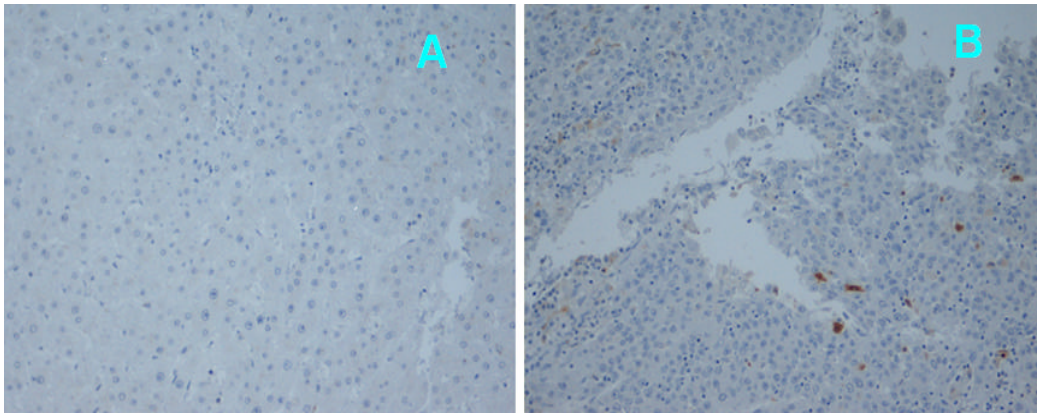

Figura 5. Padrões de imuno-expressão de Caspase 3 clivada
A) Ausência de células neoplásicas reativas para Caspase 3 clivada neste campo
B) Positividade para Caspase 3 clivada em 5 células neste campo microscópico

4.2.2 Imuno-expressão da proteína p53

Os resultados de imunorreatividade para a proteína p53 são expostos na tabela 4, onde encontramos 24 casos negativos (31,1%) ; 1+: imuno-expressão menor que 10% de células em 26 (33,8%) dos casos ; 2+: imuno-expressão entre 10-25% das células em 7 (9,1%) dos casos; 3+: imuno-

expressão entre 25-50% das células em 7 (9,1%) dos casos; 4+: imuno-expressão igual ou maior que 50% das células em 13 (16,9%) dos casos. Dois casos não foram válidos para esta análise (fragmentos não representados no corte correspondente no TMA)

Tabela 4 – Imuno-expressão de p53

P53	Nº	%
Negativo	24	31,1
1+	26	33,8
2+	7	9,1
3+	7	9,1
4+	13	16,9
Total	77	100,0

A ausência de imuno-expressão para proteína p53 avaliada no presente estudo é representada na figura 6.

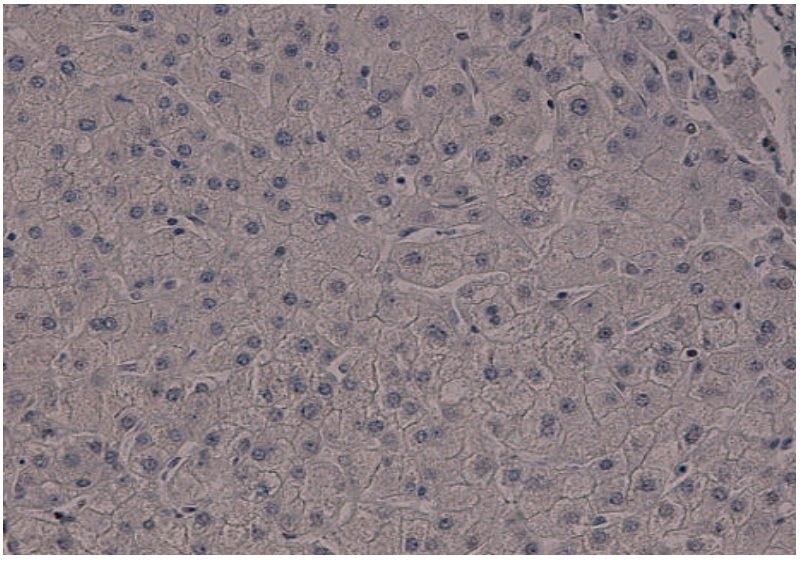

Figura 6: Padrão de imuno-expressão negativa para a proteína p53 em amostra de tecido não-neoplásico

Fotomicrografias de casos representativamente negativos e positivos para a proteína p53 avaliados no presente estudo (figura 7).

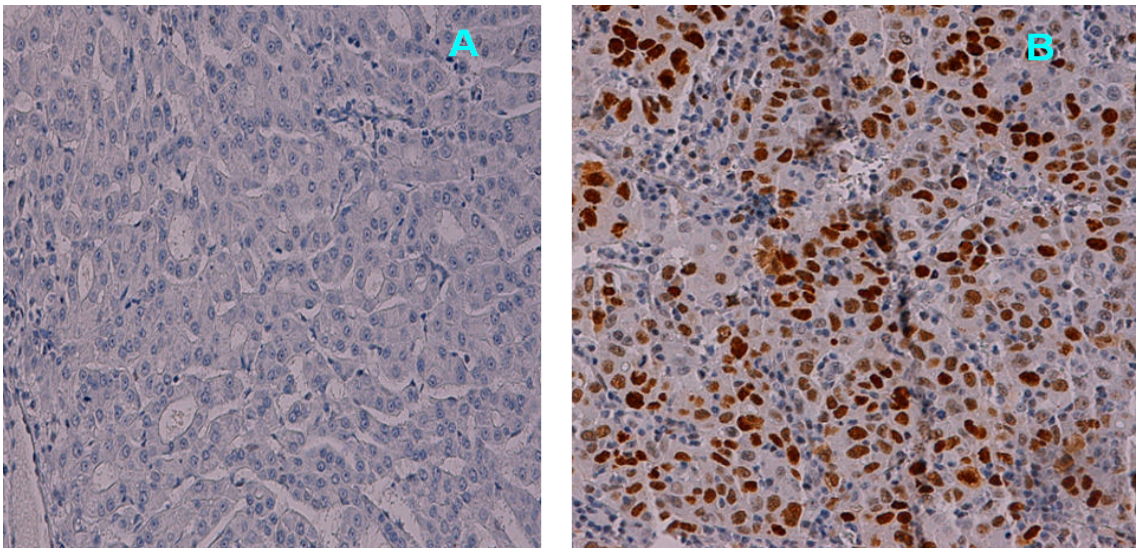

Figura 7. Padrões de imuno-expressão para a proteína p53
A)Caso negativo e CHC grau histológico II. B) Caso positivo e CHC grau histológico IV

4.2.3 Imuno-expressão da proteína Bax

Os resultados de imunorreatividade para a proteína Bax estão expostos na tabela 5, onde encontramos negatividade em 19 casos (24,4%) ; 1+: imuno-expressão menor que 10% de células em 15 (19,2%) dos casos ; 2+: imuno-expressão entre 10-25% das células em 8 (10,2%) dos casos; 3+: imuno-expressão entre 25-50% das células em 17 (21,8%) dos casos; 4+: imuno-expressão igual ou maior que 50% das células em 19 (24,4%) dos casos. Um caso não foi válido para esta análise (fragmentos não representados no corte correspondente no TMA).

Tabela 5 – Imuno-expressão de Bax

Bax	Nº	%
Negativo	19	24,4
1+	15	19,2
2+	8	10,2
3+	17	21,8
4+	19	24,4
Total	78	100,0

Fotomicrografias de caso representativamente negativo para a proteína Bax avaliado no presente estudo (figura 8).

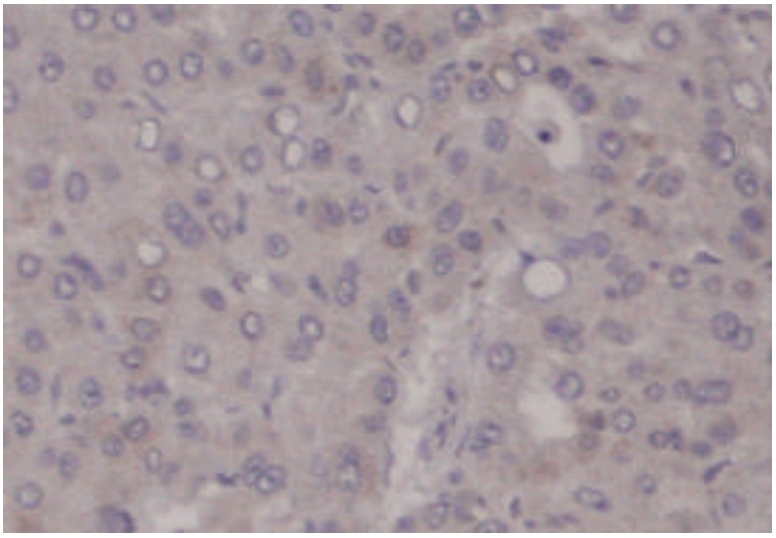

Figura 8. Padrão de imuno-expressão negativo para a proteína Bax em caso de CHC

Fotomicrografias de casos representativamente negativos, positivos e grau histológico de Edmondson-Steiner para a proteína Bax avaliado no presente estudo (figura 9).

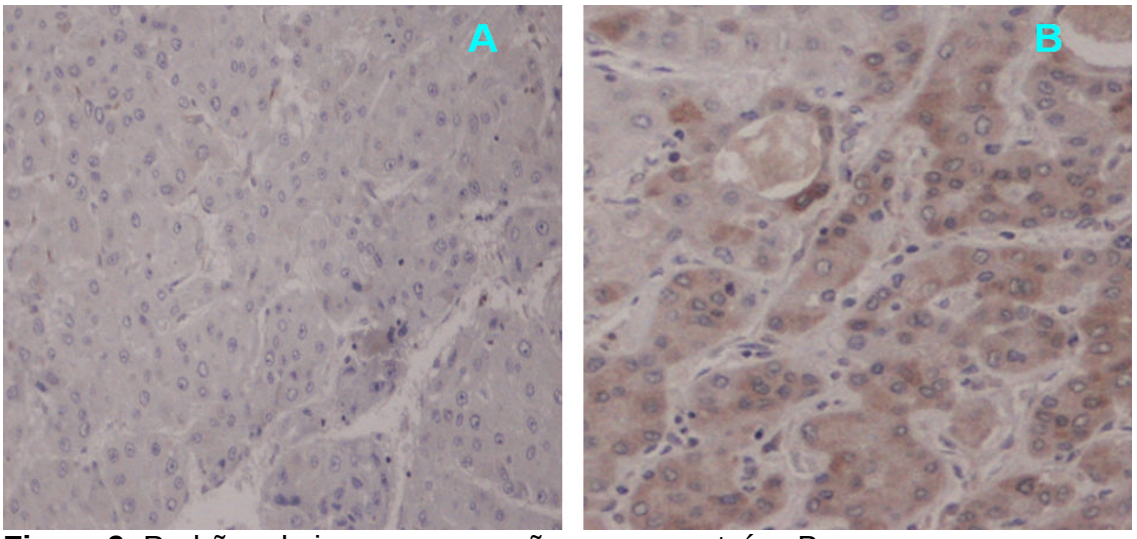

Figura 9. Padrões de imuno-expressão para a proteína Bax
A) Reação negativa em CHC grau histológico III. B) Reação positiva em CHC grau histológico III

4.2.4 Imuno-expressão da proteína Citocromo c

Os resultados de imunorreatividade para citocromo c estão expostos na tabela 6, onde encontramos; negatividade em 03 casos (3,8%); 1+: imuno-expressão menor que 10% de células em 05 (6,3%) ;

2+: imuno-expressão entre 10-25% das células em 02 (2,5%) dos casos;

3+: imuno-expressão entre 25-50% das células em 03 (3,8%) dos casos;

4+: imuno-expressão igual ou maior que 50% das células em 66 (83,5%) dos casos.

Tabela 6 – Imuno-expressão de citocromo c

Citocromo c	Nº	%
Negativo	03	3,8
1+	05	6,3
2+	02	2,5
3+	03	3,8
4+	66	83,5
Total	79	100,0

Fotomicrografias de caso representativamente negativo para citocromo c avaliado no presente estudo (figura 10).

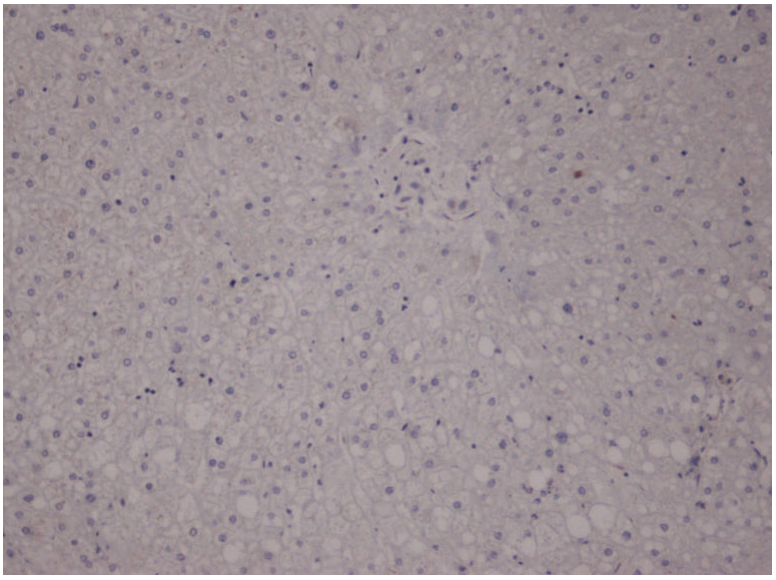

Figura 10: Padrão de imuno-expressão negativo para citocromo c em amostras de tecido não-neoplásico.

Fotomicrografias de casos representativamente negativos e positivos para citocromo c avaliado no presente estudo (figura 9).

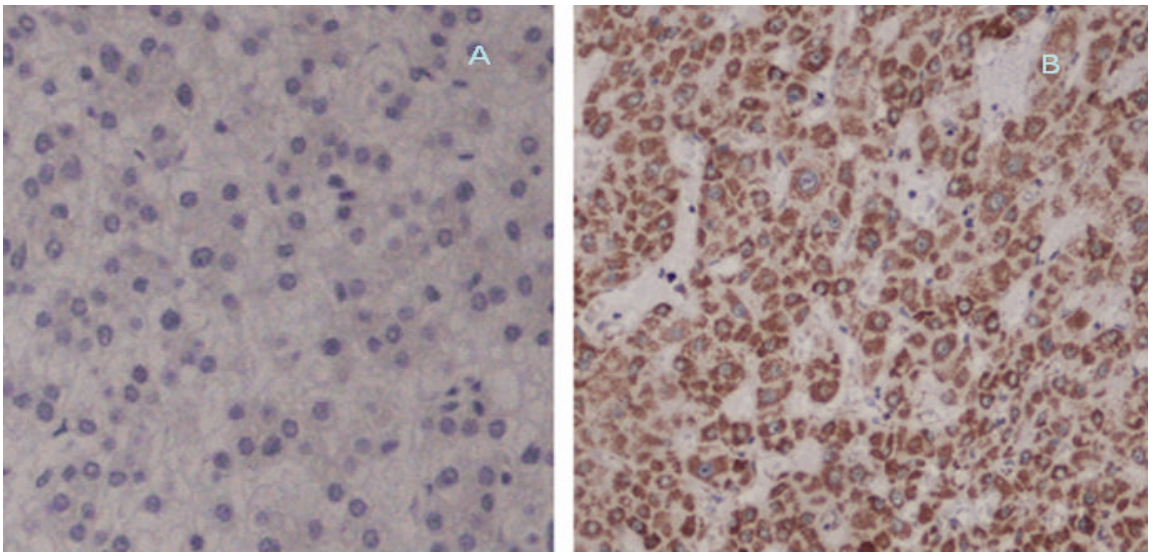

Figura 11. Padrões de imuno-expressão para Citocromo c A) Caso negativo em CHC grau histológico III B) Caso positivo em CHC grau histológico IV.

4.3 Relação entre as variáveis imuno-histoquímicas e clínico-patológicas

4.3.1 Parâmetros clínico-patológicos e apoptose

4.3.1.1 Avaliação da associação entre apoptose e gênero

Não houve diferença estatisticamente significativa entre a positividade da proteína Caspase 3 clivada, a qual representa um produto final da ativação dos processos que conduzem à apoptose gerando o índice apoptótico, conforme o gênero.

Tabela 7: Apoptose e gênero (sexo)

		Feminino	Masculino	Total
		N (%)	N (%)	N (%)
Apoptose	0 a 1 por 1000	7 (20,6)	27 (79,4)	34 (100)
	2 a 10	2 (28,6)	5 (71,4)	7 (100)
	>10	9 (30,0)	21 (70,0)	30 (100)
Total		**18 (25,4)**	**53 (74,6)**	**71 (100)**

(p=0,674, Pearson Chi-Square)

4.3.1.2 Comparação da apoptose na neoplasia e em tecido não tumoral

As amostras de tecido tumoral apresentaram índice apoptótico quase 3 vezes maior do que no tecido hepático não tumoral (p= 0,01, Wilcoxon), com média 3,642 ± ,8,3457 no tecido tumoral Vs 0,965 ± 3,09 no tecido não neoplásico (cirrótico ou normal) (p=0,01, Wilcoxon).

Tabela 8 – Apoptose no tumor e amostra não-neoplásica

		Tecido Tumoral	**Tecido não neoplásico**
		Frequência (%)	**Frequência (%)**
Válidos	0 a 1 por 1000	36 (47,3)	45 (86,5)
	2 a 10	7 (9,1)	5 (9,6)
	>10	33 (43,4)	2 (3,9)
	Total	76 (100)	52 (100)
Não Válidos		3	27
	Total	79	79

4.3.1.3 Avaliação da associação entre apoptose nas amostras de CHC conforme presença ou não de cirrose no tecido hepático não-tumoral

Apesar de não haver diferença estatisticamente significativa entre o índice apoptótico no CHC comparadas a presença ou ausência de cirrose hepática no tecido hepático circunjacente, 71,9% de altas taxas de apoptose (>10 corpos apoptóticos /1000 células) foi verificado em tecido com presença de cirrose, contra 28,1% em tecidos com ausência de cirrose .

Tabela 9 – Apoptose no CHC conforme presença de cirrose no fígado circunjacente

		Apoptose			
		0 a 1 por 1000	2 a 10	>10	Total
		N (%)	N (%)	N (%)	N (%)
Cirrose	Não	11 (31,4)	4 (57,1)	9 (28,1)	26 (32,4)
	Sim	24 (68,6)	3 (42,9)	23 (71,9)	51 (67,6)
Total		35 (100)	7 (100)	32 (100)	77 (100)

(p=0,327, Pearson Chi-Square)

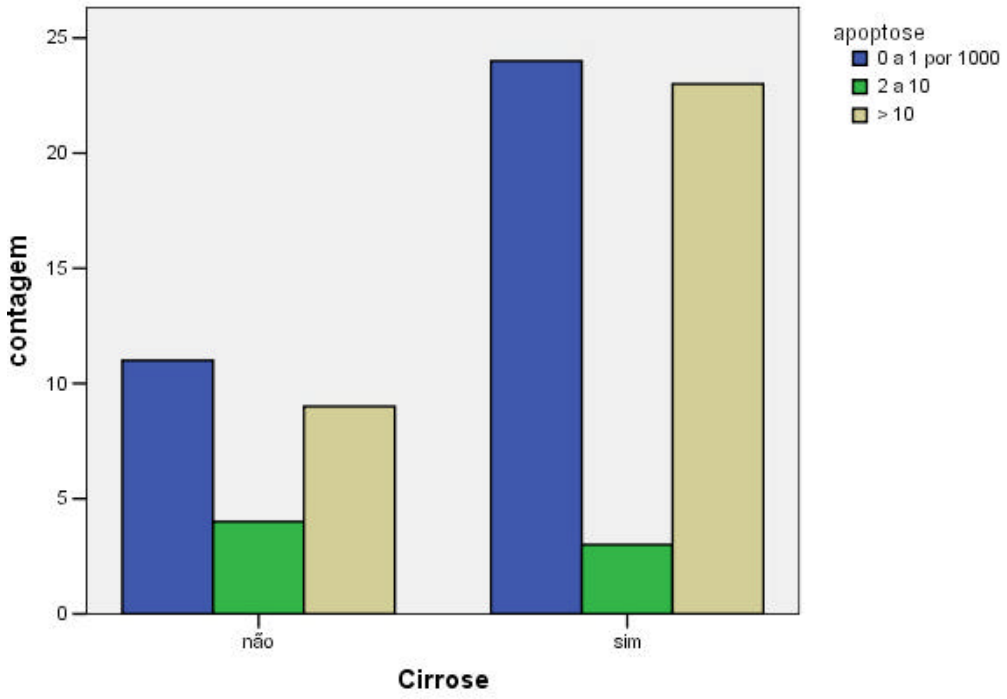

Gráfico 1: Apoptose e presença de cirrose

4.3.1.4 Avaliação da associação entre apoptose e invasão vascular

Em nossa série, 40% das amostras com baixo índice apoptótico apresentavam invasão vascular. Quando analisamos moderado e alto índice apoptótico, a invasão vascular esteve presente em 57,1% e 51,6%, respectivamente, mostrando não haver associação significativa entre maior índice e maior invasão vascular.(p=0,538)

Tabela 10 – Apoptose e invasão vascular

		Apoptose			
		0 a 1 por 1000	2 a 10	>10	Total
		N (%)	N (%)	N (%)	N (%)
Invasão Vascular	Não	21 (60)	3 (42,9)	15 (48,4)	39 (53,4)
	Sim	14 (40)	4 (57,1)	16 (51,6)	34 (46,6)
Total		**35 (100)**	**7 (100)**	**31 (100)**	**73 (100)**

(p=0,538, Pearson Chi-Square)

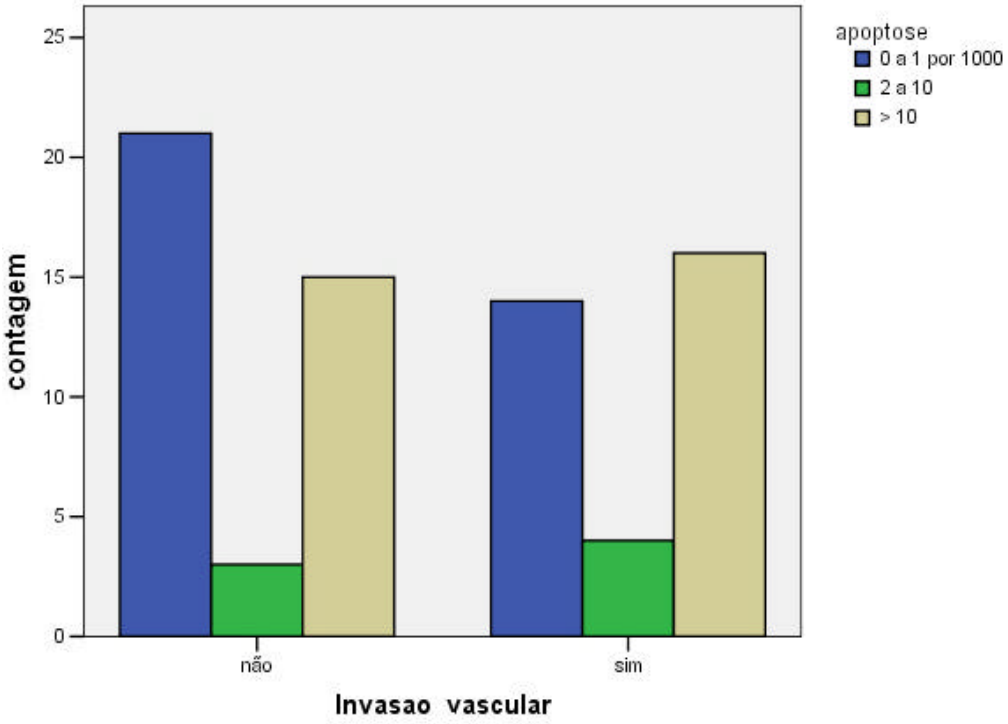

Gráfico 2: Apoptose e invasão vascular

4.3.1.5 Avaliação da associação entre apoptose e grau de Edmondson-Steiner

Verificamos tendências estatísticas ao compararmos o índice apoptótico com os graus de Edmondson-Steiner. Quanto maior o grau, maior foi a apoptose. (p=0,08)

Tabela 11 – Apoptose e graus de Edmondson-Steiner

		Apoptose			
		0 a 1 por 1000	**2 a 10**	**>10**	**Total**
		N (%)	**N (%)**	**N (%)**	**N (%)**
Edmondson	1 e 2	11 (30,6)	2 (28,6)	3 (9,1)	16 (21,1)
	3 e 4	25 (69,4)	5 (71,4)	30 (90,9)	60 (78,9)
Total		**36 (100)**	**7 (100)**	**33 (100)**	**76 (100)**

(p=0,08, Pearson Chi-Square)

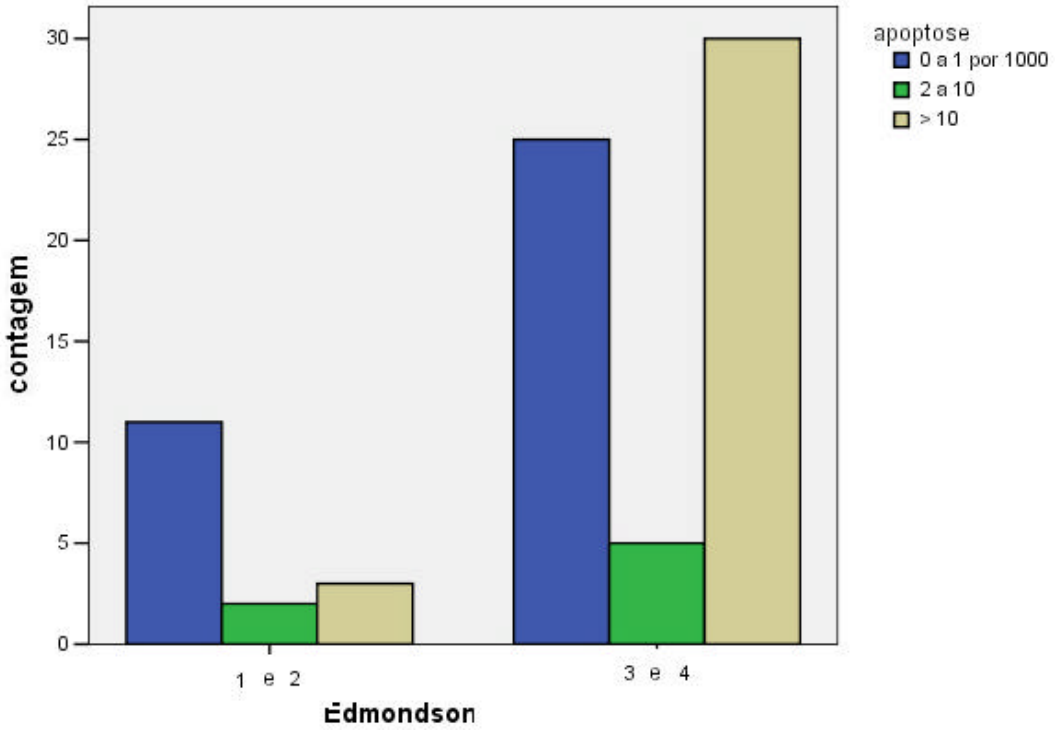

Gráfico 3: Apoptose e grau de Edmondson-Steiner

4.3.1.6 Avaliação da associação entre apoptose e tamanho do tumor

Em nossa casuística, o tamanho do tumor parece não estar associado com a progressão do índice apoptótico (9,6 cm no grupo com 0 a 1 Nº corpos/1000 células, 8,5cm no grupo 2 a 10 e 5,3cm no grupo com mais de 10 corpos apoptótico/1000 células. (p=0,35, Kruskal-Wallis).

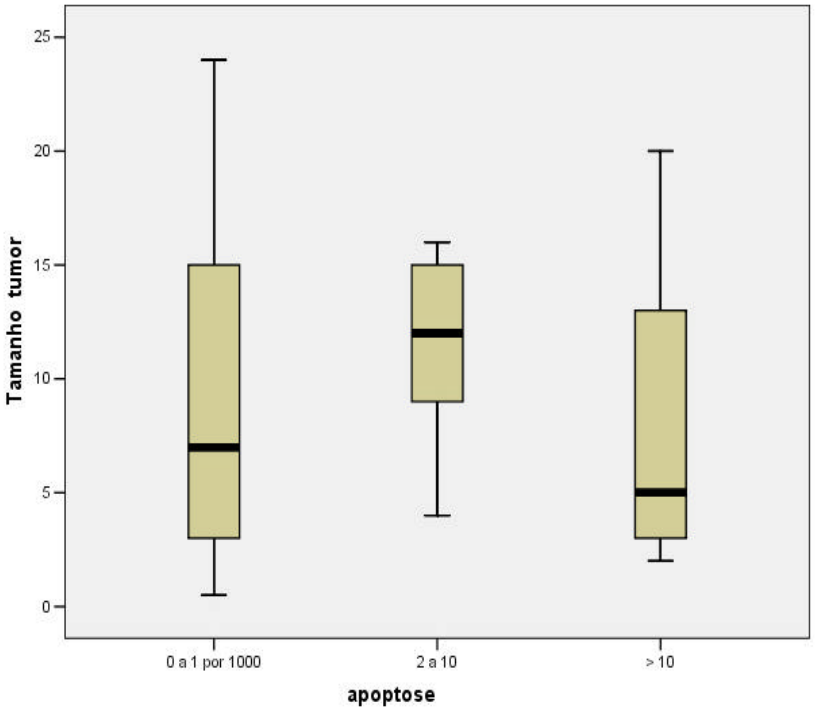

Gráfico 4: Apoptose e tamanho do tumor

4.3.2 Parâmetros clínico-patológicos e p53

4.3.2.1 Avaliação da associação entre a imuno-expressão da proteína p53 e gênero

Não houve diferença estatisticamente significativa entre a imuno-expressão da proteína p53, conforme o gênero.

Tabela 12 – Imuno-expressão de p53 e Gênero

		Feminino	Masculino	Total
		N (%)	N (%)	N (%)
P53	Pouco (0 / 1+ / 2+)	15 (78,9)	39 (73,6)	54 (75)
	Muito (3+ / 4+)	4 (21,1)	14 (26,4)	18 (25)
Total		**19 (100)**	**53 (100)**	**72 (100)**

(p=0,643, Pearson Chi-Square)

4.3.2.2 Avaliação da associação entre a imuno-expressão da proteína p53 no CHC e presença de cirrose

Encontramos maior imuno-expressão da proteína p53 nos casos de CHC ocorrendo em fígado cirrótico quando comparados com as neoplasias ocorrendo em fígado não-cirrótico (p=0,02).

Tabela 13 – Imuno-expressão de p53 e presença de cirrose

		Cirrose		
		Não	**Sim**	**Total**
		N (%)	**N (%)**	**N (%)**
P53	Pouco (0 / 1+ / 2+)	22 (91,7)	34 (66,7)	56 (74,7)
	Muito (3+ / 4+)	2 (8,3)	17 (33,3)	19 (25,3)
	Total	**24 (100)**	**51 (100)**	**75 (100)**

(p=0,02, Pearson Chi-Square)

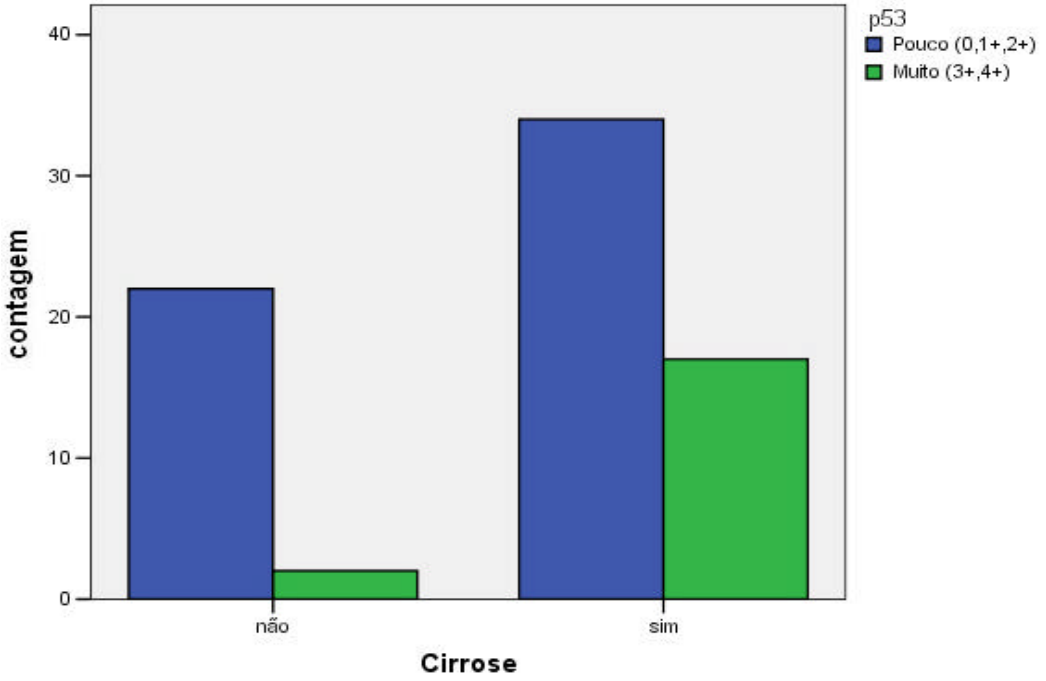

Gráfico 5: p53 e presença de cirrose

4.3.2.3 Avaliação da associação entre a imuno-expressão da proteína p53 e a presença de invasão vascular

Os resultados demonstram que os casos com maior imuno-expressão de p53 apresentavam mais frequentemente invasão vascular. (p=0,045)

Tabela 14 – Imuno-expressão de p53 e invasão vascular

		Invasão Vascular		
		Não	Sim	Total
		N (%)	N (%)	N (%)
P53	Pouco (0 / 1+ / 2+)	32 (84,2)	23 (63,9)	55 (74,3)
	Muito (3+ / 4+)	6 (15,8)	13 (36,1)	19 (25,7)
	Total	**38 (100)**	**36 (100)**	**74 (100)**

(p 0,045, Pearson Chi-Square)

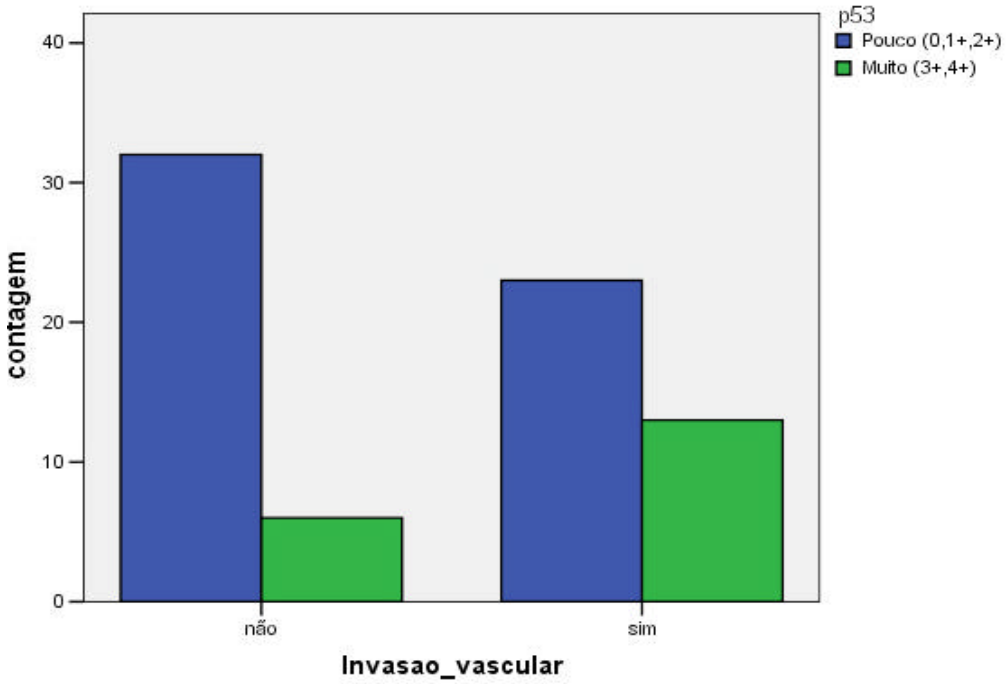

Gráfico 6: Imuno-expessão de p53 e invasão vascular

4.3.2.4 Avaliação da associação entre a imuno-expressão de p53 e grau de Edmondson-Steiner

Os graus 3 e 4 de Edmondson-Steiner apresentaram maior imuno-expressão da proteína p53. Dentre o grupo com 3+ e 4+ de positividade para proteína p53 não se observaram casos com graus 1 e 2 de Edmondson-Steiner (p=0,008).

Tabela 15 – Imuno-expressão de p53 e graus de Edmondson-Steiner

		Edmondson		
		1 e 2	**3 e 4**	**Total**
		N (%)	**N (%)**	**N (%)**
P53	Pouco (0 / 1+ / 2+)	16 (100)	41 (67,2)	57 (74,0)
	Muito (3+ / 4+)	0 (0)	20 (32,8)	20 (26,0)
	Total	**16 (100)**	**61 (100)**	**77 (100)**

(p=0,008, Pearson Chi-Square)

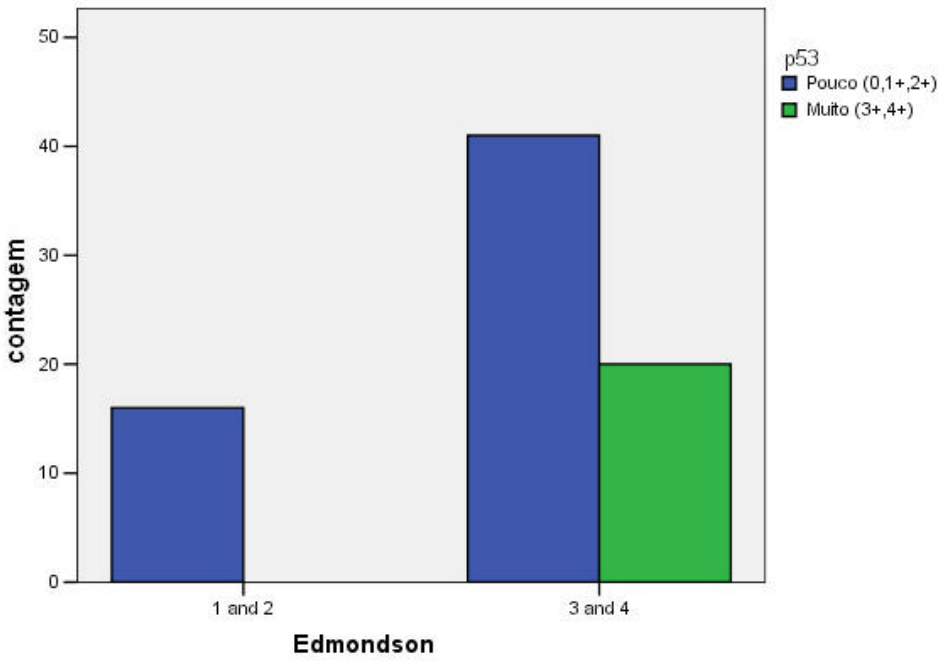

Gráfico 7: Imuno-expressão de p53 e grau de Edmondson-Steiner

4.3.2.5 Avaliação da relação entre a imuno-expressão de p53 e tamanho do tumor

Ainda que o tamanho médio dos carcinomas com positividade maior de p53 (grupos de 3+ e 4+) tenham apresentado tamanho médio maior (11,81cm+- 22,69cm) que os que apresentavam menor reatividade para p53 (8,14cm+- 14,072cm), tal índice não se mostrou estatisticamente significante (p=0, 731).

Tabela 16 – Imuno-expressão de p53 e tamanho do tumor

P53	Média	N	Desvio Padrão
Pouco (0 / 1+ / 2+))	8,1462	52	14,0723
Muito (3+ / 4+)	11,8111	18	22,6988
Total	**9,0886**	**70**	**15,6107**

(p=0,731, Mann-Whitney)

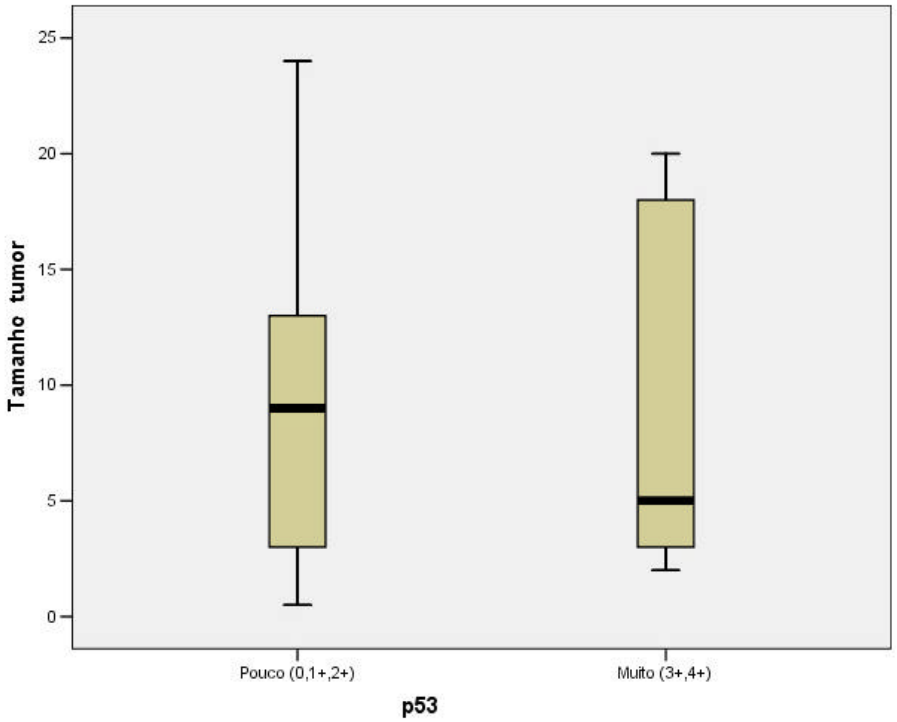

Gráfico 8: Imuno-expressão de p53 e tamanho do tumor

4.3.3 Parâmetros clínico-patológicos e Bax

4.3.3.1 Avaliação da associação entre a proteína Bax e gênero

Não houve associação estatisticamente significativa entre a imuno-expressão da proteína Bax conforme o gênero.

Tabela 17 – Imuno-expressão de Bax e gênero

		Feminino	Masculino	Total
		N (%)	N (%)	N (%)
BAX	Pouco (0 / 1+ / 2+)	11 (55,0)	28 (52,8)	39 (53,4)
	Muito (3+ / 4+)	9 (45,0)	25 (47,2)	34 (46,6)
	Total	**20 (100)**	**53 (100)**	**73 (100)**

(p 0,868, Pearson Chi-Square)

4.3.3.2 Avaliação da associação entre a proteína Bax no CHC e presença de cirrose

Os valores das classes de imuno-expressão de Bax tiveram valores semelhantes (51% no agrupamento de 0,1 e 2+ e 49% no agrupamento de 3 e 4+), não sendo observada associação estatisticamente significativa entre a imuno-expressão de Bax e a presença ou ausência de cirrose hepática.

Tabela 18 – Imuno-expressão de Bax e presença de cirrose

		Cirrose		
		Não	Sim	Total
		N (%)	N (%)	N (%)
BAX	Pouco (0 / 1+ / 2+)	15 (60)	26 (51)	41(53,9)
	Muito (3+ / 4+)	10 (40)	25 (49)	35 (46,1)
	Total	**25 (100)**	**51 (100)**	**76 (100)**

(p=0,459, Pearson Chi-Square)

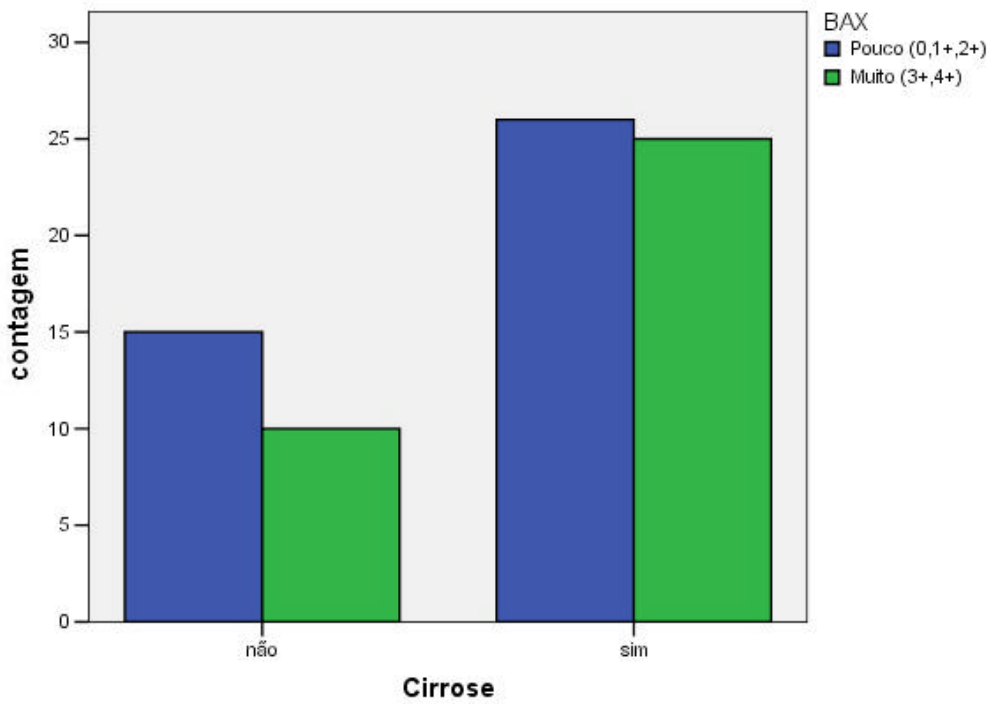

Gráfico 9: Imuno-expressão de Bax e presença de cirrose

4.3.3.3 Avaliação da associação entre a proteína Bax e invasão vascular

Não houve associação estatisticamente significativa entre a imuno-expressão de Bax e a presença de invasão vascular.

Tabela 19 – Imuno-expressão de Bax e invasão vascular

		Invasão Vascular		
		Não	Sim	Total
		N (%)	N (%)	N (%)
BAX	Pouco (0 / 1+ / 2+)	18 (46,2)	23 (63,9)	41 (54,7)
	Muito (3+ / 4+)	21 (53,8)	13 (36,1)	34 (45,3)
	Total	**39 (100)**	**36 (100)**	**75 (100)**

(p=0,123, Pearson Chi-Square)

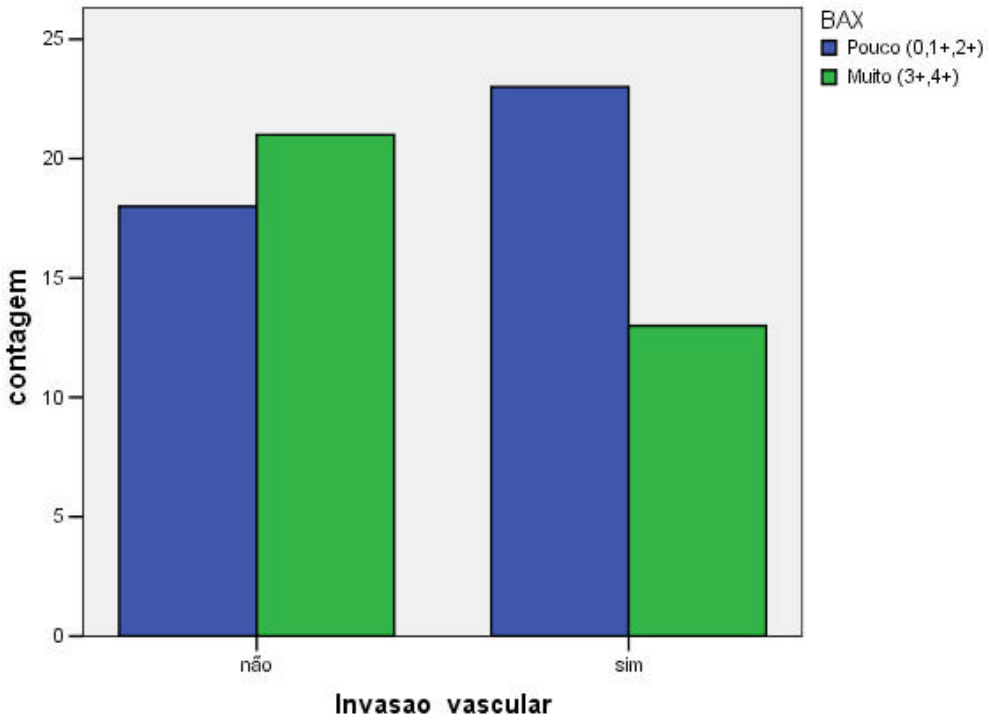

Gráfico 10: Imuno-expressão de Bax e invasão vascular

4.3.3.4 Avaliação da associação entre a proteína Bax e grau de Edmondson-Steiner

Não houve diferenças estatisticamente significativas entre o grau de Edmondson-Steiner e a imuno-expressão da proteína Bax.

Tabela 20 – Imuno-expressão de Bax e graus de Edmondson-Steiner

		Edmondson		
		1 e 2	3 e 4	Total
		N (%)	N (%)	N (%)
BAX	Pouco (0 / 1+ / 2+)	9 (52,9)	33 (54,1)	42 (53,8)
	Muito (3+ / 4+)	8 (47,1)	28 (45,9)	36 (46,2)
	Total	**17 (100)**	**61 (100)**	**78 (100)**

(p=0,933, Pearson Chi-Square)

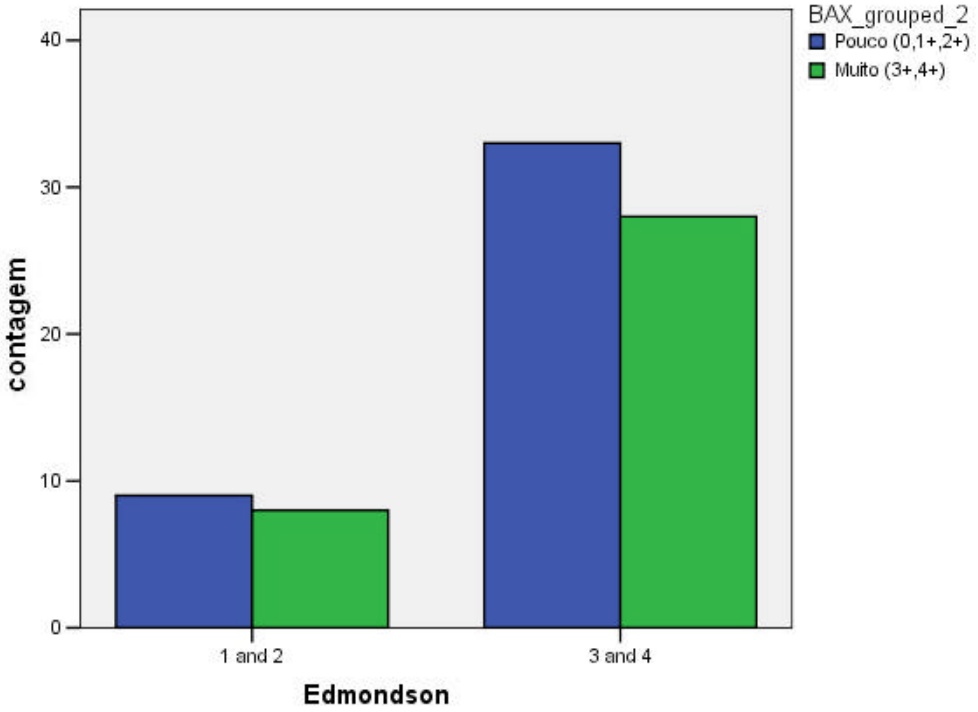

Gráfico 11: Bax e grau de Edmondson-Steiner

4.3.3.5 Avaliação da associação entre a proteína Bax e tamanho do tumor

Neoplasias maiores apresentaram tendência à maior imuno-expressão de Bax com tamanho médio maior (10,33cm ± 16,98cm) no grupo de 3 e 4+ de positividade de Bax comparados com o tamanho médio (7,92cm± 16,19cm) no grupo de 0,1 e 2+ de positividade de Bax (p=0,096).

Tabela 21 – Imuno-expressão de Bax e tamanho do tumor

BAX	Média	N	Desvio Padrão
Pouco (0 / 1+ / 2+)	7,9237	38	16,19377
Muito (3+ / 4+)	10,3364	33	16,98346
Total	**9,0451**	**71**	**16,49053**

(p=0,096, Mann-Whitney).

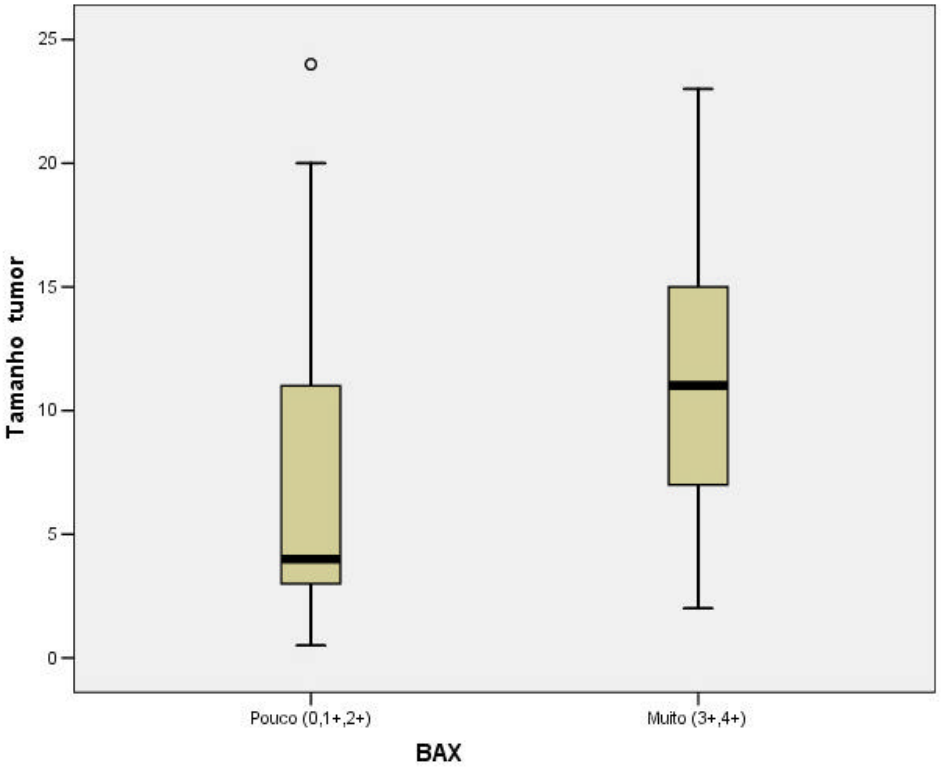

Gráfico 12:Imuno-expressão de Bax e tamanho do tumor

4.3.4. Parâmetros clínicopatológicos e Citocromo c

4.3.4.1 Avaliação da associação entre citocromo c e gênero (sexo)

Não encontramos diferenças estatisticamente significativa entre a imuno-expressão de citocromo c, conforme o gênero.

Tabela 22 – Imuno-expressão de Citocromo c e gênero

		Feminino	Masculino	Total
		N (%)	N (%)	N (%)
Citocromo C	Pouco (0 / 1+ / 2+)	4 (20)	6 (11,1)	10 (13,5)
	Muito (3+ / 4+)	16 (80)	48 (88,9)	64 (86,5)
Total		20 (100)	54 (100)	74 (100)

(p=0,321, Pearson Chi-Square)

4.3.4.2 Avaliação da associação entre a proteína citocromo c no CHC e a presença de cirrose

Na presente casuística, a superexpressão de Citocromo c (3 e 4+) foi detectada em 94,1% dos CHC com informe de cirrose, e em 73,1% dos casos de CHC sem cirrose, evidenciando a forte associação entre a superexpressão de citocromo c e presença de cirrose (p=0,009).

Tabela 23 – Imuno-expressão de Citocromo c e presença de cirrose

		Cirrose		
		Não	**Sim**	**Total**
		N (%)	**N (%)**	**N (%)**
Citocromo C	Pouco (0 / 1+ / 2+)	7 (26,9)	3 (5,9)	10 (13)
	Muito (3+ / 4+)	19 (73,1)	48 (94,1)	67 (87)
Total		**26 (100)**	**51 (100)**	**77 (100)**

(p=0,009, Pearson Chi-Square)

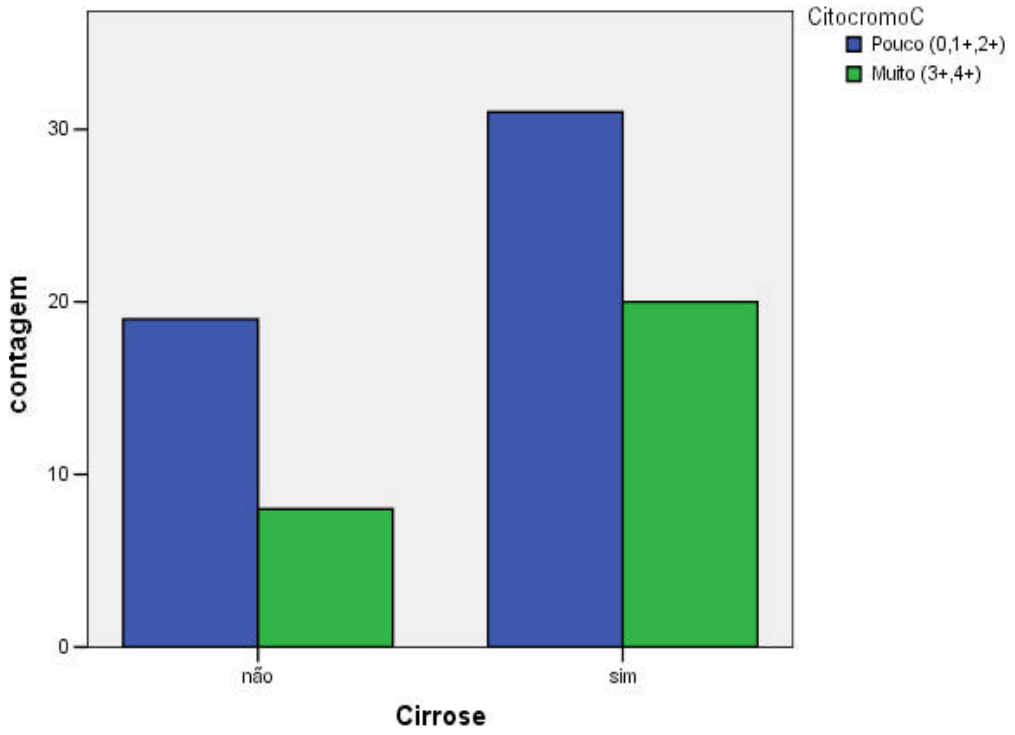

Gráfico 13: Imuno-expressão de Citocromo c e presença de cirrose

4.3.4.3 Avaliação da relação entre a imuno-expressão de citocromo c e invasão vascular

Com invasão ou sem invasão vascular, os valores de imuno-expressão de citocromo c mantiveram-se semelhantes entre si, não evidenciando associação estatisticamente significativa entre estas variáveis.

Tabela 24 – Imuno-expressão de Citocromo c e invasão vascular

		Invasão Vascular		
		Não	**Sim**	**Total**
		N (%)	**N (%)**	**N (%)**
Citocromo C	Pouco (0 / 1+ / 2+)	5 (12,8)	5 (13,5)	10 (13,2)
	Muito (3+ / 4+)	34 (87,2)	32 (86,5)	66 (86,8)
Total		**39 (100)**	**37 (100)**	**76 (100)**

(p=0,929, Pearson Chi-Square)

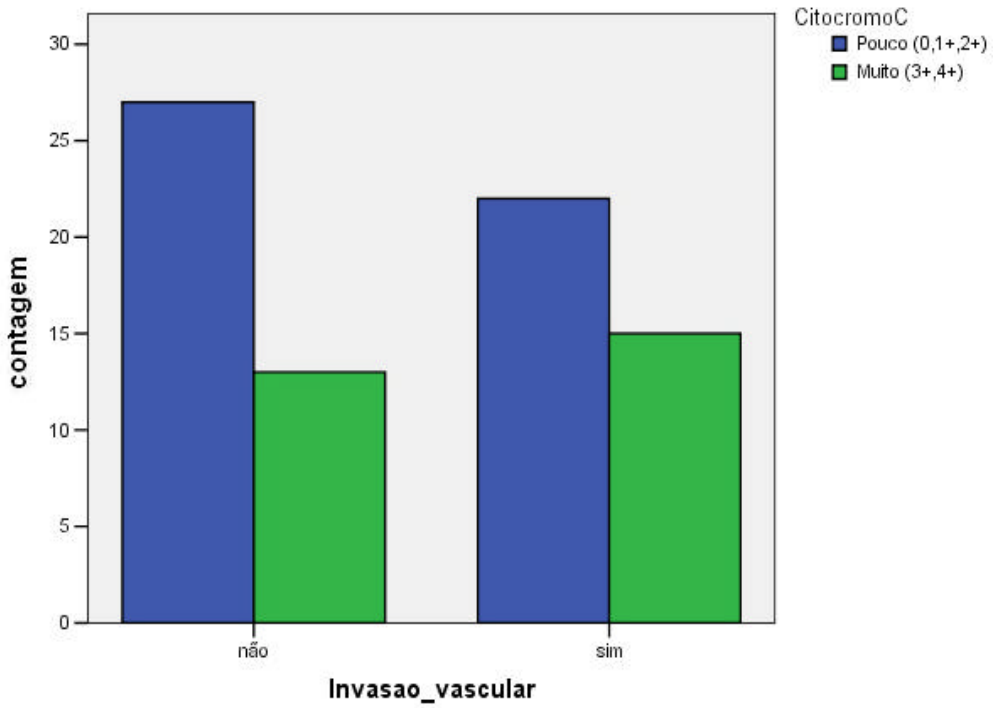

Gráfico 14: Citocromo c e invasão vascular

4.3.4.4 Avaliação da relação entre a expressão de citocromo c e grau de Edmondson-Steiner

Não houve diferenças estatisticamente significativas entre o grau de Edmondson-Steiner e a imuno-expressão de citocromo c.

Tabela 25 – Imuno-expressão de Citocromo c e Graus de Edmondson - Steiner

		Edmondson		
		1 e 2	**3 e 4**	**Total**
		N (%)	**N (%)**	**N (%)**
Citocromo C	Pouco (0 / 1+ / 2+)	2 (11,8)	8 (12,9)	10 (12,7)
	Muito (3+ / 4+)	15 (88,2)	54 (87,1)	69 (87,3)
Total		**17 (100)**	**62 (100)**	**79 (100)**

(p=0,9, Pearson Chi-Square)

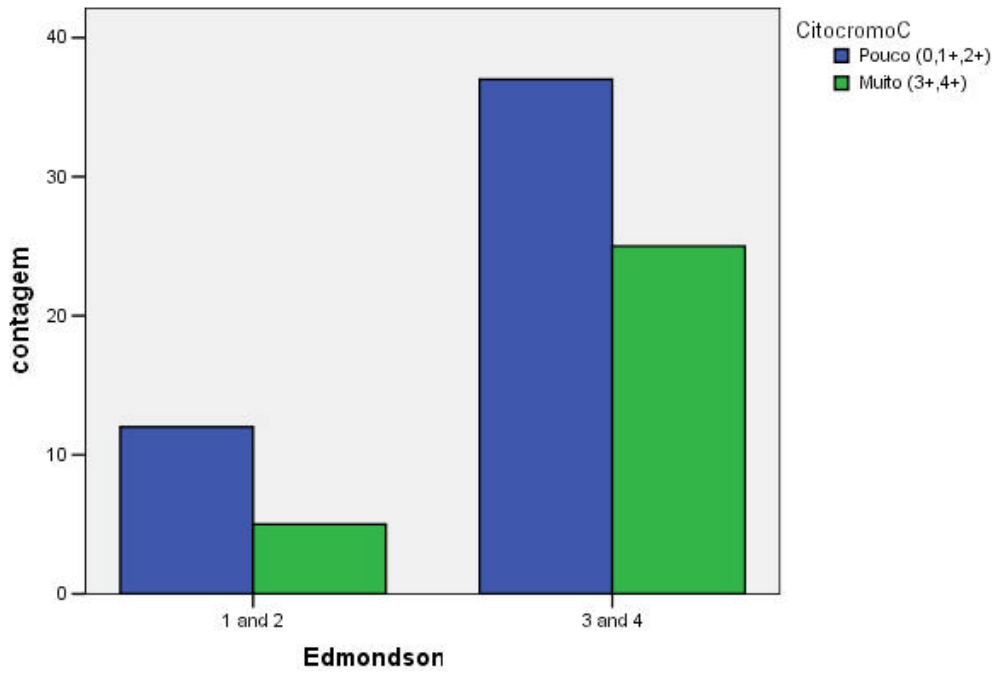

Gráfico 15: Imuno-expressão de Citocromo c e grau de Edmondson

4.3.4.5 Avaliação da associação entre a proteína citocromo c e tamanho do tumor

A média de tamanho do tumor manteve-se praticamente igual em relação a baixa e superexpressão de citocromo c (8,60cm±7,58cm no agrupamento 0,1 e 2+ Vs 8,98cm±17,45cm no agrupamento 3 e 4+), não representando significância estatística (p=0,519, Mann Whitney).

Tabela 26 – Imuno-expressão de Citocromo c e tamanho do tumor

Citocromo C	Média	N	Desvio Padrão
Pouco (0 / 1+ / 2+)	8,6000	10	7,58581
Muito (3+ / 4+)	8,9871	62	17,45264
Total	**8,9333**	**72**	**16,40142**

(p=0,519, Mann Whitney)

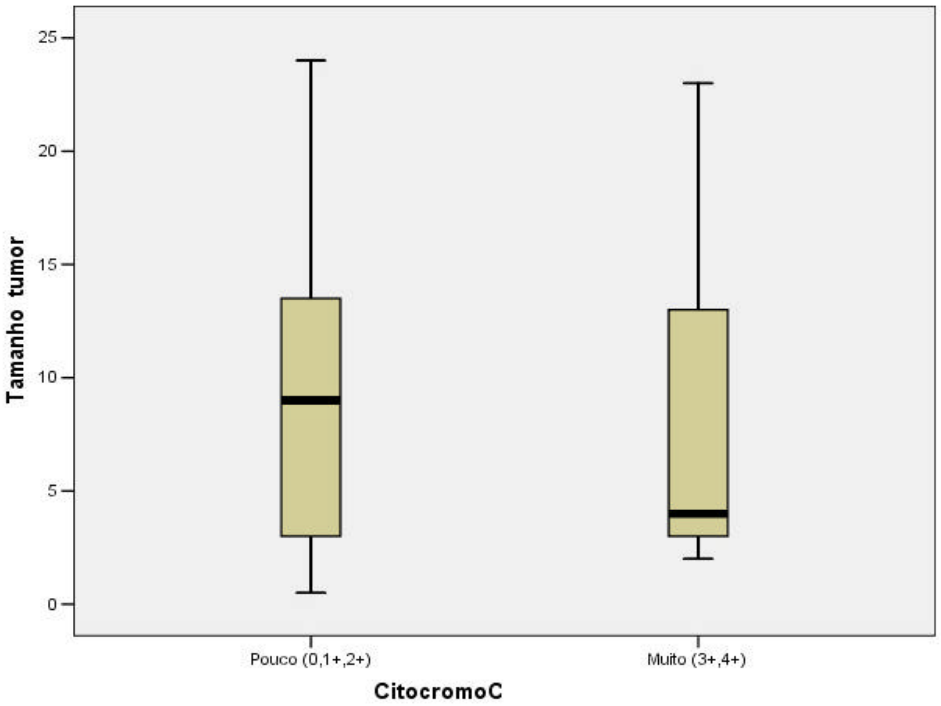

Gráfico 16: Imuno-expressão de Citocromo c e tamanho do tumor

4.4 Relação entre as distribuições das variáveis imuno-histoquímicas

4.4.1 Avaliação da associação entre apoptose e imuno-expressão da proteínas p53

No agrupamento adotado neste estudo (0,1 e 2+ versus 3,4+) não encontramos associação estatisticamente significante.

Tabela 27 – Apoptose e imuno-expressão de p53

		Apoptose			
		0 a 1 por 1000	**2 a 10**	**>10**	**Total**
		N (%)	**N (%)**	**N (%)**	**N (%)**
P53	Pouco (0 / 1+ / 2+)	29 (80,6)	5 (83,3)	22 (66,7)	56 (74,7)
	Muito (3+ / 4+)	7 (19,4)	1 (16,7)	11 (33,3)	19 (25,3)
	Total	**36 (100)**	**6 (100)**	**33 (100)**	**75 (100)**

(p=0,365, Pearson Chi-Square)

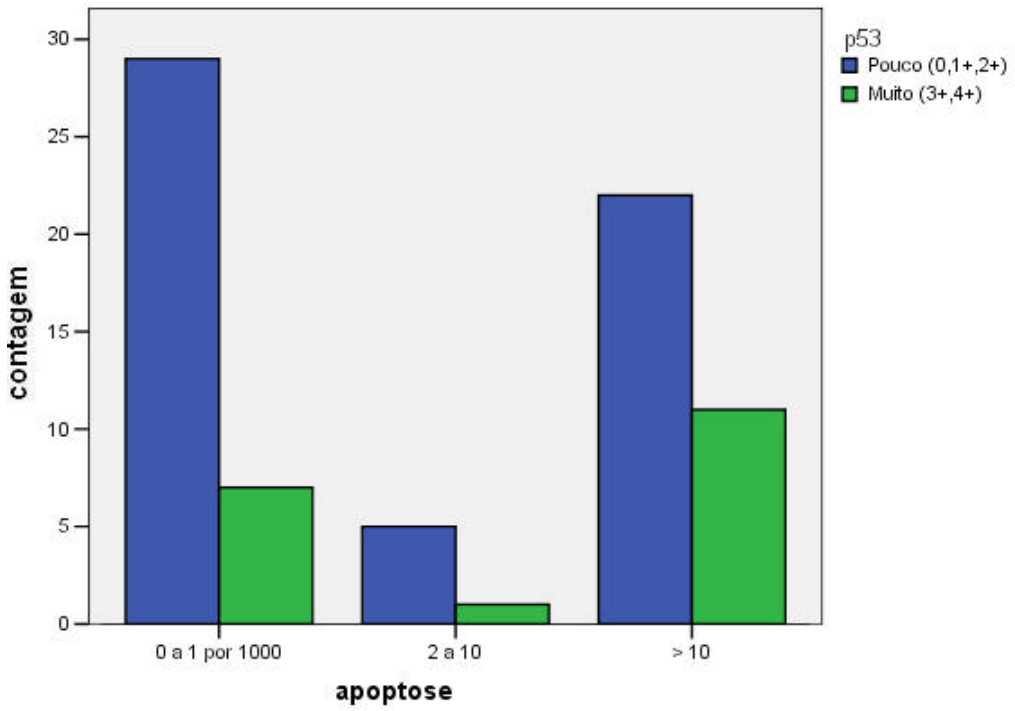

Gráfico 17: Apoptose e imuno-expressão de p53

4.4.2 Avaliação da associação entre apoptose e imuno-expressão da proteínas Bax

Não houve associação estatisticamente significativa entre o índice apoptótico e imuno-expressão da proteína Bax.

Tabela 28 – Apoptose e imuno-expressão de Bax

		Apoptose			
		0 a 1 por 1000	2 a 10	>10	Total
		N (%)	N (%)	N (%)	N (%)
BAX	Pouco (0 / 1+ / 2+)	19 (52,8)	3 (42,9)	18 (54,5)	40 (52,6)
	Muito (3+ / 4+)	17 (47,2)	4 (57,1)	15 (45,5)	36 (47,4)
	Total	**36 (100)**	**7 (100)**	**33 (100)**	**76 (100)**

(p=0,853, Pearson Chi-Square)

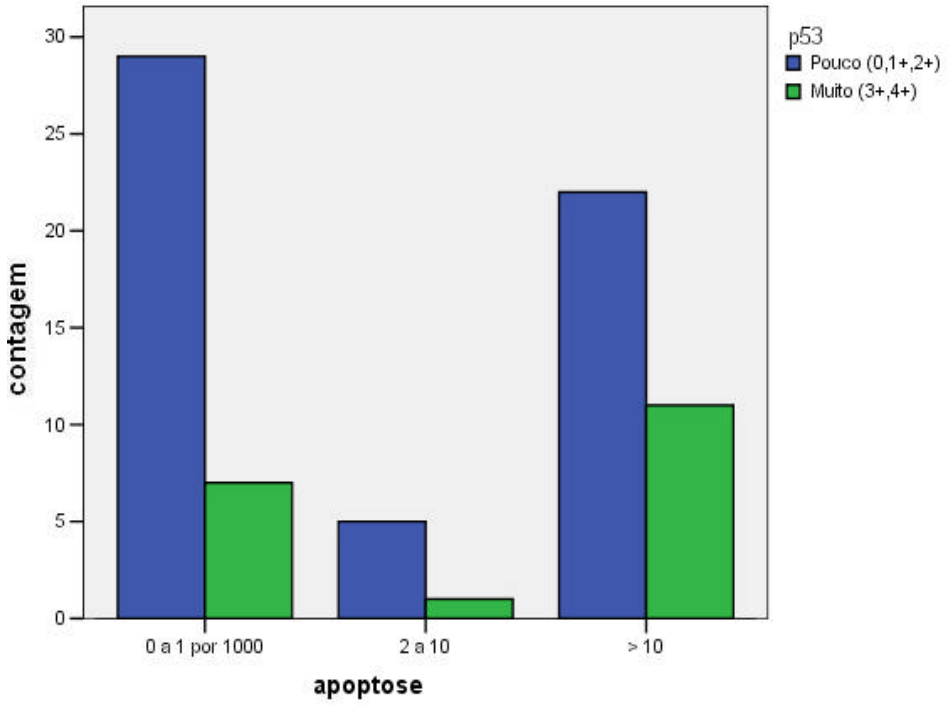

Gráfico 18: Apoptose e imuno-expressão de Bax

4.4.3 Avaliação da associação entre o índice apoptótico e imuno-expressão da proteína citocromo c

Não houve associação estatisticamente significativa entre o índice apoptótico e imuno-expressão da proteína citocromo c, não correlacionando maior imuno-expressão de citocromo c e maior índice apoptótico.

Tabela 29 – Apoptose e imuno-expressão de Citocromo c

		Apoptose			
		0 a 1 por 1000	**2 a 10**	**>10**	**Total**
		N (%)	**N (%)**	**N (%)**	**N (%)**
citocromo c	Pouco (0 / 1+ / 2+)	21 (58,3)	5 (71,4)	21 (63,3)	47 (61,8)
	Muito (3+ / 4+)	15 (41,7)	2 (28,6)	12 (36,4)	29 (38,2)
Total		**36 (100)**	**7 (100)**	**33 (100)**	**76 (100)**

(p=0,777, Pearson Chi-Square)

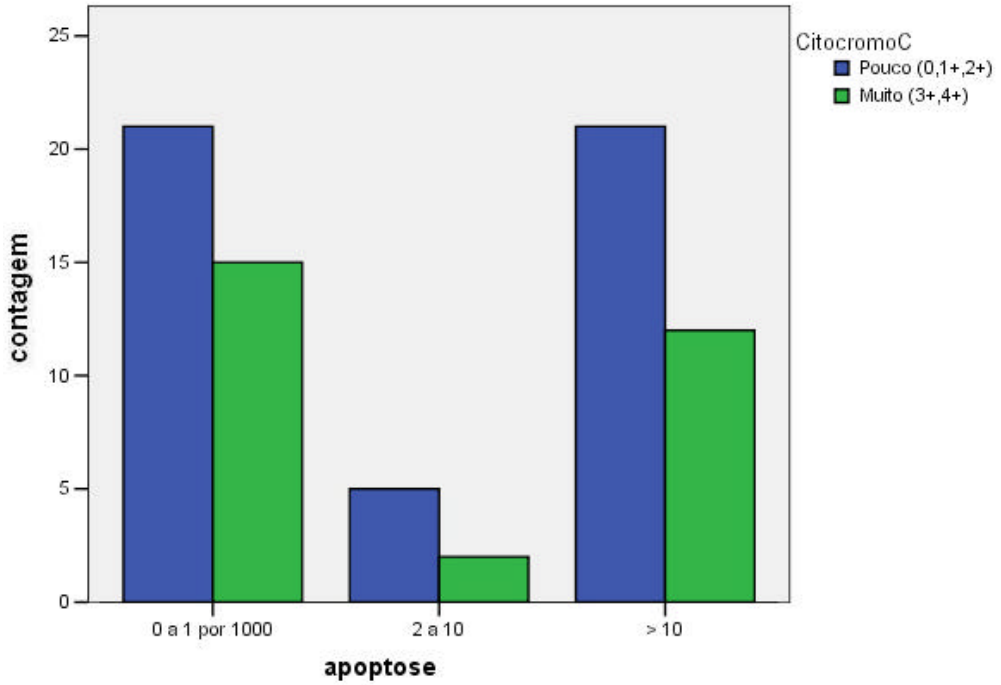

Gráfico 19: Apoptose e imuno-expressão de Citocromo c

4.4.4 Avaliação da associação entre a imuno-expressão das proteínas Bax e p53

Não foram encontradas associação estatisticamente significativas entre a distribuição da imuno-expressão de p53 quando comparado com a imuno-expressão da proteína Bax. Encontramos maior superexpressão de p53 em relação a superexpressão de Bax, havendo inclusive tendência a relação inversa.

Tabela 30 – Imuno-expressão de Bax e p53

		P53		
		Pouco (0 / 1+ / 2+)	Muito (3+ / 4+)	Total
		N (%)	N (%)	N (%)
BAX	Pouco (0 / 1+ / 2+)	27 (48,2)	14 (70)	41 (53,9)
	Muito (3+ / 4+)	29 (51,8)	6 (30)	35 (46,1)
Total		56 (100)	20 (100)	76 (100)

(p=0,093, Pearson Chi-square)

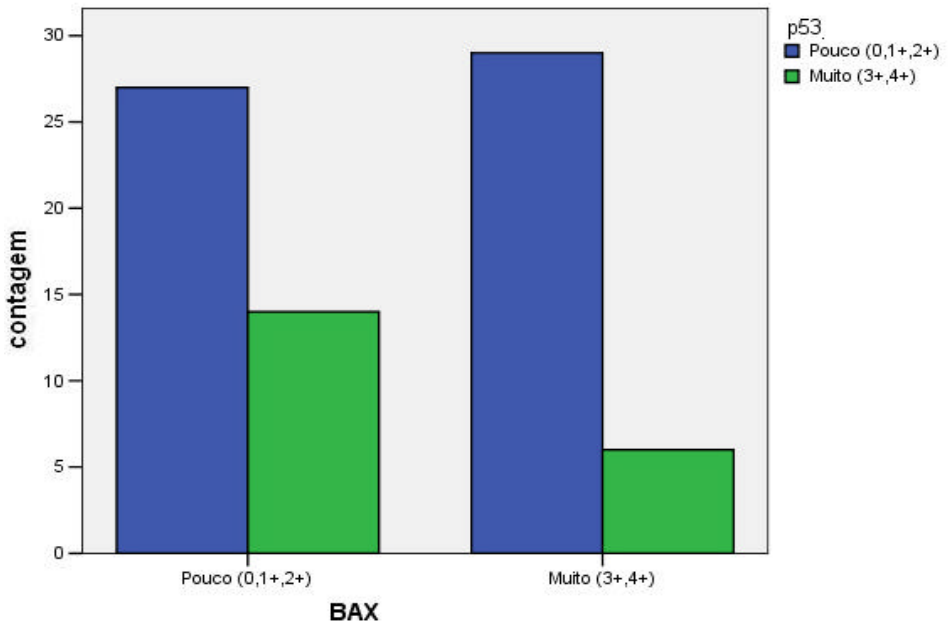

Gráfico 20: Imuno-expressão de Bax e p53

4.4.5 Avaliação da associação entre a imuno-expressão das proteínas p53 e Citocromo c

A superexpressão de citocromo c foi acentuada no grupo de superexpressão de p53**.** Todos os 20 casos com expressão graus 3 e 4+ para proteína p53 apresentaram forte reatividade para proteína citocromo c. Por outro lado, apenas 47 (82,5% dos 57 casos com reatividade baixa para p53 mostraram forte reatividade para citocromo c.

Tabela 31 – Imuno-expressão de p53 e Citocromo c

		Citocromo C		
		Pouco (0 / 1+ / 2+)	Muito (3+ / 4+)	**Total**
		N (%)	**N (%)**	**N (%)**
P53	Pouco (0 / 1+ / 2+)	10 (17,5)	47 (82,5)	57 (100)
	Muito (3+ / 4+)	0 (0)	20 (100)	20 (100)
Total		**10 (13,0)**	**67 (87,0)**	**77 (100)**

(p=0,045, Pearson Chi-Square)

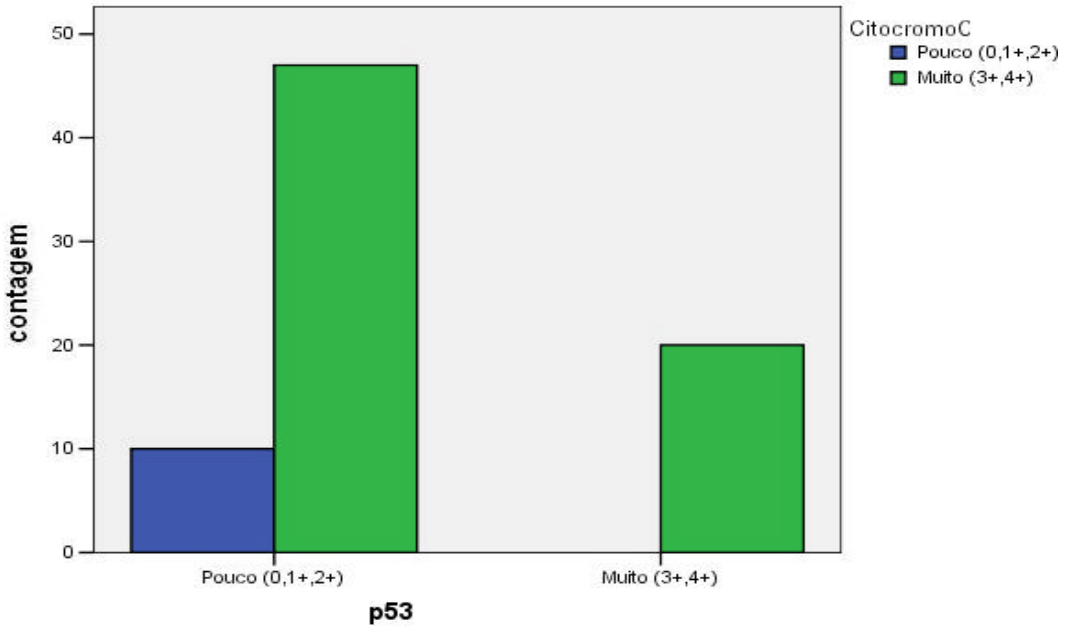

Gráfico 21: Imuno-expressão de p53 e Citocromo c

4.4.6 Avaliação da associação entre a imuno-expressão das proteínas Bax e Citocromo c

Não houve associação estatisticamente significativa entre a imuno-expressão de Bax quando comparado com a imuno-expressão da proteína citocromo c.

Tabela 32 – Imuno-expressão de Bax e Citocromo c

		Citocromo C		
		Pouco (0 / 1+ / 2+)	Muito (3+ / 4+)	**Total**
		N (%)	**N (%)**	**N (%)**
BAX	Pouco (0 / 1+ / 2+)	6 (66,7)	36 (52,2)	42 (53,8)
	Muito (3+ / 4+)	3 (33,3)	33 (47,8)	36 (46,2)
Total		**9 (100)**	**69 (100)**	**78 (100)**

(p=,412, Pearson Chi-square)

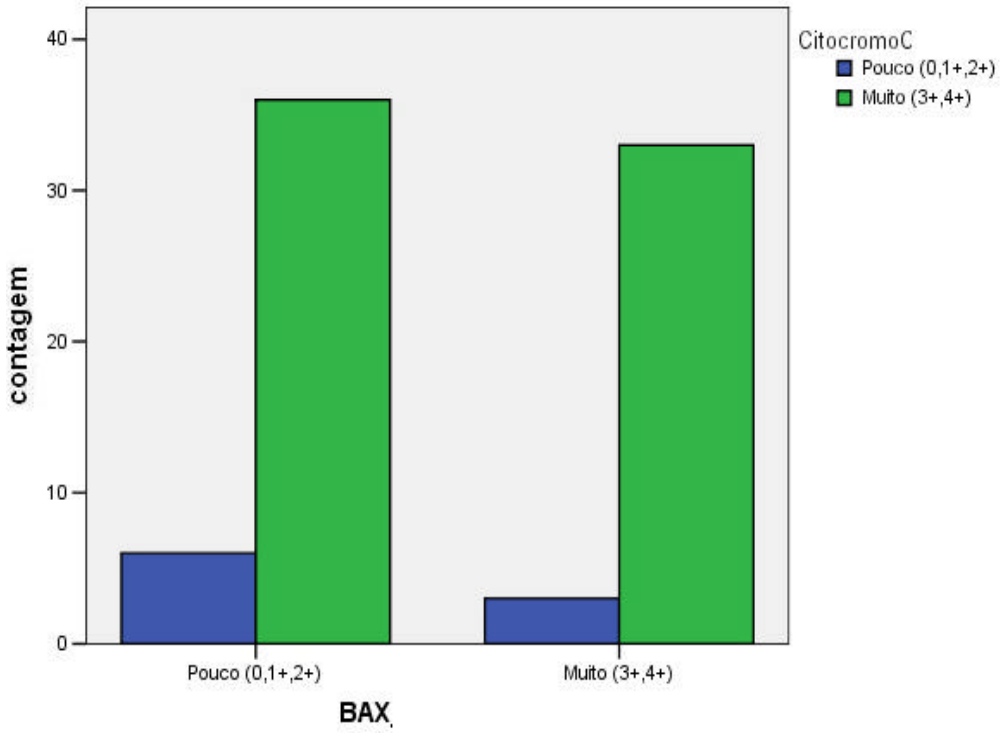

Gráfico 22: Imuno-expressão de Bax e Citocromo c

5- DISCUSSÃO

O Carcinoma hepatocelular corrresponde a 80% a 90% das neoplasias malignas primárias do fígado (Lau, *et al.*, 2008). Atualmente, é um dos tumores malignos mais comuns em todo o mundo, com mais de 500.000 novos casos diagnosticados anualmente, sendo a terceira principal causa de morte relacionada a neoplasias (Narciso *et al.,* 2006; Wu *et al.,* 2006).

Como muitos outros tumores, o desenvolvimento do carcinoma hepatocelular ocorre através de um processo com várias alterações genômicas e epigenéticas que regulam a expressão de genes, levando a ativação de oncogenes, rearranjos cromossômicos e inativação ou perda de genes supressores tumorais (But *et al*, 2008; Tischoff *et al.,* 2008).

A determinação dos genes possivelmente envolvidos na fisiopatologia do CHC pode ser útil não só na identificação de marcadores da doença como de possíveis alvos terapêuticos.

Em nosso estudo, correlacionamos a expressão de proteínas da via intrínseca de apoptose mediada pelo gene p53 (via mitocondrial) em amostras de tecido hepático neoplásico com as variáveis clinico-patológicas obtidas dos laudos anatomo-patológicos destes pacientes, bem como o índice apoptótico nestes tecidos e em tecido não neoplásico , merecendo destaque a comparação entre aqueles que incidem em fígados com ou sem cirrose.

5.1. P53 no carcinoma Hepatocelular e em condições relacionadas

O gene p53 tem importância crítica na carcinogênese, entretanto o papel preciso de sua expressão alterada em diferentes etapas ainda é incerto (Bitomsky & Thomas G., 2009).

Pelo fato de a meia-vida desta proteína selvagem (*wild-type*) ser curta, aproximadamente 20 minutos, sua detecção imuno-histoquímica é quase sempre relacionada às formas mutadas (May *et al.*,1999).

Nesta investigação, nos propusemos a investigar a imunoexpressão de p53 e de proteínas relacionadas à via mitocondrial da apoptose em uma série de casos de CHC.

A prevalência de casos com imunoexpressão da proteína p53 em mais de 10% das células em nossa série foi de 35,1% (e a prevalência de 26% quando considerados os casos com imunoexpressão > 25%). Tal valor guarda semelhança próxima com os valores encontrados por Paiva e colegas (2002), 35,71%, e por Alves e colegas (2004), 35,2%, em populações brasileiras. A literatura dos vários continentes registra valores variados de imunoexpressão de p53 pelo método imuno-histoquímico, entre 23,1% e 62,5% (sendo 35,1% a mediana dos valores por nós levantados nos artigos de Moghaddam e colegas (2007), Anzola e colegas (2004), Cengiz e colegas (2003), Marwoto e colegas (2000), Itoh e colegas (2000), Qin e colegas (1997), Bourdon e colegas (1995), Wee e colegas (1995), Ng e colegas (1994), Hsu e colegas (1993)). Tal diversidade de valores reflete a

diversidade das populações estudadas, nas quais os variados fatores etiológicos relacionados à carcinogênese do carcinoma hepatocelular têm peso diferenciado, como definições quanto ao ponto de corte para considerar-se um caso como positivo para p53 ao nível da imunoexpressão.

Nossos dados consolidam o achado de maior imunoexpressão de p53 em CHC de alto grau (3 e 4 de Edmondson e Steiner), quando comparados aos de baixo grau (p=0,008). Alves e colegas (2004) já encontrara associação semelhante estudando CHC de população brasileira. Cengiz e colegas (2003), Itoh e colegas (2000), Qin e colegas (1997), Naka e colegas (1998), Ng e colegas (1994) e D'Errico e colegas (1994), estudando outras populações também encontraram associação parecida.

Nossa hipótese é que, a despeito das possíveis variações da etiologia em jogo na carcinogênese do CHC , valores maiores de imunoexpressão da proteína p53 geralmente estão associados a alto grau histológico. Entretanto, alguns poucos autores encontraram ausência de associação estatísticamente significante entre essas duas variáveis (Nakopoulou e colegas., 1995; Wee e colegas., 1995), tendo Zhang e colegas (2009) relatado associação inversa.

Em 2003, estudando a correlação entre a mutação do gene p53 e recorrência do CHC I-Shyan *et al (*2003) encontraram em 79 pacientes a distribuição quanto ao grau de Edmondson grau: I:II:III:IV 4:30:42:3 (5.1:38.0:53.2:3.8%), sendo de iguais proporções neste estudo, além da associação clinica-patológica também semelhantes de 52 (65.8%) do sexo

masculino e média de idade de 52.4±16.6, sendo na presente série os valores de 53 (67,5%) e 53±17,3, respectivamente.

Stroescu *et al (*2008) encontraram positividade imuno-histoquímica para proteína p53 em amostras de CHC em 68% dos casos; em 85,7% delas grau histológico de acordo com Edmondson Steiner III e IV vs 42,1% delas grau histológico de Edmondson Steiner I e II, concluíndo que houve alta positividade de imuno-expressão de p53 em células com histologia indiferenciada (85,7 vs 42,1%) conforme os critérios de Edmondson Steiner (graus III e IV vs graus I e II). Tal estudo e outros concluíram que cânceres com mutação no gene p53 tendem a ser mais agressivos e quimio-resistentes que outros de similares tecidos expressando p53 selvagem (Tho *et al*, 1993 ; Li *et al,* 1996; Stroescu *et al,* 2008).

Naquele mesmo artigo de Stroescu e colegas, os resultados de expressão de PCNA, VEGF, Ki67 e p53 em CHC tiveram valor prognóstico similar ao encontrado na graduação de Edmondson-Steiner e tamanho do tumor. Foi também demonstrado que tumores com alto índice de PCNA e superexpressão de p53 e VEGF tendem a ter maior risco de recorrência.

Segundo Shi *et al (*2002) o grau de atipia celular (Edmondson-Steiner) aumenta com os estágios clínicos do CHC (extensão ou diâmetro do tumor).

Em nossa série, também foi estatisticamente significante (p=0,02) a associação entre maior imunoexpressão da proteína p53 em CHC relationado a fígado cirrótico, possivelmente indicando que as agressões a que os hepatócitos estão sujeitos durante o processo de cirrotização também têm potencial de alterarem o status da proteína p53. Tretiakova e

colegas (2010) chegaram a achado semelhante utilizando-se de metodologia diversa, quando observaram maior expressão de RNA mensageiro do gene p53 em CHC associados a cirrose.

Assim como Jeng e colegas (2000), também encontramos associação entre maior imunoexpressão de p53 e invasão vascular em nossos CHC (p=0,045). Porém, quando comparamos o tamanho dos CHC de nossa amostra com a imunoexpressão de p53, não encontramos significância estatística (p=0,731). Por outro lado, Cengiz e colegas (2003), Qin e colegas (1997) e Naka e colegas (1998) evidenciaram níveis maiores de imunoexpressão da proteína p53 em CHC com tamanho maior. Acreditamos que nosso achado negativo possa estar relacionado a termos tratado a variável tamanho como contínua, já que pelo menos um trabalho a estratifica utilizando 5,0 cm como ponto de corte (Qin e colegas., 1997).

5.2 A importância da via mitocondrial da apoptose no Carcinoma hepatocelular

Chipuk e colaboradores (2004) já haviam comprovado experimentalmente que a proteína p53 é suficiente para tornar ativa a proteína Bax a qual então permeabiliza a mitocôndria e promove o programa apoptótico, evidenciando a importância desta proteína na tradução da informação gerada pelo p53 em um comando cujo resultado final é a morte celular por apoptose, e consequentemente embasando que a via

mitocondrial da apoptose mediada pelo p53 passa necessariamente pela proteína Bax.

A importância desta via de apoptose para o estudo da carcinogênese hepática pode ser ilustrada pelo estudo de Han e colaboradores (2007) os quais documentaram a expressão de Bax em implantes tumorais de carcinoma hepatocelular transplantados em camundongos nus, seja ao nível da expressão proteica seja ao nível da expressão de mRNA. Estes autores perceberam 40 % de imunoexpressão no grupo controle de camundongos com implantes tumorais sem tratamento quimioterápico, e, além disso, perceberam aumento para uma expressão de até 90 % no grupo de camundongos cujos implantes tumorais foram tratados com o quimioterápico bufalina.

Duan e colaboradores (2005), utilizando modelo experimental animal de carcinoma hepatocelular induzido por aflatoxina, também detectaram aumento da expressão protéica da proteína Bax (e também da proteína p53) por imuno-histoquímica, durante a formação do carcinoma hepatocelular.

Seguindo esta linha de raciocínio, nós estudamos a imunoexpressão da proteína Bax em carcinomas hepatocelulares. Embora 46,2 % dos carcinomas hepatocelulares de nossa série tenham sido positivos (>25 % das células neoplásicas expressavam a proteína Bax), valor este que se aproxima do valor encontrado no grupo controle de Han (2007), quando os dados de expressão foram confrontados com as variáveis patológicas de cirrose prévia, invasão vascular, grau histológico de Edmondson-Steiner ,

não constatamos nenhuma associação estatisticamente significante, o que nos leva a crer que apesar de uma parcela expressiva de nossa casuística de carcinomas hepatocelulares apresentarem níveis altos de imunoexpressão de Bax, tal expressão não constitui um subgrupo morfologicamente peculiar, excetuando-se uma tendência a associação com tumores maiores (p=0,09).

Em consonância com nossos resultados, Guo e colaboradores (2002), também não encontraram associação entre a expressão de Bax e as variáveis sexo, gênero, diferenciação tumoral e estadio, ao estudarem a expressão de mRNA em casuística de carcinomas hepatocelulares humanos. Ikeguchi e colegas (2002) também não encontraram associação entre a expressão gênica de Bax por PCR em tempo real e as variáveis clinicopatológicas por eles estudadas.

Verificamos maior consonância ainda entre nossos resultados e os de Chiu e colaboradores (2003), principalmente quando associamos o fato de nós não termos encontrado associação entre a imunoexpressão de p53 e de Bax, uma vez que em seu artigo Chiu (2003) descreveu regulação elevada de Bax nos carcinomas hepatocelulares por ele estudados, porém sem distinção da expressão de Bax entre o grupo imunopositivo para p53 quando comparado com o grupo imunonegativo para p53. Por outro lado, Garcia e colaboradores (2002), avaliando as variáveis sobrevida e letalidade (não estudadas em nossa pesquisa), detectaram maior sobrevida e menor

letalidade justamente nos carcinomas hepatocelulares com maior imunoexpressão de Bax, tanto na análise univariada quanto na multivariada.

Investigações acerca de Bax, sugerem-na como agente sensibilizado por drogas quimioterápicas e indutor da apoptose (Zheng *et al.,* 2005).

Não encontramos na literatura informes sobre correlação entre os graus de Edmondson Steiner e imuno-expressão de Bax, não havendo no presente estudo diferenças significativas.

Uma vez que a via mitocondrial da apoptose mediada pelo p53 passa pela liberação do citocromo c mitocondrial, Chipuk (2004), continuamos nossa análise avaliando a imunoexpressão de citocromo c em nossa série de casos de carcinoma hepatocelular. Quanto maior foi a imunoexpressão nuclear da proteína p53 maior foi a imunoexpressão de citocromo c. Embora não tenhamos encontrado na literatura um artigo que utilizasse metodologia semelhante a nossa, Simbula e colaboradores (2007), trabalhando com modelo experimental envolvendo a indução de apoptose em linhagens celulares de hepatocarcinoma, verificaram dados na mesma linha dos nossos quando demonstraram que a indução de apoptose pelo ácido alfa-lipoico promoveu a ativação de p53 e a liberação de citocromo c mitocondrial. Por outro lado, Yang e colaboradores (2008), não chegaram às mesmas evidências, pois verificaram que a alfafetoproteína modulava a via da apoptose mitocondrial sinalizada pelo p53 justamente através da inibição da liberação do citocromo c quando a pesquisaram modelo experimental em cultivo de linhagens de hepatocarcinoma.

5.3. Apoptose em Carcinoma Hepatocelular e em condições relacionadas

No presente estudo, a apoptose foi estudada através do índice apoptótico em amostras neoplásicas e não neoplásicas, tanto em fígados cirróticos como nos não cirróticos.

Os nossos dados apontam que amostras de tecido tumoral (CHC) têm mais apoptose (média 3,642/1000 células) quando comparadas com o tecido não tumoral (média = 0,965/1000 células).

Peng *et al* (2001) compararam apoptose em CHC e em tecido não neoplásico cirrótico, encontrando índice apoptótico menores nos Hepatocarcinomas ($p < 0,001$), com relação inversa em nosso estudo , já que obtivemos índice apoptótico quase 3 vezes maior no tecido tumoral quando comparado com o tecido hepático não tumoral ($p=0,01$). Podemos especular como possíveis causas de tal discrepância o uso de método TUNEL para pesquisa de apoptose naquele trabalho, enquanto aqui o marcador foi a imuno-expressão de caspase-3 clivada. Talvez mais importante seja o fato daquele trabalho abordar casuística chinesa. Mesmo que não explicitado naquele texto, precisamos levar em consideração que possivelmente a participação causal do vírus da hepatite B naquela população é muito superior à do nosso estudo, reforçando nossa idéia de que causas diferentes de CHC podem estar associadas a ativação diferente de mecanismos de carcinogênese.

Zeng e colaboradores (2010), em recente estudo mais centrado na angiogênese em CHC relatam, como achado secundário, índice apoptótico maior em amostras tumorais de casos sem presença de cirrose. Quando efetuamos tal comparação em nossa casuística, não encontramos diferenças na apoptose em CHC ocorrendo em fígado cirrótico versus não cirrótico (p=0,327).

Estudo experimental em ratos demonstrou a atividade apoptótica gradualmente aumentada do tecido hepático para estágio pré-neoplásico e progredindo para Carcinoma hepatocelular (Grasl-kraupp, *et al.,*1997).

Índices apoptóticos diminuídos podem associar-se a base do desenvolvimento de carcinomas hepatocelulares (Rodrigues *et al*., 2000).

Pizem *et al* (2001), determinaram a atividade proliferativa e a apoptose dos hepatócitos neoplásicos e não neoplásicos em 16 pacientes portadores de CHC . Tais autores não obtiveram diferenças entre a atividade apoptótica nos CHC em comparação com tecido não tumoral. Salientaram, entretanto, que a detecção morfológica convencional mostrou-se mais sensível para corpos apoptóticos que a pesquisa mediante TUNEL. De outra parte, em trabalho de Dukers *et al.,* 2002, foi evidenciado que os níveis de positividade de caspase 3 clivada correlacionam-se fortemente com a morfologia típica da célula em apoptose, sugerindo a alta expressão desta proteína em estágios avançados da hepatocarcinogênese.

Verificamos, então , que os diversos estudos mostram resultados heterogêneos, possivelmente porque refletem realidades diversas em populações de sítios geográficos muito diferentes e tumores com etiologia

variável, sendo ainda marcante a diferença de técnicas de avaliação e de (semi)quantificação do índice apoptótico. Por este motivo, sendo nosso presente trabalho baseado na imunomarcação de caspase-3 clivada, talvez o melhor marcador disponível atualmente, com amplificação mediante sistema de polímeros curtos evitando reação com biotina endógena e quantificação com contagem de todas as células reativas da amostra ganha especial peso no informe de que as células do CHC exibem maior índice apoptótico que o tecido não neoplásico circunjacente.

O percentual relativamente baixo de CHC em cirróticos (66,3%) em nosso trabalho decorre do fato da escolha da casuística ter por base a qualidade da amostra anatomopatologica, não refletindo o conjunto epidemiológico em nosso meio. Várias casuísticas brasileiras ou em outros países revelam maior prevalência de CHC em cirrose (Dias, 2003).

A associação entre cirrose hepática e CHC é enfatizada em muitas publicações (Carrilho *et al.,* 1993; Carrilho, 2001; Gonçalves *et al*., 1995), e o processo cirrótico pode determinar uma condição pré-neoplásica independentemente de sua etiologia (Johnson *et al.,* 1987; Borzio *et al.,* 1991; Libbrecht *et a*l., 2001), embora um possível mecanismo de ação direta do VHC venha sendo proposto por Sakamura *et al* (1995) baseado na propriedade de transformação da proteína NS3 viral. Uma vez estabelecida a cirrose, a taxa de evolução para o CHC é de 1% a 6% ao ano (Cottone *et al.,* 1994).

No Japão, a presença de nódulos regenerativos no fígado cirrótico referidos como nódulo macrorregenerativo ou hiperplasia adenomatosa,

atualmente denominada de nódulos displásicos parecem importantes na patogênese do Carcinoma hepatocelular de acordo com Arakawu *et al,* 1986. Na hepatocarcinogênese do fígado cirrótico, muitos autores daquele país sugerem que os nódulos displásicos podem ser importantes etapas no desenvolvimento do CHC (Arakawu *et al*.,1986 ; Kojiro *et al*.,1987 ; Ohta *et al*.,1987).

Nossos resultados constataram que o índice apoptótico não foi significativamente maior nos casos em que havia presença de cirrose (p=0,327) .

Sun e colegas (2000) investigando a relação do gene p21 e apoptose em CHC através da hibridização *in situ* para caspase 3 não encontraram relação desta proteína com dados clinicopatológicos como tamanho de tumor, sexo, idade e presença de metástases exceto grau de diferenciação (72% de moderado e alto grau de diferenciação apresentavam caspase 3 transcrita positiva, enquanto 38,1% dos pobremente diferenciados expressavam caspase 3 transcrita ($p < 0,05$), sugerindo que caspase 3 é correlacionada com o grau de diferenciação em CHC. Na presente série, o tamanho do tumor, sexo e idade também não se correlacionaram com apoptose mas contrastou com o referido trabalho quando o índice apoptótico, representado pela imunomarcação de caspase 3 clivada foi maior nos casos com histologia indiferenciada, sem associação estatisticamente significante.

Nan *et al* (2005) verificaram que os Hepatocarcinomas com graus de Edmondson-Steiner avançados nao correlacionaram com índice apoptótico

p=0,686, enquanto, em nosso estudo, tal relação atingiu níveis limítrofes (p=0,08) (Nan *et al*., 2005).

Na China, estudando a correlação de invasão tumoral e metástases em pacientes com diagnóstico de CHC, Xiao *et al* (2000) demonstraram a taxa apoptótica ser menor em pacientes portadores de tais aspectos quando comparada com pacientes sem estes achados. Em nosso estudo, não encontramos associação significativa entre o índice apoptótico e presença ou ausência de invasão vascular.

Muitos recentes estudos mostraram que Bcl-2 e bax são importantes na regulação da apoptose em neoplasias de próstata, mamária e gástrica (Li *et al*., 1997; Xue *et al*.,1999), mas não encontra-se na literatura relações entre regulação de genes da apoptose e índice apoptótico em Carcinoma hepatocelular (Xu *et al*., 2000).

O potencial uso da caspase-3 como fator prognóstico tumoral ainda não está bem estabelecido nos ensaios clínicos já realizados, embora autores encontraram correlação significativa da caspase-3 com fatores prognósticos e sobrevida (Hsia.,*et al*, 2004).

Os resultados apresentados indicam que a perda da regulação da apoptose parece ser processo importante para a progressão do CHC, e que pode ser resultado da mutação do gene p53 e seus transcritos. Adicionalmente, sendo a resistência à apoptose característica importante que diferencia os tumores que respondem dos que não respondem às estratégias terapêuticas convencionais (radioterapia, quimioterapia, cirurgia, etc.), o reconhecimento das diferenças na expressão das proteínas

envolvidas na apoptose pode propiciar o aparecimento de tratamentos moleculares alvos-específicos promissores para a diminuição da morbidade e mortalidade ocasionadas por essas neoplasias.

Essas evidências demonstram que a perda da expressão da proteína caspase 3 está associada a resistência a terapias e a apoptose em muitos tumores sumarizando a importância da desregulação deste mecanismo de morte celular no carcinoma hepatocelular, destacando também prováveis diferenças do mecanismo carcinogenético na presença ou não de cirrose.

CONCLUSÕES

1. O índice apoptótico avaliado pela quantificação da expressão de caspase-3 clivada;

   a. foi significativamente superior na neoplasia que nas amostras de tecido não-neoplásico.

   b. nas amostras neoplásicas, os carcinomas com graus histológicos maiores (g.3 e g.4) exibiram índices marginalmentes superiores de apoptose (p=0,08).

   Estas evidências demonstram a importância da desregulação deste mecanismo de morte celular no carcinoma hepatocelular, com maiores índices nos casos com evidências de maior gravidade.

2. A imuno-expressão de p53 mostrou-se maior nos carcinomas hepatocelulares de maior potencial biológico de gravidade, resultando significante sua associação com a presença de invasão vascular, graus histológicos maiores. Também relevante foi sua maior ocorrência nos CHC em fígados cirróticos.

3. A imuno-expressão de Bax apresentou apenas uma tendência a associação com o tamanho do tumor. A ausência de evidências de sua relação com todas as demais variáveis torna necessários outros estudos, eventualmente com usando outras técnicas para avaliação das diversas etapas da expressão gênica para melhor compreensão de seu papel no desenvolvimento do carcinoma hepatocelular.

4. A imuno-expressão do citocromo c no carcinoma hepatocelular mostrou-se associada à imuno-expressão de p53, coerente com dados de literatura que mostram papel importante do p53 na mediação da expressão do citocromo c na indução da apoptose pela via mitocondrial. Assim como detectado com p53, a expressão de citocromo c também mostrou maior positividade no CHC ocorrendo em fígado cirrótico. Tomados em conjunto, esses achados sugerem prováveis diferenças carcinogenéticas na presença ou não de cirrose hepática.

ANEXOS

Principais achados de estudo individualizados por caso;

Anexo A: Dados gerais da casuística

Dados clinico-patológicos							
Amostras	Idade	Sexo	Cirrose	Grau	Tamanho Tumor (cm)	Invasão Vascular	Etiologia
33-0261-0	61	0	0	4	9	0	ni
33-4110-0	55	1	0	3	12.5	1	2
34-6487-3	7	1	0	3	0,5	0	7
35-8112-8	11	1	0	3	4	0	2
37-9182-3	76	1	0	3	9	0	2
38-3546-4	42	1	0	3	1.0	1	7
38-7205-0	53	1	1	3	10	0	7
39-3837-9	28	0	0	3	9.0	1	2
40-1619-0	62	1	1	3	4.0	0	2
40-4914-4	64	1	1	3	2.3	0	1
41-2354-9	62	1	1	4	13,5	1	Ni
44-0588-9	65	1	1	3	1.5	0	1
44-1764-0	66	1	1	3	15	1	4
44-5261-5	73	1	1	3	4	1	1
45-3266-0	52	1	1	2	1.5	0	1
45-7081-2	64	0	1	3	3	0	7
46-7412-0a	62	0	1	3	3	0	1
46-7831-1	52	1	1	3	7	1	1
47-3319-3	18	1	1	3	2.5	0	7
47-3500-5	64	1	1	2	ni	0	1
48-0569-0	37	0	1	3	ni	1	2
48-2074-6	48	1	1	3	3	0	5
49-6429-2	53	0	1	3	2.5	0	1
50-0356-3	12	1	0	2	13	1	7
50-1144-2	41	1	1	4	20	1	1
50-3935-5	54	1	1	3	20	1	2
50-4946-6	66	0	0	2	11	1	Ni
50-8175-0	55	1	1	3	1.7	0	3
51-1976-6	58	1	0	2	13	1	7
51-4511-2	58	0	1	3	ni	0	Ni
52-8936-0	59	1	0	3	5	0	Ni
53-2848-9	21	1	1	3	18	1	2
53-9792-8	39	1	1	3	3	0	1
54-4313-0	64	0	0	2	3	1	1
54-4550-7	17	0	0	3	17	1	1
54-7218-0	39	1	0	2	23	0	7
54-8974-1	64	0	1	3	3.0	0	1
54-9164-9	24	0	0	2	24	1	Ni
55-5104-8	50	0	1	3	3.2	1	2

55-7673-3	69	0	0	3	6.4	1	7
56-1874-6	67	1	1	3	16	0	2
56-2624-2	80	1	1	3	2.3	0	1
56-3859-3	30	1	0	3	16	0	2
56-4440-2	54	1	1	3	3.0	1	2
57-5935-8	80	0	1	3	4.0	1	1
57-9083-2	45	1	0	3	7.0	1	3
58-0681-3	54	1	1	3	4.0	0	1
58-4778-8	49	1	1	3	ni	1	3
58-9693-2	69	0	0	2	12	1	Ni
63-1266-7	49	1	1	2	1.8	0	1
OC97 1628B	69	1	1	3	2.0	1	Ni
OC99 2527A	74	1	1	3	5.9	1	Ni
OC99 0647A	67	1	1	2	2.8	0	Ni
OC00 3935C	46	1	1	3	4	1	Ni
OC00 5013B	70	0	1	3	2	0	1
OC01 4298G	15	0	0	3	ni	ni	Ni
OC01 6899B	64	1	0	3	3.2	1	4
OC02 3568D	55	1	0	3	ni	0	Ni
OC02 4088D	71	1	0	3	3.5	1	Ni
OC02 5219D	58	1	0	3	6	0	Ni
OC02 6153E	53	1	1	4	3	1	1
OC02 3359F	49	1	1	3	2.5	0	2
OC03 0634D	48	1	1	3	1.2	0	Ni
OC03 1664E	48	1	1	3	4.5	0	1
OC03 2207B	66	1	1	4	4	1	4
OC03 2521B	50	1	ni	3	ni	ni	Ni
OC03 5374B	35	1	1	3	3	0	Ni
OC03 7044B	57	1	1	2	2	0	1
OC03 7527D	73	1	1	3	2.7	0	2
OC04 0901A	77	0	1	1	2.1	0	1
OC047315D	52	1	ni	3	ni	ni	Ni
OC04 8230D	65	1	1	3	4	1	1
OC04 8288	71	1	1	2	1,2	0	1
OC04 8513B	77	1	0	3	ni	1	Ni
OC04 8914B	70	0	1	3	1.5	1	1
OC05 1142A	72	1	0	2	1.3	1	1
OC05 3111G2	63	0	1	2	1.6	1	1
OC05 5382C	59	1	1	3	11	1	Ni
OC05 8434A	64	1	1	2	2	0	Ni

Legenda
Ni = não informado
1= sim 0= não
Etiologia: 1= HCV 2=HBV 3=HCV+HBV 4=EtOH
5= EtOH+HCV 6=EtOH+HBV 7= outros
Sexo: 0=feminino 1=masculino

Anexo B: Principais achados com relação a proteína P53

		p53 no tumor
Amostras	Tu1-positividade **%**	Tu1-positividade **+**
33-0261-0	10	1
33-4110-0	0	0
34-6487-3	10	1
35-8112-8	99	99
37-9182-3	0	1
38-3546-4	0	0
38-7205-0	10	1
39-3837-9	10	1
40-1619-0	0	0
40-4914-4	20	2
41-2354-9	100	4
44-0588-9	40	3
44-1764-0	10	1
44-5261-5	0	0
45-3266-0	10	1
45-7081-2	10	1
46-7412-0a	20	2
46-7831-1	10	1
47-3319-3	0	0
47-3500-5	0	0
48-0569-0	90	4
48-2074-6	10	1
49-6429-2	10	1
50-0356-3	0	0
50-1144-2	40	3
50-3935-5	80	4
50-4946-6	0	0
50-8175-0	10	1
51-1976-6	10	1
51-4511-2	10	1
52-8936-0	0	0
53-2848-9	100	4
53-9792-8	30	3
54-4313-0	99	99
54-4550-7	10	1
54-7218-0	0	0
54-8974-1	10	1
54-9164-9	0	0
55-5104-8	0	0
55-7673-3	10	1
56-1874-6	0	0
56-2624-2	0	0
56-3859-3	20	2

56-4440-2	20	2
57-5935-8	40	3
57-9083-2	20	2
58-0681-3	20	2
58-4778-8	10	1
58-9693-2	0	0
63-1266-7	0	0
OC97 1628B	100	4
OC99 2527A	60	4
OC99 0647A	0	0
OC00 3935C	40	3
OC00 5013B	80	4
OC01 4298G	0	0
OC01 6899B	0	0
OC02 3568D	20	2
OC02 4088D	10	1
OC02 5219D	100	4
OC02 6153E	90	4
OC02 3359F	30	3
OC03 0634D	10	1
OC03 1664E	10	1
OC03 2207B	90	4
OC03 2521B	80	4
OC03 5374B	0	0
OC03 7044B	10	1
OC03 7527D	100	4
OC04 0901A	0	0
OC047315D	10	1
OC04 8230D	10	1
OC04 8288	10	1
OC04 8513B	80	4
OC04 8914B	50	3
OC05 1142A	0	0
OC05 3111G2	0	0
OC05 5382C	10	1
OC05 8434A	0	0

Legenda: 99 perda física ou representativa

Anexo C: Principais achados com relação a expressão de Bax

		Bax no tumor
amostras	Tu1-positividade **%**	Tu1-positividade **+**
33-0261-0	70	4
33-4110-0	0	0
34-6487-3	10	1
35-8112-8	90	4
37-9182-3	30	3
38-3546-4	99	99
38-7205-0	70	4
39-3837-9	60	4
40-1619-0	50	3
40-4914-4	10	1
41-2354-9	100	4
44-0588-9	0	0
44-1764-0	40	3
44-5261-5	10	1
45-3266-0	0	0
45-7081-2	0	0
46-7412-0a	80	4
46-7831-1	40	3
47-3319-3	100	4
47-3500-5	60	4
48-0569-0	20	2
48-2074-6	0	0
49-6429-2	50	3
50-0356-3	50	3
50-1144-2	50	3
50-3935-5	0	0
50-4946-6	10	0
50-8175-0	40	3
51-1976-6	20	2
51-4511-2	70	4
52-8936-0	0	0
53-2848-9	40	3
53-9792-8	0	0
54-4313-0	0	0
54-4550-7	10	1
54-7218-0	40	3
54-8974-1	70	4
54-9164-9	10	1
55-5104-8	10	1
55-7673-3	40	3
56-1874-6	0	0
56-2624-2	20	2
56-3859-3	30	3

56-4440-2	100	4
57-5935-8	0	0
57-9083-2	20	2
58-0681-3	60	4
58-4778-8	20	2
58-9693-2	80	4
63-1266-7	0	0
OC97 1628B	0	0
OC99 2527A	70	4
OC99 0647A	40	3
OC00 3935C	0	0
OC00 5013B	0	0
OC01 4298G	70	4
OC01 6899B	20	2
OC02 3568D	10	1
OC02 4088D	10	1
OC02 5219D	10	1
OC02 6153E	20	2
OC02 3359F	100	4
OC03 0634D	30	3
OC03 1664E	90	4
OC03 2207B	10	1
OC03 2521B	50	3
OC03 5374B	0	0
OC03 7044B	30	3
OC03 7527D	10	1
OC04 0901A	0	0
OC047315D	10	1
OC04 8230D	10	1
OC04 8288	10	1
OC04 8513B	0	0
OC04 8914B	10	1
OC05 1142A	20	2
OC05 3111G2	60	4
OC05 5382C	30	3
OC05 8434A	70	4

Legenda: 99 perda física ou representativa

Anexo D: Principais achados com relação a expressão de citocromo c

		Citocromo c no tumor
amostras	Tu1-positividade **%**	Tu1-positividade **+**
33-0261-0	25	2
33-4110-0	100	4
34-6487-3	0	0
35-8112-8	90	4
37-9182-3	100	4
38-3546-4	10	1
38-7205-0	100	4
39-3837-9	80	4
40-1619-0	100	4
40-4914-4	70	4
41-2354-9	100	4
44-0588-9	100	4
44-1764-0	100	4
44-5261-5	100	4
45-3266-0	90	4
45-7081-2	0	0
46-7412-0a	100	4
46-7831-1	90	4
47-3319-3	100	1
47-3500-5	100	4
48-0569-0	100	4
48-2074-6	60	4
49-6429-2	60	4
50-0356-3	30	0
50-1144-2	100	4
50-3935-5	70	3
50-4946-6	80	4
50-8175-0	100	4
51-1976-6	100	4
51-4511-2	90	4
52-8936-0	20	2
53-2848-9	90	4
53-9792-8	100	4
54-4313-0	70	0
54-4550-7	100	4
54-7218-0	90	4
54-8974-1	100	4
54-9164-9	10	1
55-5104-8	60	3
55-7673-3	95	4
56-1874-6	10	1
56-2624-2	100	4
56-3859-3	100	4

56-4440-2	10	1
57-5935-8	90	4
57-9083-2	60	4
58-0681-3	80	4
58-4778-8	100	4
58-9693-2	0	0
63-1266-7	100	4
OC97 1628B	100	4
OC99 2527A	80	4
OC99 0647A	100	1
OC00 3935C	40	3
OC00 5013B	90	4
OC01 4298G	100	4
OC01 6899B	100	2
OC02 3568D	100	4
OC02 4088D	100	4
OC02 5219D	100	4
OC02 6153E	100	4
OC02 3359F	30	1
OC03 0634D	100	4
OC03 1664E	90	4
OC03 2207B	90	4
OC03 2521B	60	4
OC03 5374B	90	4
OC03 7044B	100	4
OC03 7527D	90	2
OC04 0901A	100	4
OC047315D	90	4
OC04 8230D	100	4
OC04 8288	100	4
OC04 8513B	100	4
OC04 8914B	90	4
OC05 1142A	100	1
OC05 3111G2	100	4
OC05 5382C	100	4
OC05 8434A	100	4

Legenda: 99 perda física ou representativa

Anexo E: Principais achados com relação ao índice apoptótico no tecido neoplásico.

CASPASE 3 CLIVADA NO TUMOR

TU NºCORPOS TU	NºDE CÉLS	Nº CORP/ Nº CELS	multipl por 1000
0	1000	0	0
0	1000	0	0
0	1000	0	0
5	5200	0,000962	0,9
1	1770	0,000565	0,5
99	99	99	99
0	1000	0	0
6	1280	0,004688	4,6
2	1670	0,001198	1,1
1	630	0,001587	1,5
69	1370	0,050365	50,3
2	1470	0,001361	1,3
1	1510	0,000662	0,6
0	1000	0	0
0	1000	0	0
0	1000	0	0
16	3670	0,00436	4,3
0	1000	0	0
0	1000	0	0
0	1000	0	0
153	730	0,209589	209,5
0	1000	0	0
2	870	0,002299	2,2
0	1000	0	0
0	1000	0	0
112	3560	0,031461	31,4
0	1000	0	0
0	1000	0	0
1	216	0,00463	4,6
0	1000	0	0
1	158	0,006329	6,3
0	1000	0	0
0	1000	0	0
99		99	99
0	1000	0	0
0	1000	0	0
5	2010	0,002488	2,4
0	1000	0	0

2	1550	0,00129	1,2
7	960	0,007292	7,2
1	1090	0,000917	0,9
0	1000	0	0
7	940	0,007447	7,4
4	2180	0,001835	1,8
1	1580	0,000633	0,6
0	1000	0	0
0	1000	0	0
10	740	0,013514	13,5
1	2760	0,000362	0,3
0	1000	0	0
6	1320	0,004545	4,5
0	1000	0	0
0	1000	0	0
0	1000	0	0
5	1090	0,004587	4,5
1	470	0,002128	2,1
0	1000	0	0
4	278	0,014388	14,3
0	1000	0	0
23	7580	0,003034	3
19	1680	0,01131	11,3
0	1000	0	0
6	2690	0,00223	2,2
10	3330	0,003003	3
36	5100	0,007059	7
0	1000	0	0
0	1000	0	0
0	1000	0	0
12	1250	0,0096	9,6
0	1000	0	0
3	1590	0,001887	1,8
39	1110	0,035135	35,1
0	1000	0	0
14	3020	0,004636	4,6
3	830	0,003614	3,6
1	3580	0,000279	0,2
3	1720	0,001744	1,7
27	1220	0,022131	22,1
6	4610	0,001302	1,3

Legenda: 99 perda física ou representativa

Anexo F: Principais achados com relação ao índice apoptótico no tecido não-neoplásico.

CASPASE 3 CLIVADA NO TEC NÃO NEOPLÁSICO

CIRROSE NºCORP CIRROSE	NºDE CÉLS	Nº CORP/ Nº CELS	multipl por 1000
0	1000	0	0
1	1730	0,00057803	0,5
0		99	99
99		99	99
99		99	99
0	1000	0	0
99		99	99
0	1000	0	0
1	690	0,00144928	1,4
3	610	0,00491803	4,9
1	98	0,01020408	10,2
0	1000	0	0
0	1000	0	0
1	2100	0,00047619	0,4
0	1000	0	0
0	1000	0	0
12	670	0,01791045	17,9
99		99	99
0	1000	0	0
99		99	99
99		99	99
99		99	99
99		99	99
0	1000	0	0
3	1040	0,00288462	2,8
0	1000	0	0
0	1000	0	0
0	1000	0	0
0	1000	0	0
0	1000	0	0
99		99	99
99		99	99
0	1000	0	0
0	1000	0	0
0	1000	0	0
0	1000	0	0

0	1000	0	0
0	1000	0	0
0	1000	0	0
0	1000	0	0
0	1000	0	0
99		99	99
99		99	99
0	1000	0	0
99		99	99
99		99	99
0	1000	0	0
1	115	0,00869565	8,6
99		99	99
0	1000	0	0
99		99	99
12	6160	0,00194805	1,9
0	1000	0	0
0	1000	0	0
0	1000	0	0
0	1000	0	0
99		99	99
0	1000	0	0
0	1000	0	0
0	1000	0	0
0	1000	0	0
0	1000	0	0
2	2010	0,00099502	0,9
99		99	99
99		99	99
99		99	99
0	1000	0	0
99		99	99
0	1000	0	0
99		99	99
99		99	99
0	1000	0	0
99		99	99
99		99	99
0	1000	0	0
1	1340	0,00074627	0,7
0	1000	0	0
99		99	99
0	1000	0	0

Legenda: 99 perda física ou representativa

8 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adams, J.M.; Cory, S. The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. Science. 1998; 281(5381):1322-6.

Alberts, B.; Johnson, A.; Lewis,J.;Raff,M.; Roberts, K.;Walter,P. The cell cycle and programmed cell death. In: Alberts, B.; Johnson, A.; Lewis,J.; Raff,M.; Roberts, K.;Walter,P (eds) Molecular Biology of the Cell. 4th ed. Garland Science Taylor ¨Francis Group. 2002; pp983-1009.

Alves VA, Nita ME, Carrilho FJ, Ono-Nita SK, Wakamatsu A, Lehrbach DM, de Carvalho MF, de Mello ES, Gayotto LC, da Silva LC. p53 immunostaining pattern in Brazilian patients with hepatocellular carcinoma. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 2004; 46(1):25-31.

Amaral JD, Castro RE, Solá S, Steer CJ, Rodrigues CM. p53 Is a Key Molecular Target of Ursodeoxycholic Acid in Regulating Apoptosis. J Biol Chem. 2007; 282 (47): 34250-34259.

Amaral JD, Castro RE, Steer CJ, Rodrigues CM. p53 and the regulation of hepatocyte apoptosis: implications for disease pathogenesis. Trends Mol Med. 2009 ;15 :531-41

Amarante-Mendes, G.P.; Green, D.R. The regulator apoptotic cell death. Braz. J. Med. Biol. Res. 1999; v.32, p.1053-1061.

Anzola M, Saiz A, Cuevas N, Lopez-Martinez M, Martinez de Pancorbo MA, Burgos JJ. High levels of p53 protein expression do not correlate with p53 mutations in hepatocellular carcinoma. J Viral Hepat. 2004; 11(6):502-10.

Arakawa, M.; Kage, M.; Sugihara, S. *et al*. - Emergence of malignant lesions within an adenomatous hyperplastic nodule in a cirrhotic liver. Observations in five cases. Gastroenterology. 1996; 91: 198-208.

Asker C. Wiman KG, Selinova G. p53-induced apoptosis as a safeguard against cancer. Biochem Biophys Res Commun. 1999; 265(1):1-6.

Bitomsky N, Hofmann TG. Apoptosis and autophagy: Regulation of apoptosis by DNA damage signalling - roles of p53, p73 and HIPK2. FEBS J. 2009;276 : 6074-83.

Borzio, M. *et al.* Liver cell dysplasia and risk of hepatocellular carcinoma in cirrhosis: a preliminary report. *BMJ. 1991;* v. 302, p. 1312.

Bourdon JC, D'Errico A, Paterlini P, Grigioni W, May E, Debuire B. p53 protein accumulation in European hepatocellular carcinoma is not always dependent on p53 gene mutation. Gastroenterology. 1995; 108(4):1176-82.

Bosch, F.X.; Ribes, J.; Borras, J. Epidemiology of primary liver cancer. Semin Liver Dis. 1999; 19:271-285.

Braithwaite AW, Prives CL. p53: more research and more questions. Cell Death Differ. 2006; 13(6):877-80.

Brechot C. Molecular mechanisms of hepatitis B and C viruses related to liver carcinogenesis. Hepatogastroenterology. 1998; 45:1189-96.

Brown JM, Wouters BG. Apoptosis, p53, and tumor cell sensitivity to anticancer agents. Cancer Res.1999; 59(7):1391-1399.

But, D. Y. K. *et al*. Natural history of hepatitis-related hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol. 2008;* v. 14, n.11, p.1652-1656.

Carrilho, F. J. Carcinoma hepatocelular e cirrose hepática: estudo caso-controle de variáveis clínicas, bioquímicas, sorológicas e morfológicas.Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo. 1993; 185p.

Carrilho, F. J. et al. Carcinoma hepatocelular. In: Gayotto, L. C. C.; Alves, V. A. F. Doenças do fígado e vias biliares. 1. ed. São Paulo: Atheneu, 2001. p. 997-1016.

Cengiz C, Akarca US, Goker E, Yuce G. Detection of mutant p53 in hepatocellular cancer from Turkey and its correlation with clinicopathologic parameters. Dig Dis Sci. 2003; 48(5):865-9.

Chai, J; Du, C; Wu, JW; Kyin, S; Wang, X; Shi, Y. Structural and biochemical basis of apoptotic activation by Smac/Diablo. Nature. 2000; Volume 406, Issue 6798, pp. 855-862.

Chipuk JE, Kuwana T, Bouchier-Hayes L, Droin NM, Newmeyer DD, Schuler M, Green DR. Direct activation of Bax by p53 mediates mitochondrial membrane permeabilization and apoptosis. Science. 2004; 303(5660):1010-4.

Chiu CT, Yeh TS, Hsu JC, Chen MF. Expression of Bcl-2 family modulated through p53-dependent pathway in human hepatocellular carcinoma. Dig Dis Sci. 2003; Apr; 48(4): 670-6.

Conte VP. Hepatocellular carcinoma. Part 1. General considerations and diagnosis. Arq Gastroenterol. 2000; 37(1):58-68.

Cottone M, Turri M, Caltagitone M et al. Screening for hepatocellular carcinoma in patients with Child A cirrhosis: an 8 year prospective study by ultrasound and alphafetoprotein. J Hepatol. 1994; 21:1029-34.

D'Errico A, Grigioni WF, Fiorentino M, Baccarini P, Grazi GL, Mancini AM. Overexpression of p53 protein and Ki67 proliferative index in hepatocellular carcinoma: an immunohistochemical study on 109 Italian patients. Pathol Int. 1994; 44(9):682-7.

Derossi DR, Ito K, Couto Filho JO, Bacchi CE. Avaliação da expressão da proteína Bcl-2 no carcinoma de mama: estudo em punção aspirativa por agulha fina; correlação com grau histológico em espécimes cirúrgicos correspondentes. J Bras Patol Med Lab. 2003; 39: 229- 35.

DeVita Jr VT, Hellmann S, Rosenberg SA, (eds.) Cancer: principles and practice of oncology 7th. *ed.* Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins, 2005, CD-ROM.

Dias, M. B. K. Carcinoma hepatocelular: história natural e sobrevida em amostra hospitalar no Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, 2003. Dissertação / Escola Nacional de Saúde Pública, Fundação Oswaldo Cruz.

D'Ippolito, G. *et al*. Apresentações incomuns do hepatocarcinoma: ensaio iconográfico. Radiol Brás. 2006; v. 39, n. 2, p. 137-143.

DiVito KA, Charette LA, Rimm DL, Camp RL. Long-term preservation of antigenicity on tissue microarrays. Lab Invest. 2004; Aug;84(8):1071-8.

Donato F, Gelatti U, Limina RM, Fattovich G. Southern Europe as an exemple of interaction between various environmental factors: a systematic review of th epidemiologic evidence. Oncogene. 2006; Jun 26;25(27):3756

Duan XX, Ou JS, Li Y, Su JJ, Ou C, Yang C, Yue HF, Ban KC. Dynamic expression of apoptosis-related genes during development of laboratory hepatocellular carcinoma and its relation to apoptosis. World J Gastroenterol. 2005; 11(30):4740-4.

Dukers, D.F., Oudejans, J.J., Vos, W., ten Berge, R.L., Meijer, C.J. Apoptosis in B-cell lymphomas and reactive lymphoid tissues always involves activation of caspase 3 as determined by a new in situ detection method. J. Pathol. 2002; 196, 307–315.

Edmondson HA, Steiner PE. Primary carcinoma of the liver: a study of 100 cases among 48,900 necropsies. Cancer 1954; 7: 462-503.

Emedicine from webMD Hepatocellular Carcinoma. Disponível em: http://emedicine. medscape.com/article/197319 – overview Acesso em 30.10.09.

Ferreira CG, Epping M, Kruyt FA, Giaccone G. Apoptosis: target of cancer therapy. Clin Cancer Res. 2002; 8:2024-34.

Garcia EJ, Lawson D, Cotsonis G, Cohen C. Hepatocellular carcinoma and markers of apoptosis (bcl-2, bax, bcl-x): prognostic significance. Appl Immunohistochem Mol Morphol. 2002; Sep;10(3):210-7.

Gerbes AL, Caselmann WH. Point mutations of the p53 gene, human hepatocellucar carcinoma and aflatoxinas. J Hepatol. 1993; 19(2): 312-315.

Gewies A. Introduction of apoptosis. ApoReview. [serial online]. 2003;1-26. Available from:http://www.celldeath.de/encyclo/aporev/aporev.htm Acesso em 7 de junho de 2006.

Gonçalves CS, Pereira FEL, Gayotto LCC. Hepatocellular carcinoma in Brazil: report of a national survey (Florianopolis, SC,1995). Rev Inst Med Trop S Paulo. 1997; 39:165-70.

Grasl-Kraupp, B Ruttkay-Nedecky, L Mullauer; Taper H. Huber W. Bursch W. Schulte-Hermann R. Inherent increase of apoptosis in liver tumors: Implications for carcinogenesis and tumor regression. Hepatology. 1997; 25, 4, p906-912.

Gown AM. and Mark C. Willingham. Improved Detection of Apoptotic Cells in Archival Paraffin Sections: Immunohistochemistry Using Antibodies to Cleaved Caspase 3. The Journal of Histochemistry & Cytochemistry. 2002; Volume 50(4): 449–454.

Guo XZ, Shao XD, Liu MP, Xu JH, Ren LN, Zhao JJ, Li HY, Wang D. Effect of bax, bcl-2 and bcl-xL on regulating apoptosis in tissues of normal liver and hepatocellular carcinoma. World J Gastroenterol. 2002; 8(6):1059-62.

Han KQ, Huang G, Gu W, Su YH, Huang XQ, Ling CQ. Anti-tumor activities and apoptosis-regulated mechanisms of bufalin on the orthotopic transplantation tumor model of human hepatocellular carcinoma in nude mice. World J Gastroenterol. 2007; 13(24):3374-9.

Hall, P.A.; Lane, D.P. p53 in tumor pathology: can we trust immunohistochemistry?- Revisited. J. Pathol., Philadelphia. 1994; v.172, p.1-4, 1994.

Haupt S et al. Apoptosis- the p53 network. J Cell Sci. 2003; 116(Pt20):4077-4085.

Hengartner, M.O. The biochemistry of apoptosis. Nature. 2000; v.407, p.770-776.

Hickmann ES, Moroni MC, Helin K. The role of p53 and pRB in apoptosis and cancer. Curr Opin Genet Dev. 2002; 12(1):60-6.

Hsu HC, Tseng HJ, Lai PL, Lee PH, Peng SY. Expression of p53 gene in 184 unifocal hepatocellular carcinomas: association with tumor growth and invasiveness. Cancer Res. 1993; 53(19):4691-4.

INCA (Instituto Nacional do Câncer). Câncer de Fígado. Disponível em: http://www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=330 Em 30.10.09 Revista Prática Hospitalar. 2005; Ano VII. Número 41.

Ikeguchi M, Hirooka Y, Kaibara N. Quantitative analysis of apoptosis-related gene expression in hepatocellular carcinoma. Cancer. 2002; 95(9):1938-45.

Ishak KG, Anthony PP, Sobin LH. Histological typing of tumors of the liver. 1994; 2nd ed. Berlin: Spriner-Verlag.

Iida, V. H. *et al*. Cirrose hepática: aspectos morfológicos relacionados a suas possíveis complicações. Um estudo centrado em necropsias. J Bras Patol Med Lab. 2005; v. 41, n. 1, p. 29-36.

I-Shyan S, Kuo-Shyang Jeng, Ju-Yann Wu Is p53 gene mutation an indicatior of the biological behaviors of recurrence of hepatocellular carcinoma? World J Gastroenterol. 2003;9(6):1202-1207.

Itoh T, Shiro T, Seki T, Nakagawa T, Wakabayashi M, Inoue K, Okamura A. Relationship between p53 overexpression and the proliferative activity in hepatocellular carcinoma. Int J Mol Med. 2000; 6(2):137-42.

Jeng KS, Sheen IS, Chen BF, Wu JY. Is the p53 gene mutation of prognostic value in hepatocellular carcinoma after resection? Arch Surg. 2000; 135(11):1329-33.

Jin S, Levine AJ. The p53 functional circuit. J Cell Sci. 2001; 114(Pt 23): 4139-4140.

Johnson, P.J.; Williams, R. Cirrhosis and the etiology of hepatocellular carcinoma. J Hepatol,1987; v. 4, p. 140-7.

Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. Br J Cancer 1972; 26: 239-257.

Kim, C.M.; Koike, K.; Saito, I.; Miyamura, T.; Gilbert, J. HBx gene of hepatitis B virus induces liver cancer in transgenic mice. Nature. 1991; 351, 317-320.

Kojiro, M. & Nakashima, T. - Pathology of hepatocellular carcinoma. In: Okuda,K. & Ishak, K.G. Neoplasms of the liver. Tokyo, Springer-Verlag, 1987; p. 81-104.

Kononen J, Bubendorf L, Kallioniemi A, Barlund M, Schraml P, Leighton S, et al. Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. Nat Med. 1998; Jul;4(7):844-7.

Kountouras J, Zavos C, Chatzopoulos D. Apoptosis in hepatocellular carcinoma. Hepatogastroenterology. 2003; 50(49): 242-249.

Kubbutat, M.H.G.; Vousden K.H. Keeping an old friend under control: regulation of p53 stability. Mol. Med. Today. 1998; 4: 250-6.

Kumar, V; Abbas, A.K.; Fausto, N. Robbins e Contran – Patologia: Bases patológicas das doenças. Elsevier. 2005; 7º ed, 27-33 e 1299 – 1303.

Lakin, N.D.; Jackson, S.P. Regulation of p53 in response to DNA damage. Oncogene. 1999; 18: 7644-55.

Lau, WY et al. Hepatocellular carcinoma: current management and recent advances. Hepatobiliary Pancreat Dis Int. 2008; v 7. n. 3, p. 237-247.

Levine AJ, Hu W, Feng Z. The P53 pathway: what questions remain to be explored? Cell Death Differ. 2006; 13: 1027-1036.

Li JQ, Zhang CQ, Zhang YQ, Yuan YF, Chen MS, Li GH. imunohistochemical study of PCNA and p53 in primary liver cancer - an implication for prognosis and treatment. J Exp Clin Cancer Res. 1996; 15: 77-80.

Li XL, Hao YR, Zou JX, Yang JH, Geng JH. Relationship between C-myc and Bcl-2 alterations and biological behavior and apoptosis in gastric cancer. Xin Xiaohuabingxue Zazhi, 1997;5: 773-774.

Libbrecht, L *et al.* Predictive value of liver cell dysplasia for development of hepatocellular carcinoma in patients with non-cirrhotic and cirrhotic chronic viral hepatitis. Histopathology. 2001; v. 39, p. 66-73.

Llovet JM, Fuster J, Bruix J. The Barcelona approach: diagnosis, staging, and treatment of hepatocellular carcinoma. Liver Transpl. 2004; 10: S115-S120.

Loro, L. L.; Vintermyr, O. K.; Johannessen, A. C. Cell death regulation in oral squamous cell carcinoma: methodological considerations and clinical

significance. Journal of Oral Pathology and Medicine. 2003; v. 32, p. 125-138.

Lunn, R.M., Yu-Jing Zhang, Li-Yu Wang, Chien-Jen Chen, Po-Huang Lee, Chue-Shue Lee,2 Wei-Yann Tsai, and Regina M. Santella. p53 Mutations, Chronic Hepatitis B Virus Infection, and Aflatoxin Exposure in Hepatocellular Carcinoma in Taiwan. Cancer research. 1997; 57. 3471-3477.

Marsoni S, Damia G. Molecular targeting: new therapeutic strategies to improve tumour apoptosis. Ann Oncol 2004;15 (Supl 4):iv229-231.

Marwoto W, Miskad UA, Siregar NC, Gani RA, Boedihusodo U, Nurdjanah S, Suwarso, Watadianto, Boedi P, Hasan HA, Akbar N, Noer HM, Hayashi Y. Immunohistochemical study of P53, PCNA and AFP in hepatocellular carcinoma, a comparison between Indonesian and Japanese cases. Kobe J Med Sci. 2000; 46(5):217-29.

May, P.; May, E. Twenty years of p53 research: structural and functions aspects of the protein. Oncogene, London. 1999; v.18, p.7621-738, 1999.

Moghaddam SJ, Haghighi EN, Samiee S, Shahid N, Keramati AR, Dadgar S, Zali MR. Immunohistochemical analysis of p53, cyclinD1, RB1, c-fos and N-ras gene expression in hepatocellular carcinoma in Iran. World J Gastroenterol. 2007; 13(4):588-93.

Mullauer, L.; Gruber, P.; Sebinger, D.; Buch, J.; Wohlfart, S.; Chott, A. Mutations in apoptosis genes: a pathogenic factor for human disease. Mut Res. 2001; 488: 211-31.

Naka T, Toyota N, Kaneko T, Kaibara N. Protein expression of p53, p21WAF1, and Rb as prognostic indicators in patients with surgically treated hepatocellular carcinoma. Anticancer Res. 1998; 18(1B):555-64.

Nakopoulou L, Janinis J, Giannopoulou I, Lazaris AC, Koureas A, Zacharoulis D. Immunohistochemical expression of p53 protein and proliferating cell nuclear antigen in hepatocellular carcinoma. Pathol Res Pract. 1995; 191(12):1208-13.

Nan KJ, Ruan ZP, Jing Z, Qin HX, Wang HY, Guo H, Xu R. 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.

Narciso, GR et al. Perfil do carcinoma hepatocelular em pacientes portadores de hepatopatia crônica pelo vírus C. Scientia Medica. 2006; v 16, n. 4, p. 157-161.

Navas, S.A.; Sabino, M.; Rodriguez-Amaya, D.B.; Aflatoxin M(1) and ochratoxin A in a human milk bank in the city of Sao Paulo, Brazil Food Addit Contam. 2005; May 22(5):457-62.

Ng IO, Srivastava G, Chung LP, Tsang SW, Ng MM. Overexpression and point mutations of p53 tumor suppressor gene in hepatocellular carcinomas in Hong Kong Chinese people. Cancer. 1994; 74(1):30-7.

Nicholson DW. From bench to clinic with apoptosis-base therapeutic agents. Nature. 2000; 407:810-16.

Nogueira JA, Ono-Nita SK, Nita ME, de Souza MM, do Carmo EP, Mello ES, Scapulatempo C, Paranaguá-Vezozzo DC, Carrilho FJ, Alves VA. 249 TP53 mutation has high prevalence and is correlated with larger and poorly differentiated HCC in Brazilian patients. BMC Cancer. 2009; Jun 26;9.

Ohta, G. & Nakanuma, Y. - Comparative study of three nodular lesions in cirrhosis: adenomatoid hyperplasia, adenomatoid hyperplasia with intermediate lesion and small hepatocellular carcinoma. In: Okuda, K. & Isahk, K.G. Neoplasms of the liver. Tokyo, Springer-Verlag, 1987. p. 177-187.

Oltvai, Z.N.; Milliman, C.L.; Korsmeyer, S.J. Bcl-2 heterodimers in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. Cell. 1993; 74: 609-19.

Oncogene (2003) 22, 50935107. DOI 10.1038 SJ.ONC.1206557

Oren, M. Regulation of the p53 tumour suppressor protein. The Journal of Biological Chemistry. 1999; 274: 36031-34.

Paiva C, Oshima CT, Lanzoni VP, Forones NM. Apoptosis, PCNA and p53 in hepatocellular carcinoma. Hepatogastroenterology. 2002; 49(46):1058-61

Parkin DM. Global cancer statistics in the year 2000. The lancet oncology. 2001; 2(9):533-43.

Parolin, M. B. *et al*. Resultados do transplante hepático em pacientes com diagnóstico pós operatório de hepatocarcinoma. Arq Gastroenterol. 2006; v. 43, n. 4, p. 259-264.

Pizem J, Marolt VF, Luzar B, Cör A. Proliferative and apoptotic activity in hepatocellular carcinoma and surrounding non-neoplastic liver tissue. Pflugers Arch. 2001; 442(6 Suppl 1): R174-6.

Ponomarkov, V.& Mackey,LJ. Tumours of the liver and biliary system. Bulletin of the World Health Organization. 1976; v.53, n.2-3, p.187-194.

Qin G, Su J, Ning Y, Duan X, Luo D, Lotlikar PD. p53 protein expression in patients with hepatocellular carcinoma from the high incidence area of Guangxi, Southern China. Cancer Lett. 1997; 121(2):203-10.

Qin LX, Tang ZY. The prognostic molecular markers in hepatocellular carcinoma.World J Gastroenterol. 2002; 8(3):385-392.

Resendes A.R., N. Majo´, J. Segale´s, J. Espadamala, E. Mateu,F. Chianini, M. Nofrari´as, M. Domingo Apoptosis in normal lymphoid organs from healthy normal,conventional pigs at different ages detected by TUNEL and cleaved caspase-3 immunohistochemistryin paraffin-embedded tissues Veterinary Immunology and Immunopathology. 2004; 99. 203–213.

Riedl SJ, Shi Y.Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis. Nat Ver Mol Cell Biol. 2004; 5:897-907.

Rodrigues CMP, Brites D, Serejo F, Costa A, Ramalho F, Moura MC. Apoptotic cell death does not parallel other indicators of liver damage in chronic hepatitis C patients. J Viral Hepat. 2000; 7: 175- 183.

Ruchaud S *et al*. Caspase-6 gene disruption reveals a requirement for lamin A cleavage in apoptotic chromatin condensation. EMBO J. 2002; 21:1967-77.

Sabah M, Cummins R, Leader M, Kay E. Immunoreactivity of p53, Mdm2, p21 (WAF1/CIP1) Bcl-2, and Bax in soft tissue sarcomas: correlation with histologic grade. Appl Immunohistochem Mol Morphol. 2007; 15 (1): 64-69

Sakamura D, Furukawa T, Takegami T. Hepatitis C virus non-structural protein NS3 transforms NIH 3T3 cells. J Virol. 1995; 63:3893-3896..

Schuler M, Green DR. Mechanisms of p53-dependent apoptosis. Biochem Soc Trans 2001; 29(Pt 6):684-688.

Shi NL, Cheol K P,Chang O S, Jong S C,Young LO, Jae W C,Byung C Y. Correlation of Mutation and Immunohistochemistry of p53 in Hepatocellular Carcinomas in Korean People J Korean Med Sci 2002; 17: 801-5.

Siegel, R.M.; Fleisher, T.A. The role of Fas and related death receptors in autoimmune and other disease states. J Allergy Clin Immunol. 1999 ;103: 729-38.

Simbula G, Columbano A, Ledda-Columbano GM, Sanna L, Deidda M, Diana A, Pibiri M. Increased ROS generation and p53 activation in alpha-lipoic acid-induced apoptosis of hepatoma cells. Apoptosis. 2007; 12(1):113-23.

Sorensen HT, Friis S, Olsen JH, Thulstrup AM, Mellemkjaer L, Linet M, Trichopoulus D, Vilstrup H, Olsen J. Risk of liver and other types of cancer in patients with cirrhosis: a nationwide cohort study in Denmark. Hepatology.1998; 28:921-5.

Soussi T, Asselain B, Hamroum D, Kato S, Ishioka C, Claustre M, et al. Meta analysis of the p53 mutation database for mutant p53 biological activity reveals a methodologic bias in mutation detection. Clin Cancer Res. 2006; 12(1):62-9.

Stroescu C, Adrian Dragnea, Bogdan Ivanov, Catalin Pechianu, Vlad Herlea, Olivia Sgarbura, Andra Popescu, Irinel Popescu Expression of p53, Bcl-2, VEGF, Ki67 and PCNA and Prognostic Significance in Hepatocellular Carcinoma J Gastrointestin Liver Dis. 2008; Vol.17 No 4, 411-417.

Sung CO, Yoo BC, Koh KC, Cho JW, Park CK. Prognostic significance of p53 overexpression after hepatic resection of hepatocellular carcinoma. Korean J Gastroenterol. 2005; June; 45(6):425-30.

Tabor E, Di Bisceglie AM. Hepatocellular carcinoma. Clinics in Liver Disease. 1999; 2(3):327-348.

Tannapfel A. Wittekind C. Genes involved in hepatocellular carcinoma: deregulation in cell cycling and apoptosis. Virchows Arch. 2002; 440(4):345-352.

Tretiakova MS, Shabani-Rad MT, Guggisberg K, Hart J, Anders RA, Gao ZH. Genomic and immunophenotypical differences between hepatocellular carcinoma with and without cirrhosis. Histopathology. 2010; 56(6):683-93.

Thompson CB. Apoptosis. In: Paul WE, editor. Fundamental immunology. 4 ed. Philadelphia: Lippincott-Raven. 1999; p813-29.

Thorgeirsson SS, Teramoto T, Factor VM. Dysregulation of apoptosis in hepatocellular carcinoma. Semin Liver Dis. 1998; 18(2):115-122.

Toh T, Shiro T, Seki T. The clinicopathological study of p53 overexpression in hepatocellular carcinoma. Acta Hepatol Jpn. 1993; 34: 989-994.

Tolbert, D.; Fenoglio-Preiser, C.; Noffsinger, A.; De Voe, G.; MacDonald, J.; Benedetti, J.; Stemmermann, G.N. The relation of p53 gene mutations to gastric cancer subsite and phenotype. Cancer Causes Control 10. 1999; 227-31.

Uo T, Kinoshita Y, Morrison RS. Apoptotic Actions of p53 RequireTranscriptional Activation of PUMA and Do Not Involve a Direct Mitochondrial/Cytoplasmic Site of Action in Postnatal Cortical Neurons. J Neurosci. 2007; 27(45):12198-12210.

Vogelstein, B.; Kinzler, K.W. p53 function and dysfunction. Cell 70. 1992; 523-6.

Wang P, Yu J, Zhang L. The nuclear function of p53 is required for PUMA-mediated apoptosis induced by DNA damage. Proc Natl Acad Sci U S A. 2007;104 (10): 4054-4059.

Wee A, Teh M, Raju GC. p53 expression in hepatocellular carcinoma in a population in Singapore with endemic hepatitis B virus infection. J Clin Pathol. 1995; 48(3):236-8.

Wu, W. et al. Combined Hepatoma specific serum alpha-fetoprotein and moving alphafetoprotein - mRNA in the diagnosis of hepatocellular carcinoma. Hepatobiliary Pancreat DisInt. 2006; v 5, n. 4.

Xiao EH, Hu GD, Li JQ. Relationship between apoptosis and invasive and metastic potential of hepatocellular carcinoma. Hepatobiliary & Pancreatic Diseases International. 2002; V 1, (4):574 -576.

Xu HY, Yang YL, Guan XL, Song G, Jiang AM, Shi LJ. Expression of regulating apoptosis gene and apoptosis index in primary liver cancer. World J Gastroentero, 2000;6(5): 721-724.

Xue XC, Fang GE, Hua JD. Gastric cancer and apoptosis. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi, 1999;7: 359-361.

Yang X, Zhang Y, Zhang L, Zhang L, Mao J. Silencing alpha-fetoprotein expression induces growth arrest and apoptosis in human hepatocellular cancer cell. Cancer Lett. 2008; 271(2):281-93.

Yu Q. Restoring p53-mediated apoptosis in cancer cells: new opportunities for cancer therapy. Drug resistent update.2006;9(1-2):19-25.

Zeng W, Gouw AS, van den Heuvel MC, Molema G, Poppema S, van der Jagt EJ, de Jong KP. Hepatocellular carcinomas in cirrhotic and noncirrhotic human livers share angiogenic characteristics. Ann Surg Oncol. 2010 ;17(6):1564-71.

Zhang MF, Zhang ZY, Fu J, Yang YF, Yun JP. Correlation between expression of p53, p21/WAF1, and MDM2 proteins and their prognostic significance in primary hepatocellular carcinoma. J Transl Med. 2009 Dec 22;7:110.

Zhang ZM *et al.* Inducing apoptosis and upregulation of Bax and Fas ligand expression by allicin in hepatocellular carcinoma in Balb/c nude mice. Chin Med J (Engl). 2006; 119(5): 422-425.

Zhao M, Zimmermann A. Apoptosis in human hepatocellular carcinoma and in liver cell dysplasia is correlated with p53 protein immunoreactivity. J Clin Pathol, 1997; 50:394-400.

Zheng JY, Guang-Shun Yang, Wei-Zhong Wang, Jiang Li, Kai-Zong Li, Wen-Xian Guan, Wen-Liang Wang. Overexpression of Bax induces apoptosis and enhances drug sensitivity of hepatocellular cancer-9204 cells. World J Gastroenterol 2005; 11(23):3498-3503.

Zimmermann, K. C.; Green, D. R. How cells die: Apoptosis pathways. Journal of Allergy and Clinical Immunology. 2001; v. 108, n. 4, p. 99-103.

Zuccari, D. A. P. C.; Terzian, A. C. B. ; Pereira, R. S.; Pavan, M. V.; Ruiz, C. M.; Sueiro, F. A. R.; Andrade, J. C. A.; Cordeiro, J. A. Avaliação imunohistoquímica do gene p53 nas neoplasias mamárias caninas. ARS Veterinária. 2005; v.21, n. 3, p. 344-350.