



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA E MEDICINA LEGAL
MESTRADO EM PATOLOGIA

LEILA CARLA DA CUNHA SILVA MAGALHÃES

**MACRÓFAGOS ASSOCIADOS AO TUMOR EM CARCINOMA
HEPATOCELULAR: AVALIAÇÃO QUANTITATIVA E CORRELAÇÃO COM
ASPECTOS CLÍNICOS E PATOLÓGICOS**

FORTALEZA

2010

LEILA CARLA DA CUNHA SILVA MAGALHÃES

**MACRÓFAGOS ASSOCIADOS AO TUMOR EM CARCINOMA
HEPATOCELULAR: AVALIAÇÃO QUANTITATIVA E CORRELAÇÃO COM
ASPECTOS CLÍNICO-PATOLÓGICOS**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade Federal do Ceará para obtenção do título
de mestre em Patologia.

Orientador: Prof. Dr. José Telmo Valença Júnior

FORTALEZA

2010

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

M167m Magalhães, Leila Carla da Cunha Silva.
MACRÓFAGOS ASSOCIADOS AO TUMOR EM CARCINOMA HEPATOCELULAR: AVALIAÇÃO
QUANTITATIVA E CORRELAÇÃO COM ASPECTOS CLÍNICOS E PATOLÓGICOS / Leila Carla da
Cunha Silva Magalhães. – 2010.
73 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-
Graduação em Patologia, Fortaleza, 2010.

Orientação: Prof. Dr. José Telmo Valença Júnior.

1. Carcinoma hepatocelular. 2. TAM. 3. CD68. 4. aspectos clínicos e patológicos. I. Título.

CDD 571.9

LEILA CARLA DA CUNHA SILVA MAGALHÃES

Dissertação de mestrado apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, Curso de Pós-Graduação em Patologia, como requisito para obtenção do título de mestre em Patologia.

Aprovado em: 04/08/2010

BANCA EXAMINADORA

Dr. José Telmo Valença Júnior (Orientador)

Universidade Federal do Ceará- UFC

Dr. Max Victor Carioca Freitas

Universidade Federal do Ceará- UFC

Dr. José Huygens Parente Garcia

Universidade Federal do Ceará-UFC

Dr. Paulo Roberto Carvalho de Almeida

Universidade Federal do Ceará-UFC

Aos meus filhos, **Isadora e Heitor**, que em sua inocência permitiram
minha ausência e festejaram o meu amor a cada breve retorno.

Ao meu marido, **Júlio César**, por compreender e incentivar os meus sonhos.

AGRADECIMENTOS

Irei sempre agradecer primeiro a **Deus** pelos meus pais, **Célia e Zé Silva**, por todo o amor e por tornarem possível cada passo.

Obrigada ao **Dr. José Telmo Valença Júnior** pela confiança em ter me aceitado como orientanda e pelo constante exemplo de competência e busca de conhecimentos.

Obrigada à **professora Aline Martins** por toda ajuda e disponibilidade tornando mais suave a realização deste projeto.

Obrigada ao **Prof. Francisco Vagnaldo Fachine** pela valorosa colaboração.

Obrigada à **Coordenação do Mestrado em Patologia** pelo empenho em proporcionar a todos os mestrandos um curso de pós-graduação com qualidade e em especial à professora **Dra. Margarida Maria Pompeu** por ser incansável em sua dedicação e gentileza na formação acadêmica dos mestrandos.

Obrigada ao **Dr. Max Victor Carioca Freitas** por ser exemplo de estudo contínuo e dedicação.

Obrigada a **Equipe de Transplante Hepático do HUWC** e a todos os seus funcionários, em especial à enfermeira Clébia, pela disponibilidade em colaborar com o desenvolvimento da pesquisa.

Obrigada aos **funcionários do Departamento de Patologia** pela boa vontade em proporcionar o apoio técnico necessário para a execução deste trabalho.

Obrigada aos meus irmãos: **Dermeval, Hugo, Jocélia e Juliana**, eles foram inspiração, torcida, estímulo e principalmente conforto.

Por fim, obrigada aos **amigos, aos colegas de trabalho** e a **todos** que de alguma maneira contribuíram para a realização deste projeto

RESUMO

Introdução: O papel dos macrófagos na gênese tumoral é complexo porque eles podem prevenir ou promover o desenvolvimento do tumor. Os diferentes microambientes onde os macrófagos associados ao tumor (TAMs) agem incluem áreas peritumoral e intratumoral. Neste estudo iremos avaliar a evidência de infiltração de TAMs no microambiente tumoral e correlacionar com fatores clínicos e patológicos de prognóstico em pacientes com carcinoma hepatocelular (CHC) em tratamento por transplante hepático. **Método:** A infiltração de TAMs foi avaliada por imuno-histoquímica em 35 amostras de tecidos contendo carcinoma hepatocelular (CHC). Cada amostra foi corada com marcador de macrófagos CD68, a infiltração foi avaliada quantitativamente e os resultados expressos em quantidade de células por cinco campos de grande aumento ao microscópio óptico (400x). A relação entre a infiltração de TAMs e os achados clínico-patológicos foram submetidos à análise estatística. **Resultados:** Foram analisadas 35 amostras de carcinoma hepatocelular. Constatou-se maior infiltração de TAMs em áreas peritumorais em relação à área intratumoral ($p < 0,001$). Um segundo resultado relevante foi uma associação linear negativa entre a presença de TAMs intratumoral e o tamanho do tumor ($p = 0,03$). **Conclusões:** O tamanho do tumor é um reconhecido fator clínico de prognóstico. Foi observado, neste estudo, que a concentração de macrófagos (TAMs) intra e peritumorais é estatisticamente diferente no CHC, e que há uma correlação negativa entre o tamanho do tumor e a quantidade de TAMs intratumoral, indicando que a quantidade de TAMs no microambiente do hepatocarcinoma pode ser fator limitante para o crescimento tumoral.

Palavras-chave: Carcinoma hepatocelular, TAM, CD68, aspectos clínicos e patológicos.

ABSTRACT

Purpose:The role of macrophages in tumorigenesis is complex because they can both prevent and promote tumor development. The distinct microenvironments where tumor-associated macrophages (TAMs) act include intratumoral and peritumoral areas. This study aims to evaluate the evidence of TAMs' infiltration in the tumoral microenvironment and its correlations with clinicopathologic features and prognostic values in resected hepatocellular carcinoma (HCC) patients.**Methods:**TAMs' infiltration was evaluated in paraffin-embedded tissues from 35 HCC patients through immunohistochemistry methods. Each specimen was stained with the pan-monocyte/macrophage marker CD68, and average infiltration was quantitatively evaluated and results were expressed as cells-per-five-independent-visual-field by light microscopy (magnification, 400x). Correlation between TAMs' infiltration and clinicopathologic features, were statistically analyzed.**Results:**Through the evaluation of these 35 specimens of hepatocellular carcinoma (HCC) we find a higher TAMs' infiltration in the peritumoral area, which was statistically significant ($p < 0,001$), regarding the intratumoral area. A second important result was a negative linear correlation between the presence of intratumoral TAMs and tumor size ($p = 0.03$).**Conclusions:**The tumor diameter is a recognized clinical prognostic factor in HCC, used worldwide. The negative correlation between tumor diameter and number of intratumoral TAMs reinforces the idea that the number of TAMs within the tumor may be a limiting factor for tumor growth in the microenvironment of HCC.

Keywords: Hepatocellular carcinoma (HCC), TAMs, CD68, clinicopathologic features.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Distribuição da taxa de mortalidade por CHC de acordo com a idade.....	12
Figura 2- Coloração HE área intratumoral e peritumoral.....	42
Figura 3-Coloração imuno-histoquímica para CD68 área intratumoral e peritumoral.....	43
Tabela 1- Dados clínicos: Idade, sexo, etiologia da cirrose e número de nódulos.....	39
Tabela 2- Percentual do tamanho tumoral entre os pacientes analisados.....	40
Tabela 3-Relação entre tamanho tumoral e invasão vascular.....	48

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1- Etiologia da cirrose dentre os pacientes estudados.....	37
Gráfico 2–Distribuição dos pacientes quanto ao sexo.....	41
Gráfico 3–Distribuição dos pacientes quanto à idade.....	41
Gráfico 4- Quantificação de macrófagos nas regiões histológicas intra e peritumorais.....	42
Gráfico 5- Quantificação intratumoral de TAMs nos pacientes com e sem invasão vascular.....	43
Gráfico 6-Quantificação peritumoral de TAMs nos pacientes com e sem invasão vascular.....	43
Gráfico 7- Associação entreTAMs intratumoral e tamanho do tumor.....	44
Gráfico 8-Associação entre TAMs peritumoral e tamanho do tumor.....	45
Gráfico 9- Associação entre TAMs peritumorale tempo livre de doença.....	47
Gráfico 10- Associação entre alfa-fetoproteína e o tamanho do tumor.....	48
Gráfico 11- Associação entre valor de alfa-fetoproteína após remoção dos valores discrepantes e o tamanho do tumor.....	48

LISTA DE ABREVIATURAS

AFT B1- Aflatoxina B1

AFP- Alfa-fetoproteína

CD68- marcador imuno-histoquímico de macrófagos

CHC- Carcinoma Hepatocelular

HE- Hematoxilina-Eosina

HUWC- Hospital Universitário Walter Cantídio

IHQ- Imuno-histoquímica

P53- Gene supressor tumoral p53

SAME- Serviço de Arquivo Médico e Estatístico

TAM- Macrófagos Associados ao Tumor

UFC- Universidade Federal do Ceará

VHB- Vírus da Hepatite B

VHC- Vírus da Hepatite C

VHD- Vírus da Hepatite Delta

SUMÁRIO

LISTA DE ILUSTRAÇÕES.....	7
LISTA DE GRÁFICOS.....	8
LISTA DE ABREVIATURAS.....	9
1. INTRODUÇÃO.....	11
1.1 EPIDEMIOLOGIA DO CARCINOMA HEPATOCELULAR.....	11
1.2 ETIOPATOGENESE.....	13
1.2.1 CIRROSE.....	14
1.2.2 VÍRUS B.....	14
1.2.3 VÍRUS C.....	16
1.2.4 ÁLCOOL.....	17
1.2.5 DOENÇA HEPÁTICA GORDUROSA NÃO-ALCOÓLICA.....	19
1.2.6 AFLATOXINAS.....	20
1.2.7 HEMOCROMATOSE.....	20
1.3 FATORES CLÍNICO-PATOLÓGICOS DE PROGNÓSTICO.....	21
1.3.1 TAMANHO DO TUMOR.....	21
1.3.2 GRADUAÇÃO DE EDMONDSON-STEINER.....	22
1.3.3 INVASÃO VASCULAR.....	23
1.3.4 DOSAGEM DE ALFA-FETOPROTEÍNA.....	24
1.4 MICROAMBIENTE TUMORAL.....	25
1.4.1 MACRÓFAGOS ASSOCIADOS AO TUMOR.....	26
2. OBJETIVOS.....	30

2.1	OBJETIVO GERAL.....	30
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	30
3.	MÉTODO.....	31
3.1	CASUÍSTICA.....	31
3.2	DADOS CLÍNICOS.....	32
3.3	CONFEÇÕES DAS LÂMINAS.....	33
3.4	LEITURA DAS LÂMINAS.....	33
3.4.1	LEITURA DA COLORAÇÃO H-E.....	33
3.4.2	LEITURA DA IMUNO-HISTOQUÍMICA.....	34
3.5	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	34
4.	RESULTADOS.....	36
5.	DISCUSSÃO.....	50
6.	CONCLUSÕES.....	57
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	58
	ANEXO A.....	66
	ANEXO B.....	67
	ANEXO C.....	68

1. INTRODUÇÃO

1.1 Epidemiologia do Carcinoma Hepatocelular

O Carcinoma Hepatocelular (CHC) é o quinto câncer mais freqüente e a terceira causa mais comum de morte por câncer em todo o mundo. Ocorre mais freqüentemente no sudeste da Ásia e África (Figura 1). A China sozinha contribui com mais de 50% da incidência mundial dos casos de todo o mundo. Sua incidência vem aumentando nos últimos anos, o que parece estar relacionado à ocorrência de cirrose e às infecções pelos vírus da hepatite B (VHB) e hepatite C (VHC) (El-SERAG, 2007 e MANN et al, 2007).

No Brasil, este tumor não consta entre os dez mais freqüentes e há poucos dados acerca de sua real incidência. Apesar disso, algumas descrições de séries mostram que o CHC é mais freqüente nos estados de Espírito Santo, Bahia e Amazonas. Corresponde à oitava causa de morte por câncer no país e tem morbimortalidade bastante considerável, acarretando custos elevados para o Sistema Único de Saúde (SUS) como um todo (INCA 2009 e PIMENTA, 2010).

A infecção pelo vírus C da hepatite tem sido apontada como a principal causa do aumento de casos de carcinoma hepatocelular entre os países ocidentais com histórico de baixas taxas desta neoplasia como os Estados Unidos, Austrália e Reino Unido, onde a vacinação para VHB tem elevada cobertura na população e a dieta é pobre em aflatoxinas B1. A China e outros países asiáticos passaram a vacinar todos os recém-nascidos contra o vírus da hepatite B e têm adotado programas de governo que intervêm na alimentação

substituindo milho por arroz e reduzindo a exposição à Aflatoxina B1 reconhecida substância hepatocarcinogênica resultando na redução na incidência de carcinoma hepatocelular (GRETEN, 2009).

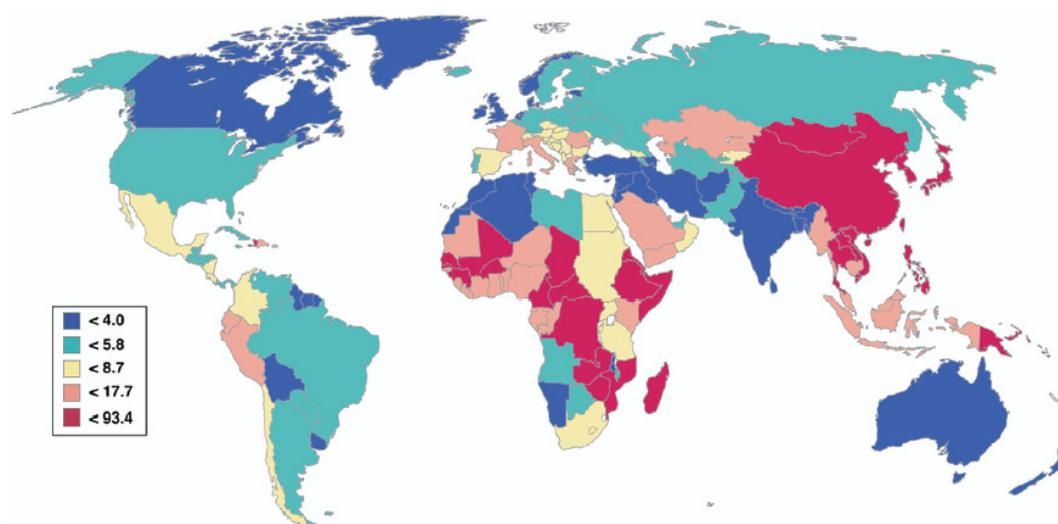


Figura 1- Variação da taxa de mortalidade por CHC de acordo com a idade. As taxas são expressas por 100.000habitantes

Fonte: Organização Mundial de Saúde. Dados de Mortalidade. Disponível em: <http://www.who.int/whosis/en/> 2010.

O carcinoma hepatocelular é mais frequente entre os homens numa proporção de 4:1 em relação às mulheres. Têm sido apontadas razões hormonais e razões comportamentais para essa diferença de incidência entre os sexos por diferenças específicas relacionadas à hormônios androgênicos e à exposição aos fatores ambientais de risco. Em geral, os homens ingerem mais bebidas alcoólicas, são mais freqüentemente contaminados pelos vírus B e C da hepatite, fumam mais e têm mais reservas corporais de ferro. Além

disso, estudos experimentais com camundongos confirmaram a tendência masculina às maiores taxas desta neoplasia, o que remete a fatores endógenos como hormônios andrógenos e maior massa corporal contribuindo para a ocorrência desta neoplasia (CONTE, 2000).

Em relação à idade o CHC se apresenta em diferentes faixas etárias a depender da região, do sexo e da etiologia. Em todas as áreas a incidência de CHC entre as mulheres tem sido em média em torno de cinco anos mais tarde do que nos homens. Em populações de baixo risco em países como os Estados Unidos, Canadá e Reino Unido as maiores incidências são entre pessoas com idade de 75 anos ou mais. Padrões semelhantes são vistos entre muitas populações asiáticas de alto risco, entretanto nas populações africanas de alto risco, como Gambia e Mali, o pico de idade está entre 60 e 65 anos. Estas diferenças estão relacionadas à idade de aquisição da infecção viral e à existência de outros fatores de risco. A infecção pelo vírus C ocorre consideravelmente mais entre os adultos e pelo vírus B entre os mais jovens, crianças e intra-útero (EL-SERAG, 2007 e KUMAR, 2005).

1.2 Etiopatogênese

1.2.1 Cirrose

A presença de cirrose hepática é o principal fator de risco para o desenvolvimento do CHC. Entre 70 e 90% de todos os casos de carcinoma hepatocelular ocorrem em ambiente de doença hepática bem estabelecida e de cirrose. As principais causas de cirrose em paciente com CHC incluem hepatite B, hepatite C, doença hepática alcoólica e esteato-hepatite não alcoólica. Menos comum são hemocromatose hereditária, deficiência de alfa-1-antitripsina, hepatite autoimune e algumas porfirias (MANN 2007).

O CHC em fígado cirrótico resulta de episódios repetidos de morte e regeneração dos hepatócitos, perpetuando um ciclo de proliferação celular com aumento da síntese de DNA nos nódulos de regeneração e esses processos podem levar a rearranjos aberrantes e a alterações da função proteica reguladora (KUMAR, 2005 e PIMENTA, 2010).

Mutações em genes supressores tumorais podem ocorrer na etiopatogênese do CHC. Genes supressores tumorais codificam proteínas que se opõem ao câncer, que interferem no desenvolvimento dos tumores. Alguns tumores como o carcinoma hepatocelular decorrem de alterações moleculares provenientes de mutações e algumas dessas mutações ocorrem em genes supressores tumorais. O gene supressor tumoral mais estudado e relacionado ao carcinoma hepatocelular é o p53; este gene regula o ciclo celular bem como

induz à apoptose as células com dano grave no DNA. Têm sido encontradas mutações no gene p53 em 24-69% dos casos de CHC em algumas séries (DUFOUR 2007 e MANN 2007).

1.2.2 Vírus B

O vírus da hepatite B (VHB) é um vírus DNA que pertence ao grupo hepadnavírus. A hepatite B se instala após longo período de incubação do vírus, podendo durar entre quatro a vinte e seis semanas, e é transmitido por via parenteral e sexual. O vírus pode ser transmitido também da mãe para o recém-nascido por transmissão vertical. (BOGLIOLO, 2006)

Estima-se que em todo o mundo existam cerca de 300 milhões de pessoas com infecção crônica pelo vírus da hepatite B. Estudos de caso-controle mostram que VHB crônico contribui para um aumento de 5 a 15 vezes no risco de desenvolver CHC se comparado com a população geral. A grande maioria, entre 70 e 90%, de CHC relacionados ao VHB ocorrem na presença de cirrose, entretanto VHB é relevante fator de risco para CHC mesmo na ausência de cirrose devido à lesão direta que o vírus B provoca no DNA do hepatócito. Nas áreas onde o VHB é endêmico a transmissão vertical, ou seja, de mãe para filho intra-uterina, é a principal fonte de infecção e cerca de 90% das pessoas contaminadas por esta via evoluem com doença crônica. Esse padrão é diferente entre as populações que adquirem o vírus B nas fases adultas por via sexual ou parenteral. Entre estes, mais de 90% da infecção aguda resolve-se espontaneamente. (CONTE, 2000)

A vacinação para hepatite B é reconhecida como a medida mais efetiva para prevenir a infecção pelo VHB, reduzindo desse modo a mortalidade por complicações associadas ao VHB, incluindo CHC. Em crianças taiwanesas foi realizado estudo após dez anos do início do programa de imunização que demonstrou redução importante na incidência de CHC entre crianças de 6 a 14 anos. A incidência caiu de 0,7 por 100.000 crianças no período de 1982 a 1986 para 0,36 por 100.000 crianças no período de 1990 a 1994. Houve uma redução semelhante na mortalidade associada ao CHC no mesmo período. A vacinação rotineira na infância para hepatite B, com cobertura de 90% na primeira dose administrada ao nascer, previne em 84% as mortes mundiais relacionadas ao HBV. (EL-SERAG 2007)

1.2.3 Vírus C

O vírus da hepatite C tem um grande impacto na saúde pública, cerca de 170 milhões de pessoas estão contaminadas em todo o mundo, com uma estimativa de incidência global de três a quatro milhões de novas infecções por ano (ANDRADE, 2009).

A infecção crônica pelo vírus C da hepatite (VHC) é o principal fator de risco para o desenvolvimento de CHC. Marcadores para a infecção do VHC foram encontrados em diferentes proporções entre as populações, por exemplo, 44 a 66% na Itália, 27-58% na

França, 60-75% na Espanha e em 80 a 90% dos pacientes com CHC no Japão. Após 25 a 30 anos da infecção pelo VHC, as taxas de cirrose estão entre 15 e 35% e a probabilidade de pessoas contaminadas com o VHC desenvolverem carcinoma hepatocelular é difícil de estimar devido à prolongada evolução da doença, no entanto a melhor estimativa é de 1 a 3% após 30 anos de infecção(FREEMAN, 2001)

A contaminação pelo vírus C da hepatite aumenta o risco de CHC por promover fibrose e eventualmente cirrose no fígado. Ao contrário da hepatite B, muitos casos de hepatite C não são detectados clinicamente na fase aguda, e evoluem em sua maioria para formas crônicas. Nos pacientes infectados pelo VHC, os fatores ambientais e do hospedeiro parecem ser mais importantes do que os fatores virais na progressão para cirrose. Estes fatores ambientais incluem idade, tempo de contaminação, sexo masculino, ingestão excessiva de álcool (maior que 50g/dia), diabetes, obesidade e co-infecção com vírus da imunodeficiência humana ou VHB. Não há fortes evidências que fatores virais como o genótipo ou outros possam ser importantes na determinação da progressão de cirrose para CHC em pacientes infectados com VHC(DONATO, 2002).

A terapia antiviral em paciente com cirrose relacionada ao VHC pode diminuir moderadamente o risco de desenvolvimento de CHC entre os pacientes tratados com interferon (INF), este último é efetivo em eliminar VHC e reduzir os níveis séricos de aminotransferases em alguns pacientes com hepatite C crônica. A resposta à terapia com INF está relacionada a fatores como o subtipo viral, a concentração sérica do VHC e à histologia hepática (BRUNO, 2001)

IKEDA *et al* publicaram em 1999 um trabalho realizado com 1.643 pacientes portadores de hepatite pelo vírus C onde foi avaliado o efeito do tratamento com interferon na carcinogênese do carcinoma hepatocelular e conclui que esta terapia se comporta com ação anti-carcinogênica.

1.2.4 Álcool

A associação entre cirrose hepática e álcool é reconhecida desde o século XVIII, quando foi descrita por Matthwe Bailei. Estudos epidemiológicos subsequentes realizados em vários países como EUA, Canadá, França e Suécia demonstram relação direta entre a mortalidade para cirrose e o grau de consumo de álcool (BOGLIOLO, 2006).

O Brasil tem uma das maiores produções per capita de destilados do mundo e o preço dos mesmos, especialmente a cachaça, é muito baixo entre nós, o que favorece amplamente o seu consumo. O alcoolismo crônico pode produzir diversos padrões de doença tais como esteatose, esteato-hepatite alcoólica, cirrose e carcinoma hepatocelular (KUMAR, 2005).

Em 2007 um grupo de epidemiologistas e pesquisadores da Agência Internacional para a Pesquisa do Câncer (IARC) em Lyon na França se reuniu para avaliar o potencial papel carcinogênico do álcool e do acetaldeído, seu primeiro metabólito, em estudos experimentais em animais e humanos. Este grupo de trabalho concluiu que a ocorrência

de tumores malignos na cavidade oral, faringe, laringe, esôfago, fígado, trato colorretal e mama feminina podem surgir decorrentes do consumo de álcool (SEITZ, 2007).

Uma ingestão alcoólica entre 50 a 70g/dia de álcool por períodos prolongados é um reconhecido fator de risco para o desenvolvimento do CHC. Além de estar fortemente associado ao desenvolvimento de cirrose hepática há evidências de que haja um efeito carcinogênico direto pelo álcool às células do fígado. A associação de álcool e infecções pelos vírus da hepatite B ou C tem produzido efeitos carcinogênicos sinérgicos aumentando os riscos para CHC (DONATO 2002 e SEITZ 2007).

1.2.5 Doença Hepática Gordurosa Não-alcoólica

O fígado gorduroso não-alcoólico é uma condição que se assemelha à doença hepática induzida pelo álcool, mas ocorre em pacientes que não são etilistas crônicos. Afeta predominantemente as mulheres e está fortemente associado à obesidade, dislipidemias, hiperinsulinemia, resistência à insulina e diabetes tipo 2 (LARSSON, 2007).

Esta condição demonstra achado histológico de esteatose, que progride comumente para inflamação parenquimatosa multifocal denominada esteato-hepatite, com morte de hepatócitos e consequente fibrose. Os sucessivos processos inflamatórios e fibróticos subclínicos por período prolongado resultarão em cirrose hepática. Estudos com biópsias

seqüenciais em intervalos de sete e nove anos mostram evolução para cirrose em 17% dos casos de esteato-hepatite. A cirrose já estabelecida como descrito anteriormente concorrerá para a ocorrência do CHC.(BOGLIOLO e KUMAR 2005).

Dados epidemiológicos mundiais estimam que dez por cento dos pacientes submetidos à ressecção cirúrgica de carcinoma hepatocelular associado com doença hepática crônica não tenham etiologia da cirrose estabelecida. Estudos recentes mostram que os pacientes com hepatite crônica criptogênica frequentemente têm fatores de risco para doença hepática gordurosa não-alcoólica. (REGIMBEAU 2004, LARSSON 2007).

1.2.6 Aflatoxinas

Dentre os outros fatores que contribuem para a ocorrência de CHC destacam-se a Aflatoxina, uma micotoxina produzida por algumas cepas do fungo *Aspergillus flavus*, encontrado em cereais, especialmente amendoins armazenados inadequadamente. A aflatoxina hepatocarcinogênica mais potente é a aflatoxina B1 e alguns estudos mostram que a excreção urinária de metabólitos da aflatoxina B1 está associada com aumento de quatro vezes no risco de desenvolver CHC. Parece haver ação sinérgica entre as aflatoxinas e o vírus da hepatite B. Indivíduos portadores de infecção pelo VHB e com

níveis elevados de excreção de aflatoxina B1 têm um aumento em torno de 60 vezes no risco de desenvolver CHC.

1.2.7 Hemocromatose

Doença que resulta de um defeito genético que causa absorção excessiva de ferro (hemocromatose hereditária) ou como uma consequência da administração parenteral de ferro (hemocromatose secundária) e se caracteriza pelo acúmulo excessivo de ferro no corpo, a maior parte do qual é depositado em órgãos parenquimatosos como o fígado e o pâncreas. A hemocromatose hereditária é um distúrbio herdado recessivo e homozigoto. A manifestação patológica nos órgãos acometidos é produto da toxicidade direta produzida pelo ferro em excesso, lentamente formando septos fibrosos e levando em última análise a um padrão de cirrose micronodular. O risco de portadores de hemocromatose desenvolver carcinoma hepatocelular é 200 vezes maior do que na população geral (KUMAR, 2005).

1.3 Fatores clínico e patológicos de prognóstico

1.3.1 Tamanho do Tumor

Em sua evolução natural, o câncer tende a crescer e invadir primeiro o órgão onde se originou depois as estruturas adjacentes e, finalmente, sítios à distância. Visando estabelecer o grau de desenvolvimento e disseminação de uma neoplasia, com vistas sobretudo a orientar as medidas terapêuticas e a estabelecer seu prognóstico as neoplasias vêm sendo classificadas em estádios clínicos e patológicos. O sistema mais empregado no estadiamento das neoplasias é o TNM, no qual T indica o tamanho do tumor em centímetros, N significa a existência de metástases em linfonodos e M se refere à presença de metástases em outros órgãos.

O tamanho do tumor tem sido utilizado mundialmente como um dos requisitos para o diagnóstico não invasivo de CHC juntamente com a dosagem de alfa-fetoproteína e exames de imagem demonstrando hipervascularização arterial.

De acordo com o consenso formulado pela Associação Européia para o Estudo do Fígado 2001 e adaptado em 2006, são usados critérios clínicos e radiológicos em fígado cirrótico onde nódulos maiores que 2cm de diâmetro, associados a dosagem de alfa-fetoproteína superior a 400ng/ml e um exame de imagem demonstrando hipervascularização permite o diagnóstico clínico de CHC; nos nódulos menores que 2,0cm são necessárias duas modalidades de exames de imagem demonstrando hipervascularização (GOMAA, 2009). No Brasil, foram estabelecidos através de regulação pela Portaria 208 de 30 de outubro de 2009 do Ministério da Saúde o uso dos Critérios de Milão com base no tamanho do tumor.

Em relação ao prognóstico o tamanho do tumor também é utilizado como parâmetro. Em pacientes que realizaram hepatectomia por CHC, algumas características

clínico-patológicas como o tamanho do tumor, a graduação histopatológica e a presença de invasão vascular têm sido utilizados como fatores preditores de pior prognóstico e recorrência(GOMAA, 2009 e MANN, 2007).

1.3.2 Graduação de Edmondson-Steiner

O padrão histológico e arquitetural do tumor determina a graduação de Edmondson-Steiner, sendo este o fator histológico referido em diferentes estudos como diretamente associado à sobrevida e tempo livre de doença(SHIRABE, 1995 e VALENÇA Jr,2001)

A graduação de Edmondson-Steiner é subdividida em quatro estádios, a saber:

Grau I- neoplasia bem diferenciada, podendo não ser visualizadas áreas de crescimento agressivo, o que dificulta algumas vezes o diagnóstico. Apresenta aumento do tamanho dos hepatócitos e formações luminares contendo bile.

Grau II- neoplasia com moderada diferenciação apresentando hepatócitos neoplásicos com núcleos maiores e hipercromáticos, citoplasma abundante, acidófilo e de limites bem definidos. Os ácinos são frequentes, com lúmens de diferentes tamanhos e preenchidos por bile ou precipitado protéico.

Grau III- os núcleos são maiores e mais hipercromáticos que aqueles encontrados no grau II, exibindo aumento da relação núcleo-citoplasmática. Uma de suas principais

características é a formação de células gigantes tumorais que são mais frequentemente observadas neste grau. São também vistos colapso e distorção trabecular.

Grau IV- apresentam núcleos intensamente hipercromáticos, com relação núcleo-citoplasmática extremamente elevada. O citoplasma é geralmente escasso. O padrão arquitetural é medular, com formação de trabéculas e diminuição da coesão celular. Há menor formação acinar, menos bile e menor número de células gigantes. Podem ser vistas áreas fusiformes e de células pequenas e pouco diferenciadas.

1.3.3 Invasão Vascular

Invasão dos vasos sanguíneos e linfáticos pela neoplasia se deve à propriedade das células malignas de destruir a matriz extracelular através de proteases e elastases, possibilitando se locomover por adesão a receptores específicos, vencer a membrana basal dos vasos e penetrar na sua luz, especialmente nos capilares e vênulas, de paredes mais finas (BOGLIOLO, 2006).

A presença de invasão vascular é um aspecto histológico relevante para o prognóstico do carcinoma hepatocelular, tendo sido observado maior risco de recorrência tumoral entre os pacientes que apresentavam este achado nas microsecções (HO et al., 2006 e MANN, 2007).

1.3.4 Dosagem de alfa-fetoproteína

Alfa-fetoproteína é uma glicoproteína fetal específica com peso molecular em torno de 70kDa que em condições fisiológicas é sintetizada primariamente pelo fígado embrionário, pelas células do saco vitelino e pelo trato intestinal fetal no primeiro trimestre de gestação. A concentração sérica de AFP declina rapidamente após o nascimento e sua expressão é reprimida em adultos. Pacientes com doença hepática crônica, particularmente aqueles associados com alto grau de regeneração dos hepatócitos, CHC, carcinomas embriogênicos, gástricos e pulmonares podem expressar valores elevados de alfa-fetoproteína (GOMAA, 2009).

A dosagem de alfa-fetoproteína (AFP) tem sido utilizada como principal marcador sorológico no diagnóstico aqui no Brasil, todavia seu valor isolado não pode ser utilizado como critério diagnóstico, uma vez que doenças como hepatites, cirrose, e até carcinoma pulmonar elevam os níveis séricos dessa glicoproteína. Além disso, nem todos os pacientes com CHC têm elevação da concentração de AFP. Apesar destas limitações para o diagnóstico, a AFP é um marcador frequentemente utilizado para avaliar recidiva de CHC durante o acompanhamento de pacientes já diagnosticados e tratados (GOMAA, 2006) e tem sido muito útil na avaliação do prognóstico, pois valores acima de 1.000ng/mL são associados com pior prognóstico e recidiva do tumor (COELHO, 2009).

1.4 Microambiente tumoral

Considera-se microambiente tumoral a área formada pelas células tumorais, parênquima, células inflamatórias, estroma e todos os produtos moleculares provenientes deste conjunto. Células tumorais produzem várias citocinas e quimiocinas que atraem leucócitos. Os componentes inflamatórios de uma neoplasia em desenvolvimento podem incluir uma população diversa de leucócitos, por exemplo, neutrófilos, células dendríticas, macrófagos, eosinófilos e mastócitos, bem como linfócitos, e todas estas células são capazes de produzir um variado perfil de citocinas e mediadores citotóxicos incluindo intermediários reativos do oxigênio, proteases, metaloproteinases (MMPs), agentes perfurantes da membrana e mediadores solúveis de morte celular como o Fator de Necrose Tumoral- α , interleucinas e interferons (ALBINI, 2007).

Modelos *in vitro* e *in vivo* usando células tumorais e células estromais demonstram que sinais do estroma e de interação intercelular são determinantes no comportamento do tumor determinando o crescimento e invasão tumoral (FARROW, 2008)

Estudos recentes indicam que a disfunção primária do microambiente tumoral somada à disfunção do epitélio é decisiva na carcinogênese (ALBINI, 2007). A carcinogênese e a angiogênese tumoral resultam da interação das células cancerígenas com células endoteliais vasculares ou linfáticas, estroma normal e células inflamatórias.

Osmonócitos na presença de fator estimulador de colônias granulócitos-macrófagos (GM-CSF) e interleucina-4 são diferenciados em células dendríticas imaturas. Células dendríticas migram dentro e na periferia do tecido inflamado onde capturam antígenos e após maturação migram para os linfonodos onde estimulam a ativação de linfócitos. Fatores

solúveis como a IL-6 e Fator Estimulador de Colônias-1 (CSF-1) derivados de células neoplásicas atraem precursores mieloides com fenótipos semelhantes aos macrófagos. Curiosamente, células dendríticas encontradas em infiltrados tumorais são freqüentemente imaturas e defeituosas na capacidade de estimular células-T (COUSSENS, 2002 e FARROW, 2008).

O microambiente tumoral tem sido considerado responsável pela manutenção da neoplasia e pela permissão de invasão e disseminação das células tumorais. Dentre as células inflamatórias presentes na área tumoral destacam-se os macrófagos responsáveis pela imunidade inata com poder de produzir citocinas letais às células tumorais, bem como de contribuir substancialmente para a imunidade adquirida (WITZ, 2006).

1.4.1 Macrófagos Associados ao Tumor

Macrófagos associados ao Tumor (TAMs) são um componente significativo do infiltrado inflamatório em tecidos neoplásicos e são derivados de monócitos que são recrutados por quimiocinas e proteínas quimioatratadoras de monócitos. TAMs têm um papel duplo nas neoplasias podendo, por um lado, produzir diversos fatores de crescimento angiogênicos e linfangiogênicos, citocinas e proteases que potencializam a progressão do tumor e por outro lado, também sendo capazes de produzir Interleucina-10 que efetivamente age na função anti-tumoral através de células T citotóxicas (COUSSENS, 2002, KHORANA, 2003)

Durante muitos anos a presença dos macrófagos associados ao tumor (TAMs) foi vista como um fator desfavorável ao prognóstico do paciente por contribuir para a progressão tumoral em neoplasias de mama, endométrio, bexiga e rim (LI, 2009; LEWIS, 2006)

Estudos recentes têm demonstrado que TAMs apresentam possibilidades distintas de comportamento no microambiente tumoral a depender da intensidade de infiltração, especificidade do tecido, tipo neoplásico e localização da infiltração macrofágica. Outras publicações sugerem que acúmulo de TAMs na periferia do tumor estimula a produção de diferentes fatores de destruição tumoral tais como o Fator de Necrose Tumoral- α , óxido nítrico e interferon- γ e, de modo contrário, o centro do tumor teria áreas de hipóxia que induziriam a produção de fatores angiogênicos pelos TAMs, o que acarretaria propensão a progressão tumoral. (LI *et al.*, 2009; LEWIS e POLLARD, 2006).

Tem-se demonstrado que em cânceres de mama, próstata, ovário e colo uterino a alta infiltração de TAM está correlacionada com pior prognóstico. Outros estudos mostram que em neoplasias gástricas, colorretais e no melanoma a alta infiltração de macrófagos correlaciona-se com prognóstico favorável (LEWIS, 2006).

Um estudo realizado com 446 pacientes portadores de câncer de cólon revelou que densa infiltração de macrófagos na área tumoral influencia positivamente o prognóstico dos pacientes com este tumor e que o contato entre as células tumorais e os macrófagos pode influenciar o equilíbrio entre propriedades pró-tumorais e antitumorais, produzidas pelos macrófagos. (FORSELL, 2007).

A presença de macrófagos no ambiente tumoral (TAMs) no CHC tem apresentado resultados variadose até conflitantes, sendo os estudos mais recentes favoráveis a um melhor prognóstico dospacientes com tumores hepáticos exibindo elevada infiltração macrofágica, todavia, ainda permanece a ser elucidado o verdadeiro papel dos TAMs em relação à recorrência da doença ou metástase de carcinoma hepatocelular (BORTOLAMI, 2002; LI, 2009; PENG, 2005).

SHIMURA *et al*, em um estudo sobre câncer de próstata e macrófagos associados ao tumor demonstrou que uma infiltração reduzida de TAM está associada a progressão deste tipo de câncer. O referido estudo analisou diferentes compartimentos do tumor e demonstrou que TAMs podem ter atividade paradoxal em relação aos efeitos na progressão do câncer a depender do local de infiltração, se no compartimento de células cancerosas ou compartimento estromal. Esta avaliação compartimentada do ambiente tumoral não tem sido observada em muitas publicações. Outro aspecto observado em nossa revisão bibliográfica foi que na maioria dos estudos realizados com macrófagos associados ao tumor (TAM) não foi realizado mensuração quantitativa destas células e sim medidas semi-quantitativas de acordo com a densidade percebida pelos observadores. Não há muitos relatos sobre o assunto e os estudos disponíveis não fazem distinção entre a presença de macrófagos intra ou peritumorais.

BUDHU *et al*(2006) em seu estudo sobre alterações genéticas predispondo a ocorrência de metástase, postula que é possível que no CHC o microambiente tumoral possa determinar ou influenciar as alterações genéticas por meio de uma reprogramação das citocinas Th1 e Th2 no tecido hepático não canceroso. No referido estudo foi constatado

que havia expressão elevada do Fator Estimulador de Colônias de Macrófagos (CSF-1) em microambiente hepático de pacientes portadores de metástase venosa intra-hepática.

Atualmente tem sido utilizado os Critérios de Milão, baseados no tamanho do tumor, para a seleção de pacientes aptos ao transplante hepático como tratamento do carcinoma hepatocelular, todavia os indícios demonstrados na literatura revelam que este parâmetro isolado é insuficiente para inferir sobre a recidiva tumoral, e sugerem que outros achados do microambiente tumoral como a invasão vascular por células neoplásicas e o infiltrado de células inflamatórias e suas citocinas devam ser considerados em estudos científicos de relevância visando a expansão dos critérios atuais.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Quantificar a presença de Macrófagos Associados ao Tumor (TAMs) e avaliar sua relação com os aspectos clínico-patológicos em pacientes portadores de Carcinoma Hepatocelular (CHC).

2.2 Objetivos Específicos

- Demonstrar e quantificar a presença de macrófagos peritumorais e intra-tumorais (TAMs) no CHC através da imunomarcção com CD68
- Determinar se existe correlação entre quantidade de TAMs e graduação de Edmondson-Steiner
- Determinar correlação entre tamanho do tumor e dosagem de alfa-fetoproteína
- Estabelecer se a invasão vascular em CHC tem relação direta com densidade de TAMs
- Correlacionar quantidade de TAMs aos aspectos clínico-patológicos nos pacientes com carcinoma hepatocelular

3. MÉTODO

3.1 Casuística

Foram selecionados, retrospectivamente, junto ao Departamento de Patologia e Medicina Legal (DPML) da Universidade Federal do Ceará (UFC) 44 casos de Carcinoma hepatocelular (CHC) diagnosticados no período entre janeiro de 2005 a dezembro de 2009, através de hepatectomia total por transplante hepático.

Os critérios de inclusão foram: a) Revisão e confirmação do diagnóstico por dois patologistas; b) Mensuração da amostra tumoral em bloco de parafina garantindo que

houvesse quantidade suficiente para realização de novos cortes histológicos e manutenção da reserva sem prejuízo para exames posteriores pelos pacientes; c) Avaliar que as amostras permitiriam cortes histológicos com mínimo de cinco campos de 400x (campos de grande aumento).

Os critérios de exclusão foram: a) casos com diagnóstico discordante entre os patologistas; b) impossibilidade de reconhecer a arquitetura tumoral e estabelecer o grau de Edmondson-Steiner; c) amostra histopatológica limitada para a reavaliação e novos cortes.

Foram avaliados os blocos de parafina e as lâminas histológicas objetivando definir os critérios de inclusão e exclusão de cada caso. A amostra final foi de 35 casos que preenchiam os critérios de inclusão, visto que três casos apresentavam necrose intratumoral impossibilitando avaliar o grau de diferenciação, quatro casos tinham o tamanho tumoral menor que 5mm, não atingindo área suficiente para novos cortes com avaliação e dois casos tinham amostragem exígua para a contagem de CD68.

O projeto desta pesquisa foi previamente submetido à análise pelo Comitê de Ética em Pesquisas do Hospital Universitário Walter Cantídio e obteve aprovação (ver anexo A).

Foi obtido o consentimento do fiel depositário dos blocos e lâminas no Departamento de Patologia da Universidade Federal do Ceará, bem como do fiel depositário dos prontuários no Hospital Walter Cantídio para a realização da pesquisa. Também foi firmado e assinado pelos pesquisadores um termo para a utilização dos dados obtidos junto aos documentos e material de biópsia com exclusividade nesta pesquisa.

3.2 Dados Clínicos

Foram obtidas informações clínicas através de consulta aos prontuários no Serviço de Arquivo Médico Estatístico (SAME) do Hospital Universitário Walter Cantídio da Universidade Federal do Ceará (UFC), ou presentes na ficha clínica do serviço de transplantes da referida instituição.

Os dados clínicos avaliados foram: sexo, idade, hábitos de cigarro, álcool e drogas, data do diagnóstico, tamanho do tumor (relatados pela macroscopia, ultrassonografia ou tomografia computadorizada), dosagem de alfa-fetoproteína, realização de quimio-embolização, tempo livre de doença e data do óbito, quando ocorrido. Estes dados foram registrados em uma ficha padronizada (Anexo B).

3.3 Confeção das Lâminas

As amostras se encontravam em blocos de parafina no Departamento de Patologia e Medicina Legal (DPML) da UFC. Foram realizados cortes histológicos com espessura padrão de 4 μ m conseguindo-se duas amostrasseriadas, sendo uma corada com hematoxilina-eosina (H-E) de forma habitual e outra preparada em lâmina especial para coloração imuno-histoquímica conforme descrito previamente no estudo de Forssell e colaboradores. Foi realizado controle da imunomarcação em tecido de amígdala palatina previamente selecionada para este fim. A coloração foi realizada em um equipamento semi-automático (Ventana) para procedimentos laboratoriais de imuno-histoquímica, com autonomia de trinta lâminas por vez, sendo utilizado anticorpo monoclonal CD68 (Dako)

com diluição recomendada pelo fabricante conforme descrito em trabalhos anteriores (FORSELL 2007).

3.4 Leitura das Lâminas

3.4.1 Leitura da coloração H-E

As lâminas coradas pelo HE foram revisadas por dois observadores reavaliando todos os achados histológicos incluindo tipo tumoral, estadiamento patológico, graduação de Edmondson-Steiner, infiltração vascular tumoral e infiltração de células inflamatórias com contagem de macrófagos na área tumoral (TAMs). Foram estudados dois espaços no microambiente da neoplasia: área intratumoral e área peritumoral.

3.4.2 Leitura Imuno-histoquímica

A imunomarcagem mostrou que os macrófagos (TAMs) foram corados fortemente em seu citoplasma na cor marrom pelo anticorpo CD68. A análise foi feita pelos mesmos observadores em microscópio óptico marca Nikon, modelo E200, sem qualquer conhecimento prévio sobre prognóstico ou correlação clínico-patológica. Casos considerados conflitantes foram revisados pelos referidos patologistas e o resultado foi obtido do consenso entre os dois. Foi realizada contagem numérica de TAMs em cinco campos de grande aumento (400x) conforme descrito no estudo prévio de LI *et al* em 2009. Foram avaliadas áreas distintas do ambiente tumoral, sendo especificamente observado áreas intratumorais e peritumorais.

3.5 Análise Estatística

Foi utilizado O *software* GraphPad Prism[®] versão 5.00 para Windows[®] (GraphPad Software, San Diego, Califórnia, USA, 2007) tanto para a realização dos procedimentos estatísticos como para a elaboração dos gráficos. As variáveis quantitativas, contínuas e discretas, foram inicialmente analisadas pelo teste de Kolmogorov-Smirnov para verificar a normalidade da distribuição. Para a estatística descritiva, calcularam-se a média e o desvio padrão (dados paramétricos) ou a mediana, intervalo interquartil e valor mínimo e máximo (dados não-paramétricos).

Comparações entre duas variáveis independentes foram realizadas pelo teste *t* para dados não-emparelhados. Tratando-se de duas variáveis dependentes, comparações entre elas foram feitas pelo teste *t* para dados emparelhados. O grau e o sinal da correlação linear entre duas variáveis foram verificados pelo coeficiente de correlação de Pearson (dados paramétricos) ou pelo coeficiente de correlação de Spearman (dados não-paramétricos) (ARMITAGE; BERRY, 1994).

Em todos os casos, estabeleceu-se em 0,05 (5%) a probabilidade α do erro tipo I (nível de significância), sendo considerado como estatisticamente significativo um valor *p* menor que 0,05.

4 RESULTADOS

Os pacientes estudados se distribuíaam quanto ao sexo em 29 (82,8%) masculinos e 06 (17,12%) femininos. O sexo masculino foi predominante no acometimento de carcinoma hepatocelular.

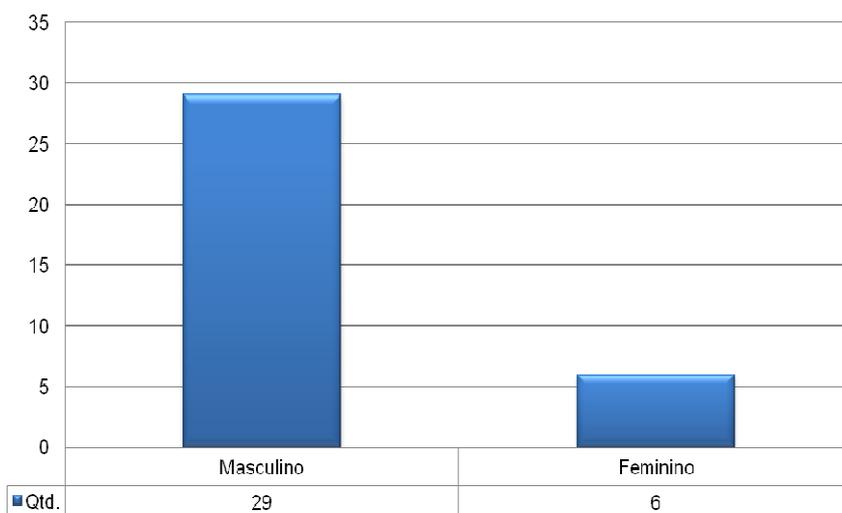


Gráfico 2- Distribuição dos pacientes quanto ao sexo

Quanto à idade, 14 pacientes tinham idade acima de 60 anos e 21 pacientes abaixo de 60 anos, sendo a média de idade de 55,13 anos no momento do diagnóstico (Figura 3).

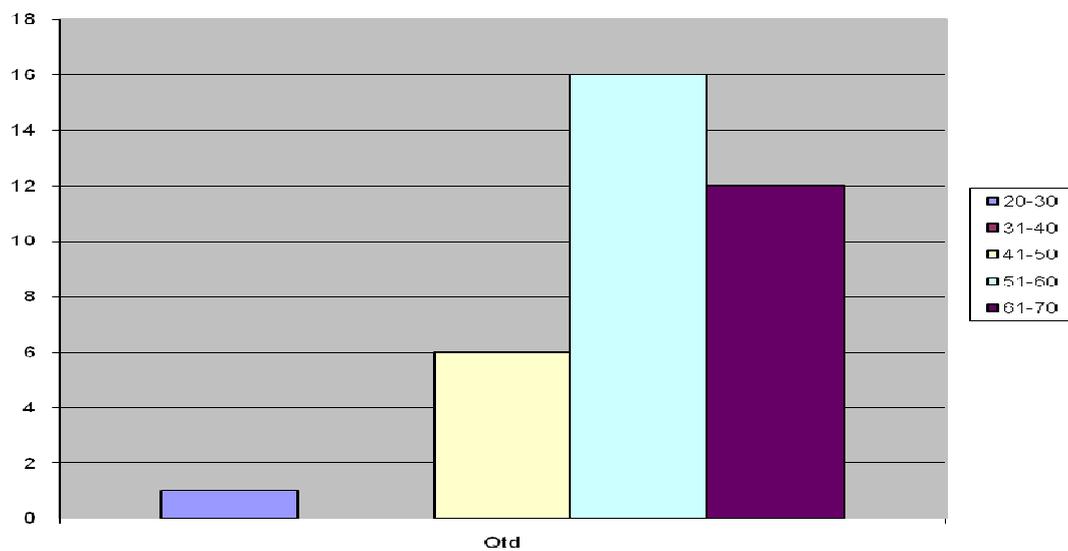


Gráfico 2- Distribuição dos pacientes quanto à idade em que foi estabelecido o diagnóstico

Todos os pacientes estudados tinham cirrose associada ao carcinoma hepatocelular. Em relação à etiologia da cirrose 32 pacientes(91,4%) tinham fatores definidos e 03 casos (8,6%) não tinham etiologia definida (Tabela 1). Dentre os fatores etiológicos encontrados a infecção pelo vírus da hepatite C esteve presente em 16 (47,5%) dos casos com etiologia definida, sendo que em 03 casos estavam associados ao uso crônico do álcool. O vírus da hepatite B foi responsável por 08 (25%) dos casos; a ingestão alcoólica crônica estava presente em 10 (9,37%) dos casos, sendo que em 03 casos estavam associados ao VHC. Um paciente (3,12%) era portador de hemocromatose (Figura 2).

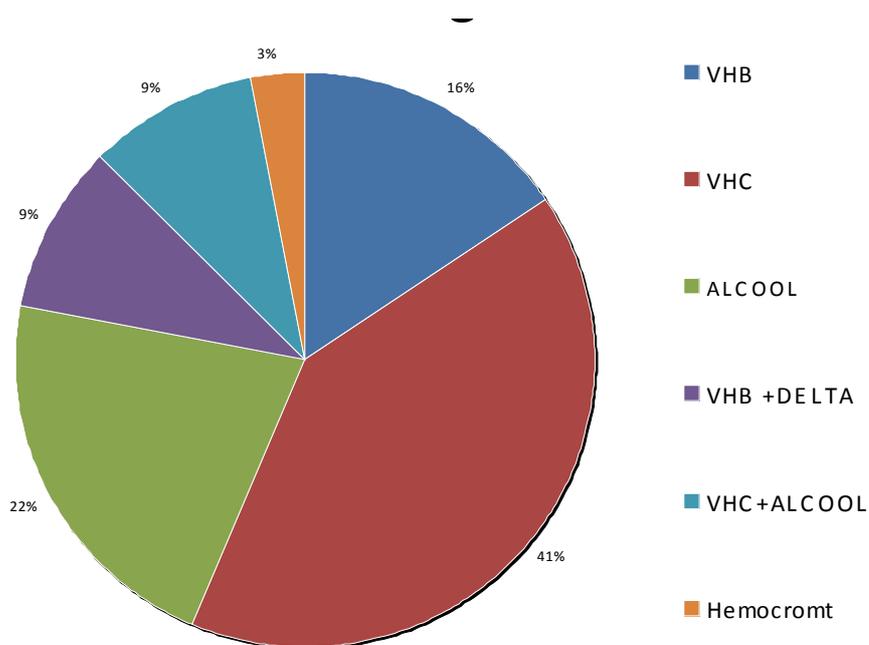


Figura 2 – Etiologia da cirrose dentre os pacientes estudados (n=32)

Houve presença de invasão vascular pela neoplasia em 08 casos estudados, destes 50% tinham alfa-fetoproteína pré-transplante acima de 20ng/ml. Dentre os casos que apresentavam infiltração vascular 87,5% tinham tamanho tumoral igual ou maior a 2cm.

Foi realizado tratamento de quimioembolização prévia ao transplante em cinco (14,28%) pacientes. Foram feitas comparações entre os pacientes submetidos ou não à quimioembolização com a quantidade de macrófagos intra e peritumoral, mediante o uso do teste *t* para variáveis não-emparelhadas. Os dados foram expressos como média e desvio padrão das medições efetuadas nos preparados histológicos de 5 pacientes que realizaram quimioembolização e 30 sujeitos que não foram submetidos a tal procedimento. Na quantificação de macrófagos intratumorais foram feitas comparações entre os dois grupos de pacientes e não foi constatada diferença estatisticamente significativa ($P = 0,9215$) entre eles (Gráfico3) Na quantificação peritumoral de macrófagos também não foi estatisticamente significativa ($P = 0,8795$) a diferença encontrada entre os pacientes submetidos ($123,60 \pm 41,02$) ou não ($119,30 \pm 60,26$) à quimioembolização (Gráfico 4).

TABELA 1- Características clínicas e demográficas dos pacientes com CHC

Idade média (anos)	55,1
Sexo	
Masculino	29
Feminino	06
Etiologia da Cirrose	

Hepatite C	13
Hepatite B	05
Álcool	07
Hepatite C + Álcool	03
Hepatite B + Delta	03
Hemocromatose	03
Não definida	03
Número de Nódulos	
Único	13
Múltiplos	22

TABELA 2- Percentual do tamanho tumoral entre os pacientes analisados

Tamanho(cm)	Qtd.	%
0 a 1	1	2,86%
1,1 a 2	11	31,43%

2,1 a 3	15	42,86%
3,1 a 4	4	11,43%
4,1 a 5	3	8,57%
5,1 a 6	0	0,00%
6,1 a 7	1	2,86%

Vinte e dois pacientes (62,8%) apresentavam tamanho tumoral acima de 2,0cm e menor que 5,0cm (Tabela 2).

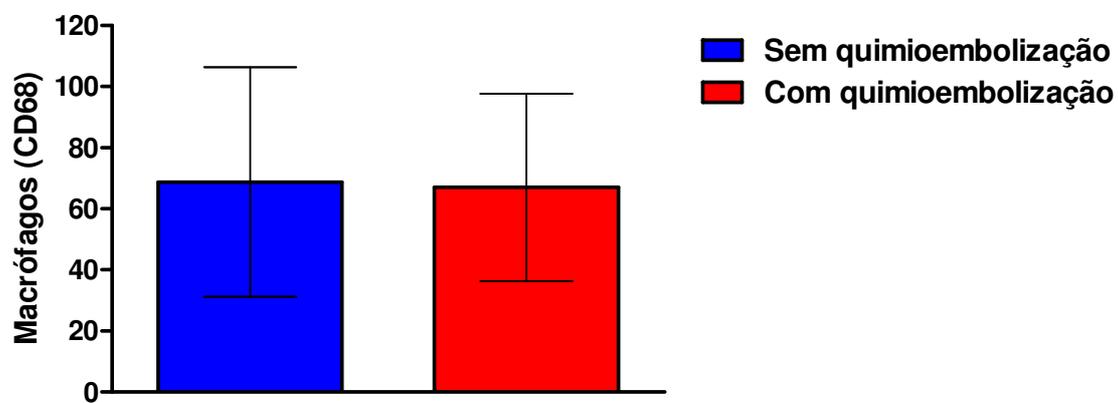


Gráfico 3– Quantificação intratumoral de macrófagos nos pacientes submetidos à quimioembolização (n=5) ou não submetidos à quimioembolização (n=30)

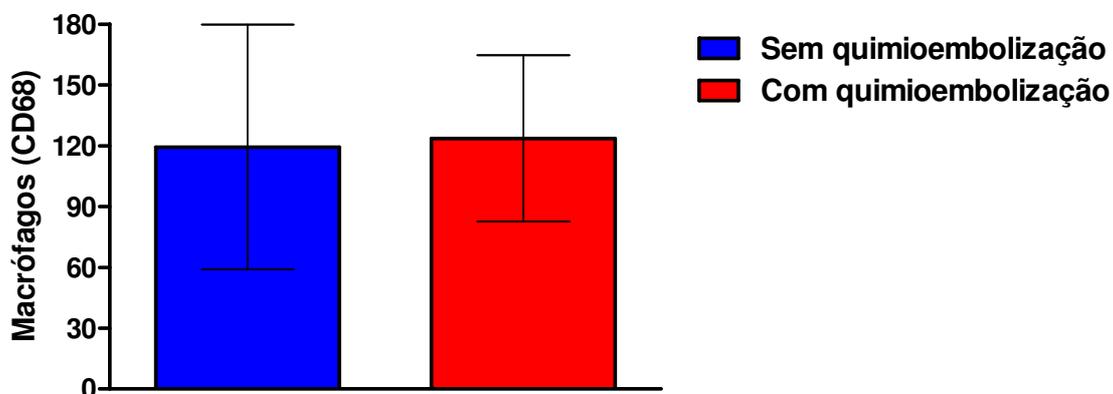


Gráfico 4 – Quantificação peritumoral de macrófagos nos pacientes submetidos ou não à quimioembolização.

Constatou-se que a quantidade de macrófagos verificada na região peritumoral ($119,91 \pm 57,42$) foi significativamente maior ($p < 0,0001$) que a observada na região intratumoral ($68,51 \pm 36,28$). A quantificação de macrófagos nas regiões intra e peritumoral, conforme expressão imuno-histoquímica de CD68 tiveram os dados expressos como média e desvio padrão das medições efetuadas nos preparados histológicos de 35 pacientes em cada região. As comparações entre as duas regiões anatômicas foram feitas mediante o uso do teste *t* para variáveis emparelhadas (Gráfico 5).

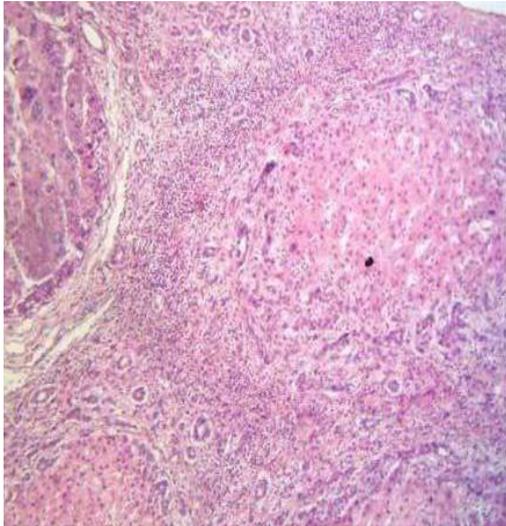


Figura3 – Coloração HE área intratumoral e peritumoral (200x)

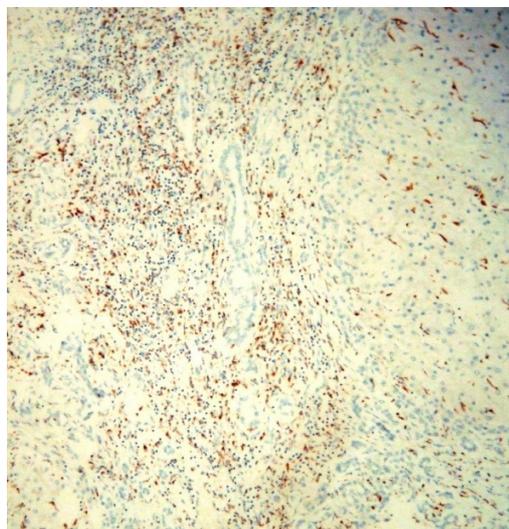


Figura 4– Coloração imuno-histoquímica para CD68 área intratumoral e peritumoral (200x)

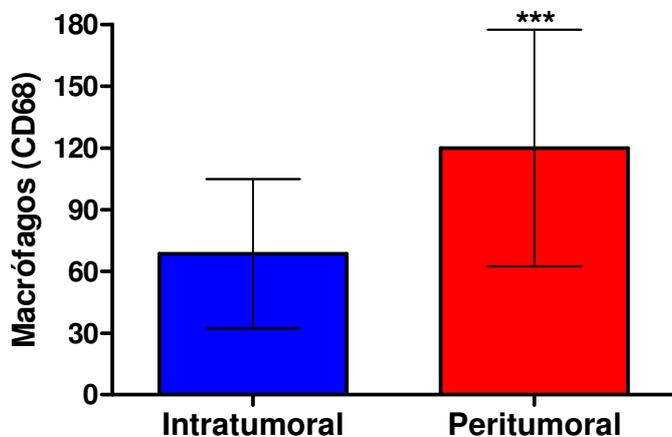


Gráfico6– Quantificação de macrófagos nas regiões intratumoral e peritumoral ($p < 0,0001$)

A partir de dados expressos como média e desvio padrão das medições efetuadas nos preparados histológicos de 8 pacientes cujos exames evidenciaram invasão vascular e 27 sujeitos nos quais tal achado não foi observado, a quantificação intratumoral de macrófagos foi maior entre os pacientes sem invasão vascular ($73,48 \pm 37,61$) do que entre os pacientes com invasão vascular ($51,75 \pm 26,92$), embora a diferença não tenha sido significativa do ponto de vista estatístico ($p = 0,1390$);

As comparações entre os dois grupos de pacientes foram feitas mediante o uso do teste *t* para variáveis não-emparelhadas (Gráficos 5 e 6).

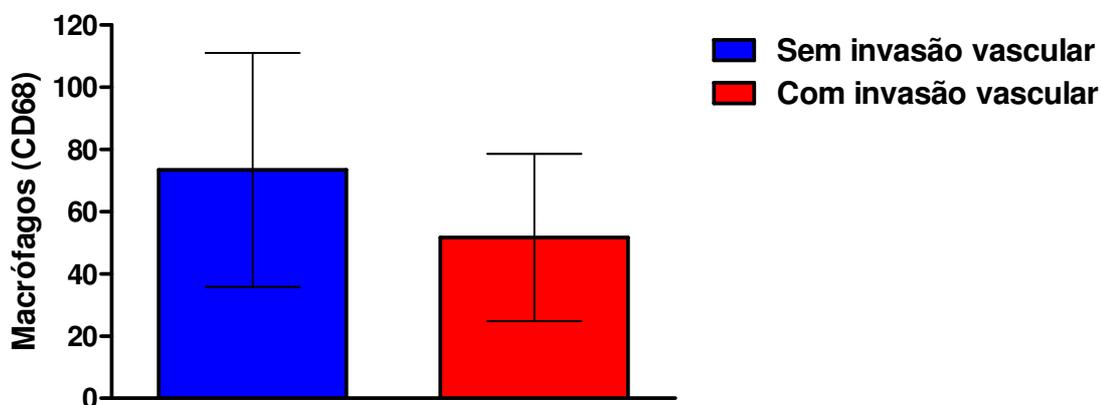


Gráfico 7 – Quantificação intratumoral de macrófagos nos pacientes com e sem invasão vascular

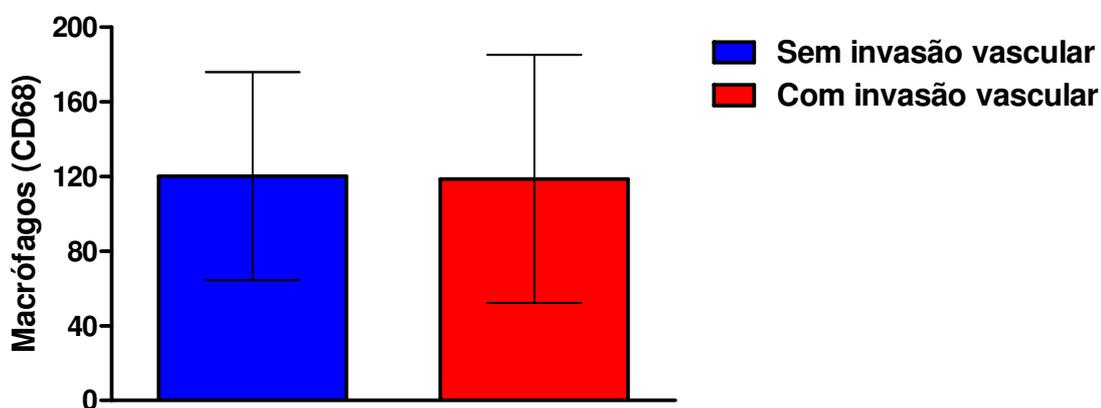


Gráfico 8 – Quantificação peritumoral de macrófagos nos pacientes com e sem invasão vascular

Houve associação entre a quantidade de macrófagos intratumorais, conforme expressão imuno-histoquímica de CD68, e o tamanho do tumor (Gráfico 6).

O grau e o sinal da correlação linear entre as duas variáveis foram quantificados pelo coeficiente de correlação de Pearson (r). Verificou-se uma fraca correlação linear negativa ($r = -0,3517$) significativo do ponto de vista estatístico ($p = 0,0383$) entre a quantidade de macrófagos intratumorais e o tamanho do tumor. Entre os macrófagos peritumorais e o tamanho do tumor demonstra-se correlação linear positiva ($r = 0,1890$), porém a diferença estatística não foi significativa ($p = 0,2768$). O grau e o sinal da correlação linear entre as duas variáveis foram quantificados pelo coeficiente de correlação de Pearson (r) (Gráfico 7). Estes achados sugerem que há diferença no perfil dos macrófagos peri e intratumoral.

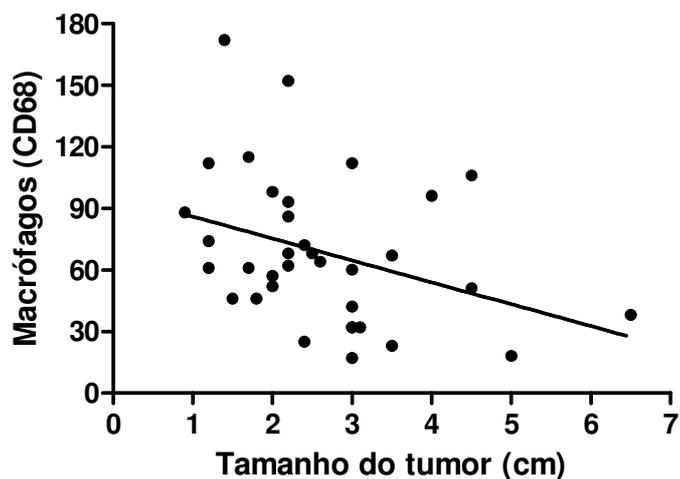


Gráfico 9 – Associação entre a quantidade de macrófagos intratumorais e o tamanho do tumor ($p=0,0383$)

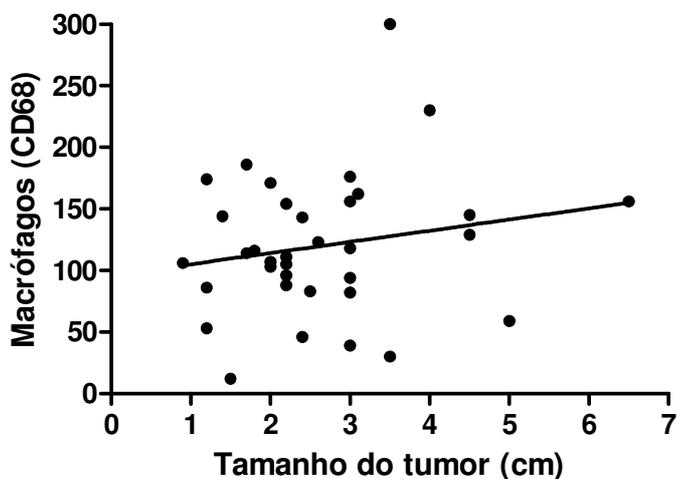


Gráfico 10 – Associação entre a quantidade de macrófagos peritumorais e o tamanho do tumor

Não se demonstra neste estudo associação entre a quantidade de macrófagos intratumorais e o grau de Edmondson-Steiner. O grau e o sinal da correlação linear entre as duas variáveis foram quantificados pelo coeficiente de correlação de Spearman (r). Não foi constatada correlação linear ($r = -0,0012$; $p = 0,9944$) entre a quantidade de macrófagos intratumorais e o grau de Edmondson-Steiner (Gráfico 8). Também não foi constatada correlação linear ($r = 0,1123$; $p = 0,5209$) entre a quantidade de macrófagos peritumorais e o grau de Edmondson-Steiner (Gráfico 9).

Ao estudarmos o tempo livre de doença, em meses, e sua associação com a quantidade de macrófagos, utilizamos o coeficiente de correlação de Pearson (r) para quantificar o grau e o sinal da correlação linear entre as duas variáveis e verificamos uma fraca correlação linear negativa ($r = -0,3142$; $p = 0,0660$) entre os macrófagos intratumorais, bem como entre os macrófagos peritumorais ($r = -0,2804$; $p = 0,1028$) (Gráfico 10).

Não foi constatada correlação linear ($r = 0,0589$; $p = 0,7370$) entre os valores da alfa-fetoproteína e o tamanho do tumor (Gráfico 11 e 12).

TABELA 3-Relação entre tamanho tumoral e presença ou não de invasão vascular

	Com invasão vascular	Sem invasão vascular
Tumor < 2,0cm	02	11
Tumor > 2,0cm	06	16

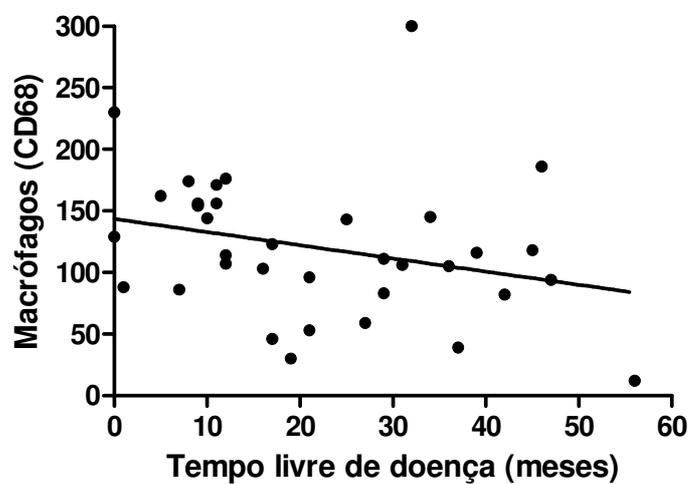


Gráfico 11 – Associação entre a quantidade de macrófagos peritumorais e o tempo livre de doença (meses)

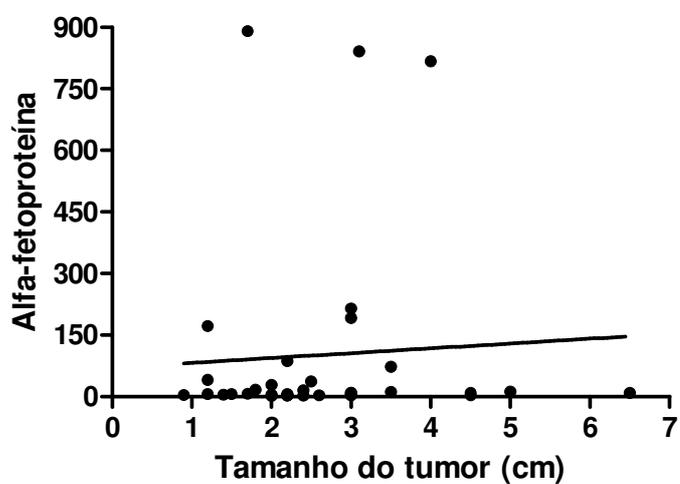


Gráfico 12 – Associação entre a alfa-fetoproteína e o tamanho do tumor.

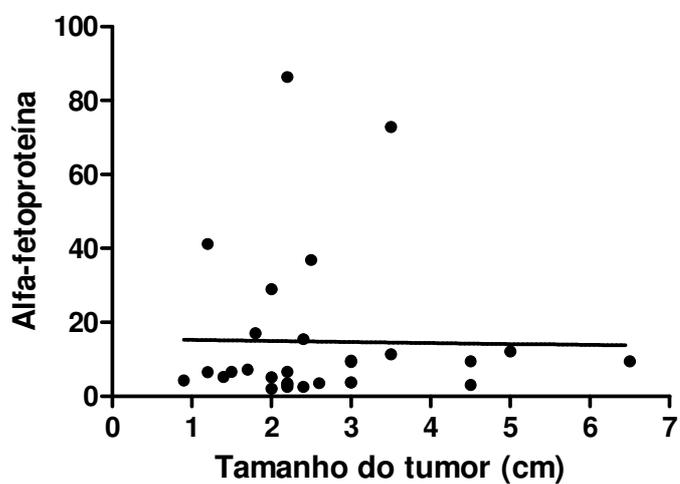


Gráfico 13 – Associação entre a alfa-fetoproteína e o tamanho do tumor após a remoção dos valores discrepantes da alfa-fetoproteína (6 pacientes).

5 DISCUSSÃO

No presente estudo a distribuição de casos de CHC em relação ao sexo e a idade foi condizente com a literatura. Nosso estudo apresentou uma proporção de quatro homens para uma mulher o que tem sido observado em vários estudos no mundo inteiro. Fatores endógenos, ambientais e comportamentais podem estar associados à predominância de casos de CHC entre os homens.

A média de idade em que se estabeleceu o diagnóstico de CHC entre os nossos pacientes foi de 55,1 anos, o que também está de acordo com a maioria dos estudos publicados, onde a média de idade encontra-se entre quinta e sexta décadas. Sabe-se que a idade de distribuição de CHC mundialmente pode variar de acordo com a região estudada, taxa de incidência, sexo e possivelmente pela etiologia (EL-SERAG 2007, KUMAR,2004).

A medida do maior diâmetro tumoral foi estabelecida para cada amostra estudada e foi observada uma diferença de 5,6cm do menor para o maior tumor analisado. Não houve associação entre o tamanho do tumor e a dosagem de alfa-fetoproteína demonstrando que a quantidade de alfa-fetoproteína independe do crescimento tumoral, podendo ser decorrente de diversas situações clínicas e patológicas. Estudos demonstram que até 65% de pacientes com tumor hepático podem manter níveis normais de alfa-fetoproteína (menor que 20ng/mL) e que apenas 22% dos pacientes com Carcinoma hepatocelular tiveram níveis de AFP acima de 200ng/mL. Também tem que se considerar que doenças como hepatite, cirrose, e até carcinoma pulmonar elevam os níveis séricos dessa glicoproteína (COELHO,2009; GOMAA, 2009).

A quantidade de TAMs nos tumores e adjacências tem variado nos diferentes estudos realizados, de acordo com o órgão acometido e a localização destes macrófagos no microambiente tumoral. Também foram descritas variações do comportamento destes macrófagos, se estimulantes ou não ao desenvolvimento tumoral (CHEN, 2005, FORSELL, 2007; LI, 2009; SICA, 2006).

LEWIS e POLLARD publicaram em 2006 uma revisão de literatura que demonstrava que a alta infiltração de TAMs em tumores de estômago, colorretal e melanoma mostrava-se favorável ao prognóstico dos pacientes, e em tumores de mama, próstata, endométrio, bexiga, rim, esôfago e carcinoma de pele a alta infiltração macrofágica estava relacionada com pior prognóstico.

Em nosso estudo avaliamos a infiltração de macrófagos em duas áreas distintas do microambiente tumoral: a região intratumoral e a peritumoral. Observamos que a quantidade de TAMs nas áreas peritumorais foi maior do que a observada nas áreas intratumorais e este dado foi significativo do ponto de vista estatístico ($p < 0,0001$). As áreas peritumorais são ricas em células de inflamação, fibroblastos, células endoteliais e outras células epiteliais não malignas, além das células de Kupffer que representam uma população de macrófagos residentes no tecido hepático e que se somam aos TAMs na marcação pelo corante imuno-histoquímico, mas que possuem uma disposição histológica e fenotípica bem conhecida e distinta.

A presença de cirrose hepática em todos os casos estudados proveniente de prolongado processo inflamatório crônico pode contribuir, em parte, com o aumentados componentes

celulares e inflamatórios no compartimento peritumoral. (COUSSENS, 2002 e LEWIS, 2006).

O tamanho do tumor foi correlacionado com a quantidade de macrófagos observada dentro da neoplasia (intratumoral) e nas adjacências (peritumoral), tendo sido verificada maior quantidade de macrófagos no microambiente intratumoral dos tumores menores, enquanto nos tumores maiores decrescia esta quantidade, revelando assim uma correlação linear negativa, significante do ponto de vista estatístico ($p=0,0383$), entre a quantidade de macrófagos intratumorais e o tamanho do tumor. Este resultado pode ser analisado como produto do balanço regulatório entre os perfis de citocinas produzidos nos diferentes compartimentos da neoplasia (SHIMURA *et al*, 2000).

A agressividade tumoral se correlaciona com o grau de Edmondson-Steiner, presença ou ausência de necrose e de invasão vascular. Uma vantagem na utilização da graduação de Edmondson-Steiner é que ela se baseia nos aspectos histológicos de diferenciação tumoral, ou seja, os aspectos microscópicos revelam o grau de distorção celular e arquitetural do tumor, podendo ser aplicada em neoplasias de quaisquer diâmetros. Observa-se que tumores de maiores diâmetros podem ter comportamento pouco agressivo do ponto de vista da diferenciação histológica e tumores bem pequenos podem ter intenso pleomorfismo inclusive apresentar metástases ou invasão vascular.

Em nosso estudo, não se observou relação de dependência entre o grau de Edmondson-Steiner com a infiltração de TAMs, todavia houve correlação entre a quantidade de TAMs e o tamanho do tumor como demonstrado nos gráficos 6 e 7.

Observamos que os tumores pequenos apresentavam maior infiltração de TAMs no compartimento intratumoral, e os tumores maiores apresentavam maior infiltração de TAMs no compartimento peritumoral. É fundamental entender porque foram recrutados poucos macrófagos para dentro das neoplasias grandes e muitos macrófagos para as neoplasias pequenas remetendo ao modelo de inflamação como peça chave desta questão. Possivelmente o perfil de citocinas produzidas pelos macrófagos seja distinto entre as áreas estudadas modificando o fenótipo adquirido por estas células nos diferentes compartimentos do microambiente tumoral, ou ainda, as citocinas liberadas por estes macrófagos possam fazer parte do repertório de supressão tumoral, rica em interleucina-10 e ativação de linfócitos T citotóxicos o que pode promover regressão do tumor.

Os tumores maiores exibiam baixa infiltração de macrófagos intratumorais e elevada densidade dessa população celular nas áreas peritumorais. Duas possíveis explicações foram aventadas para explicar este achado: uma seria a possibilidade que essa baixa quantidade de macrófagos entre as células tumorais não fosse suficiente em produzir substâncias de ação anti-tumoral o que permitiria um maior crescimento da neoplasia; a outra seria que a maior quantidade de macrófagos no tecido peritumoral poderia ter alguma ação tumorigênica que favorecesse o crescimento do tumor.

Os neutrófilos são as primeiras células de inflamação recrutadas para o local de dano tecidual. Os monócitos que se diferenciam em macrófagos são os próximos a chegar guiados por fatores quimiotáticos. Uma vez ativados os macrófagos são as principais fontes de produção de fatores de crescimento, citocinas, que afetam profundamente o endotélio,

epitélio e estroma do microambiente local. As células tumorais produzem várias citocinas e quimiocinas que atraem leucócitos.

O componente inflamatório de uma neoplasia em desenvolvimento pode incluir uma população diversificada de leucócitos, por exemplo, neutrófilos, células dendríticas, macrófagos, eosinófilos e mastócitos, bem como linfócitos, todos sendo capazes de produzir uma variedade de citocinas, mediadores citotóxicos, proteases, metaloproteinases da matriz (MMPs) e mediadores de morte celular como TNF- α , interleucinas e interferons. TAMs são um significativo componente inflamatório em tecidos neoplásicos e são derivados de monócitos que são recrutados largamente por proteínas e quimiocinas quimiotáticas de monócitos (COUSSENS, 2002).

Estudos utilizando camundongos transgênicos suprimidos para a expressão do Fator Estimulador de Colônias de Monócitos (CSF-1) mostram menor migração de macrófagos para os sítios tumorais e maior desenvolvimento tumoral em neoplasias avançadas. Pode-se inferir que as células neoplásicas em tumores de pequeno diâmetro ainda não tenham sofrido perda da expressão de Fator Estimulador de Colônias e, portanto, mantenham seu potencial de recrutar macrófagos, estes por sua vez sendo capazes de produzir seu repertório antitumoral, limitando o crescimento neoplásico. Já as neoplasias de maiores diâmetros tenham maior grau de lesão e dano genético com prejuízo em sua capacidade de recrutar macrófagos para o sítio tumoral, desse modo contribuindo menos com os fatores anti-tumorais promovendo um balanço negativo em favor do crescimento neoplásico.

Alguns estudos recentes sugerem que defeitos no mecanismo anti-inflamatório endógeno possam influenciar o câncer. Os principais mediadores envolvidos neste

mecanismo são o TGF- β e a IL-10. Estudos experimentais com camundongos transgênicos e inativos para a expressão do gene SM AD-4, uma proteína requerida para a sinalização de TGF- β , causou o desenvolvimento espontâneo de tumores gastrointestinais nos animais estudados. Em outros estudos a deleção do gene da IL-10 em camundongos causou doença intestinal inflamatória e promoveu o desenvolvimento de câncer colorretal (BERG, 1996; BECKER, 2004; KUHN, 1993; LAWRENCE, 2007).

Não houve diferença estatística entre a quantidade de TAMs apresentadas pelo grupo de pacientes submetidos à quimio-embolização (05 pacientes) e aqueles que não foram submetidos a este procedimento (30 pacientes) quando se estudam ambos os compartimentos intra e peritumoral. Uma possível explicação seja por haver isquemia e morte celular em ambos os compartimentos analisados (intra e peritumoral) uma vez que haverá ação das drogas quimioterápicas e embolizantes em todo o microambiente tumoral (GRETEN, 2005).

A presença de TAMs entre os casos que apresentavam ou não invasão vascular variou em relação ao compartimento analisado, se intra ou peritumoral, todavia essa diferença não foi estatisticamente significativa. É sabido que a ocorrência de invasão vascular, angiogênese e metástase estão associadas a um aumento na expressão de Fator de Crescimento do Endotélio Vascular (VEGF), e que este estimula a migração de macrófagos para o sítio tumoral (KHORANA, 2003).

Não foi possível detectar diferença estatística devido ao tamanho da amostra estudada e porque o estudo dividiu a quantidade de TAMs no microambiente tumoral, pois a ação desta substância certamente tem efeito parácrino nos compartimentos analisados.

Analizamos também a correlação entre TAMs e o tempo livre de doença, mas não foi possível estabelecer significância estatística, possivelmente pelo tamanho da amostra e pelo tempo de acompanhamento que não alcançou cinco anos após a ressecção cirúrgica. Dentre os pacientes submetidos a transplante de fígado em conformidade com os critérios de Milão 8 a 15% têm recorrência da doença. Ainda assim verificou-se uma fraca correlação linear negativa entre a quantidade de macrófagos intra e peritumoral e o tempo livre de doença.

Este resultado mostra-se condizente com a literatura em relação aos macrófagos peritumorais e contraditório em relação aos macrófagos intratumorais, todavia os estudos anteriores não faziam qualquer distinção entre esta topografia no microambiente tumoral, apenas considerava a quantidade total de macrófagos associados ao tumor. Para este tipo tumoral os estudos verificaram que a quantidade de TAMs é diretamente associada ao tempo livre de doença e pacientes com alta infiltração de TAMs tem melhor prognóstico e aumento da sobrevida geral (LI, 2009). A sobrevida média dos doentes estaria mais ligada à gravidade da cirrose e de suas complicações, particularmente a insuficiência hepática e os sangramentos, do que ao tumor propriamente dito (CONTE, 2000).

O transplante hepático é uma abordagem de tratamento para o CHC considerado atualmente a mais adequada do ponto de vista oncológico, pois além de remover o tumor, substitui o parênquima hepático comprometido por fígado normal, restabelecendo sua função, diminuindo as recidivas em casos selecionados e retirando todo o tecido cirrótico que é pré-maligno.

A observação de que pacientes cirróticos com tumores pequenos não detectados nos exames pré-transplante (tumores incidentais) apresentavam índice de sobrevida livre de recorrência do tumor indistinguíveis dos cirróticos sem malignidade, embasou as convicções do potencial curativo do transplante hepático em relação ao CHC (PAROLINI, 2001).

O presente estudo revela que no carcinoma hepatocelular existe uma maior população de macrófagos intratumoral do que peritumoral e este dado foi estatisticamente significativo. Mostrou-se ainda que os tumores menores exibem maior quantidade destes macrófagos no seu interior evidenciando uma correlação linear negativa. Algumas questões como a relação entre a composição de subpopulações destes macrófagos de acordo com o perfil de citocinas produzidas, assim como a influencia dos macrófagos no mecanismo de regulação do crescimento tumoral ainda necessitam de esclarecimentos adicionais através de novos estudos.

6. CONCLUSÕES

O carcinoma hepatocelular apresenta tamanhos populacionais distintos no microambiente tumoral, sendo a concentração de TAMs dentro do tumor significativamente menor do que a observada nas regiões peritumorais.

Houve correlação linear negativa estatisticamente significativa entre a quantidade de TAMs intratumoral e o tamanho do tumor, mas não entre este e TAMs peritumorais. Infere-se que existam sub-populações distintas de macrófagos dentro de um mesmo microambiente tumoral.

Não houve correlação entre TAMs e graduação de Edmondson-Steiner, bem como não houve correlação entre TAM e a presença ou ausência de invasão vascular.

Constatou-se fraca correlação linear negativa entre os macrófagos intratumorais e o tempo livre de doença, todavia o período do estudo foi curto para avaliar a sobrevivência dos pacientes.

Não foi constatada correlação linear entre os valores da alfa-fetoproteína e o tamanho do tumor.

São necessários estudos detalhando o perfil de citocinas produzidas pelos macrófagos associados ao tumor em carcinoma hepatocelular e avaliar a expressão de substâncias capazes de atrair os macrófagos para o microambiente tumoral para melhor esclarecer a participação de TAMs nestes tumores.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBINI, A.; SPORN, M. B. The Tumour microenvironment as a target for chemoprevention. **Cancer**. V.7, p.139-147, 2007.

ANDERSON, A.R. *et al.* Tumor morphology and phenotypic evolution driven by selective pressure from the microenvironment. **Cell**, v.127, p. 905–915, 2006.

ANDRADE, L. J. O. *et al.* Association between hepatitis C and hepatocellular carcinoma. **J Glob infect dis**, v.1, p.33-37, 2009.

APETOH, L.; *et al.* Molecular Interactions between Dying Tumor Cells and the Innate Immune Systems Determine the Efficacy of Conventional Anticancer Therapies. **Cancer Res**. V.68(11), p. 4026-4030, 2008.

ARMITAGE, P.; BERRY, G. Statistical methods in medical research. 3. ed. **Oxford: Blackwell**, p. 620 1994.

BARUCH, A. B. Inflammation-associated immune suppression in cancer: the roles played by cytokines, chemokines and additional mediators. V.16, p. 38-52, 2006.

BECKER, C. *et al.* TGF- β suppresses tumor progression in colon cancer by inhibition of IL-6 trans-signaling. **Immunity**. V. 21, p.491–501, 2004.

BERG, D.J. *et al.* Enterocolitis and colon cancer in interleukin-10-deficient mice are associated with aberrant cytokine production and CD4⁺ Th1-like responses. **J. Clin. Invest.** V.98, p.1010–1020, 1996.

BOGLIOLO, L. **Patologia geral básica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.

BRUNO, S. *et al.* Long-term beneficial effects in sustained responders to interferon- α therapy for chronic hepatitis C. **J Hepatology**, v.34, p. 748-755, 2001.

BUCALA, R.; DONNELLY, S. C. Macrophage Migration Inhibitory Factor: A Probable Link between Inflammation and Cancer. **Immunity**. V.26, p.281-285, 2007.

BUDHU, A. *et al.* Prediction of venous metastases, recurrence, and prognosis in hepatocellular carcinoma based on a unique response signature of the liver microenvironment. **Cancer Cell**. V.10, p. 99-111, 2006.

_____, BRASIL- Ministério da Saúde. Portaria 1.160 29 de maio de 2006- Regulamento técnico para distribuição de órgãos de doadores cadáveres para transplante. DOU 197, 2006.

CHEN, J. J.W *et al.* Tumor-associated Macrophages: The Double-Edge Sword in Cancer Progression. **J of Clinical Oncology**. V23, p. 953-964

COELHO, G.R., VASCONCELOS, K.F., VASCONCELOS, J.B.M. *et al.* Orthotopic Liver Transplantation for Hepatocellular Carcinoma: One Center's Experience in the Northeast of Brazil. **Transplantation Proceedings**, v.41, p.1740-1742, 2009.

CONTE, V.P. Carcinoma hepatocelular. Parte 1. Considerações gerais e diagnostic. **Arq gastroenterol.**v.37, 2000.

COUSSENS, L.M.; WERB, Z. Inflammation and Cancer. **Nature**, V.420, p.19-26, 2002.

COTRIM, H. P; *et al.* Nonalcoholic steatohepatitis and hepatocellular carcinoma: natural history? **Am J Gastroenterology.**v.5, p. 3018-3019, 2000.

D'ALBUQUERQUE, L.A.C. *et al.* transplante de fígado no Carcinoma Hepatocelular: a escassez de órgãos e resultados bem estabelecidos justificariam ampliação das indicações ou de novas modalidades técnicas? **Arq Gastroenterol.** v.38, p.213-215, 2001.

DONATO, F. *et al.* Alcohol and hepatocellular carcinoma: the effect of lifetime intake and hepatitis virus infections in men and women. **Am J Epidemiology**, v.155, p. 323-331, 2002.

DUFOUR, J. F. *et al.* Tumour suppressors in liver carcinogenesis. **Journal of Hepatology**, v.47, p. 860-867, 2007.

EL-SERAG, H.B.; RUDOLPH, K.L. Hepatocellular carcinoma: Epidemiology and Molecular Carcinogenesis. **Gastroenterology**, v.132, p. 2557-2576, 2007.

FARROW, B.; ALBO, D.; BERGER, D.H. The role of the Tumor Microenvironment in the progression of Pancreatic Cancer. **Journal of Surgical Research**. V.149, p.319-328, 2008.

FORSSELL, J. *et al.* High macrophage infiltration along the tumor front correlates with improved survival in colon cancer. **Clin Cancer Res.**, v.13(5), .1472-1479, 2007.

FRANÇA, A.V. *et al.* Diagnosis, staging and treatment of hepatocellular carcinoma. **Braz J Med Biol Res.**, v. 37, p.1689-1705,2004.

FREEMAN, A.J.; DORE, G.J.; LAW, M.G., *et al.* Estimating progression to cirrhosis in chronic hepatitis C virus infection. **Hepatology**, v.34, p. 809-816, 2001.

GARCIA, J.H.P. *et al.* Orthotopic Liver Transplantation for Hepatocellular Carcinoma: One Center's Experience in the Northeast of Brazil. **Transplantation Proceedings**, v.41, p.1740-1742, 2009.

GAO, Q. *et al.* Intratumoral balance of regulatory and cytotoxic T cells is associated with prognosis of hepatocellular carcinoma after resection. **Journal of Clin Oncology**, v.18, p.2586-2593, 2007.

GOMAA, A.I. *et al.* Diagnosis of hepatocellular carcinoma. **World J Gastroenterol.**, v.15(11), p.1301-1314, 2009.

GRESNER, O. A.; WEISKIRCHEN, R.; GRESNER, A. M. Biomarkers of liver fibrosis: Clinical translation of molecular pathogenesis or based on liver-dependent malfunction tests. **Clinica Chimica Acta.** V.381, p.107-113, 2007.

GRETEN, T.F. *et al.* Molecular therapy for the treatment of hepatocellular carcinoma. **British Journal of Cancer.** V. 100, p.19-23. 2009.

GRETEN, T.F. *et al.* Survival rate in patients with hepatocellular carcinoma: a retrospective analysis of 389 patients. **British J of Cancer**, v.92, p.1862-1868.

HEMMING, A.W. *et al.* liver transplantation for hepatocellular carcinoma. **Ann Surg** V.233, p.652-659, 2001.

IKEDA, K. *et al.* Effect of interferon therapy on hepatocellular carcinogenesis in patients with chronic hepatitis type C: a long-term observation study of 1643 patients using statistical bias corrections with proportion hazard analysis. **Hepatology**, v. 29, p. 1124-1130, 1999.

IÑIGO, E.R. *et al.* Percentage of Hepatitis C Virus-Infected Hepatocytes Is a Better Predictor of Response Than Serum Viremia Levels. **Journal Mol Diagnostics** v. 7, P.535-543, 2005.

JONAS, S.*et al.* Vascular invasion and histopathologic grading determine outcome after liver transplantation for hepatocellular carcinoma in cirrhosis. **Hepatology** V.33, p.1080-1086, 2001.

KAWAI, O. *et al.* Predominant Infiltration of Macrophages and CD68⁺ T Cells in Cancer Nests Is a Significant Predictor of Survival in Stage IV Non-small Cell Lung Cancer. **Cancer** V. 113. P.1387-1395, 2008.

KUHN, R. *et al.* Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis. **Cell**. V. 75, p. 263–274, 1993.

KUMAR, V; ABBAS, A.K; FAUSTO, N.O Fígado e as Vias Biliares In: **__Bases Patológicas das Doenças**, 7ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005.cap.18, p.967-972.

KHORANA, A. A. *et al.* Vascular Endothelial Growth Factor, CD68, and Epidermal Growth Factor Receptor Expression and Survival in Patients with stage II and Stage III Colon Carcinoma. **Cancer**. V.97, p.960-968, 2003.

LARSSON, S.C.; WOLK, A. Overweight, obesity and risk of liver cancer: a meta-analysis of cohort studies. **British J of Cancer**. V.97, p.1005-1008, 2007.

LAWRENCE, T. Inflammation and Cancer: a failure of resolution? **Trends in Pharmac Sciences** v.28, p.162-165, 2007.

LEWIS C.E.; POLLARD, J. W. Distinct Role of Macrophages in Different Tumor Microenvironments. **Cancer Res.**, v. 66, p.605-612, 2006.

LI, Y. W. *et al.* Tumor-infiltrating macrophages can predict favorable prognosis in hepatocellular carcinoma after resection. **J Cancer Res Clin Oncol.**, v.135, p. 439-449, 2009.

LIN, C. Y. *et al.* Macrophage activation increases the invasive properties of hepatoma cells by destabilization of the adherences junction. **Federation of Europ Biochem Societies**, v.580, p.3042-3050, 2006.

LIU, Z.M. *et al.* Hepatitis B virus infection contributes to oxidative stress in a population exposed to aflatoxin B1 and high-risk for hepatocellular carcinoma. **Cancer Lett.** v.18, p 212-222.2008.

LU, H.; OUYANG, W.; HUANG, C. Inflammation, a Key Event in Cancer Development. **Mol Cancer Res.** v.4, p.221-233, 2006.

MACLENNAN, G.T. *et al.* The influence of Chronic Inflammation in Prostatic Carcinogenesis: A 5-Year Follow-up Study. **The J of Urology.** V. 176, p.1012-1016, 2006.

MANN, C. D. *et al.* Prognostic molecular markers in hepatocellular carcinoma: A systematic review. **European J of Cancer**, v.43, p. 979-992, 2007.

OKUDA K. *et al.* Natural history of hepatocellular carcinoma and prognosis in relation to treatment. Study of 850 patients. **Cancer**, v.56, p.918-928 198

OSADA, S.; SAJI, S. KUNO, T. Clinical significance of combination study of apoptotic factors and a proliferating cell nuclear antigen in estimating the prognosis of hepatocellular carcinoma. **J. Surg Oncology**. V. 85 (1), P. 48-54, 2004.

PAROLINI, M.B. *et al.* Resultados do Transplante hepático em portadores de Hepatocarcinoma. **Arq. Gastroenterologia**. V.38. p. 2001.

PIMENTA, J. R; MASSABKI, P.S. Carcinoma hepatocelular: um panorama clinic. **Rev. Bras Clin Med**. V.8, p.59-67, 2010.

POLLARD J. W. Tumor-educated macrophages promote tumor progression and metastasis. **Nat. Rev. Cancerv**.4, p.71–78, 2004.

POLIAK, K. *et al.* Co-evolution of tumor cells and their microenvironment. **Trends in Genetics**. V 25, p 30-31, 2008

REGIMBEAU, J. M. *et al.* Obesity and diabetes as a risk factor for hepatocellular carcinoma. **Liver Transpl**, v. 10, p. 569-573, 2004.

RUDOLPH, K.L. *et al.* Inhibition of experimental liver cirrhosis in mice by telomerase gene delivery. **Science** v.287, p.1253-1258, 2000.

SCHEDIN, P.; ELIAS, A. Multistep tumorigenesis and the microenvironment. **Breast Cancer Res** v.6, p.93-101, 2004.

SICA, A. *et al.* Tumor-associated macrophages are a distinct M2 polarized population promoting tumorprogression: Potential targets of anti-cancer therapy. **European J of Cancer**, v.42, p.717-727, 2006.

TLSTY, T. D., COUSSENS, L. M. Tumor stroma and regulation of cancer development. **Ann. Rev. Pathol. Mech. Dis.** V.1, p 119-150, 2006.

VALENÇA JR, J. T. Caracterização das AgNORs no Hepatocarcinoma: análise morfológica e quantitativa comparação com a graduação de Edmondson-Steiner. 171f. **Tese (Doutorado em Ciências Médicas)-** Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, 2001.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Mortality database. Available from: URL: <http://www.who.int/whosis/en/> . 2010

ZEN, Y. *et al.* Hepatocellular carcinoma arising in non-alcoholic steatohepatitis. **Pathology Int.** v.51, p. 127-131. 2001.

ANEXO A- PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA

ANEXO B- FICHA DE DADOS CLÍNICOS**Nº Prontuário** _____**Sexo** Feminino Masculino**Dosagem de alfa-fetoproteína pré-transplante** _____ ng/ml**Quimioembolização pré-transplante** Sim Não**Tamanho do tumor** (maior eixo) _____ cm**Nº Nódulos** Único Múltiplos**Presença de Cirrose** Sim Não**Etiologia da Cirrose**

VHB VHC VHB + Álcool VHC + Álcool
 VHB + Delta VHC + Delta Álcool Hemocromatose
 outros _____ Não definida

Graduação de Edmondson –Steiner I II III IV**Tempo pós-transplante** (meses) _____**Recidiva tumoral** Sim Não**Óbito relacionado ao Tumor** Sim Não**Invasão Vascular** Sim Não**Invasão Neural** Sim Não

ANEXO C- ASPECTOS HISTOPATOLÓGICOS

Pacientes	CD68 intra	CD68 Peri	Edmondson-Steiner	Invasão Vasos	Tamanho Nódulo(cm)
01	18	59	3	Sim	5,0
02	38	156	2	Não	6,5
03	52	171	3	Sim	2,0
04	93	96	2	Não	2,2
05	23	30	2	Sim	3,5
06	25	46	3	Não	2,4
07	17	39	2	Não	3,0
08	57	103	2	Não	2,0
09	67	300	3	Não	3,5
10	86	105	2	Não	2,2
11	172	144	2	Não	1,4
12	74	86	2	Sim	1,2
13	32	176	3	Não	3,0
14	62	111	2	Não	2,2
15	61	53	3	Não	1,2
16	46	116	2	Não	1,8
17	32	162	2	Sim	3,1
18	46	12	2	Não	1,5
19	112	174	2	Não	1,2
20	106	145	2	Não	4,5
21	60	82	2	Não	3,0
22	88	106	2	Não	0,9
23	112	156	3	Não	3,0
24	152	154	4	Não	1,2
25	64	123	2	Não	2,6
26	68	83	2	Sim	2,5
27	115	114	3	Não	1,7
28	98	107	2	Não	2,0
29	51	129	3	Sim	4,5
30	32	118	2	Não	3,0
31	42	94	3	Não	3,0
32	61	186	2	Não	1,7
33	68	88	3	Não	2,2
34	96	230	2	Sim	4,0
35	72	143	4	Não	2,4

