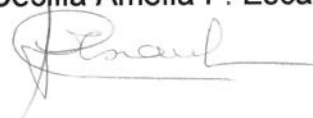


JOSÉ TELMO VALENÇA JÚNIOR

Este exemplar corresponde à versão final da Tese de Doutorado apresentada ao Curso de Pós-Graduação Ciências Médicas da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, para obtenção do título de Doutor em Ciências Médicas, Área de Anatomia Patológica.

Campinas, 15 de outubro de 2001.

Profa. Dra. Cecília Amélia F. Escanhoela
Orientadora

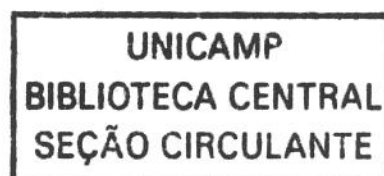


***CARACTERIZAÇÃO DAS AGNORS NO
HEPATOCARCINOMA: ANÁLISE MORFOLÓGICA E
QUANTITATIVA E COMPARAÇÃO COM A GRADUAÇÃO DE
EDMONDSON-STEINER***

CAMPINAS

2001

i



64970.000e

JOSÉ TELMO VALENÇA JÚNIOR

***CARACTERIZAÇÃO DAS AGNORS NO
HEPATOCARCINOMA: ANÁLISE MORFOLÓGICA E
QUANTITATIVA E COMPARAÇÃO COM A GRADUAÇÃO DE
EDMONDSON-STEINER***

*Tese de Doutorado apresentada à Pós-Graduação da
Faculdade de Ciências Médicas da Universidade
Estadual de Campinas para obtenção do título de Doutor
em Ciências Médicas, área de Anatomia Patológica.*

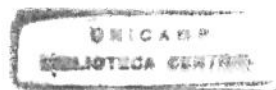
ORIENTADOR: PROFA. DRA. CECILIA AMELIA FAZZIO ESCANHOELA

CO-ORIENTADOR: PROF. DR. KONRADIN METZE

CAMPINAS

2001

iii



UNIDADE BC
 Nº. CHAMADA: T/UNICAMP
 V234c
 V. 16
 TITULO REC. 47255
 PROG. 16-837102
 C ☐ D ☐ K ☐
 PREÇO R\$ 11,00
 DATA 16/02/06
 N.º CPD

CM00162840-0

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
 BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
 UNICAMP**

V234c Valença Júnior, José Telmo
 Caracterização das AgNORs no hepatocarcinoma: análise morfológica e quantitativa e comparação com a graduação de Edmondson - Steiner / José Telmo Valença Júnior. Campinas, SP : [s.n.], 2001.

Orientadores : Cecília Amélia Fazzio Escanhoela, Konradim Meltze
 Tese (Doutorado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.

1. Carcinoma. 2. Fatores prognósticos. I. Cecília Amélia Fazzio Escanhoela. II. Konradim Meltze. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

Banca examinadora da tese de Doutorado

Orientador: Profa. Dra. Cecilia Amélia Fazzio Escanhoela

Membros:

1. Profa. Dra. Valéria Pereira Langoni - UF/SP
2. Profa. Dra. Regina Maria Leitão - USP/SP
3. Profa. Dra. Albina Attenein - FCM/UNICAMP
4. Profa. Dra. Míriam Thersan - FCM/UNICAMP
5. Profa. Dra. Cecilia Escanhoela - FCM/UNICAMP

Curso de pós-graduação em Ciências Médicas, área de concentração em Anatomia Patológica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 15.10.2001

DEDICATÓRIA

À minha mãe, Ione, e a meu pai, Telmo, que com amor me educaram e são pilares da minha felicidade.

Aos meus irmãos Mônica e Fábio que, com carinho, me apoiam em momentos difíceis.

A Luiz, pelo amor e companheirismo, de grande importância em momentos decisivos.

À Profª. Dra. Cecilia Amelia Fazzio Escanhoela, antes de tudo grande amiga e mulher. Seus conselhos me foram importantes não só para este trabalho, mas como lições de vida.

Ao Prof. Dr. Konradin Metze, pelo incentivo, sugestões apresentadas e pelo trabalho esmerado sem os quais este estudo não poderia se realizar.

Ao Dr. Jazon Romilson de Souza Almeida e à Dra. Ilka de Fátima Santana F. Boin, pela ajuda à coleta de dados.

Ao Prof. Dr. José Vassallo e Prof. Dra. Albina M. A. M. Altemani, pelo incentivo e sugestões ao trabalho.

À Glauce Aparecida Pinto, Cristiano Aparecido Chagas e Marisa de Almeida Matsura, pela amizade e colaboração no estudo imuno-histoquímico.

À Geralda Domiciana Pádua e Luzia Aparecida M. Ribeiro, pela amizade e dedicação na escolha de blocos e confecção de lâminas.

A Sérgio Roberto Cardoso pela solicitude e trabalho na coloração de lâminas.

À Maria do Carmo Machado da Silva, Elisabeth Justi Rodrigues e Flávia Fernanda Russo pela amizade, carinho e paciência em momentos difíceis.

À Cristiane Pereira Gomes e Luciana de Meireles Kusamura, pela grande amizade, incentivo e sugestões.

A todos os colegas, funcionários e docentes do Departamento de Anatomia Patológica, pelo estímulo e apoio.

Aos funcionários do Hospital de Clínicas, pelo auxílio na execução deste trabalho.

Aos pacientes, todo meu respeito.

O PENSAMENTO SÓ NASCE COM A DÚVIDA.

ROGER MARTIN DU GARD

	PÁG.
RESUMO.....	xxxi
1. INTRODUÇÃO.....	35
1.1. Carcinoma hepatocelular: importância epidemiológica.....	37
1.2. Fatores etiopatogênicos.....	37
1.2.1. Cirrose hepática (CH).....	37
1.2.2. Vírus da hepatite B (VHB).....	38
1.2.3. Vírus da hepatite C (VHC).....	39
1.2.4. Alcoolismo.....	39
1.2.5. Mutação do gene supressor tumoral p53.....	40
1.2.6. Aflatoxina.....	40
1.2.7. Outros fatores.....	41
1.3. Fatores prognósticos do CHC.....	41
1.3.1. História natural.....	41
1.3.2. Fatores clínicos.....	42
1.3.2.1. Estadiamento clínico.....	42
1.3.2.2. Sexo.....	42
1.3.2.3. Idade.....	43
1.3.2.4. Alfa-fetoproteína.....	43
1.3.2.5. Tratamento cirúrgico e sobrevida.....	43

1.3.2.6. Outros fatores clínicos.....	44
1.3.3. Fatores macroscópicos.....	45
1.3.3.1. Tamanho tumoral.....	45
1.3.3.2. Número de tumores.....	45
1.3.3.3. Envolvimento da veia porta.....	45
1.3.3.4. Concomitância de cirrose.....	46
1.3.3.5. Linfonodos.....	46
1.3.3.6. Classificação tnm e estadiamento tumoral.....	46
1.3.4. Fatores histológicos.....	47
1.3.4.1. Graduação histológica de EDMONDSON-STEINER.....	47
1.3.4.2. Graduação histológica de EDMONDSON-STEINER modificada.....	49
1.3.4.3. Padrões histológicos do CHC.....	49
1.3.4.4. Outros fatores microscópicos.....	50
1.3.5. Fatores moleculares.....	52
1.3.5.1. Regiões organizadoras de nucléolos (NORs).....	52
1.3.5.2. Antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA).....	55
1.3.5.3. Ki-67 e anticorpo MIB-1.....	57
1.3.5.4. Citometria de fluxo.....	58
1.3.5.5. Mutação do gene p53.....	59
1.3.6. Análise de imagem assistida por computador.....	60
2. OBJETIVOS.....	65

4.5. Graduação histológica de EDMONDSON-STEINER modificada.....	94
4.6. Parâmetros AgNOR e nucleares.....	97
4.6.1. Casos controle.....	97
4.6.2. Carcinoma hepatocelular.....	98
4.7. PCNA.....	103
4.8. Correlações das variáveis entre si.....	104
4.9. Análise univariada e multivariada de cox e curvas de KAPLAN-MEYER.....	106
4.10. Análise discriminante linear.....	109
4.11. Análise fatorial.....	109
5. DISCUSSÃO.....	111
5.1. Fatores clínicos.....	113
5.2. Classificação histológica de EDMONDSON-STEINER clássica e modificada.....	114
5.3. Padrão histológico.....	115
5.4. Parâmetros AgNOR.....	116
5.4.1. n AgNOR_MEAN.....	116
5.4.2. area AgNOR_MEAN.....	118
5.4.3. Outros parâmetros AgNOR.....	119
5.4.4. PCNA-i.....	120
5.4.5. Análise fatorial.....	121
5.5. Análise multivariada.....	122

6. CONCLUSÕES.....	125
7. SUMMARY.....	129
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	133
9. ANEXOS.....	173

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS UTILIZADOS

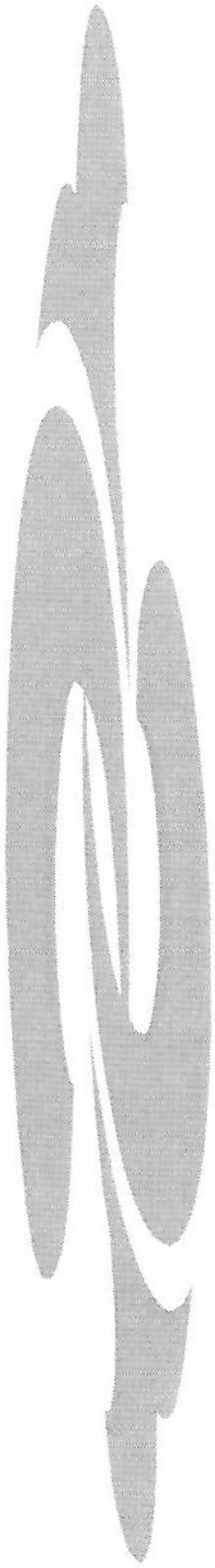
Σ	Angström (1 angström = 10^{-8} cm)
AFP	Alfafetoproteína
AgHBs	Antígeno Austrália do vírus da hepatite B
AgNOR	Regiões organizadoras do nucléolo impregnadas pela prata
AgNORsize	Tamanho das AgNORs por núcleo
% area AgNOR	Relação da área total das AgNORs pela área nuclear
ALT	Aminotransferase
area AgNOR	Área total das AgNORs por núcleo
AreaNuclear	Área nuclear
BrdU	Bromodeoxiuridina
°C	Grau na escala centesimal Celsius
CH	Cirrose
CHC	Carcinoma hepatocelular
cm	Centímetro
_CV	Coeficiente de variância
DAP	Departamento de Anatomia Patológica
DNA	Ácido desoxiribonucleico
DP	Desvio padrão
E-S	Classificação clássica de Edmondson-Steiner
E-S mod	Classificação de Edmondson-Steiner modificada por Nzeako <i>et al.</i> (1995)
<i>et al.</i>	e colaboradores
FCM	Faculdade de Ciências Médicas
g	Gramma
HE	Hematoxilina-Eosina
M	Molar
_MEAN	Média
mg/dl	Miligramas por decilitros
mRNA	RNA mensageiro

μm	Micrômetro, a milésima parte do milímetro
μm^2	Micrômetro ao quadrado
n	número
n AgNOR	Número de AgNORs por nécleo
NOR	Regiões organizadoras do nucléolo
NSE	Enolase neurônio-específica
p	Nível de significância
PCNA	Proliferating cell nuclear antigen
PCNA-i	Índice PCNA, percentagem de núcleos corados pela reação imuno-histoquímica para PCNA por número total de núcleos contados
pH	Símbolo indicando alcalinidade ou acidez em escala de 0-14.
rDNA	DNA ribossomal
RI	Índice de Rüschoff
RNA	Ácido ribonucleico
rRNA	RNA ribossomal
-100	Proteína S-100
Seq	seqüência
%TAAg $\geq$ 7	Percentagem de núcleos com área total das AgNORs maior que 7 μm
VHB	Vírus da hepatite B
VHC	Vírus da hepatite C
UNICAMP	Universidade Estadual de Campinas
400X, 1000X	Número de vezes em que a imagem é ampliada
%	Percentagem

	PÁG.
Tabela 1: %area AgNOR_MEAN através de curvas de estabilização.....	80
Tabela 2: Sexo, idade e tamanho tumoral.....	87
Tabela 3: Parâmetros AgNOR (casos-controle).....	98
Tabela 4: Média e desvio padrão dos parâmetros nucleares e AgNOR.....	102
Tabela 5: Graduação de Edmondson-Steiner clássica e modificada, Índice de Rüschoff, PCNA-i e percentual de núcleos com área total de AgNORs $\geq 7 \mu\text{m}^2$	103
Tabela 6: Análise univariada de regressão de Cox.....	108
Tabela 7: Análise discriminante linear baseada apenas em parâmentros AgNOR.....	109
Tabela 8: Análise fatorial: parâmetros AgNOR e PCNA-i.....	110
Tabela 9: Resultados encontrados na literatura e em nosso trabalho em relação à classificação de Edmondson-Steiner (1954).....	114
Tabela 10: Comparação dos resultados obtidos em relação ao n AgNOR_MEAN em nosso trabalho e na literatura.....	116
Tabela 11: Comparação dos resultados obtidos em relação a area AgNOR_MEAN em nosso trabalho e na literatura.....	118
Tabela 12: Comparação entre o PCNA-i em nossa pesquisa e outros autores...	121

	PÁG.
Figura 1: Coloração das NORs pelo metodo de Ploton <i>et al.</i> (1986).....	73
Figura 2: Coloração pela imuno-histoquímica para PCNA.....	76
Figura 3: Análise de imagem assistida por computador.....	79
Figura 4: Grau I de Edmondson-Steiner.....	89
Figura 5: Grau II de Edmondson-Steiner.....	89
Figura 6: Grau II de Edmondson-Steiner.....	90
Figura 7: Grau III de Edmondson-Steiner.....	91
Figura 8: Grau III de Edmondson-Steiner.....	92
Figura 9: Grau IV de Edmondson-Steiner.....	93
Figura 10: Grau I de Edmondson-Steiner modificado.....	94
Figura 11: Grau II de Edmondson-Steiner modificado.....	95
Figura 12: Grau III de Edmondson-Steiner modificado.....	96
Figura 13: Grau IV de Edmondson-Steiner modificado.....	97

	PÁG.
Gráfico 1: Curvas de estabilização.....	81
Gráfico 2: Curvas de sobrevida de 31 pacientes com CHC.....	106
Gráfico 3: Sobrevida de pacientes com CHC de baixo grau (I e II) e alto grau (III e IV) - Classificação clássica de Edmondson-Steiner binarizada.....	107



RESUMO

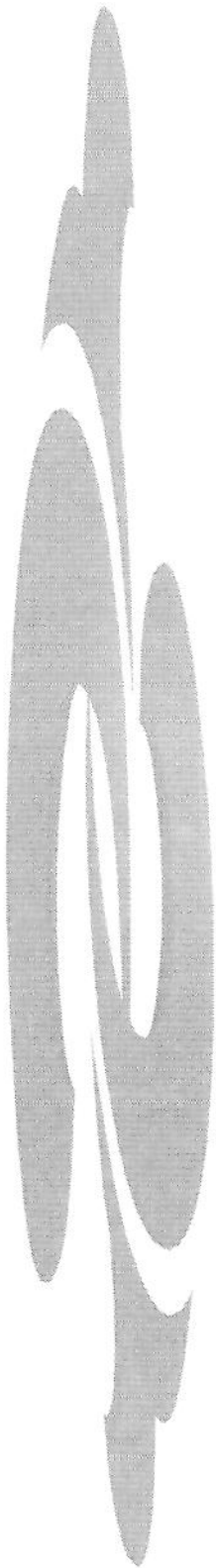
O objetivo deste trabalho foi avaliar o prognóstico e o valor diagnóstico dos parâmetros AgNOR e do PCNA em biópsias hepáticas de 34 casos de pacientes portadores de carcinoma hepatocelular, através da análise de imagem assistida por computador.

O número de AgNOR por núcleo e a percentagem da área AgNOR por área nuclear, mas não o índice PCNA (PCNA-i), mostram correlação significativa com a graduação histológica de Edmondson-Steiner (1954) e com a modificada por Nzeako et al. (1995).

A graduação de Edmondson-Steiner clássica (1954) foi o único fator com valor prognóstico em análise multivariada. Os parâmetros sexo, idade, diâmetro tumoral máximo, média de AgNORs, área AgNOR total e sua relação com a área nuclear, área nuclear, PCNA-i e a graduação histológica modificada de Edmondson-Steiner não apresentaram importância prognóstica na sobrevida dos pacientes.

Através da análise fatorial, dois fatores puderam ser criados, podendo explicar, juntos, 72% da variância de todos os nove parâmetros incluídos neste estudo.

Na análise discriminante linear, os parâmetros AgNOR puderam separar células hepáticas normais e células de tumores de baixo e alto grau em 83,7% dos casos. Portanto, a técnica de coloração para as NORs pode ser aplicada em biópsias hepáticas para o diagnóstico diferencial e a graduação histológica do CHC.



1. INTRODUÇÃO

1.1. CARCINOMA HEPATOCELULAR: IMPORTÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA

O carcinoma hepatocelular (CHC) é o tumor hepático mais comum em todo o mundo (OKUDA *et al.*, 1985; OKUDA, 1986; CALVET *et al.*, 1990; KASHALA *et al.*, 1990), e é considerado problema social em muitos países (OKUDA *et al.*, 1985; KASHALA *et al.*, 1990).

O CHC é mais freqüente no sexo masculino que no feminino, numa proporção aproximada de 4:1 (DI BISCEGLIE *et al.*, 1988; CROCE, *et al.*, 1993), observada também no Brasil (GUEDES E SILVA *et al.*, 1984; GONÇALVES *et al.*, 1986).

Ocorre mais comumente em indivíduos de maior idade, em média entre 50 e 60 anos (GONÇALVES *et al.*, 1986; CALVET *et al.*, 1990; CARRILHO, 1993; FÓRUM, 1995). Em regiões de alta prevalência, a idade média de aparição do CHC encontra-se entre os 30 e 40 anos (OKUDA, 1986), enquanto que, em áreas de média e baixa prevalência, a idade média é de 50 a 60 anos (CALVET *et al.*, 1990).

No Brasil a prevalência é considerada baixa, variando entre regiões (GUEDES E SILVA *et al.*, 1984). Esta disparidade de dados pode ser justificada pela presença de diferentes agentes carcinogênicos em cada região, pela deficiência na notificação, pela falta de diagnóstico ou pelo mau preenchimento dos atestados de óbito.

1.2. FATORES ETIOPATOGÊNICOS

1.2.1. Cirrose hepática (CH)

Entre 60 a 95% dos casos de CHC existe a associação com doença hepática, freqüentemente a CH (OKUDA *et al.*, 1985; JONHSON & WILLIAMS, 1987), variando de acordo com as diferentes áreas geográficas, sendo incomum a aparição de CHC em fígado normal (CALVET *et al.*, 1990; YUKI *et al.*, 1990; FÓRUM, 1995). Na presença deste, a variante fibrolamelar do CHC é mais freqüentemente observada, principalmente em jovens (SCHWARTZ, 1994).

Além disso, dados revelam que os pacientes portadores de CH são grupo de risco para o desenvolvimento de CHC (OKUDA, 1992). A frequência de desenvolvimento de CHC em pacientes portadores de CH é de aproximadamente 3 a 6% no primeiro ano do diagnóstico, 10% aos dois anos, 15% aos três anos e 24% aos quatro anos (OKUDA, 1992; ZOLI *et al.*, 1996). O tempo de evolução da CH parece ser um fator determinante no desenvolvimento tumoral (FATTOVICH *et al.*, 1995).

Outro fato importante é que a recorrência tumoral em fígados com cirrose é freqüente após a excisão cirúrgica (BELGHITI, 1990).

Dentre as etiologias mais comuns de CH encontram-se a viral (pós-hepatite), alcoolismo, cirrose biliar primária, deficiência de alfa-1 anti-tripsina, doença de Wilson, hemocromatose, porfiria cutânea tarda e auto-imune. A cirrose de etiologia auto-imune raramente evolui para o CHC, provavelmente em razão do óbito ocorrer precocemente na evolução da doença (CANÇADO, 1995).

1.2.2. Vírus da hepatite B (VHB)

O VHB parece atuar direta e indiretamente na carcinogênese. A existência de CHC em fígado não cirrótico em portadores do VHB e a capacidade deste de integrar-se ao DNA do hepatócito do hospedeiro, em fases precoces do desenvolvimento da doença hepática, levam a crer que haja uma ação direta do vírus na carcinogênese do CHC (BRECHOT *et al.*, 1980; OKUDA, 1992; SHIRATORI *et al.*, 1995).

No entanto, ainda é mais freqüente a presença da doença hepática avançada no momento do diagnóstico do CHC, sugerindo a importância da cirrose hepática na sua gênese, tendo o vírus um papel coadjuvante (KEW, 1995). No Brasil, o antígeno Austrália (AgHBs) do VHB está presente em cerca de 39% (FÓRUM, 1995) a 42,5% (COTRIM *et al.*, 1992) dos casos de CHC. Em São Paulo, sua frequência é de 34,1% nos portadores de CHC (CARRILHO, 1993).

1.2.3. Vírus da hepatite C (VHC)

O VHC, identificado em 1989, é responsável pela maioria das hepatites Não-A Não-B pós-transfusionais, anteriormente diagnosticadas como criptogênicas. É considerado uma das causas de CHC, cujo mecanismo patogênico ainda permanece não estabelecido (KEW, 1995) e, quando associado a intensa atividade proliferativa, é um fator de grande risco para o desenvolvimento do CHC (FARINATI *et al.*, 1996a). Em países como o Japão, o VHC é encontrado em cerca de 80% dos casos de CHC (SHIRATORI *et al.*, 1995); no Brasil, estima-se que possa ser encontrado em cerca de 27% (FÓRUM, 1995) e em São Paulo, em 34,1% (CARRILHO, 1993).

Sendo o VHC um vírus RNA, o mecanismo carcinogênico difere de outros fatores oncogênicos, como o VHB, pois não é capaz de integrar-se ao DNA do hepatócito (SHIRATORI *et al.*, 1995). Um mecanismo possível seria a intensa atividade regenerativa secundária à doença necro-inflamatória hepática, ocorrendo a liberação de radicais livres que são mutagênicos (KEW, 1995).

No Brasil, 4% dos pacientes portadores de CHC apresentam a coexistência entre o VHB e o VHC (FÓRUM, 1995).

1.2.4. Alcoolismo

O processo patogênico através do qual o álcool leva à formação do CHC ainda não está estabelecido. A CH pode representar, talvez, o fator primordial para o seu desenvolvimento, como também a ação de outros agentes carcinogênicos. A atividade enzimática do hepatócito, o metabolismo do DNA, a resposta imune e a nutrição podem ser afetados pelo álcool, o que poderia estar relacionado ao surgimento do CHC (LIEBER *et al.*, 1986).

O alcoolismo está presente em cerca de 37% dos casos de CHC no Brasil (FÓRUM, 1995) e em 31,7% em São Paulo (CARRILHO, 1993).

1.2.5. Mutação do gene supressor tumoral p53

O gene p53 codifica uma fosfoproteína nuclear de 53KD, com sequência específica de DNA, que age regulando a transcrição, ativando genes supressores do crescimento e suprimindo genes promotores do crescimento, além da inibir a replicação do DNA e apoptose (BORRESEN *et al.*, 1995; HAFFNER & OREN, 1995; SOONG *et al.*, 1996; FRESNO *et al.*, 1997). A inativação dessa fosfoproteína representa relevante evento na carcinogênese e pode ser o resultado da mutação, deleção ou interação do gene p53 com proteínas virais e/ou oncogenes (BORRESEN *et al.*, 1995; SOONG *et al.*, 1996; FRESNO *et al.*, 1997; KRAGGERUD *et al.*, 1997). Sua mutação, nos códons 249 e 250, é observada em pacientes portadores de CHC, porém se discute se o fenômeno é precoce ou tardio na evolução deste tipo de tumor (BAKER *et al.*, 1990; SCORSONE *et al.*, 1992; KEW, 1995). A ausência de expressão do p53 no fígado não neoplásico sugere a ocorrência tardia desta mutação no processo da carcinogênese (ALVES *et al.*, 1994). A mutação do p53 se relaciona também ao mecanismo de ação da aflatoxina B1, na gênese do CHC (OZTURK *et al.*, 1991). Em relação à sua importância em pacientes com hepatites virais, alguns trabalhos sugerem que a perda e/ou mutações do gene p53 não desempenham algum papel na hepatocarcinogênese (HOSONO *et al.*, 1991, SHIEH *et al.*, 1993), o que é negado por outros autores (TERAMOTO *et al.*, 1994; HONDA *et al.*, 1998).

1.2.6. Aflatoxina

A aflatoxina B1, produzida pelos fungos *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*, representa um discutível hepatocarcinógeno. Foi observada uma correlação entre a ingestão de alimentos contaminados com aflatoxina e o desenvolvimento de CHC. Porém as áreas de maior contaminação alimentar com a aflatoxina são também áreas geográficas de alta prevalência de VHB. A aflatoxina poderia agir diretamente no processo hepatocarcinogênico, mas também poderia ter um papel coadjuvante ao do VHB ou ao do alcoolismo (VAN RENSBURG *et al.*, 1985; SELL *et al.*, 1991; COLOMBO &

SANGIOVANNI, 1997). Foi ainda observada a presença de mutação do gene supressor tumoral p53 em CHC de pacientes de risco para o consumo de aflatoxina (OZTURK *et al.*, 1991).

1.2.7. Outros fatores

Dietas vegetarianas, esteróides anabolisantes, andrógenos, tabaco, solução coloidal de dióxido de tório (utilizado como contraste em radiologia), exposição ambiental em indústrias de PVC e pesticidas organofosforados podem exercer papel no desenvolvimento de CHC (COLOMBO & SANGIOVANNI, 1997). Com relação aos contraceptivos orais, não há evidências suficientes de que o CHC possa se originar do adenoma, tumor mais freqüentemente associado àqueles (OKUDA, 1992).

1.3. FATORES PROGNÓSTICOS DO CHC

1.3.1. História natural

A sobrevida média de pacientes que não foram submetidos a qualquer tipo de tratamento foi estudada por diversos autores. OKUDA *et al.* (1985) referem que a sobrevida mediana de pacientes em estágio I era de 8,3 meses. Em seus critérios, o estágio I representa um tumor ocupando menos que 50% da área hepática, com níveis séricos de albumina maiores que 30 mg/dl e níveis séricos de bilirrubina menores que 3 mg/dl. Já CHLEBOWSKI *et al.* (1983) e NAGASUE *et al.* (1984) demonstraram que a sobrevida média destes pacientes era de aproximadamente 4 meses.

EBARA *et al.* (1986) estudaram a história natural do CHC de pequeno tamanho. A sobrevida média de 22 pacientes com CHC menores que 3 cm em maior eixo foi de 90,7% depois de um ano, 55% após 2 anos, e 12,8% após três anos sem tratamento específico.

1.3.2. Fatores clínicos

1.3.2.1. Estadiamento clínico

O estágio em que se encontra o paciente é um dos mais importantes fatores prognósticos. OKUDA *et al.* (1985) desenvolveram um sistema de variáveis clínicas que definem os estágios clínicos I, II e III de pacientes com CHC (Anexo A). Através desse sistema foi possível comparar a sobrevida de 850 pacientes e demonstrar que pacientes em estágio I apresentam melhores perspectivas, tanto na evolução natural da doença, como também naqueles submetidos a tratamento cirúrgico ou medicamentoso. Esses achados foram posteriormente confirmados por outros autores (ROSELLINI *et al.*, 1992; FARINATI *et al.*, 1996b).

1.3.2.2. Sexo

Apesar de alguns estudos demonstrarem que não há diferença prognóstica em relação ao sexo do paciente (THE LIVER CANCER STUDY GROUP OF JAPAN, 1994), NG *et al.* (1995c) sugerem que o sexo feminino apresenta melhor prognóstico, quando comparado ao sexo masculino. Os motivos para essa melhor sobrevida ainda não foram determinados, porém os fatores que parecem estar implicados incluem a ploidia tumoral, a predominância de receptores para estrogênicos ou androgênicos e o ritmo de crescimento tumoral (SHEU *et al.*, 1985; NAGASUE *et al.*, 1989; NAGASUE *et al.*, 1992). Outra explicação seria que pacientes masculinos com fígado cirrótico apresentam ritmo de síntese de DNA mais acelerado, provavelmente decorrente da maior quantidade do fator de crescimento epidérmico (ECF) em homens. Sabe-se que pacientes cirróticos com taxa aumentada de síntese de DNA apresentam maiores chances de desenvolver CHC, e dois terços daqueles pacientes são do sexo masculino (TARAO *et al.*, 1989, 1993).

1.3.2.3. Idade

Uma melhor sobrevida foi observada por TANNAPFEL *et al.* (1999) em pacientes com menos de 60 anos. No Japão, uma análise de mais de 5800 casos, indica que um melhor prognóstico é observado em pacientes mais jovens, quando as faixas etárias são divididas da seguinte maneira: menor que 40 anos, entre 40 e 59 anos e maiores que 60 (THE LIVER CANCER STUDY GROUP OF JAPAN, 1994). Entretanto, a contribuição da idade do paciente com CHC para sua sobrevida é assunto controverso na literatura (ATTALI *et al.*, 1987; FALKSON *et al.*, 1988; CALVET *et al.*, 1990)

1.3.2.4. Alfafetoproteína

Os níveis séricos de alfafetoproteína (AFP) à apresentação clínica são importantes, não só para o diagnóstico clínico do CHC (ABELEV, 1968; O'CONOR *et al.*, 1970), como também correlacionam-se com o pior ou melhor prognóstico dos pacientes (JONHSON & WILLIAMS, 1980; NOMURA, OHNISHI, TANABE, 1989; YAMASHITA *et al.*, 1991; IZUMI *et al.*, 1992; THE LIVER CANCER STUDY GROUP OF JAPAN, 1994; SHIMADA *et al.*, 1996; AOYAGI *et al.*, 1998).

Algumas moléculas de AFP sofrem ação da enzima α 1-6fucosyltransferase na presença de GDP-fucose, dando origem a moléculas LCA-reativas (*Lens culinaris* agglutinin). Essa enzima encontra-se em diversos órgãos e apresenta alta atividade em pacientes com CHC (UOZUMI *et al.*, 1996a, 1996b). Recentemente, YAMASHITA *et al.* (1996) relataram uma correlação positiva entre a presença de AFP-L3 (uma molécula de AFP LCA-reativa) e um pior prognóstico para pacientes com CHC em estágio inicial, idéia essa compartilhada por outros autores (MORIWAKI *et al.*, 1997; AOYAGI *et al.*, 1998).

1.3.2.5. Tratamento cirúrgico e sobrevida

Há mais de 15 anos, grandes progressos foram realizados no sentido de se detectar precocemente o CHC (OKUDA, 1980; THE LIVER CANCER STUDY GROUP OF JAPAN, 1987; 1990), como também foram desenvolvidas técnicas cirúrgicas sofisticadas que reduziram a mortalidade peri-operatória (LIVER CANCER STUDY

GROUP OF JAPAN, 1989). A maior causa de mortalidade peri-operatória era decorrente da falência hepática, problema esse resolvido pela precisa avaliação da reserva funcional hepática pré-operatória (OZAWA *et al.*, 1983; YAMANAKA *et al.*, 1984). Apesar disso, a sobrevida média de pacientes submetidos a tratamentos cirúrgicos mantém-se insatisfatória (THE LIVER CANCER STUDY GROUP OF JAPAN, 1994). Relata-se sobrevida em cinco anos variando de 25 a 65% entre pacientes que foram submetidos à ressecção total dos tumores (ARII *et al.*, 1992; IKEDA *et al.*, 1993). Isso se deve à recorrência tumoral freqüente pós-ressecção (NAGAO *et al.*, 1990), fenômeno este observado mesmo em pacientes submetidos a transplante. Nestes pacientes, 50 a 70% dos casos apresentam recorrência, tanto no fígado transplantado, como em sítios distantes (IWATSUKI *et al.*, 1985; OLTHOFF *et al.*, 1990; YOKOYAMA *et al.*, 1990). Acredita-se que a rápida recorrência se deva à terapia imunossupressora ao qual o paciente transplantado é submetido (PANIS *et al.*, 1992).

1.3.2.6. Outros fatores clínicos

A presença do antígeno Austrália do vírus da hepatite B (AgHBs) e altos níveis séricos de aminotransferase (ALT) são também fatores prognósticos para o CHC (ADACHI *et al.*, 1996).

Carcinoma hepatocelular que apresenta expressão do antígeno Le^Y exibe maior grau de desdiferenciação e de proliferação celular, o que se correlaciona indiretamente com o prognóstico (WAKABAYASHI *et al.*, 1995).

A presença de metástases correlaciona-se com pior prognóstico para o paciente (BARBU *et al.*, 1997).

1.3.3. Fatores macroscópicos

1.3.3.1. Tamanho tumoral

Pacientes com tumores de pequeno tamanho, geralmente com menos de 5 cm em maior eixo, apresentariam melhor prognóstico (KISHI *et al.*, 1983, ARII *et al.*, 1992, HARATAKE *et al.*, 1993). Outros autores subdividiram o tamanho tumoral em quatro categorias: menores que 2 cm, entre 2,1 e 5 cm, 5,1 e 10 cm e maiores que 10,1 cm. Essa ordenação se correlaciona com a sobrevida global dos pacientes (THE LIVER CANCER STUDY GROUP OF JAPAN, 1994). Em geral, os menores tumores são também os mais bem diferenciados, o que supõe melhor sobrevida destes pacientes (SHIRABE *et al.*, 1995). Apoiando este raciocínio, SUGIHARA *et al.* (1992) demonstraram, usando biópsia por agulha fina guiada por ultrassom, que a desdiferenciação do CHC ocorre durante o crescimento tumoral.

Apesar desse conhecimento, mesmo tumores de pequeno tamanho apresentam uma recorrência extremamente alta (KITAMOTO *et al.*, 1993).

Contrariamente a este raciocínio, NG *et al.* (1995a) não encontraram diferença estatisticamente significativa, em termos de prognóstico, em análise multivariada.

1.3.3.2. Número de tumores

Pacientes portadores de lesão solitária exibem melhor sobrevida que aqueles com múltiplas lesões (ARII *et al.*, 1992; IKEDA *et al.*, 1993, THE LIVER CANCER STUDY GROUP OF JAPAN, 1994).

1.3.3.3. Envolvimento da veia porta

Um importante fator prognóstico negativo é a observação do envolvimento da veia porta pelo tumor (ARII *et al.*, 1992; HARATAKE *et al.*, 1993; THE LIVER CANCER STUDY GROUP OF JAPAN, 1994). A invasão da veia porta ou da supra-hepática pelo CHC é comum, devido ao seu estroma ricamente vascularizado (HARATAKE *et al.*, 1993).

1.3.3.4. Concomitância de cirrose

Os pacientes com CHC e com cirrose concomitante exibem pior prognóstico, quando comparados àqueles sem cirrose (NAGASUE *et al.*, 1986; OHNISHI *et al.*, 1982; EBARA *et al.*, 1986; QUEIROZ, MOREIRA, ANDRADE, 1987; COLOMBO *et al.*, 1991; OKUDA & OKUDA, 1991; COLOMBO, 1993; TSUKUMA *et al.*, 1993; IMBERTI *et al.*, 1993; SUGA *et al.*, 1994; TSAI *et al.*, 1994; MIES & MASSAROLLO, 1995). Provavelmente isso se deva à forte participação da carcinogênese multicêntrica e metacrônica e à falência hepática no período pós-cirúrgico. (THE LIVER CANCER STUDY GROUP OF JAPAN, 1994).

1.3.3.5. Linfonodos

A presença de linfonodos afetados pelo CHC compromete a sobrevida dos pacientes, sendo a sua constatação uma contra-indicação para a realização de hepatectomias em centros asiáticos (NAGASUE *et al.*, 1993). Contudo, alguns autores não encontraram associação positiva entre a presença de linfonodos com metástase de CHC e a sobrevida dos pacientes (LAU *et al.*, 1998).

1.3.3.6. Classificação TNM e estadiamento tumoral (UICC, 1987)

A classificação pTNM introduzida pela *International Union Against Cancer* (HERMANEK, HUTTER, SOBIN, 1997) incorpora dados já descritos como: tamanho tumoral, número de tumores, presença de envolvimento da veia porta, dentre outros. LAU *et al.* (1998) demonstraram que ela apresenta correlação, tanto com a sobrevida global dos pacientes, como também com a sobrevida livre de doença. Todos os fatores que compõem a classificação pTNM, isoladamente, se correlacionam com a sobrevida global e a sobrevida livre de doença, porém o número de tumores, o tamanho tumoral e a invasão da veia porta são os mais importantes.

1.3.4. Fatores histológicos

1.3.4.1. Graduação de EDMONDSON-STEINER

Em 1954, EDMONDSON & STEINER realizaram estudo sobre o aspecto histopatológico do CHC. Dentre 48900 necrópsias realizadas no Los Angeles County Hospital, eles selecionaram todos os carcinomas diagnosticados como primários do fígado, num total de 100. Nos tumores de origem hepatocitária, os autores definiram uma graduação histológica com quatro graus de diferenciação celular. Eles tomaram como base a graduação de BRODERS (1920) para carcinoma epidermóide do lábio, modificando-a para um tumor de órgão sólido. O grau de diferenciação varia, segundo os autores, de células semelhantes a hepatócitos maduros até células de aspecto embrionário. O grau I apresentar-se-ia extremamente bem diferenciado, sendo difícil o diagnóstico sem a demonstração de áreas de crescimento agressivo. Um problema visualizado pelos autores seria distinguir essas lesões de hiperplasia adenomatosa e de adenomas hepatocelulares. O aumento do tamanho celular e a presença de muitas formações luminares contendo bile fariam a favor de CHC grau I. O termo seria, segundo os autores, melhor reservado para áreas histológicas bem diferenciadas em CHC de grau histológico maior.

No grau II, as células exibem núcleos grandes e mais hipercromáticos que hepatócitos normais, citoplasma abundante e acidófilo. Os limites citoplasmáticos são bem definidos. Os ácinos são freqüentes, com lúmens variando de tamanho e preenchidos por bile ou por precipitado protéico.

No CHC grau III, os núcleos são maiores e mais hipercromáticos que aqueles encontrados no grau II. Observa-se nitidamente aumento da relação núcleo-citoplasmática. O citoplasma pode eventualmente ser menos granular e acidófilo que no grau II e freqüentemente as formações luminares não contêm bile. Uma de suas principais características é a presença de células gigantes tumorais que são mais freqüentemente observadas neste grau. Colapso e distorção trabecular também são vistos.

No grau IV, os núcleos são intensamente hipercromáticos e a relação núcleo-citoplasmática é extremamente elevada. O citoplasma varia em quantidade, mas em geral é escasso. O padrão arquitetural é medular, com menor formação de trabéculas, com diminuição da coesão celular. Há também menor formação acinar, menos bile e menor número de células gigantes. Células fusiformes podem ser vistas, como também áreas similares ao carcinoma pouco diferenciado "oat cell".

A graduação de Edmondson-Steiner é a mais largamente utilizada no mundo para se avaliar a diferenciação histológica do CHC e apresenta forte correlação com os níveis séricos de alfa-fetoproteína, que pode ser considerado como indicador de diferenciação celular (CHAPEL *et al.*, 1996). Também apresenta correlação positiva com o grau de invasão tumoral (STEVENS *et al.*, 1994). Com relação ao prognóstico de pacientes com CHC, vários trabalhos registram uma correlação positiva entre graus bem diferenciados do CHC e a sobrevida dos pacientes (HARATAKE *et al.*, 1993; MELCHIORRI *et al.*, 1994; IKEDA *et al.*, 1993; TORII *et al.*, 1993.; NZEAKO, GOODMAN, ISHAK, 1995; CHAPEL *et al.*, 1996; KISHI *et al.*, 1983; KASHALA *et al.*, 1990; ADACHI *et al.*, 1996). Contudo, há outros estudos que não evidenciaram tal associação (LAI *et al.*, 1979; LAI *et al.*, 1990; ARII *et al.*, 1992; NG *et al.*, 1994; IZUMI *et al.*, 1994; LEE, 1994; VAUTHEY, KLIMSTRA, BLUMGART, 1995; SHIRABE *et al.*, 1995).

As críticas lançadas à graduação de Edmondson-Steiner se devem ao grau de subjetividade inerente à graduação histológica ou citológica e baixa reprodutibilidade, com alta taxa de variação inter- e intra-observadores. A heterogeneidade celular dentro de um mesmo tumor é um fato reconhecido, o que poderia explicar essa variação (TANNAPFEL *et al.*, 1999).

Alguns autores sugeriram que a graduação de Edmondson-Steiner deveria ser combinada a outros fatores menos subjetivos para se tornar um melhor fator prognóstico. (ARII *et al.*, 1992; NZEAKO *et al.*, 1995).

1.3.4.2. Graduação de EDMONDSON-STEINER modificada

Em 1995, NZEAKO *et al.* propuseram uma modificação discreta da graduação histológica de Edmondson-Steiner, baseando-se principalmente nas características nucleares das células do CHC. Os autores ainda assim utilizaram esta nova classificação tratando-a como se fosse a de Edmondson-Steiner e, em seguida, demonstraram uma correlação positiva com o prognóstico dos pacientes.

No grau 1 desta classificação, as células tumorais têm abundante citoplasma e mínima irregularidade nuclear, embora possam invadir vasos vizinhos.

No grau 2, os núcleos apresentam nucléolos proeminentes, hipercromatismo e maior irregularidade nuclear.

O grau 3 se caracteriza pela presença de maior pleomorfismo nuclear, incluindo núcleos angulados.

O grau 4 apresenta marcado pleomorfismo, hipercromatismo e células gigantes anaplásicas.

1.3.4.3. Padrões histológicos do CHC

A classificação dos tipos (ou padrões) histológicos do CHC (ISHAK *et al.*, 1994) é largamente utilizada e alguns estudos a correlacionam ainda ao prognóstico dos pacientes (NZEAKO *et al.*, 1995).

No padrão trabecular (em placas ou sinusoidal), as células tumorais organizam-se em cordões ou placas, contendo duas ou mais células, quando visualizadas em duas dimensões. Essas trabéculas são separadas por sinusóides e apresentam escasso estroma intersticial.

No padrão pseudo-glandular (adenóide ou acinar), o agrupamento celular resulta de degeneração celular central ou de trabéculas sólidas. O conteúdo dessas estruturas pseudo-glandulares são debris celulares, macrófagos e exsudato, podendo ser semelhantes a folículos tireoidianos.

O padrão compacto (sólido ou cirrótico) resulta, na grande maioria, de artefatos de compressão ou de radio- ou quimioterapia. As trabéculas são espessas e os sinusóides mais dificilmente distinguíveis.

O padrão fibrolamelar é descrito como um subtipo de CHC, que apresenta melhor prognóstico. Ocorre mais freqüentemente em crianças e adultos jovens, alcançando uma proporção de 90% em pacientes com menos de 25 anos, e menos de 5% entre pacientes com mais de 50 anos (SOREIDE *et al.*, 1986; HODGSON, 1987; ROLFES, 1988). Diferentemente do tipo comum de CHC, acomete mais o sexo feminino que o masculino. A sobrevida em 5 anos é cerca de 50% e progride lentamente, caso o tumor não seja totalmente ressecado (SOREIDE *et al.*, 1986; HODGSON, 1987; STARZL *et al.*, 1986). Exibe células poligonais, em arranjo lobular, e estroma fibroso em lamelas paralelas, formando centro estrelado.

Outro subtipo raro do CHC é o sarcomatóide, caracterizado por apresentar extensas áreas de células fusiformes e anaplásicas, áreas de necrose, hemorragia, e raras mitoses. O componente fusocelular pode exibir padrão estoriforme, porém o estudo imuno-histoquímico revela a negatividade para marcadores mesenquimatosos, não se tratando, portanto, de sarcoma verdadeiro. O componente sarcomatóide é responsável pela maioria das metástases extra-hepáticas e pelo freqüente envolvimento da veia porta (MAEDA *et al.*, 1996). Os pacientes com este tipo de tumor apresentam prognóstico reservado.

1.3.4.4. Outros fatores microscópicos

Índice mitótico maior ou igual a 4 mitoses por campo de maior aumento é considerado fator de pior prognóstico para paciente portadores de CHC (SMALLEY *et al.*, 1988; ADACHI *et al.*, 1996). É um dos meios mais antigos e mais utilizados para o estudo de proliferação celular, atualmente também avaliada por método imuno-histoquímico através de anticorpo monoclonal contra bromodeoxiuridina (BrdU), antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA), ou Ki-67 / mib-1 (GRATZENER, 1982; GERDES *et al.*, 1984; GARCIAL, COLTRERA, GOWN, 1989; EBELT *et al.*, 2000).

A presença de necrose tumoral no CHC é um fator negativo para a sobrevida do paciente, pois é determinada pelo rápido crescimento tumoral (ISHII *et al.*, 1992).

A formação de cápsula pelo tumor é fator prognóstico controverso. A ausência de cápsula no CHC ocorre em tumores com menos de 1 cm ou naqueles de padrão infiltrativo (OKUDA & KOJIRO, 1987; GRIIGINI *et al.*, 1990). A formação capsular parece que se inicia a partir do momento que o tumor atinge 2 cm (OKUDA & KOJIRO, 1987). LEE *et al.* (1988) especulam que um rápido crescimento tumoral não daria tempo suficiente para o hospedeiro reagir, formando uma cápsula circunjacente, ocorrendo o inverso num crescimento mais lento, o que é confirmado por alguns autores (ADACHI *et al.*, 1996) ou refutada por outros (SHIRABE *et al.*, 1995). A presença de cápsula tumoral seria então um fator prognóstico favorável (NAGAO *et al.*, 1987; FRANCO *et al.*, 1990; LAI *et al.*, 1990; NG *et al.*, 1992). Outro aspecto importante é a presença de infiltração de células tumorais nesta cápsula, que estaria associada a maior recorrência do tumor e conseqüentemente a pior sobrevida (ARII *et al.*, 1992).

A peliose intratumoral, secundária a altos níveis pressóricos no CHC e ao bloqueio do efluxo venoso intratumoral, pode ser visualizada em tumores com pior prognóstico (ADACHI *et al.*, 1996).

A presença de corpos hialinos, células claras, esteatose, produção de bile, necrose tumoral e células tumorais gigantes, pode estabelecer diferenças de comportamento biológico do CHC, porém mais dificilmente comprovadas (KISHI *et al.*, 1983; ADACHI *et al.*, 1996).

A presença de micro-satélites do tumor, invasão direta do tecido hepático peritumoral e presença de tumor na margem de ressecção, são também fatores de pior prognóstico (LAI *et al.*, 1990; LAI *et al.*, 1991; NG *et al.*, 1992; SUGIOKA, TSUZUKI, KANAI, 1993).

A presença de infiltrado inflamatório intra-tumoral está associada a menor recorrência e a maior sobrevida dos pacientes (NG *et al.*, 1995a). Este infiltrado é constituído principalmente por células linfocitárias T e células NK (TAKAGI *et al.*, 1989), representando uma resposta imune ao tumor.

1.3.5. Fatores moleculares

Sabe-se que a atividade proliferativa e a cinética das células tumorais são importantes parâmetros biológicos que se correlacionam com a recorrência do tumor e a sobrevida dos pacientes (FIELDING, FENOGLIO-PREISER, FREEDMAN, 1992). Daí a importância de se entender os fatores moleculares que regulam ou estimulam a proliferação celular.

1.3.5.1. Regiões organizadoras de nucléolos (NORs)

As regiões organizadoras do nucléolo (NORs) são estruturas essenciais na transcrição de ácido nucléico para proteínas. Consistem em alças de DNA (rDNA) que transcrevem para RNA ribossomal (rRNA) e, conseqüentemente, para ribossomos e proteínas. As NORs transcrevem rRNA sob a influência da RNA polimerase I. Em vista da íntima associação entre NORs e atividade celular, seu tamanho ou número podem refletir ou prever a atividade proliferativa celular.

As NORs localizam-se nos braços curtos dos cromossomos acrocêntricos 13, 14, 15, 21 e 22. Durante a interfase, as NORs correspondem bioquimicamente a centros fibrilares do nucléolo, vistos ao estudo ultra-estrutural. Elas variam de tamanho de acordo com a atividade de transcrição nucleolar. O número de centros fibrilares deveria ser, teoricamente, igual ao número de cromossomos que contêm as NORs. Contudo, uma reconstrução tridimensional dessas estruturas revelou que não há correlação numérica entre os centros fibrilares e os sítios de rDNA (MIRRE *et al.*, 1982; CATALDO *et al.*, 1985).

Durante a divisão celular, as NORs correspondem às constricções secundárias nos braços curtos dos cromossomos. Consistem-se de filamentos de 50-80 Å de diâmetro.

As NORs estão associadas a proteínas ácidas (FAKAN & HERNANDES-VERDUN, 1986). Essas proteínas ácidas, C23 (nucleolina), B23 e provavelmente RNA polimerase-I, dão a característica argirofilia às NORs (LISCHWE *et al.*, 1979; KLING *et al.*, 1980; SATOH & BUSH, 1981; OCHS *et al.*, 1983). Tanto a C23 quanto a B23 são fosfoproteínas extremamente importantes para a transcrição ribossomal.

Alguns estudos demonstram correlação direta entre o número de AgNORs e a malignidade dos tumores (CROCKER & NAR, 1987; EGAN *et al.*, 1988; CROCKER & EGAN, 1988), o que nem sempre é aceito por outros autores (TOIKKANEN & JOENSUU, 1993; ADACHI *et al.*, 1995). Mais recentemente, várias publicações têm enfatizado os aspectos morfológicos e/ou contagem das AgNORs, correlacionando-os ao comportamento biológico das neoplasias (SIVRIDIS & SIMS, 1990; ORITA *et al.*, 1990; MORITA *et al.*, 1991; KAKEJI *et al.*, 1991; GOODLAD, CROCKER, MACARTNEY, 1991; STEFANO *et al.*, 1991; JOYCE *et al.*, 1992; YAMAGUCHI *et al.*, 1993; DELAHUNT, BATHWAITE, NACEY, 1993; SUZUKI & TAKANO, 1993; LORAND-METZE & METZE, 1996; KAKEJI *et al.*, 1996; CHIUSA *et al.*, 1997; TREVISAN, GOES, COY, 1998; LORAND-METZE, CARVALHO, METZE, 1998; NAKAE *et al.*, 1998). Outros autores têm demonstrado associação entre o número de AgNORs e o percentual de células positivas para Ki-67 pela imuno-histoquímica, que indicaria o grau de proliferação dessas células (RAYMOND & LEONG, 1989; CANEPA *et al.*, 1990; CROCKER, 1990; STEFANO *et al.*, 1991; DERENZINI & TRERÈ, 1991), como também positividade para a Bromodeoxiuridina, BrdU (GIRI *et al.*, 1989; TANAKA *et al.*, 1989; ORITA *et al.*, 1990).

A aplicação das AgNORs em lesões hepáticas tem sido utilizada por CROCKER & MCGOVERN (1988), ANSELMÍ *et al.* (1990), NONOMURA *et al.* (1990) e SHIRO *et al.* (1993), tendo sido observadas diferenças estatisticamente significativas entre a morfologia (tamanho) das AgNORs em fígados normais, hepatite crônica, cirrose e carcinoma hepatocelular (CHC), concluindo-se que o aumento do número das AgNORs não só indicaria uma maior atividade proliferativa hepatocelular, como também alterações quantitativas do DNA intranuclear de hepatócitos modificados.

O número das AgNORs em células do carcinoma hepatocelular é estaticamente maior do que em células de fígado normal ou com cirrose, como também é maior quanto maior for o grau histológico do tumor (BUFO & FRASSANITO, 1992; SIDDIQUI *et al.*, 1999). Há também correlação estatisticamente significativa entre o número de AgNORs, tamanho tumoral e invasão da veia porta. Naqueles pacientes com carcinoma hepatocelular

SHIRO *et al.* (1993) observaram ainda correlação entre a morfologia dos agrupamentos das AgNORs e o prognóstico do CHC, com presença de agrupamentos grandes ou médios e de margens bem definidas nas lesões com melhor prognóstico, contrariamente à presença de AgNORs dispostas em agrupamentos pequenos e irregulares nas lesões de potencial mais agressivo.

SHIMIZU *et al.* (1995) propuseram que a contagem das AgNORs é dado importante na avaliação do grau histológico do CHC.

Na busca de um melhor esclarecimento da influência prognóstica das AgNORs em relação às neoplasias de órgãos diversos, vários autores (PLATE, RÜSCHOFF, MENNEL, 1990; LESTY *et al.*, 1992; AUBELE *et al.*, 1994) investigaram os parâmetros AgNORs, com suas respectivas siglas inglesas, a saber: número de AgNORs (N_{Ag}), área de AgNORs em cada núcleo (A_{Ag}), área total de AgNORs (T_{Ag}), tamanho individual das AgNORs (S_{Ag}), relação da área total de AgNORs por área nuclear (R_{Ag}), e a média e coeficiente de variância de cada parâmetro (acrescentando-se *_MEAN* e *_CV* para cada sigla). AUBELE *et al.* (1994), por exemplo, encontraram correlação positiva entre a sobrevida de pacientes com carcinoma de mama e quatro parâmetros AgNORs, principalmente com o coeficiente de variação da R_{Ag} (CV_{R_{Ag}}). Já BORZIO *et al.* (1998) demonstraram que o S_{Ag} maior que 7 micrômetros² em fígados cirróticos era indicativo de um maior risco para o desenvolvimento do CHC. O mesmo grupo italiano liderado por DERENZINI, propôs inicialmente um valor de 3 micrômetros² para se distinguir nódulos hepatocelulares de malignidade incerta (DERENZINI *et al.*, 1993), alterado posteriormente para 4 micrômetros² (BOLONDI *et al.*, 1996); eles sugerem ainda o valor de 5,5 micrômetros² para se distinguir o CHC com crescimento tumoral mais acelerado (TRERÈ *et al.*, 1996b).

A partir da obtenção dos parâmetros AgNORs pode-se calcular o índice de RÜSCHOFF (RI), definido sob a equação $RI = N/A$, onde N é o média do número de AgNORs por núcleos e A é a média do tamanho de cada AgNOR (RÜSCHOFF *et al.*, 1990; RÜSCHOFF *et al.*, 1992).

1.3.5.2. Antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA)

Em 1978, MIYACHI, FRITZLER, TAN descreveram um soro auto-imune, retirado de pacientes com lupus sistêmico, que reconhecia um antígeno nuclear distribuído em células em proliferação, que foi designado como antígeno nuclear de proliferação celular (*proliferating cell nuclear antigen*), também conhecido como ciclina. É uma proteína que se acumula no fim da fase G1 e na fase S de proliferação celular (NG *et al.*, 1994; WU & TSENG, 1994) e marca histologicamente estas fases (MATHEWS *et al.*, 1984; BRAVO *et al.*, 1987; BRAVO & MACDONALD-BRAVO, 1987; van DIERENDONCK *et al.*, 1991). Estudos de imunofluorescência demonstram que há duas populações do PCNA durante a fase S do ciclo celular: uma que é nucleoplasmática, encontrada em células quiescentes, e facilmente extraída por detergentes e outra, que está associada a estruturas nucleares específicas (BRAVO *et al.*, 1987).

O PCNA detergente-resistente apresenta a mesma localização da bromodeoxiuridina (incorporada no DNA durante a fase S). É uma proteína estável auxiliar da DNA polimerase- δ , sendo detectável após 24 a 48 horas do final da divisão celular (BRAVO *et al.*, 1987). Sua expressão e síntese estão vinculadas, portanto, à replicação do DNA, isto é, à iniciação da proliferação celular (McCORMICK & HALL, 1992). Também está envolvida com síntese de DNA em situações de reparo (CELIS & MADSEN, 1986; TOSCHI & BRAVO, 1988).

A regulação da expressão do PCNA é complexa e depende de níveis durante a transcrição e pós-transcrição (SHIPMAN-APPASAMY *et al.*, 1990; BASERGA, 1991; KONIECKI *et al.*, 1991), sendo esta última fase a mais importante (CHANG *et al.*, 1990; OTTAVIO *et al.*, 1990; BASERGA, 1991). Há diferenças entre a regulação do PCNA em células quiescentes e aquelas em constante ciclo proliferativo (MORRIS & MATTEWS, 1989; BASERGA, 1991). Nestas últimas, há muito pouca variação na quantidade de PCNA e níveis de mRNA durante o ciclo celular, estando aptas a responder rapidamente a fatores de crescimento (OTTAVIO *et al.*, 1990; BASERGA, 1991).

Há razoável número de anticorpos que reconhecem o PCNA, dentre eles o 19A2, 19F4 e o PC10. Há diferenças destes anticorpos com relação ao reconhecimento de epítomos do PCNA (HUFF *et al.*, 1990). Os diferentes tipos de fixação, a duração deste processo e o tamanho do fragmento em fixação são fatores que influem na expressão

imuno-histoquímica destes anticorpos (HALL *et al.*, 1990). Mesmo com estas ressalvas, este método de avaliação de proliferação celular pode substituir outros, como a contagem de mitoses, na maioria das vezes tediosos e que despendem tempo. Núcleos corados pela imuno-histoquímica para PCNA são mais facilmente contados, de uma forma menos subjetiva em comparação, por exemplo, ao método de coloração para NORs (BETHWAITE *et al.*, 1995).

YU *et al.* (1991) relatam a utilidade da expressão do PCNA em relação ao potencial maligno dos tumores. É descrito que a atividade proliferativa celular, definida pelo estudo imuno-histoquímico do PCNA, pode se correlacionar ao estadiamento anátomo-clínico dos tumores (YONEMURA *et al.*, 1993), às suas recorrências (AL-SHENEBER *et al.*, 1993), graduações, comportamento biológico e sobrevida dos pacientes (HALL *et al.*, 1990; JAIN, FILIPE, HALL, 1991; YU *et al.*, 1991; TERADA & NAKAMURA, 1992; AL-SHENEBER *et al.*, 1993; MAYER *et al.*, 1993; DELAHUNT *et al.*, 1993; YONEMURA *et al.*, 1993; BETHWAITE *et al.*, 1995; NAKAE *et al.*, 1998). O valor prognóstico do PCNA não é confirmado por alguns autores (ZIMMER *et al.*, 1992; TANIAI *et al.*, 1993; KITAMOTO *et al.*, 1993).

Em relação ao CHC, alguns estudos demonstram correlação positiva entre o índice de proliferação celular detectado através da análise imuno-histoquímica do PCNA e o comportamento biológico do tumor, em termos de invasão da veia porta, parênquima adjacente, presença de tumor em margem de ressecção (NG *et al.*, 1994), como também a pior prognóstico (NG *et al.*, 1994; NG *et al.*, 1995b).

NG *et al.* (1994) estudaram o número de núcleos corados pelo anticorpo PC10 em 1000 células tumorais (definindo-se este percentual como T-PCNA) e subdividiram o CHC em dois grupos: tumores com T-PCNA maior ou menor que 200. O T-PCNA se correlacionou com a sobrevida livre de doença dos pacientes, porém não houve associação com a diferenciação celular dos tumores ou mesmo com o tamanho tumoral. Isto também é observado em outros tumores como o carcinoma gástrico (JAIN *et al.*, 1991), carcinoma do cólon, do reto (SIITONEN *et al.*, 1993) e da tireóide (SHIMIZU *et al.*, 1993).

1.3.5.3. Ki-67 E anticorpo MIB-1

Um dos marcadores de proliferação celular mais utilizados é o anticorpo monoclonal Ki-67, que reconhece um epítipo lábil em um antígeno nuclear de células em proliferação, e esse antígeno é expresso em todas as fases do ciclo celular (GERDES *et al.*, 1984), principalmente na fase S e mitose (GERLACH *et al.*, 1997), exceto na fase de repouso ou G0 (BRUNO & DARZYNKIEWICZ, 1992). Alguns trabalhos referem uma associação entre a recorrência (STAVROPOULOS *et al.*, 1993), estadiamento e graduação tumorais (WINTZER *et al.*, 1991; PAVELIC *et al.*, 1992), enquanto que alguns estudos revelam que a expressão do Ki-67 é importante fator prognóstico nas neoplasias (GERDES, 1990; RAILO *et al.*, 1993; MILLER *et al.*, 1994; HESLIN *et al.*, 1998). Todavia, outros autores afirmaram o contrário (WINTZER *et al.*, 1991; KUBOTA *et al.*, 1992).

Um dos problemas encontrados com o anticorpo Ki-67 é o fato de necessitar de tecido em cortes congelados para sua utilização, o que foi contornado pela produção de anticorpos pela tecnologia recombinante (CATTORETTI *et al.*, 1992; KREIPE *et al.*, 1993; McCORMICK *et al.*, 1993). Um desses anticorpos, o mib-1, apresenta reatividade a diferente epítipo do antígeno Ki-67 quando comparado com o anticorpo Ki-67, podendo ser usado em cortes histológicos fixados em formalina e/ou em blocos de parafina. Provavelmente o mib-1 se correlaciona com o catabolismo do antígeno Ki-67 no final da fase M (McCORMICK *et al.*, 1993).

A averiguação do significado prognóstico do mib-1 no CHC tem sido realizada por vários autores (KERNS *et al.*, 1994; NAGAO *et al.*, 1995 a; NAGAO *et al.*, 1995 b; NG *et al.*, 1995b), tendo sido demonstrado que maior positividade para o mib-1 implica em pior sobrevida para os pacientes.

NG *et al.* (1995b) relatam uma correlação positiva entre o índice de núcleos do CHC corados pelo anticorpo mib-1, em 1000 células tumorais (T-MIB1), e pior prognóstico para os pacientes, apontando um ponto de corte maior que 20 para determinar os tumores implicados em menor sobrevida e menor tempo livre de doença. Os mesmos autores referem ainda uma correlação entre a graduação de Edmondson-Steiner (1954) e a positividade em núcleos para o mib-1. Entretanto eles não conseguiram demonstrar uma associação com parâmetros de agressividade tumoral como, por exemplo, invasão da veia porta, invasão de tecido hepático adjacente e presença de micro-satélites tumorais.

Em relação a outros marcadores de proliferação celular, MUNAKATA & HENDRICKS (1994) foram os primeiros a realizar dupla coloração para AgNORs e mib-1 em amígdalas, demonstrando que a área das AgNORs é afetada por este processo, porém o número não. Afirmam ainda que as células que apresentam maior número de AgNORs também são mais freqüentemente coradas pelo mib-1, o que está de acordo com resultados de NAGAO *et al.* (1995), que realizaram tal procedimento em CHC. Estes autores relatam ainda outro dado interessante: nos tumores hepáticos com maior grau de desdiferenciação (grau III ou IV de Edmondson-Steiner) apresentam maior número de AgNORs em células tumorais negativas para o mib-1, do que em tumores de baixo grau. Talvez indicando que o número de AgNORs se correlacione mais com os graus de diferenciação celular que propriamente com a proliferação celular.

1.3.5.4. Citometria de fluxo

A quantificação do DNA em células tumorais pela citometria de fluxo pode ser rapidamente realizada, e tem sido apontada como de grande valor prognóstico em vários tumores malignos. Muitos estudos têm relatado uma positiva influência da quantidade do DNA no prognóstico dos pacientes (ISHIZU, 1989; CARTER *et al.*, 1989; FUJIMOTO *et al.*, 1991; CHIU *et al.*, 1992), o que é contestado por outros autores (EZAKI *et al.*, 1988; CHEN *et al.*, 1991; NAGASUE *et al.*, 1992; McENTEE, BATTS, KATZMANN, 1992; REW, 1994). Alguns destes autores encontraram percentagens diferentes em relação aos tumores diplóides (de 22 a 58,2%) e aneuplóides (de 41,7 a 78%). Quando os tumores foram separados com relação ao tamanho, houve uma tendência dos tumores diplóides serem de menores dimensões (menos de 3 ou 5 cm), ocorrendo o contrário com os tumores maiores (EZAKI *et al.*, 1988; ISHIZU, 1989).

A averiguação do valor prognóstico da citometria de fluxo em CHC, tem demonstrado grande controvérsia na literatura. EZAKI *et al.* (1988) reportaram que tumores diplóides correlacionam-se significativamente com pequenos tumores, de baixo grau histológico e com a idade do paciente. Contudo, não encontraram associação entre a ploidia do tumor e a sobrevida do paciente após ressecção cirúrgica. Por outro lado,

ISHIZU (1989) não encontrou nenhuma correlação entre a quantidade de DNA tumoral e o grau histológico, mas tumores diplóides estão mais freqüentemente associados ao estágio I do TNM e a menores níveis de alfafetoproteína, além de evidenciar significativa correlação entre o padrão de ploidia tumoral e a sobrevida.

FUJIMOTO *et al.* (1991) mostraram que tumores aneuplóides correlacionam-se significativamente com tamanho tumoral, invasão vascular e metástases intra-hepáticas. A sobrevida foi menor em pacientes com tumores aneuplóides do que em pacientes com tumores de padrão diplóide. CHEN *et al.* (1991) não demonstraram nenhuma correlação positiva entre o padrão de ploidia do DNA e a sobrevida dos pacientes, tamanho tumoral e/ou presença de cirrose. CHIU *et al.* (1992) discordam destes autores, por terem observado correlação positiva entre a ploidia tumoral e a sobrevida dos pacientes, como também entre o tempo livre de doença e a taxa de recorrência, o que foi refutado por McENTEE *et al.* (1992) e BALSELLS *et al.* (1996).

Em relação a outros marcadores de proliferação celular, a quantificação de DNA por esta técnica apresenta grande correlação com o número de AgNORs em outros tumores (CROCKER, MACARTNEY, SMITH, 1988, GIRI *et al.*, 1989). A citometria de fluxo é uma técnica mais objetiva para se detectar células com mutações do gene p53 que a avaliação óptica de células coradas em imuno-histoquímica para p53, devido à subjetividade do patologista, variabilidade de fixação e recuperação antigênica incompleta (KRAGGERUD *et al.*, 1997; FRESNO *et al.*, 1997). Características nucleares encontradas no CHC podem também se correlacionar com os padrões de ploidia do DNA (SAMPATANUKUL *et al.*, 1997).

1.3.5.5. Mutação do gene p53

A mutação do gene supressor p53 é importante tanto na etiopatogênese do CHC, como também no seu prognóstico. Ela está fortemente relacionada à agressividade tumoral e pior prognóstico (HSU *et al.*, 1994a, 1994b; HONDA *et al.*, 1998), o que, no entanto, nem sempre é aceito (HALL & LANE, 1994; BOURHIS *et al.*, 1994;

AHOMADEGBE *et al.*, 1995; FURUHATA *et al.*, 1996). A mutação do p53 está ainda associada a tumores de grau histológico mais elevado (PENG, CHOU, HSU, 1998). A perda do p53 mutante no CHC em progressão, um evento comum, ainda é assunto controverso. Esta perda ocorre à medida que o tumor aumenta de tamanho, sendo encontrada em 38,5% dos tumores menores que 2cm, e em 73% dos tumores maiores que 8 cm. Essa perda parece não se correlacionar com a sobrevida dos pacientes, nem tampouco com o grau histológico ou presença de invasão portal, sugerindo que esta ocorra em fases precoces do crescimento tumoral (HSU *et al.*, 1994b). Contudo, o estudo imuno-histoquímico do p53, com o intuito de se avaliar o acúmulo da proteína mutante, é controverso, visto que a expressão imuno-histoquímica pode ser o resultado da estabilização da proteína não-mutante, que pode se expressar como parte da resposta celular aos danos do DNA (SOONG *et al.*, 1996). Assim, os dados obtidos através de métodos de biologia molecular forneceriam informações mais confiáveis sobre prognóstico do que a imuno-histoquímica realizada com o anticorpo para proteína p53, o Pab 1801 (SJÖGREN *et al.*, 1996).

1.3.6. Análise de imagem assistida por computador

O estudo morfométrico dos tumores com o auxílio do computador é hoje grande fonte de pesquisas, existindo numerosas possibilidades de avaliação dos tumores, tanto a nível estrutural (quantidade de fibrose, vasos), como celular ou nuclear. A área nuclear, área nucleolar e o "roundness factor" são alguns dos parâmetros estudados, por exemplo, em carcinoma prostático (DIAMOND *et al.*, 1982; BLOM *et al.*, 1990; SHAEFFER *et al.*, 1992; VESALAINEN *et al.*, 1995).

O modo e o grau de invasão dos tumores pode se correlacionar com estes parâmetros ou, de outra forma, com coeficientes de variação obtidos, como foi observado com carcinoma do cólon e do reto (CARTER *et al.*, 1989). É possível, através da análise de imagem por computador, se determinar e se quantificar características celulares como pleomorfismo, relação núcleo-citoplasmática e irregularidade nuclear (JARVIS, 1986, 1987; NAKAJO, YAMAMOTO, TAHARA, 1992; KAWAI *et al.*, 1994), obtendo-se

índices mais acurados que os meios convencionais de gradação de atipias celulares (JARVIS, GRAFF, WHITEHEAD, 1987). Em relação ao CHC, vários estudos têm demonstrado associação positiva entre a área nuclear das células tumorais e sua atividade proliferativa, maior agressividade tumoral e pior prognóstico (IKEGUCHI *et al.*, 1998), como também entre a relação núcleo-citoplasmática e a sobrevida do paciente (KAWAI *et al.*, 1994). Recentemente, contudo, um estudo morfométrico computadorizado ultra-estrutural revelou que diversas organelas celulares, matriz citoplasmática e volume nuclear de células tumorais do CHC apresentam-se inter-relacionadas, o que fala contra a idéia de que o pleomorfismo celular desse tumor tenha caráter anárquico (DE MENEZES, DE FARIA, SESSO, 1996).

Parâmetros moleculares também podem ser analisados. Através da coloração de Feulgen é possível se quantificar o DNA nuclear do CHC por meio da análise computadorizada de imagens (CARTER *et al.*, 1989; ORSATTI *et al.*, 1994). Essa técnica tem a vantagem da visualização direta e seleção de núcleos para mensuração e permite uma avaliação histológica rotineira do material (CARTER *et al.*, 1989).

A análise de imagem por computador apresenta ainda a vantagem de facilitar a avaliação de núcleos ou células corados pela técnica imuno-histoquímica, através da densidade óptica (WILLIAMS *et al.*, 1986; JARVIS, 1986, 1987). Caracterizar uma célula como positiva ou negativa é, às vezes, problemático e depende da natureza subjetiva dos métodos de avaliação da coloração (NORAZMI *et al.*, 1990). A variação intra- e inter-observadores na avaliação de dados como estes pode ser então minimizada pela utilização da análise de imagem assistida por computador (HORSFALL *et al.*, 1989). WELLS, DEROSE, COHEN (1996) realizaram estudo em tecido hepático adjacente ao CHC e demonstraram, utilizando análise de imagem pelo CAS 200, que a proliferação celular, avaliada por imuno-histoquímica com PCNA e mib-1, não apresentava diferenças significativas em comparação com células do CHC. RODE & DHILLON (1984), em outro exemplo, haviam relatado que a intensidade da coloração para NSE e S-100 era maior em lesões melanocíticas malignas que naquelas benignas e que tal achado apresentava valor prognóstico significativo. Esse mesmo grupo de autores, posteriormente (WILLIAMS *et al.*, 1986), com a ajuda da análise de imagem por computador, acabaram por refutar o estudo

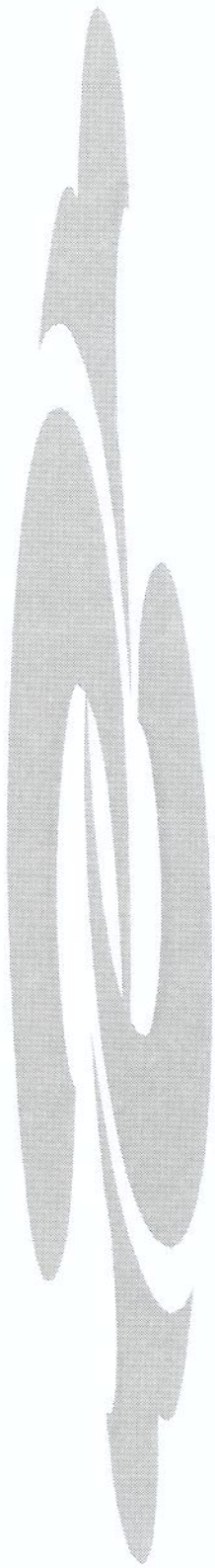
anterior, visto que as diferenças, ainda que discretas, não eram estatisticamente significativas. A análise de imagem por computador foi decisiva para a eliminação de erros e por ser extremamente rápida. Assim, podem-se estabelecer mensurações de forma padronizada, possibilitando comparações entre vários grupos de pesquisadores.

Vários autores estudaram a análise das AgNORs sob assistência computadorizada, com o intuito de medir a área total de AgNORs em cada núcleo, o tamanho e o número de AgNORs (AUBELE *et al.*, 1994; HENDRICKS, RAINER, MUNAKATA, 1995; HABERLAND *et al.*, 1996; MARTIN *et al.*, 1996; TRERÈ *et al.*, 1996a; LI *et al.*, 1996; ZACZEK, 1996; ZACZEK, SZOT, CHLAP, 1996b ZACZEK *et al.*, 1996a; BELLOTTI *et al.*, 1997; PIFFKO *et al.*, 1997; RODRIGUES *et al.*, 1997; POLLOK, 1997; MAHOVLIC *et al.*, 1999). Esses estudos demonstraram que era possível distinguir lesões benignas e malignas, como também se fazer correlações com a diferenciação celular. CHIUSA *et al.* (1997) estudaram pacientes com carcinoma da próstata e os parâmetros AgNORs e demonstraram, através de análise de imagem digital, que o número de AgNORs e área nuclear e nucleolar podiam fornecer informações importantes para separar os pacientes em grupos de alto ou baixo risco. Os parâmetros AgNORs, com o intuito de se estudar a sobrevida dos pacientes, foi também abordado em carcinoma de mama (NAKAYAMA & ABE, 1995; BELLOTTI *et al.*, 1997; GUNTHER *et al.*, 2000), melanoma maligno uveal (MCLEAN *et al.*, 1997), linfoma não-Hodgkin (CAULET-MAUGENDRE *et al.*, 1996), carcinoma escamoso do pulmão (ANTONANGELO *et al.*, 1997), carcinoma de pequenas células do pulmão (BIGRAS *et al.*, 1996), carcinoma urotelial de células transicionais (SHIINA *et al.*, 1996a, 1996b) e carcinoma endometrióide uterino (GIUFFRÉ *et al.*, 2001). Alguns autores demonstram, através do uso de análise de imagem por computador, que os parâmetros AgNOR não se correlacionam com a sobrevida dos pacientes, por exemplo, no carcinoma nasofaríngeo (PAK *et al.*, 2000b) porém, puderam auxiliar em seus diagnósticos diferenciais (PAK *et al.*, 2000a).

A análise quantitativa das AgNORs, através da análise de imagem digital, vem sendo empregada em fígados com CHC. Com estes dados é possível comparar grupos de pacientes, verificando-se que aqueles com AgNORs de padrão irregular e difuso e em

maior número apresentam tumores de comportamento biológico mais agressivo (SHIRO *et al.*, 1994). Os parâmetros AgNORs (RAN, NAg, TAAg, AAg) foram recentemente estudados em CHC por ANSELMi *et al.* (1990), SHIRO *et al.* (1994), BOLONDI *et al.* (1996) e TRERÈ *et al.* (1996b).

Outras possibilidades de emprego da análise de imagem computadorizada são como auxílio na citometria de fluxo, análise cromossômica e reconstrução tridimensional de secções de tecidos (ERLER, CHEIN, MARCHEVSKY, 1993).



2. OBJETIVOS

- Caracterizar os parâmetros AgNORS no CHC e em tecido hepático não tumoral, através da análise de imagem assistida por computador e correlacioná-los com as graduações histológicas de Edmondson-Steiner clássica e modificada.

- Verificar a importância prognóstica dos parâmetros AgNORS e das graduações histológicas de Edmondson-Steiner clássica e modificada no CHC, comparando-as entre si.

- Comparar os parâmetros AgNORS no CHC com o marcador de proliferação celular PCNA, através de coloração imuno-histoquímica.

- Avaliar a importância dos parâmetros AgNORS no diagnóstico diferencial entre CHC e tecido hepático não tumoral.



3. CASUÍSTICA E METODOLOGIA

3.1. CASUÍSTICA

Foram selecionados, retrospectivamente, junto ao Departamento de Anatomia Patológica (DAP) da Faculdade de Ciências Médicas (FCM) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), 45 casos de CHC diagnosticados entre janeiro de 1992 a janeiro de 1999, através de biópsias por agulha, em cunha, ressecção tumoral ou transplante hepático. Foram avaliados os blocos de parafina e as lâminas histológicas, no sentido de se definirem os critérios de inclusão/exclusão de cada caso.

Os critérios de inclusão foram: a) Revisão e confirmação diagnóstica de CHC por dois patologistas com experiência em hepatopatologia (JTVJ, CAFE); b) Quantidade de material em bloco de parafina suficiente para realização de coloração em Hematoxilina-Eosina (HE), para NORs (método de PLOTON *et al.*, 1986) e imuno-histoquímica para PCNA, perfazendo pelo menos uma lâmina para cada coloração; c) Corte histológico contendo pelo menos 200 células hepatocitárias tumorais, com arquitetura tecidual tumoral reconhecível. Este número 200 núcleos de células tumorais foi obtido através de teste piloto com 10 casos escolhidos aleatoriamente, de acordo com o método de curvas de estabilização, detalhado adiante (LORAND-METZE & METZE, 1996).

Os critérios de exclusão foram: a) Casos em que o diagnóstico de CHC fosse posto em questão pelos patologistas (JTVJ, CAFE); b) Casos com menos de 200 células hepatocitárias tumorais, ou que não fosse possível a realização de uma das técnicas de coloração acima expostas; c) Impossibilidade de reconhecimento da arquitetura tumoral, para avaliação do padrão histológico (segundo a Organização Mundial de Saúde), ou da graduação histológica (Edmondson-Steiner clássica ou modificada).

A amostra final foi constituída por 34 casos que preenchiam os critérios de inclusão, algumas vezes contendo mais de 2 lâminas. Posteriormente, nestes casos, foi escolhido o bloco com melhores condições técnicas, tais como áreas tumorais com menos artefatos e maior representação do tumor.

O material havia sido previamente fixado em formalina 10%, tamponada ou não, e incluído em parafina.

3.2. DADOS CLÍNICOS

As informações clínicas referentes aos pacientes foram obtidas através de consulta aos prontuários no Serviço de Ambulatório Médico Estatístico do Hospital de Clínicas da UNICAMP, ou de contatos com a equipe clínico-cirúrgica.

Os dados clínicos avaliados foram: sexo, data de nascimento, data da coleta da biópsia ou da ressecção cirúrgica, data do diagnóstico (laudo anatomopatológico), tamanho do tumor (macroscopia, ultrassom ou tomografia computadorizada), tipo de tratamento utilizado e data do óbito, quando ocorrido.

Foi também acionado o setor de convocação do Hospital das Clínicas, em caso de perda do seguimento clínico.

3.3. CONFEÇÃO DAS LÂMINAS

3.3.1. Corte dos blocos de parafina

Foram obtidos cortes nos blocos de parafina com espessura padrão de 3µm, realizados por um único técnico de laboratório, em um único micrótomo, conseguindo-se um total mínimo de 5 lâminas seriadas. As lâminas destinadas à técnica imuno-histoquímica foram previamente submetidas ao tratamento com organosilano a 2% em acetona (3-aminopropil-trietoxi-silano-SIGMA código A3648-USA). Pelo menos uma das lâminas foi corada em HE, de forma habitual.

3.3.2. Colorações especiais

3.3.2.1. Coloração para NORS (Figura 1)

Para a realização de coloração das NORs, foi utilizada a técnica de PLOTON *et al.* (1986). Ela se compõe de duas soluções: a solução A contém 2g de gelatina dissolvida em 100 ml de água destilada pré-aquecida e é acrescida 1g de ácido fórmico. A solução B é

composta por nitrato de prata a 50%. A solução final foi obtida no momento da coloração das lâminas, onde se empregou um volume da solução A e dois volumes da solução B. A solução final foi diretamente espalhada sobre os cortes histológicos, recobrando-os com lamínula. A reação foi realizada no escuro (caixa de isopor), sob temperatura ambiente, durante 30 minutos. Em seguida a lamínula foi retirada, os cortes histológicos lavados em água destilada, procedendo-se à montagem com resina sintética. Não se realizou contra-coloração nuclear .

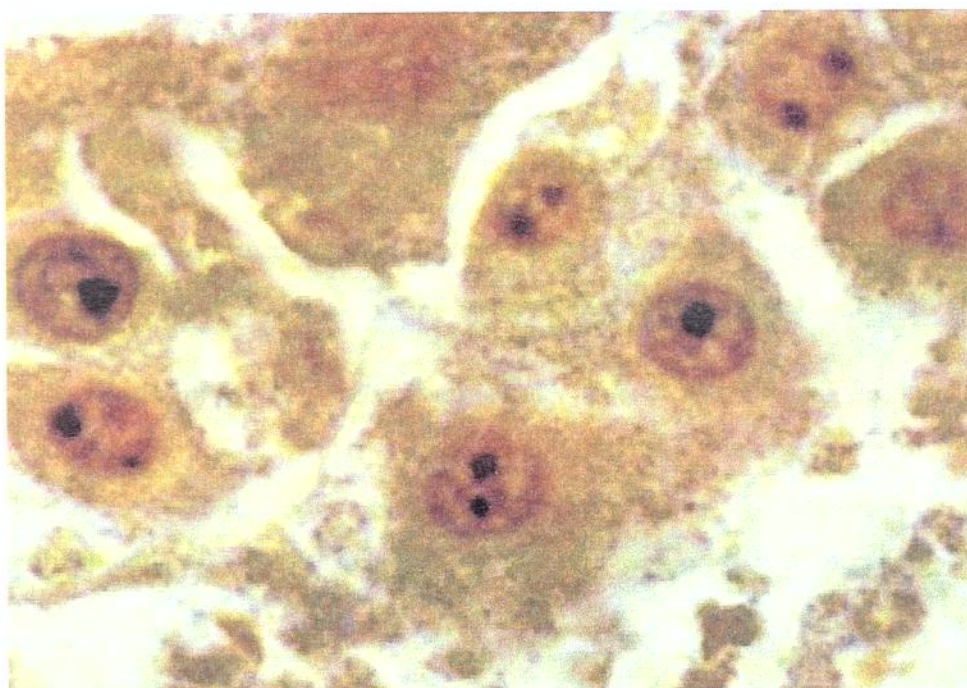


Figura 1: Coloração das NORs pelo metodo de Ploton *et al.* (1986)

Núcleos de hepatócitos com impregnações marron-enegrecidas (AgNORs) que variam de tamanho e quantidade (coloração pelo método de Ploton *et al.*, 1986 - 400X)

3.3.2.2. Estudo imuno-histoquímico para PCNA (Figura 2)

A pesquisa para o PCNA foi realizada pela técnica imuno-histoquímica em cortes de parafina de 3µm em todos os casos, como também em lâminas de controle positivo.

Todas as lâminas foram submetidas à silanização prévia do seguinte modo: 1) Imersão das lâminas em acetona por 2 minutos; 2) Imersão em solução de APTS (Sigma A3648) a 4% em acetona por 2 minutos; 3) Imersão em acetona por 4 vezes e 4) Secagem em estufa.

Realizados então os cortes histológicos, que permaneceram por uma hora em estufa aquecida a 100°C, antes da desparafinização.

O protocolo usado na técnica imuno-histoquímica consta das seguintes etapas:

Desparafinização: Os cortes histológicos são desparafinizados através da passagem em sucessivos banhos em xilol e álcoois, em diferentes concentrações (uma passagem em xilol absoluto a 110°C e duas em xilol à temperatura ambiente, álcool a 99%, álcool a 80% e álcool a 50%). São então submetidos à lavagem em água corrente e destilada.

Bloqueio da peroxidase endógena: Os cortes histológicos são imersos por 15 minutos, à temperatura ambiente, em solução 3% de 10ml de H₂O₂ e 90ml de álcool metílico.

Panela de pressão: Os cortes histológicos são imersos em tampão citrato pH 6.0 por 3 minutos e 30 segundos, a partir da ebulição. São postos a esfriar, em temperatura ambiente, por 15 minutos e lavados em água corrente. O tampão citrato pH 6.0 é composto por ácido cítrico monohidratado (2,1 g) e água destilada (1000 ml).

Anticorpo primário: As lâminas são cobertas por solução diluída do anticorpo primário PC10 (DAKO M879), na concentração de 1:150, em tampão PBS-diluyente. As lâminas são postas em geladeira a 4°C durante todo o período noturno. Após este período, são lavadas três vezes em PBS, durante 5 minutos cada, à temperatura ambiente. A solução salina tamponada com fosfatos (PBS) 0,01M / pH 7,4 é composta por cloreto de sódio (160g), fosfato de sódio dibásico anidro (27,31g), fosfato de sódio monobásico di-hidratado (4,86g) e água destilada (1000 ml). Durante a utilização desta solução deve-se diluir a 1/20 em água destilada e acertar o pH. O tampão PBS-diluyente é obtido utilizando-se 1 g de soroalbumina bovina (BSA) fração V (Sigma A7888), 0,1 g de azida sódica (NaN₃) e 100 ml de tampão PBS.

Anticorpo secundário: As lâminas são cobertas com anticorpo monoclonal secundário biotinilado Multi-Link (DAKO E0453) e colocadas em estufa durante uma hora, a 37°C. São então lavadas em PBS por 5 minutos, três vezes.

Aplicação do complexo Estreptavidina-Biotina-Peroxidase (DAKO K377): Aplica-se a estreptavidina e a biotina conjugadas à peroxidase, diluídas em tampão PBS, que fazem parte do sistema de amplificação do sinal da DAKO (Reagentes 5, 6 e 7- DAKO CSA System, HRP). Lavar em tampão PBS com três trocas, de 3 a 5 minutos cada.

Reagente cromógeno: As lâminas são imersas numa solução contendo 60 mg de DAB (3'-3"-tetra-hidrocloreto-diaminobenzidina-SIGMA, código D5637), 100 ml de tampão PBS, 2 ml de peróxido de hidrogênio a 3% e 1 ml de dimetilsulfóxido (Merck 1.02952), sendo retiradas quando adquirem uma coloração acastanhada. Lavar em água corrente e destilada por 3 minutos.

Contra-coloração: Realizada em hematoxilina de Mayer por 60 segundos, seguindo-se lavagens em água corrente e destilada, em água amoniacal (solução aquosa de hidróxido de amônio a 0,5%), imergindo por 4 vezes rapidamente e novamente em água corrente e destilada.

Desidratação: As lâminas são colocadas, sucessivamente, em etanol 50%, 80%, 95% e 100% (três vezes).

Montagem das lâminas: Com resina Entellan (MERCK, código 1.07961).

Em todas as reações constavam casos de controle positivo e negativo. Como controle positivo foram utilizados centros germinativos de linfonodos reacionais. Como controle negativo foi usada a própria reação, eliminando-se o anticorpo primário.

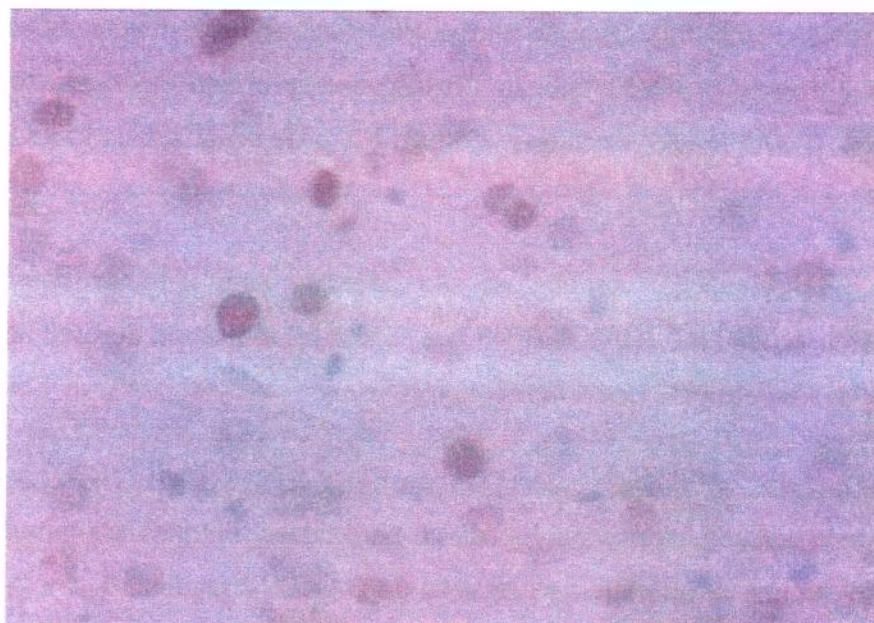


Figura 2: Coloração pela imuno-histoquímica para PCNA

Núcleos tumorais com coloração amarronzada detectando PCNA pelo anticorpo PC-10 (método de imunoperoxidase - 400X)

3.4. LEITURA DAS LÂMINAS

3.4.1. AgNORs e análise de imagem assistida por computador

Para a quantificação dos parâmetros AgNORs foi utilizado o sistema de análise de imagem KS 300 versão 2.0 (Copyright® 1995, Kontron Elektronik GmbH-Alemanha), em funcionamento no DAP-FCM-UNICAMP. Os programas e *hardware* foram incorporados ao sistema operacional Windows 3.11 for Workgroups (Copyright ® 1993, Microsoft Corporation), conectados a dois monitores de vídeo e à câmera de vídeo acoplada ao microscópio óptico da Axioplan 2, versão 1.2 (Carl Zeiss Jena GmbH-Alemanha). A configuração do KS 300 constava de: KE 2.00 basic 300, KE 2.00 meas 300_1, KE 2.00 Eval 300, KE 2.00 morphology 300_1 e 300_2, KE 2.00 colour 3000, KE 2.00 database, KE 2.02 additions 300, KE 2.00 FG1, KE 2.00 display Windows e KE 2.00 look-up table editor.

As lâminas, coradas pela técnica de PLOTON *et al.* (1986), foram lidas com objetiva de 100X (lente de imersão a óleo). A ocular era de 10X, para visualização do operador.

Foram analisados os seguintes parâmetros, com suas respectivas siglas:

1. Número de AgNORs (n AgNOR)
2. Área total de AgNORs (area AgNOR), em micrômetros²
3. Tamanho individual das AgNORs (AgNOR size), em micrômetros²
4. Área nuclear (AreaNuclear), em micrômetros²
5. Relação da área total de AgNORs por área nuclear (% area AgNOR)
6. Média e coeficiente de variância de cada parâmetro (_MEAN e _CV)

Foram obtidos, posteriormente, para cada caso, o percentual de núcleos com a Area AgNOR maior que 7 μm^2 (%TAAg ≥ 7), o índice de Rüschoff (RI) e o AgNOR size (dividindo-se o Area AgNOR pelo n AgNOR).

Para a execução do processo analítico de imagem foi usada a seguinte MACRO do sistema:

1. imgdelete "*"
2. Gclear 0
3. !tvinput 1
4. Msload "imagem"
5. !Msmeansint, "imagem";1;0,10
6. datalist "imagem", 0,1

Todas as lâminas foram lidas pela mesma pessoa (JTVJ), de forma interativa, plotando-se a imagem congelada dos núcleos das células tumorais e delineando-se os contornos nucleares de cada área prata positiva. Todas as estruturas foram desenhadas em formas semelhantes a círculos em sentido anti-horário, segundo o cursor do *mouse* (Figura 3)

Foram escolhidos 200 núcleos de células hepatocitárias tumorais de forma aleatória, sendo descartados aqueles que não apresentassem adequada definição de imagem, tanto em relação à área nuclear como também às AgNORs. A distinção entre núcleos de hepatócitos tumorais e núcleos de células de Küppfer, endoteliais ou biliares era necessária, não resultando empecilho ao trabalho.

A calibração geométrica era: $X = 0,0956938$ micrômetros/pixel e $Y = 0,0961538$ micrômetros/pixel, com razão de 0,945216.

A cada mudança de objetiva, análise de nova lâmina ou decorridos mais de 20 minutos num campo de grande aumento, era realizado novo balanceamento de brilho e cores, através das teclas F8 (AUTO/MANUAL) e F7 (*White Balance*) e ajuste, comparando-se a imagem da ocular e do monitor de vídeo.

Ao fim de cada mensuração, os dados obtidos no *Data List*, eram copiados e colocados em planilha do Excel 5.0c (Copyright® 1985-1994, Microsoft Corporation).

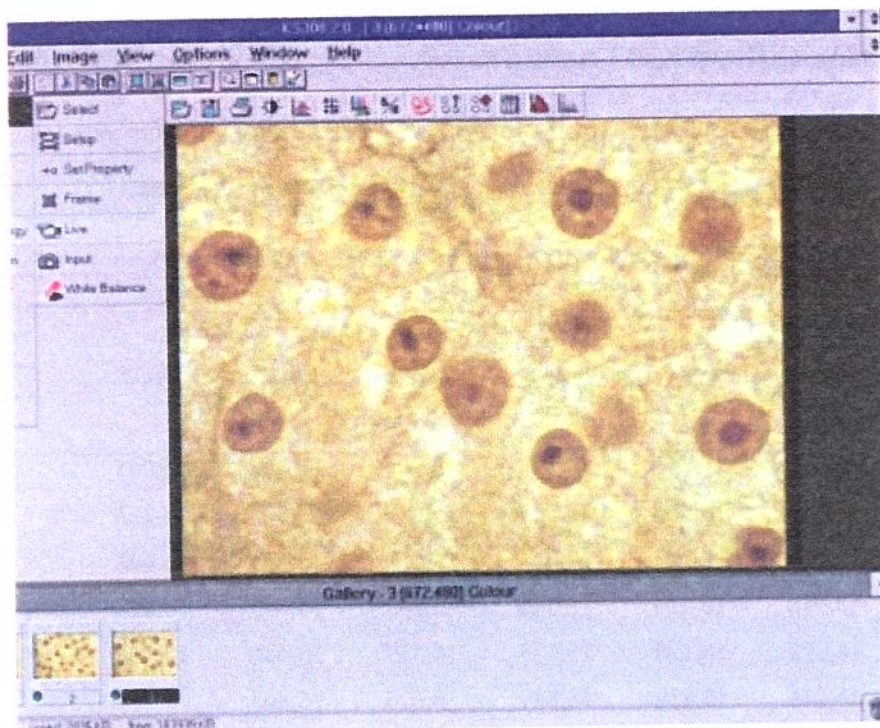


Figura 3: Análise de imagem assistida por computador

Legenda: Tela de computador exibindo o programa que analisa os parâmetros AgNOR. A imagem selecionada pelo programa é de células do CHC coradas pelo método de Ploton *et al.* (1986) para as NORs.

3.4.1.1. Curvas de estabilização (LORAND-METZE & METZE, 1996)

Foram selecionados 10 casos aleatórios de CHC, nos quais analisaram-se os parâmetros AgNOR: area AgNOR_MEAN, %area AgNOR_MEAN, AreaNuclear_MEAN. Para cada um dos parâmetros, foram inicialmente analisadas as médias obtidas dos primeiros 50 núcleos examinados. Posteriormente, mais 10 núcleos foram adicionados, e novas médias calculadas. Em seguida foi realizado um sorteio aleatório de casos, onde a sequência de núcleos foi alterada. Todas as médias foram recalculadas pelo mesmo método descrito anteriormente, repetindo-se todo o método por 10 vezes.

No exemplo abaixo, o parâmetro AgNOR analisado foi o %area AgNOR_MEAN do caso 23 (biópsia 4935/98). A Tabela 1 exibe as médias obtidas com os respectivos números de núcleos examinados, onde cada coluna representa uma sequência de casos sorteados. O GRÁFICO 1 mostra as curvas baseadas nos resultados obtidos.

Observou-se notório equilíbrio entre as médias alcançadas em torno do 2000 núcleo examinado, em todos os parâmetros AgNOR, em todos os casos.

Tabela 1: %area AgNOR_MEAN através de curvas de estabilização

Número de núcleos examinados	Seq 1	Seq 2	Seq 3	Seq 4	Seq 5	Seq 6	Seq 7
50	15,536	16,844	16,893	16,067	15,068	16,045	17,657
60	15,809	16,386	16,543	15,610	15,506	16,356	17,258
70	15,977	16,767	16,027	15,558	16,461	16,198	17,209
80	15,930	16,520	15,688	15,827	16,643	16,077	16,899
90	16,270	16,120	15,639	16,537	16,488	16,168	16,756
100	16,048	15,839	15,847	16,676	16,363	16,023	16,630
110	16,325	15,785	16,427	16,546	16,412	15,985	16,482
120	16,195	15,946	16,552	16,436	16,270	15,943	16,539
130	15,940	16,430	16,451	16,472	16,219	15,871	16,573
140	15,750	16,537	16,364	16,346	16,167	15,963	16,505
160	15,716	16,451	16,400	16,297	16,089	16,031	16,669
170	15,843	16,374	16,294	16,246	16,156	16,004	16,506
180	16,221	16,410	16,254	16,173	16,205	16,178	16,658
190	16,316	16,311	16,211	16,228	16,172	16,061	16,553
200	16,260	16,274	16,147	16,268	16,319	16,220	16,361

Seq. 1, 2, 3...7 - sequências diferentes de casos dentro um número igual de casos analisados. Os valores indicam as médias obtidas em relação a %area AgNOR_MEAN.

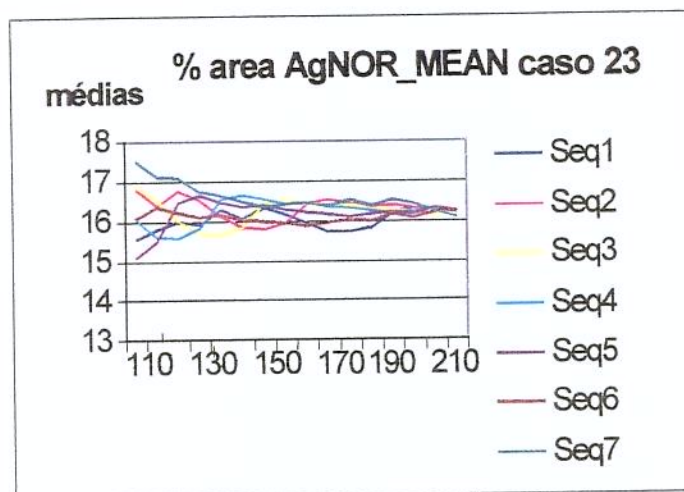


Gráfico 1: Curvas de estabilização

3.4.2. Leitura da pesquisa imuno-histoquímica de PCNA

A reação imuno-histoquímica foi classificada como positiva nos casos em que havia coloração acastanhada restrita ao núcleos, em grau de intensidade variável, lida por um só observador (JTVJ). Não foram consideradas células com coloração concomitante de núcleos e citoplasma.

Foram selecionadas áreas com núcleos positivos, em meio ao tumor ("hot spots"), onde foram contados o número destes e dos núcleos não-corados, perfazendo um total de 200 núcleos.

3.4.3. Graduação histológica do CHC

Todas as lâminas coradas em HE foram classificadas de acordo com a graduação histológica de Edmondson-Steiner (1954) e com a modificada de NZEAKO *et al.* (1995), por dois patologistas (JTVJ, CAFE), de forma simultânea. Tais classificações subdividem os tumores em 4 graus, de I a IV.

3.4.3.1. Graduação histológica de EDMONDSON-STEINER (1954)

Grau I. CHC bem diferenciado, com diagnóstico por vezes difícil, principalmente quando não são visualizadas áreas de crescimento agressivo. O aumento do tamanho celular e a presença de formações luminares contendo bile ajudam no seu diagnóstico

Grau II. Presença de células com núcleos maiores e mais hipercromáticos que os hepatócitos normais, com citoplasma abundante, acidófilo e de limites bem definidos. Os ácinos são freqüentes, com lúmens variando de tamanho e preenchidos por bile ou por precipitado protéico.

Grau III. Núcleos maiores e mais hipercromáticos que aqueles encontrados no grau II, com nítido aumento da relação núcleo-citoplasmática. O citoplasma pode, eventualmente, ser menos granular e acidófilo que no grau II e freqüentemente as formações luminares não contêm bile. Uma de suas principais características é a presença de células gigantes tumorais que são mais freqüentemente observadas neste grau. Colapso e distorção trabecular também são vistos.

Grau IV. Núcleos intensamente hipercromáticos, com relação núcleo-citoplasmática extremamente elevada. O citoplasma varia em quantidade, mas em geral é escasso. O padrão arquitetural é medular, com menor formação de trabéculas e diminuição da coesão celular. Menor formação acinar, menos bile e menor número de células gigantes. Células fusiformes podem ser vistas, como também áreas similares ao carcinoma pouco diferenciado "oat cell".

3.4.3.2. Graduação histológica modificada (NZEAKO *et al.*, 1995)

Grau 1. Células tumorais com abundante citoplasma e mínima irregularidade nuclear.

Grau 2. Núcleos com nucléolos proeminentes, hipercromatismo e maior irregularidade.

Grau 3. Presença de maior pleomorfismo nuclear, incluindo núcleos angulados.

Grau 4. Marcado pleomorfismo nuclear, hipercromatismo e células gigantes anaplásicas.

3.4.3.3. Classificação histológica do CHC (OMS)

Padrão trabecular (em placas ou sinusoidal): cordões ou placas contendo duas ou mais células, quando visualizadas em duas dimensões. Essas trabéculas estão separadas por sinusóides e apresentam escasso estroma intersticial.

Padrão pseudo-glandular (adenóide ou acinar): agrupamento celular resultante de degeneração celular central ou de trabéculas sólidas. O conteúdo dessas estruturas pseudo-glandulares está composto por detritos celulares, macrófagos e exsudato, podendo ser semelhantes a folículos tireoidianos.

Padrão compacto (sólido ou cirrótico) resulta, na grande maioria, de artefatos de compressão ou de radio- ou quimioterapia. As trabéculas são espessas e os sinusóides mais dificilmente distinguíveis.

Sub-tipo fibrolamelar: contém células poligonais, em arranjo lobular, e estroma fibroso em lamelas paralelas, formando centro estrelado.

Sub-tipo sarcomatóide: grande quantidade de células fusiformes e anaplásicas, áreas de necrose, hemorragia e raras mitoses. Pode ainda exibir padrão estoriforme.

Todos os casos foram classificados de acordo com padrão predominante ou primário, onde mais de 50 % do tumor se enquadrava, ou secundário, do qual menos de 50% do tumor se constituía.

3.5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

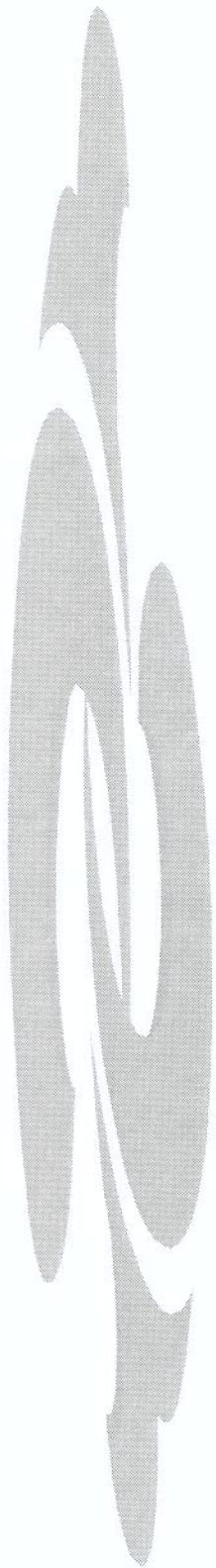
Foi utilizado o programa de estatística WinSTAT 3.1® (Kalmia Company Inc., USA) e o SPSS® para Windows®.

As associações entre as variáveis foram analisadas através da correlação de Spearman (SIEGEL & CASTELLAN, 1988). As variáveis analisadas foram: idade, graduação histológica de Edmondson-Steiner (1954) e modificada (NZEAKO *et al.*, 1995), tamanho tumoral, RI, %TAAg $\geq$ 7_MEAN, %area AgNOR_MEAN, %area AgNOR_CV, PCNA-i_MEAN, area AgNOR_MEAN, area AgNOR_CV, AgNORsize_MEAN, n AgNOR_MEAN, n AgNOR_CV, AreaNuclear_MEAN e AreaNuclear_CV. A correção do erro alfa foi realizada de acordo com CROSS & CHAFFIN (1982).

As variáveis categorizadas foram analisadas através de curvas tempo-evento de Kaplan-Meier (1958) e as contínuas através do modelo de regressão de Cox. A análise multivariada para sobrevida foi realizada segundo o modelo de regressão de Cox (1972), incluindo parâmetros com nível de significância de 0,05, ou menos.

Foi realizada análise de função discriminante linear com nove casos controle de pacientes sem hepatopatia, sem neoplasia e 34 casos de pacientes portadores de CHC, sendo divididos posteriormente em baixo e alto graus de Edmondson-Steiner. Este tipo de abordagem também é designada como “análise classificatória” (NORMAN & STREINER, 1997).

Foi utilizada ainda análise fatorial, com o objetivo de se avaliar inter-relações entre os marcadores de proliferação celular (WEISS, 1970; WEISS, 1971).



4. RESULTADOS

4.1. DADOS CLÍNICOS

A idade dos pacientes variou entre 14 e 85 anos, com média de 54 anos (desvio padrão, $\pm 19,91$). Oito pacientes eram de faixa etária menor que 40 anos, 11 pacientes estavam entre 40 e 60 anos e 15 pacientes (a maioria), tinham mais de 60 anos (TABELA 2).

Vinte e oito pacientes eram do sexo masculino e 6 do sexo feminino.

A média do tamanho tumoral em 21 pacientes, mensurado tanto por ultrassonografia ou tomografia computadorizada, quanto por macroscopia de peças cirúrgicas, foi de 8 cm ($\pm 5,18$), mediana de 7 cm. Dois pacientes apresentavam tumores menores que 2 cm, 6 tinham CHC com dimensões entre 2,1 e 5 cm, 8 entre 5,1 e 10 cm e 5 eram maiores que 10,1 cm. (TABELA 2 e ANEXOS B e C).

Tabela 2: Sexo, idade e tamanho tumoral

		n
Sexo	masculino	28
	feminino	6
Idade	≤ 40	8
	entre 40 e 60	11
	≥ 60	15
Tamanho (cm)*	≤ 2	2
	entre 2,1 e 5	6
	entre 5,1 e 10	8
	$\geq 10,1$	5

*total de 21 pacientes

A sobrevida média de 31 pacientes (dos quais se teve seguimento), a partir da data de coleta, foi de 400 dias (GRÁFICO 2).

4.2. PROCEDÊNCIA DO MATERIAL

Os casos de CHC tiveram as seguintes procedências: 8 foram oriundos de biópsia por agulha, 5 por biópsia em cunha, 4 por hepatectomia parcial e 7 eram explantes hepáticos.

4.3. PADRÃO HISTOLÓGICO (OMS)

De acordo com a classificação histológica da OMS, 33 tumores apresentaram padrão primário trabecular e um, padrão pseudo-glandular. Nenhum tumor apresentou padrão fibrolamelar predominante. Com relação ao padrão secundário, dos 34 tumores estudados, 7 eram de padrão pseudo-glandular e 27 eram do tipo trabecular (ANEXO D).

4.4. GRADUAÇÃO HISTOLÓGICA DE EDMONDSON-STEINER (1954)

De acordo com a classificação de Edmondson-Steiner (1954), 4 pacientes apresentaram tumor grau I, 20 tinham tumor grau II, 7 apresentaram tumor grau III e três grau IV (Anexo D) e Figuras 4, 5, 6, 7, 8 e 9.

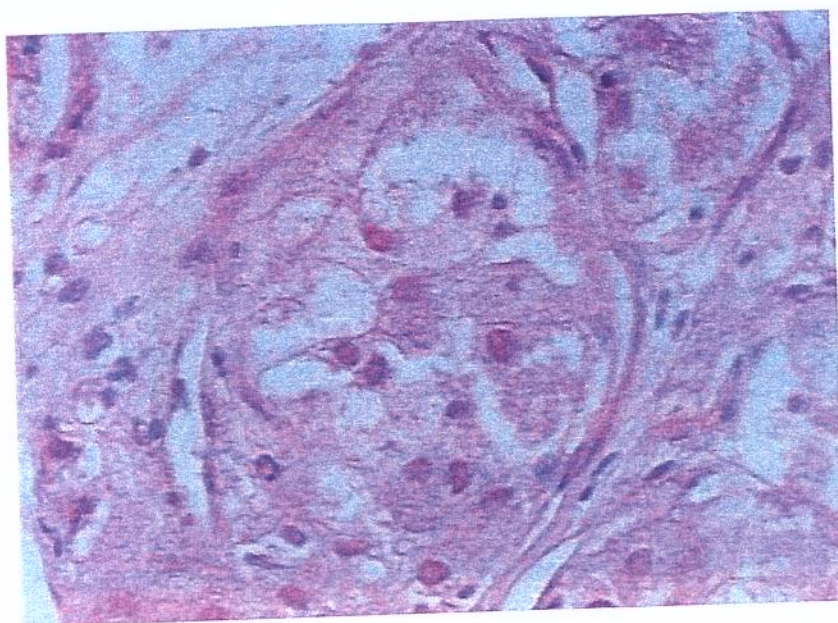


Figura 4: Grau I de Edmondson-Steiner

Células tumorais com citoplasma acidófilo e volumoso, exibindo mínima irregularidade nuclear (coloração HE - 400X).

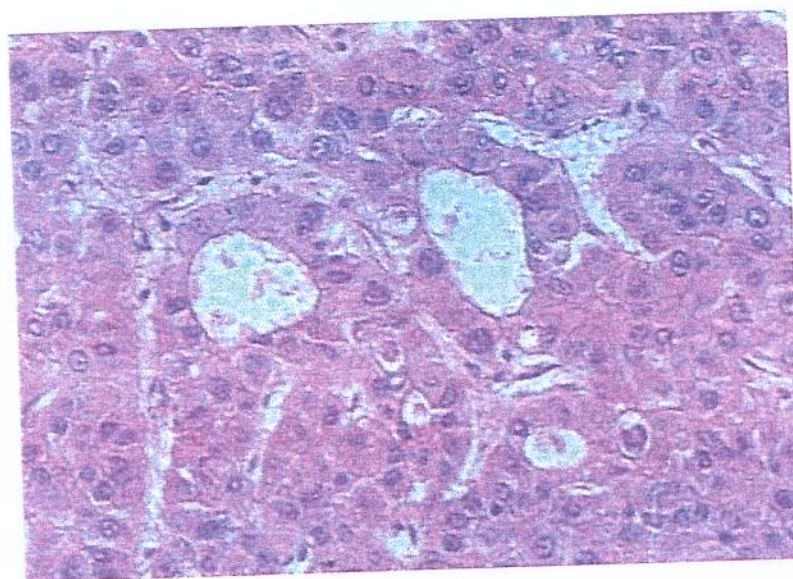


Figura 5: Grau II de Edmondson-Steiner

Notar numerosas formações pseudo-acinares com conteúdo protéico na luz (coloração HE, objetiva de 400X)



Figura 6: Grau II de Edmondson-Steiner

Pormenor exibindo formação pseudo-glandular com material protéico na luz. Presença de células com núcleos maiores e mais hipercromáticos que os hepatócitos normais, com citoplasma abundante, acidófilo e de limites bem definidos. (coloração HE - 1000X)

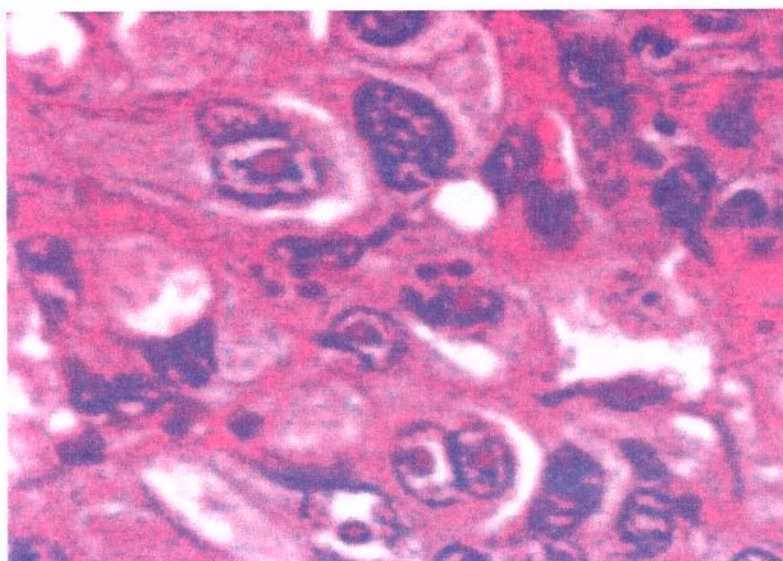


Figura 7: Grau III de Edmondson-Steiner

Observam-se aumento da relação núcleo-citoplasmática, maior irregularidade nuclear, nucléolos evidentes, além de distorção trabecular. (coloração HE, objetiva de 1000X)

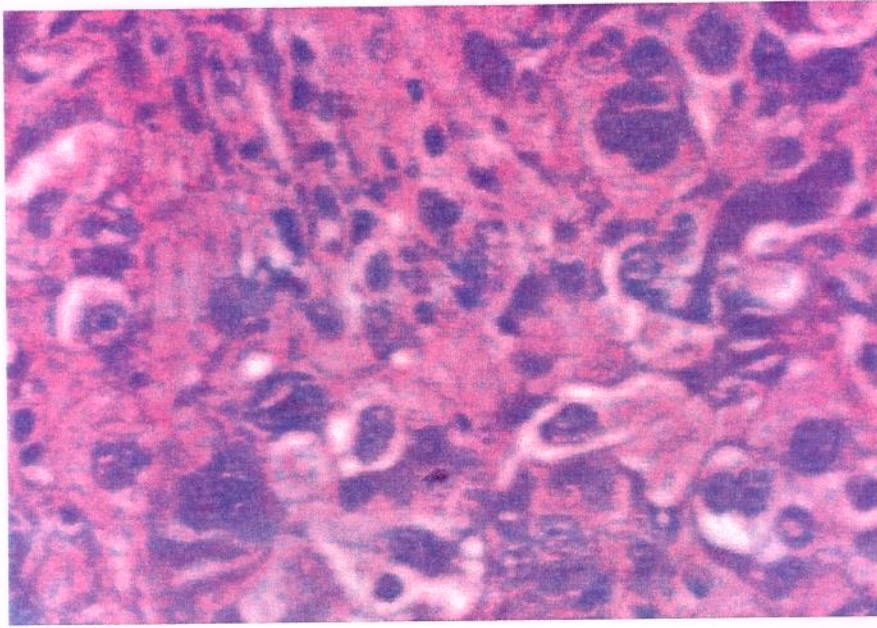


Figura 8: Grau III de Edmondson-Steiner

Observar aumento da relação núcleo-citoplasmática, maiores irregularidades nucleares, nucléolos evidentes e células gigantes. (HE - 1000X)

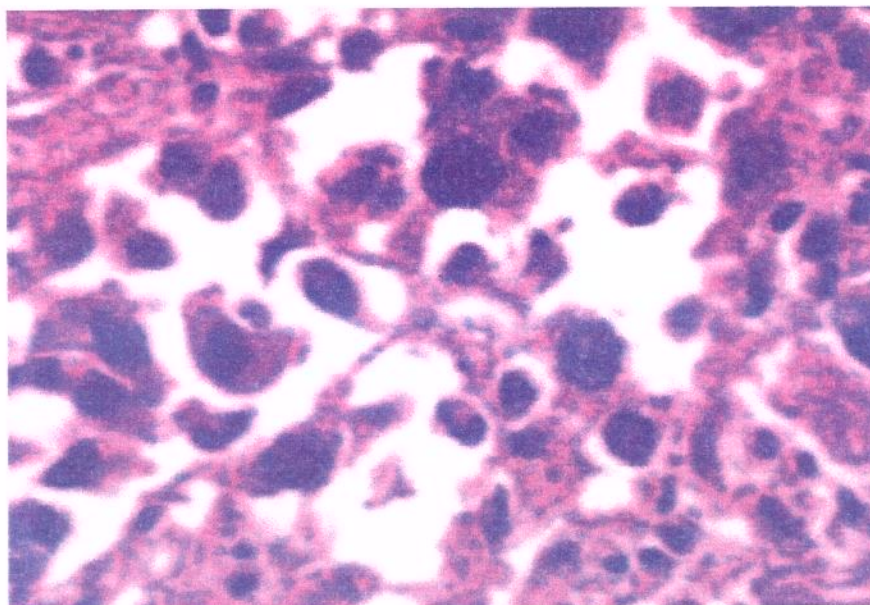


Figura 9: Grau IV de Edmondson-Steiner

Observar intenso aumento da relação núcleo-citoplasmática, hipercromatismo nuclear intenso e perda da coesão celular, com citoplasma escasso em algumas células; presença de células fusiformes (coloração HE-400X).

4.5. GRADUAÇÃO MODIFICADA DE EDMONDSON-STEINER (NZEAKO *et al.*, 1995)

De acordo com a graduação histológica de Edmondson-Steiner modificada, os tumores foram assim divididos: 4 eram grau I, 9 eram grau II, 17 eram grau III e 4 eram grau IV (Anexo e Figuras 10, 11, 12 e 13) .

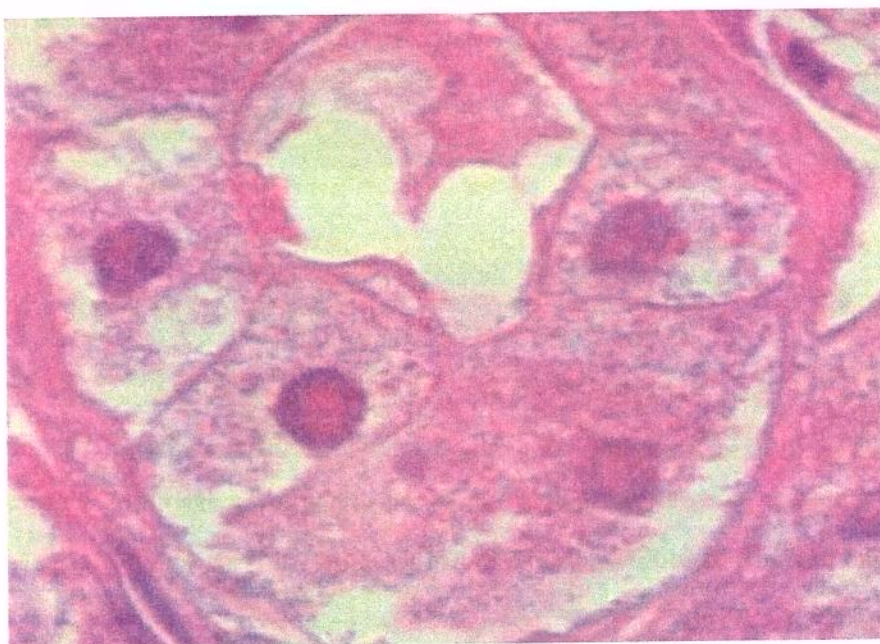


Figura 10: Grau I de Edmondson-Steiner modificado

Observam-se células tumorais com abundante citoplasma e mínima irregularidade nuclear.(coloração HE - 1000X).

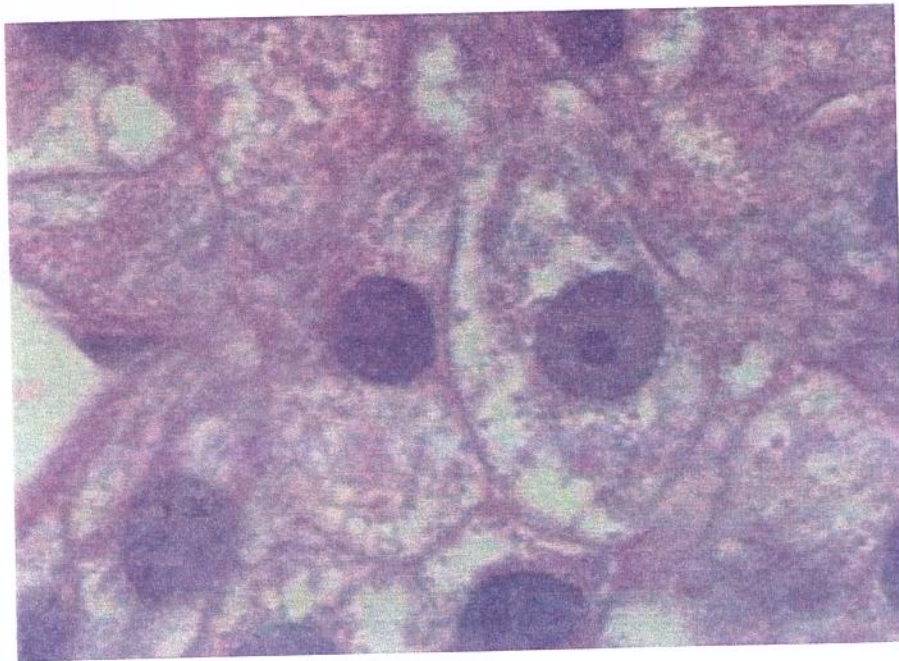


Figura 11: Grau II de Edmondson-Steiner modificado

Observar núcleos com nucléolos proeminentes, hipercromatismo e maior irregularidade. (coloração HE - 1000X).

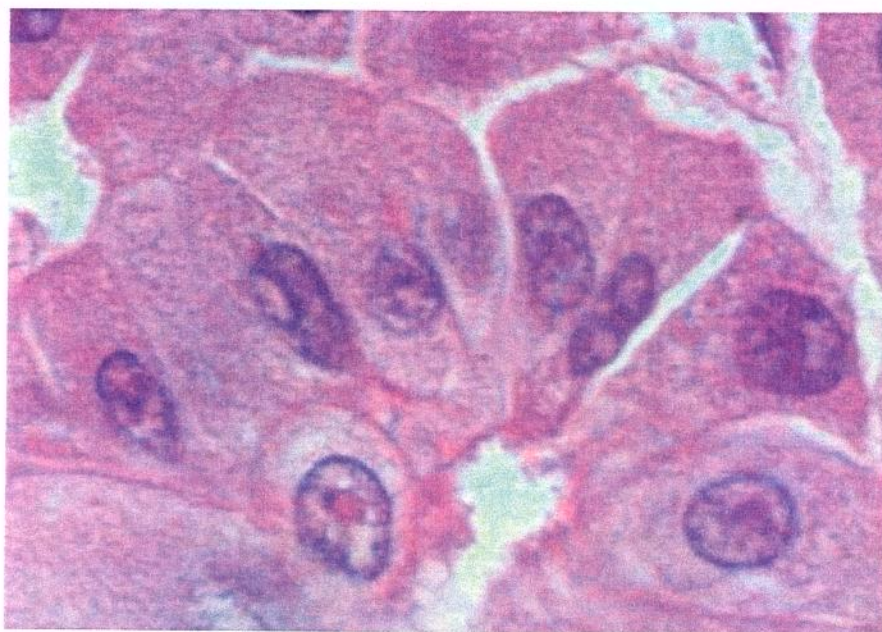


Figura 12: Grau III de Edmondson-Steiner modificado

Observa-se maior pleomorfismo nuclear, incluindo núcleos angulados (coloração HE - 1000X).

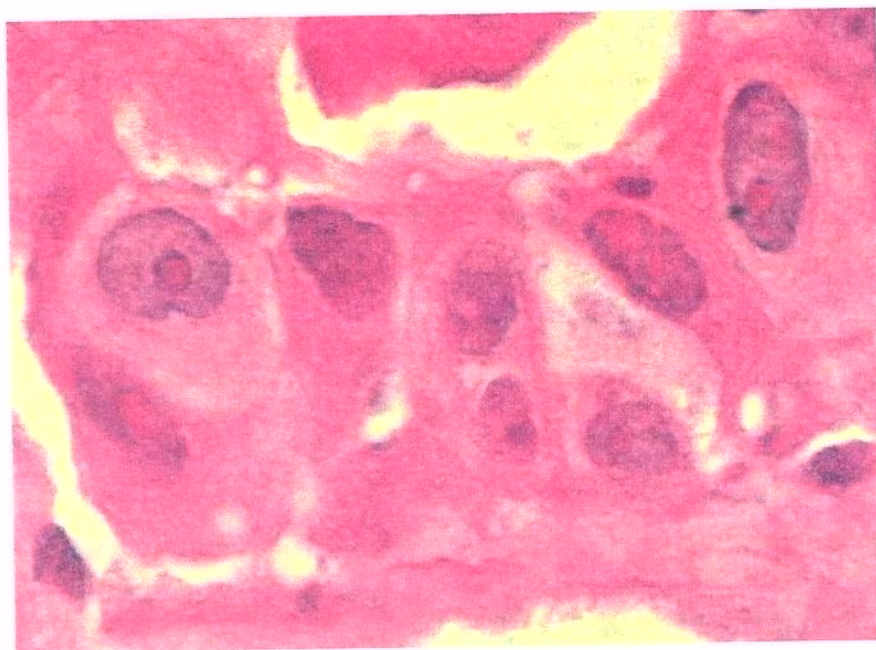


Figura 13: Grau IV de Edmondson-Steiner modificado

Notam-se pleomorfismo nuclear e hipercromatismo (coloração HE - 1000X).

4.6. PARÂMETROS AgNOR E NUCLEARES

4.6.1. Casos controle (tabela 3 e anexo M)

Dentre os casos controle observam-se os seguintes resultados:

4.6.1.1. AreaNuclear_MEAN variou de 24,94 a 38,33 μm^2 , com média de 31,53 (DP $\pm$ 3,69).

4.6.1.2. area AgNOR_MEAN foi de 3,02 a 4,22 μm^2 , com média de 3,73 ($\pm$ 0,36).

4.6.1.3. %area AgNOR_MEAN variou de 9,48 a 14,34%, com média de 12,07 ($\pm 1,5$).

4.6.1.4. n AgNOR_MEAN variou de 1,13 a 1,42, com média de 1,27 ($\pm 0,1$)

Tabela 3: Parâmetros AgNOR (casos-controle)

n	AreaNuclear_MEAN (em μm^2)	Area AgNOR_MEAN (em μm^2)	%area AgNOR_MEAN	n AgNOR_MEAN
9	31,53	3,73	12,07	1,27

4.6.2. Carcinoma hepatocelular

4.6.2.1. AreaNuclear_MEAN - nos 34 casos, variou de 19,13 a 75,22 μm^2 , com média de 39,22 (DP $\pm 13,04$) e mediana de 36,22 (AreaNuclear_CV=0,33).

4.6.2.1.1. Classificação de Edmondson-Steiner:

Grau I - 33,64 μm^2 ($\pm 7,06$)

Grau II - 35,89 $\mu\text{m}^2 \pm (11,42)$

Grau III - 48,42 $\mu\text{m}^2 \pm (15,06)$

Grau IV - 47,28 $\mu\text{m}^2 \pm (15,65)$

4.6.2.1.2. Classificação de Edmondson-Steiner modificada:

Grau I - 29,61 $\mu\text{m}^2 \pm (5,9)$

Grau II - 34,17 $\mu\text{m}^2 \pm (12,45)$

Grau III - 39,09 $\mu\text{m}^2 \pm (9,8)$

Grau IV - 60,62 $\mu\text{m}^2 \pm (10,07)$

4.6.2.2. Area AgNOR_MEAN - nos 34 casos foi $5,43 \mu\text{m}^2 \pm 2,03$, variando de 2,0775 a $9,7062 \mu\text{m}^2$. A mediana foi de $5,07 \mu\text{m}^2$.

4.6.2.2.1. Classificação de Edmondson-Steiner:

Grau I - $6,24 \mu\text{m}^2 \pm (0,99)$

Grau II - $5,38 \mu\text{m}^2 \pm (2,23)$

Grau III - $5,08 \mu\text{m}^2 \pm (2,01)$

Grau IV - $5,39 \mu\text{m}^2 \pm (2,24)$

4.6.2.2.2. Classificação de Edmondson-Steiner modificada:

Grau I - $5,21 \mu\text{m}^2 \pm (1,13)$

Grau II - $5,44 \mu\text{m}^2 \pm (1,52)$

Grau III - $5,28 \mu\text{m}^2 \pm (2,39)$

Grau IV - $6,21 \mu\text{m}^2 \pm (2,52)$

4.6.2.3. %area AgNOR_MEAN variou de 8,27 a 23,27%, com média de 14,41% ($\pm 3,62$) e mediana de 13,68%.

4.6.2.3.1. Classificação de Edmondson-Steiner:

Grau I - $14,87\% \pm (1,74)$

Grau II - $15,24\% \pm (3,86)$

Grau III - $13,3\% \pm (3,33)$

Grau IV - $10,65\% \pm (1,77)$

4.6.2.3.2. Classificação de Edmondson-Steiner modificada:

Grau I - 16,79% $\pm$ (2,1)

Grau II - 15,57% $\pm$ (3,77)

Grau III - 13,6% $\pm$ (3,8)

Grau IV - 13,6% $\pm$ 3,8

4.6.2.4. n AgNOR _MEAN variou de 1,18 a 2,64, com média de $1,68 \pm 0,36$ e mediana de 1,53.

4.6.2.4.1. Classificação de Edmondson-Steiner:

Grau I - 1,59 $\pm$ (0,32)

Grau II - 1,53 $\pm$ (0,26)

Grau III - 1,9 $\pm$ (0,33)

Grau IV - 2,16 $\pm$ (0,44)

4.6.2.4.2. Classificação de Edmondson-Steiner modificada:

Grau I - 1,33 $\pm$ (0,04)

Grau II - 1,53 $\pm$ (0,28)

Grau III - 1,72 $\pm$ (0,34)

Grau IV - 2,16 $\pm$ (0,24)

4.6.2.5. O Índice de Rüschoff (RI), nos 34 casos, variou de 0,18 a 2,48, com média de $0,62 \pm 0,41$. A mediana foi de 0,56.

4.6.2.5.1. RI_MEAN na classificação de Edmondson-Steiner:

Grau I - $0,41 \pm (0,12)$

Grau II - $0,52 \pm (0,23)$

Grau III - $0,77 \pm (0,26)$

Grau IV - $1,2035 \pm (1,1148)$

4.6.2.5.2. RI_MEAN na classificação de Edmondson-Steiner modificada:

Grau I - $0,35 \pm (0,07)$

Grau II - $0,45 \pm (0,14)$

Grau III - $0,71 \pm (0,51)$

Grau IV - $0,84 \pm (0,29)$

4.6.2.6. O percentual de núcleos de CHC com TAAg $\geq 7 \mu\text{m}^2$ (%TAAg ≥ 7) variou entre 0 a 92%, com média de 26% ($\pm 25,7$) e mediana de 19,3%.

4.6.2.6.1. Classificação de Edmondson-Steiner:

Grau I - $20,5\% \pm (7,6)$

Grau II - $23,7\% \pm (25,4)$

Grau III - $37,6\% \pm (32,5)$

Grau IV - $22\% \pm (19,8)$

4.6.2.6.2. Classificação de Edmondson-Steiner modificada:

Grau I -21,8% $\pm$ (17)

Grau II - 22,5% $\pm$ (29,8)

Grau III - 23,9% $\pm$ (24,9)

Grau IV - 47,1% $\pm$ (25)

Na Tabela 4 são demonstrados os dados coletados para parâmetros nucleares e AgNOR. A Tabela 5 mostra os valores do %TAAg ≥ 7 e RI em relação às classificações de Edmondson-Steiner clássica e modificada por NZEAKO *et al.* (1995) (maiores detalhes nos Anexos E e F).

Tabela 4: Média e desvio padrão dos parâmetros nucleares e AgNOR

	n	AreaNuclear_MEAN N	area AgNOR_MEAN	%area AgNOR_MEAN	n AgNOR_MEAN
E-S					
Grau I	4	33,64 μ m ² $\pm$ 7,06	6,24 μ m ² $\pm$ 0,99	14,87% $\pm$ 1,74	1,59 $\pm$ 0,32
Grau II	20	35,89 μ m ² $\pm$ 11,42	5,38 μ m ² $\pm$ 2,23	15,24% $\pm$ 3,86	1,53 $\pm$ 0,26
Grau III	7	48,42 μ m ² $\pm$ 15,06	5,08 μ m ² $\pm$ 2,01	13,3% $\pm$ 3,33	1,9 $\pm$ 0,33
Grau IV	3	47,28 μ m ² $\pm$ 15,65	5,39 μ m ² $\pm$ 2,24	10,65% $\pm$ 1,77	2,16 $\pm$ 0,44
E-S mod					
Grau I	4	29,61 μ m ² $\pm$ 5,9	5,21 μ m ² $\pm$ 1,13	16,79% $\pm$ 2,1	1,33 $\pm$ 0,04
Grau II	9	34,17 μ m ² $\pm$ 12,45	5,44 μ m ² $\pm$ 1,52	15,57% $\pm$ 3,77	1,53 $\pm$ 0,28
Grau III	17	39,09 μ m ² $\pm$ 9,8	5,28 μ m ² $\pm$ 2,39	13,6% $\pm$ 3,8	1,72 $\pm$ 0,34
Grau IV	4	60,62 μ m ² $\pm$ 10,07	6,21 μ m ² $\pm$ 2,52	12,8% $\pm$ 2,43	2,16 $\pm$ 0,24

E-S = classificação de Edmondson-Steiner, E-S mod = classificação de Edmondson-Steiner modificada; n = número de casos; AreaNuclear_MEAN = média de área nuclear; area AgNOR_MEAN = média da área total AgNOR por núcleo; %area AgNOR_MEAN = média da relação da área AgNOR total em relação à área nuclear; n AgNOR_MEAN = média do número de AgNOR por núcleo.

Tabela 5: Graduação de Edmondson-Steiner clássica e modificada, Índice de Rüschoff, PCNA-i e percentual de núcleos com área total de AgNORs $\geq 7 \mu\text{m}^2$

		Índice de Rüschoff	%TAAg ≥ 7	PCNA-i (%)
E-S				
Grau I	4	0,41 $\pm$ 0,12	20,5 $\pm$ 17,6	3,51 $\pm$ 2,66
Grau II	20	0,52 $\pm$ 0,23	23,7 $\pm$ 25,4	29,13 $\pm$ 25,81
Grau III	7	0,77 $\pm$ 0,26	37,6 $\pm$ 32,5	20,48 $\pm$ 17,49
Grau IV	3	1,20 $\pm$ 1,11	22 $\pm$ 19,8	11,7 $\pm$ 11,3
E-S mod				
Grau I	4	0,35 $\pm$ 0,07	21,8 $\pm$ 17	12,79 $\pm$ 9,66
Grau II	9	0,45 $\pm$ 0,14	22,5 $\pm$ 29,8	17,12 $\pm$ 19,08
Grau III	17	0,71 $\pm$ 0,51	23,9 $\pm$ 24,9	29,28 $\pm$ 26,35
Grau IV	4	0,84 $\pm$ 0,29	47,1 $\pm$ 25	18,02 $\pm$ 23,54

n = número de casos; %TAAg ≥ 7 = percentual de núcleos com área total de AgNORs $\geq 7 \mu\text{m}^2$; PCNA-i = percentual de núcleos corados para PCNA por total de núcleos examinados em “hot spots”; E-S = classificação de Edmondson-Steiner; E-S mod = classificação de Edmondson-Steiner modificada.

4.7. PCNA

O número de núcleos de células tumorais examinados em cada caso variou de 99 a 325, numa média de 196 (± 64) e mediana de 200. A percentagem de núcleos corados pela imuno-histoquímica para PCNA por número de núcleos tumorais contados (PCNA-i) variou, em 34 casos, de 0 a 92,9%, com média de 22,79% ($\pm 23\%$). Maiores detalhes podem ser observados no ANEXO L.

4.7.1. De acordo com a graduação de Edmondson-Steiner, o PCNA-i apresentou os seguintes resultados:

Grau I - 3,51% ($\pm 2,66$)

Grau II - 29,13% ($\pm 25,81$)

Grau III - 20,48% ($\pm 17,49$)

Grau IV - 11,7% ($\pm 11,3$)

Classificação de Edmondson-Steiner modificada:

Grau I - 12,79% ($\pm 9,66$)

Grau II - 17,12% ($\pm 19,08$)

Grau III - 29,28% ($\pm 26,35$)

Grau IV - 18,02% ($\pm 23,54$)

4.8. CORRELAÇÕES DAS VARIÁVEIS ENTRE SI

Foi utilizado o teste de Spearman, com nível de significância igual ou menor que 0,017, com a correção do erro alfa através do método de Cross & Chaffin (1982). Os dados podem ser observados, em pormenores, nos Anexos G, H, I e J.

Não houve correlação estatisticamente significativa entre a idade dos pacientes, padrões histológicos (OMS) e/ou tamanho tumoral do CHC, com nenhuma das variáveis analisadas.

Com relação à classificação de Edmondson-Steiner clássica, houve correlação estatisticamente significativa com o n AgNOR_MEAN ($r=0,48679$).

Observou-se correlação positiva entre os graus de Edmondson-Steiner com os graus de Edmondson-Steiner modificado ($r=0,59737$), como também com RI ($r=0,47975$) e uma correlação inversa e menos forte com a %area AgNOR_MEAN ($r=-0,4456$).

Houve correlação estatisticamente significativa entre a AreaNuclear_MEAN e a area AgNOR_CV ($r=0,49423$), %area AgNOR_CV ($r=0,58195$), n AgNOR_MEAN ($r=0,48891$), n AgNOR_CV ($r=0,6069$), %TAAg $\geq$ 7_MEAN ($r=0,79434$) e com os graus de Edmondson-Steiner modificado ($r=0,46143$). No entanto, esta última associação é óbvia, já que a definição da classificação leva em consideração a área nuclear para cada grau do CHC.

As duas associações estatisticamente significativas da variável area AgNOR_MEAN foram com o RI ($r=-0,5587$) (associação inversa) e com AgNORsize_MEAN ($r=0,82738$), porém as associações são lógicas: o RI é definido através da mensuração da area AgNOR_MEAN e o AgNORsize_MEAN é componente do conjunto maior area AgNOR_MEAN.

A %area AgNOR_MEAN se associou, com diferença estatisticamente significativa, com o %TAAg $\geq$ 7_MEAN ($r=0,56966$).

Houve correlação estatisticamente significativa entre o n AgNOR_MEAN e a graduação modificada de Edmondson-Steiner ($r=0,51879$) e entre o n AgNOR_MEAN e o RI ($r=0,66743$), porém esta última associação é óbvia, pois o n AgNOR define o RI.

Com relação à graduação modificada de Edmondson-Steiner, observou-se também associação estatisticamente significativa com o RI ($r=0,53943$).

O RI se correlacionou ainda com a classificação clássica de Edmondson-Steiner ($r=0,47975$) e com o AgNORsize_MEAN ($r=-0,90564$), porém esta relação é matemática, pois o RI é n AgNOR dividido pelo AgNORsize_MEAN.

O PCNA-i apresentou associação inversa e estatisticamente significativa com o AgNORsize_MEAN ($r=-0,45405$). Houve associação entre o PCNA-i e o RI ($r=0,39036$).

As demais variáveis não apresentaram correlações entre si, num nível de significância menor que 0,017.

4.9. ANÁLISE UNIVARIADA E MULTIVARIADA DE COX E CURVAS DE KAPLAN-MEIER - SOBREVIDA

Até o dia 16/4/1999, 20 pacientes haviam falecido, enquanto 11 estavam vivos. O seguimento clínico de três pacientes foi perdido. A sobrevida média dos pacientes, a partir da data de coleta, foi de 400 dias.

Foram realizadas as curvas de Kaplan-Meier que demonstram a sobrevida geral dos casos (Gráfico 2).

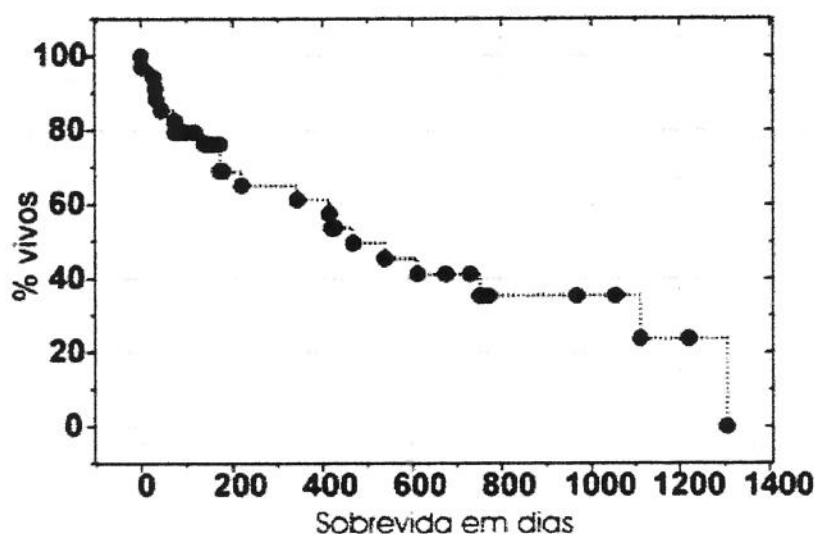


Gráfico 2: Curvas de sobrevida de 31 pacientes com CHC

As variáveis foram colocadas nos modelos uni e multivariado de Cox e avaliado seu significado prognóstico.

Através da análise univariada do modelo de regressão de Cox, pudemos demonstrar que a graduação de Edmondson-Steiner clássica ($p=0,0229$, $R=0,1753$) e n AgNOR_MEAN apresentaram diferença estatística significativa, com nível de significância limítrofe ($p=0,0635$, $R=0,1182$). A binarização da classificação clássica de Edmondson-Steiner em dois grupos (tumores de grau I e grau II como grupo de CHC baixo grau e

tumores de grau III e grau IV como CHC de alto grau) também apresentou diferença significativa em relação à sobrevida pela análise univariada ($p=0,0316$, $R=0,1593$). As demais variáveis analisadas não apresentaram diferenças significativas e podem ser observadas na Tabela 6. No Gráfico 3 observam-se curvas de Kaplan-Meier para Edmondson-Steiner binarizado.

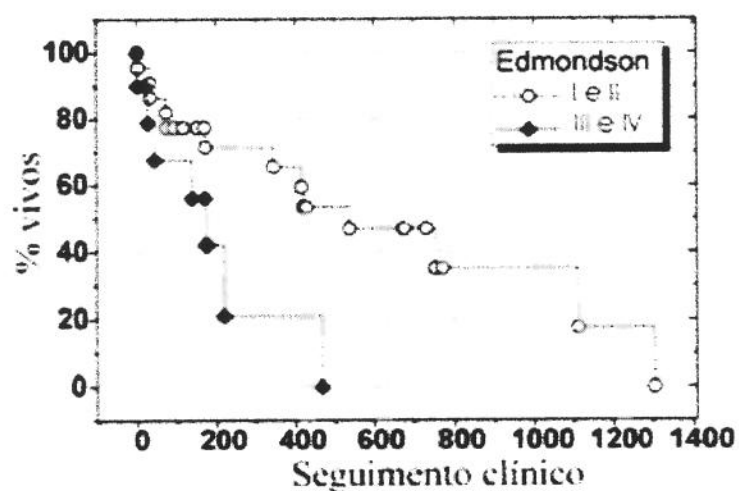


Gráfico 3: Sobrevida de pacientes com CHC de baixo grau (I e II) e alto grau (III e IV) - Classificação clássica de Edmondson-Steiner binarizada.

De acordo com os resultados acima descritos, foi realizada a análise multivariada, observando-se os seguintes resultados: a graduação de Edmondson-Steiner é a única variável que resiste ao modelo de regressão multivariada ($p=0,0229$, $R=0,1753$), ao passo que a binarização da classificação de Edmondson-Steiner ($p=0,0316$) e n AgNOR_MEAN ($p=0,0635$) não conseguem esse feito.

Tabela 6: Análise univariada de regressão de Cox

Parâmetro	p
Idade	0,7497
AreaNuclear_MEAN	0,6468
AreaNuclear_CV	0,4354
area AgNOR_MEAN	0,3691
area AgNOR_CV	0,9655
%area AgNOR_MEAN	0,8213
%area AgNOR_CV	0,7234
n AgNOR_MEAN	0,0635
n AgNOR_CV	0,9794
AgNORsize_MEAN	0,9034
Classificação de Edmondson-Steiner	0,0229
Classificação de Edmondson-Steiner modificada	0,2409
Padrão histológico (OMS)	0,9870
Padrão histológico secundário (OMS)	0,7749
Classificação de Edmondson-Steiner, binarizada	0,0316

4.10. ANÁLISE DISCRIMINANTE LINEAR

Na análise discriminante linear os parâmetros AgNOR (area AgNOR_MEAN, area AgNOR_CV, n AgNOR_MEAN, n AgNOR_CV, %area AgNOR_MEAN), conseguiram separar, em 83,7% dos casos, células hepatocitárias normais (casos controle) de células de tumores de baixo e alto grau da classificação clássica de Edmondson-Steiner (1954) (distância Mahalanobis de 1.8 a 3.6 entre os centróides; todos $p < 0.004$) (Tabela 7).

Tabela 7: Análise discriminante linear baseada apenas em parâmetros AgNOR

	Contagem real	Normal previsível	Baixo grau previsível	Alto grau previsível
Normal	9	9	0	0
Baixo grau	24	1	19	4
Alto grau	10	1	1	8

83,7% dos casos foram corretamente classificados (em negrito)

4.11. ANÁLISE FATORIAL

Para melhor avaliação das variáveis correlacionadas, foi realizada a análise fatorial com marcadores de proliferação celular. Foram analisadas: area AgNOR_MEAN, AgNORsize_MEAN, %area AgNOR_MEAN, RI, PCNA-i, n AgNOR_MEAN e a AreaNuclear_MEAN.

As variáveis respondem por 71,92% da variância do modelo, considerado como satisfatório, já que ultrapassa o mínimo de 60% (NORMAN & STREINER, 1997).

A area AgNOR_MEAN, AgNORsize_MEAN, %area AgNOR_MEAN, RI e o PCNA-i formaram um fator, denominado como fator 1, que responde a 43,6% da variância.

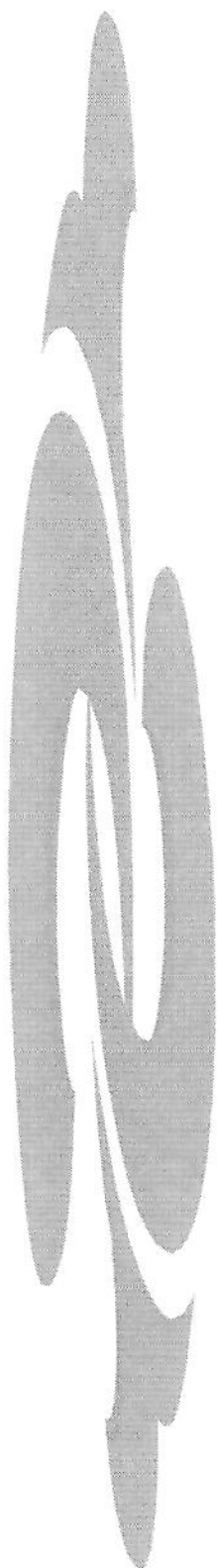
A n AgNOR_MEAN, RI e a AreaNuclear_MEAN compuseram o fator 2, que corresponde a 28,32% da variância.

Estes dados podem ser visualizados na Tabela 8.

Tabela 8: Análise fatorial: parâmetros AgNOR e PCNA-i.

	Fatores		Communality
	1	2	
area AgNOR_MEAN	0,9506	0,1428	0,92404
AgNORsize_MEAN	0,91985	-0,27405	0,92124
%area AgNOR_MEAN	0,74041	-0,47983	0,77846
RI	-0,64281	0,53469	0,6991
PCNA-i	-0,56738	-0,1214	0,33666
n AgNOR_MEAN	-0,10376	0,84422	0,72347
AreaNuclear_MEAN	0,09114	0,80231	0,652
Percentagem de variação	43,6031	28,3255	71,9286

Os fatores são compostos por variáveis, com valor maior que 0,5 (em negrito)



5. DISCUSSÃO

O CHC é neoplasia maligna extremamente agressiva e de difícil tratamento, com baixa sobrevida em cinco anos, se não tratado (NAGASUE *et al.*, CHLEBOWSKI *et al.*, 1984; OKUDA *et al.*, 1985; EBARA *et al.*, 1986), ao passo que o tratamento cirúrgico e poliquimioterapêutico podem aumentar de menos que 15% para 25 a 60% a sobrevida em cinco anos (ARII *et al.*, 1992; IKEDA *et al.*, 1993). A detecção de fatores prognósticos pode então facilitar a seleção adequada de pacientes ideais para determinado tipo de tratamento, aumentando suas chances de sobrevida.

5.1. FATORES CLÍNICOS

Nosso trabalho teve como objetivo verificar os fatores anatomoclínicos que poderiam influenciar na sobrevida do paciente. O trabalho, apesar de ser retrospectivo, tentou lançar uma sistematização de análise da biópsia do CHC, que poderia ser empregada em rotina laboratorial hospitalar. Era necessária a simulação de uma rotina em que os patologistas, a partir da biópsia de agulha ou da peça ressecada, pudessem antever o prognóstico do pacientes. Para este trabalho então não era interessante subdividir casos em biópsias de agulha ou de ressecção, visto que esta não é a situação real da rotina laboratorial.

Com relação aos dados clínicos, nosso estudo não evidenciou diferenças importantes com a literatura. Semelhante ao que observaram outros pesquisadores (KISHI, *et al.*, 1983; KASHALA *et al.*, 1990; HARATAKE *et al.*, 1993; SUEHIRO *et al.*, 1995; TRERÈ *et al.*, 1996; ADACHI *et al.*, 1996), a maioria de nossos pacientes era do sexo masculino, numa proporção de 4:1. Como explanado anteriormente, fatores hormonais parecem determinar essa maior incidência no sexo masculino (TARAO, 1989a, 1989b, 1993; NAGASUE, 1989, 1992).

O tumor, na maioria dos nossos pacientes, foi identificado na faixa etária maior que 50 anos. Boa parte da literatura apresenta resultados similares (KISHI *et al.*, 1983; WOOD *et al.*, 1988; ARII *et al.*, 1991; HARATAKE *et al.*, 1993; ADACHI *et al.*, 1996). Nossos dados diferem de KASHALA *et al.* (1990), por óbvias diferenças sócio-culturais e epidemiológicas, decorrentes do fato de sua amostragem incluir somente pacientes africanos, de regiões endêmicas para vírus B e CHC.

Em relação ao tamanho tumoral, apesar de terem sido analisados somente 21 tumores em que esse dado pode ser obtido, mais da metade deles apresentava CHC com mais de 5 cm em seu maior eixo, o que é discordante em relação ao trabalho de TRERÉ *et al.* (1996b). A mediana dos 24 tumores examinados por estes autores foi de 3 cm, e a média de 4.37 ± 2.91 cm. Um dos motivos para essa diferença é o fato que quinze dos tumores eram grau I e II e nove eram grau III e IV; 54,1% deles eram unifocais, e sabe-se que tumores menos desdiferenciados são, em geral, menores (SHIRABE *et al.*, 1995). Outro fator possível seria que no serviço em que foi realizado aquele trabalho, o método de detecção precoce do HCC seja bastante eficaz.

5.2. CLASSIFICAÇÃO DE EDMONDSON-STEINER CLÁSSICA E MODIFICADA

De acordo com a classificação clássica de Edmondson-Steiner, nossos resultados são similares aos encontrados por vários autores (vide Tabela 9).

Tabela 9: Resultados encontrados na literatura e em nosso trabalho em relação à classificação de Edmondson-Steiner (1954)

		Grau I	Grau II	Grau III	Grau IV
KISHI <i>et al.</i> , 1983	57	2 (3,5%)	28 (49,1%)	23 (40,4%)	1(7%)
NONOMURA <i>et al.</i> , 1990	63	8 (12,7%)	35 (55,6%)	18 (28,5%)	2(3,2%)
ARII <i>et al.</i> , 1991	86	5 (5,8%)	59 (68,6%)	20 (23,3%)	2(2,3%)
TERADA <i>et al.</i> , 1991	14	0	7 (50%)	7 (50%)	0
ADACHI, HASHIMOTO, TSUNEYOSHI, 1993	92	15 (16,3%)	37 (40%)	34 (37%)	6(6,7%)
ZALATNAI, LAPIS, FEHER, 1993	17	6 (35,3%)	9 (53%)	2 (11,7%)	0
NAGAO <i>et al.</i> , 1995	21	5 (23,8%)	9 (42,9%)	6 (28,6%)	1(4,7%)
ADACHI <i>et al.</i> , 1996	232	28 (12,1%)	117 (50,4%)	85 (36,6%)	2(0,9%)
CHAPEL <i>et al.</i> , 1996	124	13 (10,5%)	63 (47%)	42 (31,3%)	6(11,2%)
TRÈRE <i>et al.</i> , 1996	24	6 (25%)	9 (37,5%)	4 (16,7%)	5(20,8%)
TANNAPFEL <i>et al.</i> , 1999	193	72 (37,3%)	55 (28,4%)	52 (26,9%)	14 (7,4%)
NOSSOS DADOS	34	4 (11,8%)	20 (58,8%)	7 (20,6%)	3(8,8%)

n = número de casos; graus I, II, III e IV = referem-se à graduação de Edmondson-Steiner.

Em quase todos os estudos publicados, o grau II e o grau IV apresentam o maior e o menor número de casos, respectivamente, como também é baixo o número de casos de tumores grau I. A exceção se faz com um trabalho de TANNAPFEL *et al.* (1999), em que foram encontrados um maior número de casos de grau I.

Em relação à classificação modificada de Edmondson-Steiner por NZEAKO *et al.* (1995) demonstram que 441 pacientes (41,44%) apresentavam tumor classificado como grau I ou II e 623 como grau III ou IV (58,56%), num total de 1064 pacientes. Nossos dados são semelhantes aos observados por estes autores, com 13 pacientes exibindo grau I ou II e 21, grau III ou IV.

As classificações de Edmondson-Steiner clássica e a modificada mantêm correlação estatisticamente significativa, talvez pelo fato de apresentarem conceitos semelhantes nos graus I e II. No grau III nota-se, em ambas as classificações, o aumento do pleomorfismo nuclear hepatocelular, enquanto que no grau IV, na modificada, o pleomorfismo é intenso, ao passo que na classificação clássica valoriza-se a presença de células isoladas e infiltrativas. Essas diferenças sutis de descrição do grau IV podem explicar o porquê das diferenças encontradas em termos de prognóstico entre as classificações (isso será abordado adiante).

5.3. PADRÃO HISTOLÓGICO

Nosso estudo caracterizou o tipo trabecular como padrão histológico predominante (“primário”), o que também foi observado por NZEAKO *et al.* (1995), relatando 656 casos de padrão trabecular, 49 pseudo-glandulares e 359 de outros padrões primários. No nosso material, o padrão histológico “secundário” foi também predominantemente do tipo trabecular. Porém, devido ao fato da nossa amostragem estar constituída predominantemente por material proveniente de biópsias por agulha (52,9%), torna-se difícil a observação de outros tipos histológicos, que não este.

Estudo de 50 casos de CHC através de citologia aspirativa (“cell block”), realizado por KUNG, CHAN, FUNG (1991), demonstrou também predomínio do padrão histológico trabecular (64%). O padrão sólido (compacto) foi observado em 34% e o pseudo-glandular em 2%.

De maneira geral, pudemos constatar que poucos artigos da literatura fazem menção ao padrão histológico do CHC, provavelmente pela sua baixa correlação com a sobrevida dos pacientes.

5.4. PARÂMETROS AgNORs

5.4.1. n AgNOR_MEAN

Na Tabela 10 podemos comparar os nossos resultados aos de outros autores.

Tabela 10: Comparação dos resultados obtidos em relação ao n AgNOR_MEAN em nosso trabalho e na literatura.

AUTORES	n	μm	Tempo	nnúcleos	Análise	nAgNOR_MEAN
CROCKER & McGOVERN, 1988	10	3	30-35'	200	Ópt	$7,88 \pm 2,9$
ANSELMi <i>et al.</i> , 1990	22	3	30'	50	Ópt	$6,28 \pm 1,49$
NONOMURA <i>et al.</i> , 1990	63	3	30-60'	200	Ópt	$2,27 \pm 0,9$
TERASAKI <i>et al.</i> , 1990	75	3	30-35'	100	Ópt	$6,18 \pm 1,4$
TRERÈ <i>et al.</i> , 1991	1	3	10'	200	IMG	$3,82 \pm 1,45$
SHIRO <i>et al.</i> , 1993	64	3	60'	200	Ópt	$2,99 \pm 1,08$
ZALATNAI <i>et al.</i> , 1993	19	4	40'	200-300	Ópt	$3,32 \pm 1,43$
NAGAO <i>et al.</i> , 1995	21		30'	500	Ópt	$3,27 \pm 1,11$
SHIMIZU <i>et al.</i> , 1995	89	3	30-35'	200	Ópt	$3,26 \pm 1,23$
TANNAPFEL <i>et al.</i> , 1999	193	?	17'	200-400	Ópt	$4,8 \pm 4,3$
NOSSOS DADOS	34	3	30'	200	IMG	$1,68 \pm 0,36$

n = número de casos estudados; μm = espessura dos cortes histológicos; Tempo = tempo de incubação pelo método de PLOTON *et al.*, 1986; n núcleos = número de núcleos analisados; Análise = método de observação por microscopia óptica (Ópt) ou por análise de imagem assistida por computador (IMG); n AgNOR_MEAN = número médio de AgNORs por núcleo.

Todos os autores mencionados demonstraram valores de $n \text{ AgNOR_MEAN}$ superiores aos nossos. No entanto, a maioria destes artigos teve sua metodologia baseada em análise através de microscópio óptico comum (grande aumento, com calibração micrométrica do aparelho). Assim, AgNORs não visualizadas em determinado nível de profundidade poderiam ser visualizadas em outro. Em nosso trabalho utilizamos a leitura da lâmina sob imagem congelada pelo computador, não sendo possível a visualização de campos acima ou abaixo do que estávamos vendo. Então, conseqüentemente, o número de AgNORs contadas por núcleo era menor que aquele obtido em outros trabalhos. Em relação a este efeito, RÜSCHOFF *et al.* (1990) demonstraram a importância das condições em que a coloração das AgNORs é realizada, como também da forma em que elas são mensuradas, alterando os resultados obtidos. Sabe-se que o número das AgNORs por núcleo pode aumentar em decorrência de tempo de incubação do nitrato de prata, da temperatura ser maior que 25°C e variações da espessura dos cortes histológicos (GIRI *et al.*, 1989). A diminuição aparente do número de AgNORs pode ocorrer quando há impureza dos reagentes, inadequadas condições de luminosidade, sobreposição das AgNORs (GIRI *et al.*, 1989b) e diferenças na resolução óptica do aparelho (RÜSCHOFF, PLATE, BITTINGER, 1989). Tanto a espessura à qual os cortes eram submetidos, como o tempo de incubação pela prata, também o número de núcleos contados, variaram entre um trabalho e outro. Utilizamos cortes histológicos de 3µm no mesmo micrótomo e com o mesmo técnico para minimizar as variações. Nosso trabalho demonstra que o número mínimo, porém adequado, de núcleos contados para a avaliação de parâmetros AgNOR é de 200. Deste modo, trabalhos em que a contagem é inferior a 200 podem ser questionados com relação à sua confiabilidade.

Em relação à classificação de Edmondson-Steiner, que nosso estudo demonstrou correlação estatisticamente significativa com o $n \text{ AgNOR_MEAN}$, ZALATNAI *et al.* (1993) apresentaram resultados divergentes. Estes autores, contudo, relatam uma pequena amostra e concluem que, provavelmente, o $n \text{ AgNOR_MEAN}$ aumente de acordo com a indiferenciação celular. Portanto, o $n \text{ AgNOR_MEAN}$ poderá ser utilizado como critério de agressividade tumoral, associando-se a pior sobrevida do paciente. Os outros autores mencionados na Tabela 10 também demonstraram correlação

estatisticamente significativa entre a graduação de Edmondson-Steiner e o n AgNOR_MEAN.

As associações estatisticamente significativas encontradas entre o n AgNOR_MEAN e a AreaNuclear_MEAN e entre o n AgNOR_MEAN e a graduação de Edmondson-Steiner modificada podem ser redundantes. A primeira associação pode ser interpretada como decorrente da desdiferenciação celular, pois entre os graus I a III de Edmondson-Steiner há um aumento da área dos núcleos hepatocelulares. Por analogia, a associação entre o n AgNOR_MEAN e a graduação de Edmondson-Steiner modificada pode ser explicada pela associação entre esta e a graduação de Edmondson-Steiner clássica.

5.4.2. area AgNOR_MEAN

Tabela 11: Comparação dos resultados obtidos em relação a area AgNOR_MEAN em nosso trabalho e na literatura.

AUTORES		μm	Tempo	nnúcleos	area AgNOR_MEAN	E-S
TRERÉ <i>et al.</i> , 1991	1	3	10'	200	$3,82 \pm 1,45$	-
DERENZINI <i>et al.</i> , 1993	11	?	14'	100	$4,48 \pm 1,049$	-
BOLONDI <i>et al.</i> , 1996	5	?	14'	100	$5,93 \pm 2,89$	-
TRERÉ <i>et al.</i> , 1996b	24	?	10'	100	$6,48 \pm 2,84$	N
NOSSOS DADOS	34	3	30'	200	$5,43 \pm 2,03$	N

n = número de casos estudados; μm = espessura dos cortes histológicos; Tempo = tempo de incubação pelo método de PLOTON *et al.*, 1986; n núcleos = número de núcleos analisados; area AgNOR_MEAN = média de área AgNOR por núcleo; E-S = graduação de Edmondson-Steiner (1954).

São poucos os estudos já realizados sobre a area AgNOR_MEAN, e nossos resultados são similares aos encontrados na literatura (vide Tabela 11). TRERÈ *et al.* (1996b) avaliaram a area AgNOR_MEAN juntamente com a classificação de Edmondson-Steiner, não encontrando associação estatisticamente significativa entre estas. Estes autores referem que seus resultados são semelhantes àqueles encontrados por TARAO *et al.* (1991) e KITAMOTO *et al.* (1993), que estudaram, respectivamente, o PCNA e a incorporação de bromodeoxiuridina, demonstrando que, apesar da area AgNOR_MEAN se correlacionar com o ritmo proliferativo celular, não se correlaciona com a diferenciação tumoral. O fato de a area AgNOR_MEAN não se correlacionar a nenhuma graduação histológica em nosso estudo reforça esta idéia. LORAND-METZE *et al.* (1998) obtiveram resultados semelhantes aos nossos, analisando parâmetros AgNOR em leucemias.

5.4.3. Outros parâmetros AgNOR

Observamos correlação positiva estatisticamente significativa entre AgNORsize e a graduação de Edmondson-Steiner, o que também foi observado por SHIRO *et al.* (1993), demonstrando que quanto maior o n AgNOR_MEAN, menor é a area AgNOR_MEAN. As AgNORs de menor tamanho são, por estes autores, denominadas de T2-NOR.

A correlação observada entre %TAAg $\geq$ 7 e a classificação de Edmondson-Steiner pode ser entendida, à medida em que sabemos que quanto mais indiferenciado for o tumor, maiores são as chances de encontrarmos células pleomórficas que apresentam maior percentagem de células com area AgNOR maior que 7 μ m².

Observamos correlação estatisticamente significativa entre a graduação histológica de Edmondson-Steiner modificada e a AreaNuclear_MEAN. As demais correlações observadas entre a AreaNuclear_MEAN e outras variáveis (n AgNOR_MEAN, n AgNOR_CV, area AgNOR_CV, %area AgNOR_CV e %TAAg $\geq$ 7_MEAN) seriam decorrentes, portanto, do próprio aumento da variação morfológica nuclear (pleomorfismo), à medida em que o tumor torna-se mais indiferenciado. O mesmo pode-se dizer da correlação observada entre %area AgNOR_MEAN e a %TAAg $\geq$ 7_MEAN.

O RI apresentou correlação estatisticamente significativa com ambas as graduações histológicas. Visto que o RI é definido como o n AgNOR_MEAN dividido pelo AgNORsize_MEAN, e como o n AgNOR_MEAN está correlacionado com estas, tal correlação nos parece redundante.

A correlação observada entre o RI e a %area AgNOR_MEAN foi inversa ($r = -0,4456$), devido ao fato do RI ser inversamente proporcional ao tamanho de cada AgNOR por núcleo, correlacionando-se, portanto, de maneira inversa com o percentagem do total de Area AgNOR.

5.4.4. PCNA-i

Observamos uma correlação inversa e estatisticamente significativa entre o PCNA-i e o AgNORsize_MEAN e correlação entre o PCNA-i e o RI. Sabe-se que quanto menor o tamanho das AgNORs, maior o n AgNOR_MEAN e, portanto, mais indiferenciado é o tumor (SHIRO *et al.*, 1993). O PCNA-i se relacionaria indireta e parcialmente com a diferenciação celular, o que está em acordo com resultados obtidos por NG *et al.* (1994) e NG *et al.* (1995 a), estudando neoplasias em outros órgãos. No entanto, não se observa associação entre o PCNA-i e as graduações histológicas para o CHC (Edmondson-Steiner clássica e a modificada), o que também foi constatado por NG *et al.* (1993), TANIAI *et al.* (1993) e TANNAPFEL *et al.* (1999). Aliás, nossos resultados foram muitos semelhantes aos observados por TANNAPFEL *et al.* (1999) (Tabela 12), tanto em relação aos valores de PCNA-i, como em relação ao número de núcleos analisados, e à não observação de correlação com a sobrevida.

Tabela 12: Comparação entre o PCNA-i em nossa pesquisa e outros autores

AUTORES		n núcleos_min	PCNA-i	S	ES
TERADA & NAKAMURA, 1992	14	500	42,4 ± 7,7%	-	s
ADACHI et al, 1993	409	?	32%	s	s
KITAMOTO et al, 1993	46	500	18,7%	s	s
SUEHIRO <i>et al.</i> , 1995	141	1000	37,7 ± 28,9%	s	s
IKEGUCHI et al, 1998	76	1000	23,5 ± 19,1%	-	-
TANNAPFEL et al, 1999	193	200	25%	n	n
NOSSOS DADOS	34	196	22,79 ± 23%	n	n

n = número de casos analisados; n núcleos_min = número mínimo de núcleos contados; PCNA-i = número de núcleos corados para PCNA dividido pelo número total de núcleos; S= Sobrevida; ES = graduação de Edmondson-Steiner; (s = estatisticamente significativo; n = não significativo; - = não avaliado).

Podemos então concluir que o PCNA se relaciona fracamente aos parâmetros AgNOR e não se correlaciona às graduações histológicas, o que explicaria em parte o fato de não apresentar importância no prognóstico dos pacientes, quando comparado a outros fatores.

5.4.5. Análise fatorial

Utilizamos a análise fatorial com o intuito de avaliarmos como os marcadores de proliferação celular se correlacionam entre si. A análise fatorial foi utilizada, nesta situação, para a redução do número de variáveis encontradas (NORMAN & STREINER, 1997).

Ao analisarmos os dois fatores decorrentes desta análise, pudemos concluir que o Fator 1 se refere à área de AgNOR, individual ou coletivamente analisada, já que corresponde à combinação da area AgNOR_MEAN, AgNORsize_MEAN, %area

AgNOR_MEAN, RI e o PCNA-i. O Fator 2, por sua vez, se refere ao número de AgNORs, pois corresponde a n AgNOR_MEAN, RI e a AreaNuclear_MEAN. Como o Fator 1 corresponde a 43,6% da percentagem de variação e inclui a área AgNOR, esta deve ser vista como o mais importante fator de proliferação celular, numa variância de 71,92%. Resultados semelhantes foram demonstrados por LORAND-METZE *et al.* (1998), estudando leucemias agudas e TRERÈ *et al.* (1996b).

O fato de os parâmetros AgNOR associados à área AgNOR total estarem relacionados à proliferação celular tumoral, nos permite avaliar o tempo de duplicação do volume tumoral, como demonstrado por TRERÈ *et al.* (1996b). Isso é importante, principalmente naqueles casos em que o CHC ainda não atingiu o tamanho limite para a realização de transplante hepático, como também para se avaliar a possibilidade de invasão da veia porta, nos casos de CHC localizados próximos a esta.

Portanto, a avaliação dos parâmetros relacionados à area AgNOR e do PCNA-i deve ser realizada, no sentido de auxiliar na conduta terapêutica mais apropriada a cada caso.

5.5. ANÁLISE MULTIVARIADA

Segundo a análise multivariada de regressão de Cox, observamos que a classificação de Edmondson-Steiner é o único fator independente que se correlaciona com a sobrevida dos pacientes, o que está de acordo com várias publicações (KISHI *et al.*, 1983; KASHALA *et al.*, 1990; IKEDA *et al.*, 1993; TORII *et al.*, 1993; HARATAKE *et al.*, 1993; MELCHIORRI *et al.*, 1994; NZEAKO *et al.*, 1995; CHAPEL *et al.*, 1996; ADACHI *et al.*, 1996).

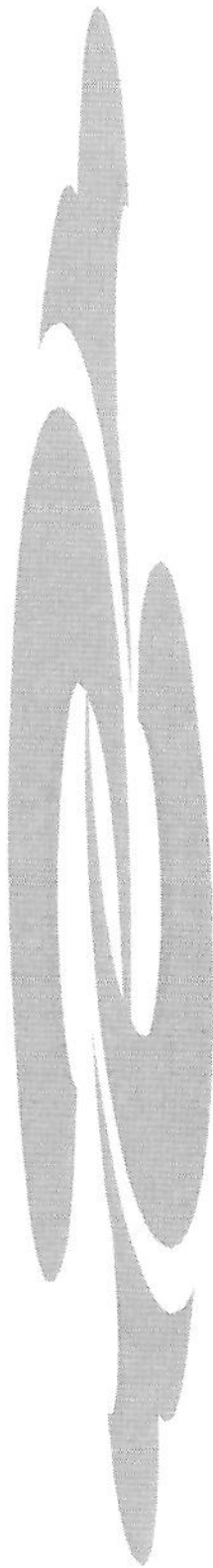
Observamos que a classificação de Edmondson-Steiner leva em consideração o pleomorfismo celular crescente e o desarranjo arquitetural em sua graduação. Esta maneira de classificar o tumor pode incorporar informações preciosas sobre o comportamento biológico da lesão. Por outro lado, nenhum dos marcadores de proliferação celular pode antever a agressividade tumoral, o que sugere que há fatores ainda a serem explorados que

possam se correlacionar tanto com a graduação de Edmondson-Steiner como com a sobrevida dos pacientes. Um fato importante que deve ser mencionado é que muitos de nossos casos se constituíram de biópsia de agulha, com representação reduzida do tumor, diferentemente de trabalhos que demonstram a importância dos parâmetros AgNOR no prognóstico de portadores de CHC. Certamente a representação do tumor em peças de ressecção oferece melhores condições para a avaliação dos parâmetros AgNOR.

Na avaliação de nossos casos, os critérios propostos no artigo original de EDMONDSON & STEINER (1954) foram aplicados com rigor. Pudemos notar que esta classificação é complexa e apresenta certo grau de subjetividade e que mínimas eventuais variações podem implicar em incorreta classificação. Ou ainda, sutis variações, como as propostas por NZEAKO *et al.* (1995), acabam criando uma graduação diversa, que por sua vez não apresenta correlação com a sobrevida. Ou seja, deixa de ter importância prognóstica. O mesmo pode se dizer da binarização da classificação de Edmondson-Steiner (isto é, classificando o tumor como baixo grau, I ou II, ou como alto grau, III ou IV). Esta binarização apresenta correlação com a sobrevida dos pacientes em análise univariada, no entanto, torna-se menos eficaz como fator prognóstico, quando em análise multivariada. Portanto, esta binarização talvez apresentasse melhor desempenho como fator prognóstico, se nossa casuística fosse maior.

Através da análise discriminante linear observamos que os parâmetros AgNOR (area AgNOR_MEAN, area AgNOR_CV, n AgNOR_MEAN, n AgNOR_CV, %area AgNOR_MEAN) podem auxiliar na determinação se o tumor é de baixo grau ou alto grau, pela classificação clássica de Edmondson-Steiner. Isso implica determinarmos, com menos subjetividade e maior acurácia, a graduação histológica mais apropriada para o tumor e, conseqüentemente, avaliarmos a sobrevida do paciente. Observamos ainda que a contagem das AgNORs no tumor pode ser útil para avaliar a sobrevida dos pacientes, em análise univariada, porém é menos eficiente que a classificação clássica de Edmondson-Steiner, em análise multivariada. Novamente, se ampliássemos o número de casos, talvez pudéssemos concluir sobre um melhor desempenho deste parâmetro AgNOR em relação à avaliação da sobrevida dos pacientes.

Frente aos nossos resultados, somos de opinião que a utilização da binarização da classificação de Edmondson-Steiner deva ser utilizada, pela diminuição da subjetividade e conseqüente melhor reprodutibilidade. Esta, associada à análise dos parâmetros AgNOR, que é factível de ser realizada rotineiramente, poderá classificar os casos de CHC de uma nova maneira, muito mais correlacionada com a sobrevida dos pacientes.



6. CONCLUSÕES

6.1. O número de AgNORs, em células do CHC, se correlaciona com as graduações histológicas de Edmondson-Steiner clássica e modificada, associando-se à sobrevida dos pacientes (em análise univariada) e representando o mais expressivo parâmetro AgNOR relacionado ao prognóstico da doença.

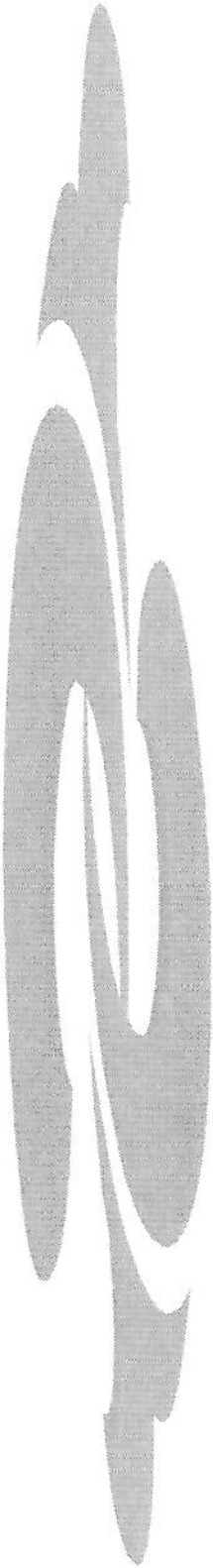
6.2. A área total de AgNORs, bem como os parâmetros AgNOR relacionados a esta, correlacionam-se com a atividade proliferativa do CHC.

6.3. Os parâmetros AgNOR podem, portanto, auxiliar indiretamente na determinação do prognóstico dos pacientes portadores de CHC.

6.4. Somente a classificação de Edmondson-Steiner (1954) se correlacionou com a sobrevida dos pacientes portadores de CHC (em análise multivariada), representando, portanto, seu fator prognóstico mais relevante.

6.5. O PCNA se correlaciona fracamente com os parâmetros AgNOR e não demonstra importância na avaliação prognóstica nos pacientes portadores de CHC.

6.6. Os parâmetros AgNORs, quando avaliados coletivamente, podem auxiliar na distinção entre tecido hepático não tumoral e CHC.



7. SUMMARY

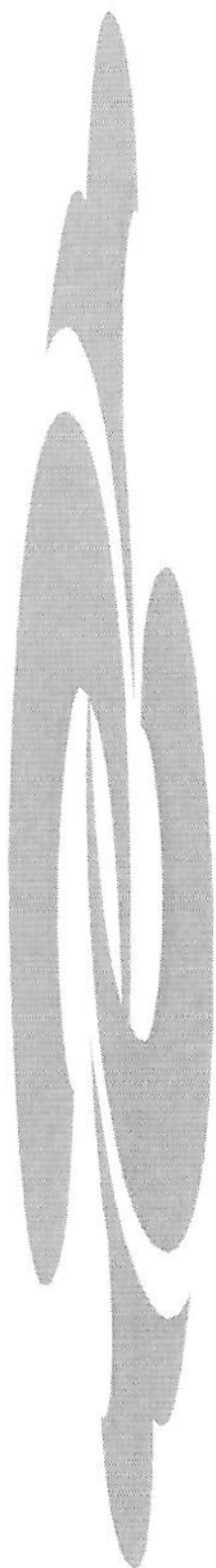
The aim of this study was to evaluate the prognostic and diagnostic value of AgNOR and PCNA staining in biopsies of 34 liver cell carcinomas using an image analyzing system.

The AgNOR number per nucleus and the relative AgNOR area, but not the PCNA index, showed a significant correlation with the histological tumor grade according to the classical and the modified Edmondson-Steiner's classification.

Regarding univariate survival, only the grade of the classical Edmondson-Steiner's classification was of prognostic significance. The parameters sex, age, maximum tumor diameter, mean AgNOR number, total nuclear area and relative AgNOR area, nuclear area, PCNA index or the grade of the modified Edmondson-Steiner's classification did not reach statistical significance regarding survival.

By a factor analysis, two factors could be created, which could explain together 72% of the variance of all nine parameters included in the study.

In a linear discriminate analysis, the AgNOR variables could separate between normal liver cells and cells from high grade or low grade carcinomas in 83,7% of the cases. Therefore, we think that the AgNOR technique can be usefully applied in biopsies of liver carcinomas for the differential diagnosis and tumor grading.



8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABELEV, G. I. Production of embrional serum alpha-globulin by hepatomas: review of experimental and clinical data. **Cancer Res.**, v. 28, n. 7, p. 1344-1350, Jul. 1968.
- ADACHI, E.; HASHIMOTO, H.; TSUNEYOSHI, T. Proliferating cell nuclear antigen in hepatocellular carcinoma and small cell liver dysplasia. **Cancer**, v. 72, n. 10, p. 2902-2909, Nov. 1993.
- ADACHI, E.; MAEDA, T.; KAJIYAMA, K.; KINUKAWA, N.; MATSUMATA, T.; SUGIMACHI, K.; TSUNEYOSHI, M. Factors correlated with portal venous invasion by hepatocellular carcinoma: univariate and multivariate analyses of 232 resected cases without preoperative treatments. **Cancer**, v. 77, n. 10, p. 2022-2031, Mai. 1996.
- ADACHI, Y.; KIDO, A.; MORI, M.; MATSUSHIMA, T.; SHIMONO, R.; INOUE, T.; SUGIMACHI, K. Nuclear DNA content and nucleolar organizer regions in colorectal cancer. **J. Surg. Oncol.**, v. 59, n. 3, p. 177-180, Jul. 1995.
- AHOMADEGBE, J. C.; BARROIS, M.; FOGEL, S., LE BIHAN, M. L.; DOUC-RASY, S.; DUVILLARD, P.; ARMAND, J. P.; RIOU, G. High incidence of p53 alteration (mutation, deletion, overexpression) in head and neck primary tumors and metastasis: absence of correlation with clinical outcome. Frequent protein overexpression in normal epithelium and in early non-invasive lesions. **Oncogene**, v.10, n. 6, p.1217-1227, Mar. 1995.
- ALVES, V. A. F.; CARRILHO, F. J.; GAYOTTO, L. C. C.; WAKAMATSU, A.; GROSSO, S. N. A.; LAUDANNA, A. A.; SILVA, L. C. Immunohistochemistry of p53 in hepatocellular carcinoma in São Paulo, Brazil. **Hepatology**, v.19, p.391, 1994.
- AL-SHENEBER, I. F.; SHIBATA, H. R.; SAMPALIS, J.; JOTHY, S. Prognostic significance of proliferating cell nuclear antigen expression in colorectal cancer. **Cancer**, v.71, n.6, p.1954-1959, Mar. 1993.

- ANSELMi, L.; SEMENTA, A. R.; BORGIANI, L.; BANDERALI, A.; ROVIDA, S.
Nucleolar organizer regions (NORs) in normal and pathological liver: a quantitative analysis. **Pathologica**, v. 82, n. 1082, p. 653-662, Nov-Dec. 1990.
- ANTONANGELO, L.; BERNARDI, F.; DEL, C.; CAPELOZZI, V. L.; TAKAGAKI, T. Y.; YOUNES, R. N.; YAGI, N.; SALDIVA, P. H. Morphometric evaluation of argyrophilic nucleolar organizer region is useful in predicting long-term survival in squamous cell carcinoma of the lung. **Chest**, v. 111, n. 1, p. 110-114, Jan. 1997.
- AOYAGI, Y.; ISOKAWA, O.; SUDA, T.; WATANABE, M.; SUZUKI, Y.; ASAKURA, H. The fucosylation index of α -fetoprotein as a possible prognostic indicator for patients with hepatocellular carcinoma. **Cancer**, v. 83, n. 10, p. 2076-2082, Nov. 1998.
- ARII, S.; TANAKA, J.; YAMAZOLE, Y.; MINEMATSU, S.; MORINO, T.; FUJITA, K.; MAETANI, S.; TOBE, P. Predictive factors for intrahepatic recurrence of hepatocellular carcinoma after partial hepatectomy. **Cancer**, v. 69, n. 4, p. 913-919, Fev. 1992.
- ATTALI, P.; PROD'HOMME, S.; PELLETIER, G.; PAPOZ, L.; INK, O.; BUFFET, C.; ETIENNE, J. P. Prognostic factors in patients with hepatocellular carcinoma: attempts for the selection of patients with prolonged survival. **Cancer**, v. 59, n. 12, p. 2108-2111, Jun. 1987.
- AUBELE, M.; AUER, G.; GAIS, P.; JUTTING, U.; RODENACKER, K.; VOSS, A. Nucleolar organizer regions (AgNORs) in ductal mammary carcinoma: comparison with classifications and prognosis. **Path. Res. Pract.**, v.190, n. 2, p.129-137, Fev. 1994.
- BAKER, S. J.; PREISINGER, A. C.; JESSUP, J. M.; PARASKEVA, C.; MARKOWITZ, S.; WILLSON, J.K.; HAMILTON, S.; VOGELSTEIN, B. P53 gene mutations occur in combination with 17p allelic deletions as late events in colorectal tumorigenesis. **Cancer Res.**, v. 50, n. 23, p. 7717-7722, Dez. 1990.

- BALSELLS, J.; CARAGOL, I.; ALLENDE, E.; DIAZ, I.; CHARCO, R.; LAZARO, J-L.; MURIO, E.; MARGARIT, C. DNA ploidy study of resected hepatocellular carcinoma in cirrhotic liver. **J. Hepatology**, v. 25, n. 6, p. 854-858, Dez. 1996.
- BARBU, V.; BONNAND, A. M.; HILLAIRES, S.; COSTE, T.; CHAZOUILERES, O.; GUGENHEIM, J.; BOUCHER, E.; POUPON, R.; POUPON, R. Circulating albumin messenger RNA in hepatocellular carcinoma: results of a multicenter prospective study. **Hepatology**, v. 26, n. 5, p.1171-1175, Nov. 1997.
- BASERGA, R. Growth regulation of the PCNA gene. **J. Cell Sci.**, v. 98, pt.4, p.433-436, Abr. 1991.
- BELGHITI, J.; PANIS, Y.; FARGES, O.; BENHAMOU, J. P.; FEKETE, F. Intrahepatic recurrence after resection of hepatocellular carcinoma complicating cirrhosis. **Ann. Surg.**, v.214, n. 2, p.114-117, Ago. 1990.
- BELLOTTI, M.; ELSNER, B.; KAHN, A.; BEZODNICK, L.; PISILLI, L.; GRECO, P. Morphometric determination of AgNORs in breast carcinoma. Correlation with flow cytometry and proliferating cell nuclear antigen. **Anal. Quant. Cytol. Histol.**, v. 19, n. 2, p.139-144, Apr. 1997.
- BETHWAITE, P. B.; DELAHUNT, B.; HOLLOWAY, L. J.; THORNTON, A. Comparison of silver-staining nucleolar organizer region (AgNOR) counts and proliferating cell nuclear antigen (PCNA) expression in reactive mesothelial hyperplasia and malignant mesothelioma. **Pathology**, v. 27, n.1, p.1-4, Jan. 1995.
- BIGRAS, G.; MARCELPOIL, R.; BRAMBILLA, E.; BRUGAL, G. Interest of targeting AgNORs measurement in cycling cells: in vivo cell kinetic evaluation of non-small cell lung cancer. **Anal. Cell. Pathol.**, v.11, n.3, p.183-198, Ago. 1996.
- BLOM, J. H.; KATE, F. J .T.; SCHROEDER, F. H.; VAN DER HEUL, R. O. Morphometrically estimated variation in nuclear size. A useful tool in grading prostatic cancer. **Urol. Res.**, v.18, n. 2, p.93-99, 1990.

- BOLONDI, L.; GRAMANTIERI, L.; CHIECO, P.; MELCHIORRI, C.; TRERÈ, D.; STECCA, B.; DERENZINI, M.; BARBARA, L. Enzymatic cytochemistry, DNA ploidy and AgNOR quantitation in hepatocellular nodules of uncertain malignant potential in liver cirrhosis. **Dig. Dis. Sci.**, v. 41, n. 4, p. 800-808, Abr. 1996.
- BORRESEN, A. L.; ANDERSEN, T. I.; EYFJORD, J. E.; CORNELIS, R. S.; THORLACIUS, S.; BORG, A.; JOHANSSON, U.; THEILLET, C.; SCHERNECK, S.; HARTMAN, S.; CORNELISSE, C. J.; HOVIG, E.; DEVILEE, P. TP53 mutations and breast cancer prognosis: particularly poor survival rates for cases with mutations in the zinc-binding domains. **Genes Chromosom. Cancer**, v. 14, n. 1, p. 71-75, Set. 1995.
- BORZIO, M.; TRERÈ, D.; BORZIO, F.; FERRARI, A. R.; BRUNO, S.; RONCALLI, M.; COLLOREDO, G.; LEANDRO, G.; OLIVERI, F.; DERENZINI, M. Hepatocyte proliferation rate is a powerful parameter for predicting hepatocellular carcinoma development in liver cirrhosis. **Mol. Pathol.**, v. 51, n. 2, p. 96-101, Abr. 1998.
- BOURHIS, J.; BOSQ, J.; WILSON, G.D.; BRESSAC, B.; TALBOT, M.; LERIDANT, A.M.; DENDALE, R.; JANIN, N.; ARMAND, J. P.; LUBOINSKI, B.; MALAISE, E. P.; WIBAULT, P.; ESCHWEGE, F. Correlation between p53 gene expression and tumor-cell proliferation in oropharyngeal cancer. **Int. J. Cancer**, v. 57, n. 4, p. 458-462, Mai. 1994.
- BRAVO, R.; FRANK, R.; BLUNDELL, P.A.; MACDONALD-BRAVO, H. Cyclin/PCNA is the auxiliary protein of DNA polymerase- δ . **Nature**, v. 326, n.6112, p.515-517, Abr. 1987.
- BRAVO, R.; MACDONALD-BRAVO, H. Existence of two populations of cyclin/proliferating cell nuclear antigen during the cell cycle: association with DNA replication sites. **J. Cell. Biol.**, v.105, n. 4, p.1549-1554, Out. 1987.
- BRECHOT, C.; POURCEL, C.; LOUIS, A.; RANI, B.; TIOLLAIS, P. Presence of integrated hepatitis B virus DNA sequences in cellular DNA in human hepatocellular carcinoma. **Nature**, v. 286, n. 5772, p. 533-535, Jul. 1980.

- BRODERS, A. C. Squamous-cell epithelioma of the lip: a study of five hundred thirty-seven cases. **J.A.M.A.**, v. 74, p. 656-664, 1920.
- BRUNO, S.; DARZYNKIEWICZ, Z. Cell cycle dependent expression and stability of the nuclear protein detected by Ki-67 antibody in HL-60 cells. **Cell Prolif.**, v. 25, n.1, p.31-40, Jan. 1992.
- BUFO, P.; FRASSANITO, F. Hepatocellular carcinoma and preneoplastic lesions of the liver: evaluation of argyrophilic nucleolar organizer regions (AgNORs). **Boll. Soc. Ital. Biol. Sper.**, v. 68, n.11, p.707-714, Nov. 1992.
- CALVET, X.; BRUIX, J.; GINES, P.; BRU, C.; SOLE, M.; VILANA, R.; RODES, J. Prognostic factors of hepatocellular carcinoma in the West: a multivariate analysis in 206 patients. **Hepatology**, v.12, n.4 Pt 1, p.753-760, Out. 1990.
- CANÇADO, E. L. R. Hepatite auto-imune. In: SILVA, L.C., 2. ed. **Hepatites agudas e crônicas**. São Paulo: Sarvier, 1995. p.218-43.
- CANEPA, M.; GANMBINI, A. R.; SEMENTA, L.; BORGIANI, S.; ROVIDA, S. Nucleolar organizer regions and Ki-67 immunostaining in ductal breast cancer: a comparative study. **Pathologica**, v.82, n.1078, p.125-132, Mar-Abr. 1990.
- CARTER, C. D.; WEEKS, S. C.; JARVIS, L. R.; WHITEHEAD, R. Morphometric analysis of nuclear features, ploidy status, and staging in rectal carcinoma. **J. Pathol.**, v.159, n. 2, p.113-120, Out. 1989.
- CARRILHO, F. J. **Carcinoma hepatocelular e cirrose hepática**: estudo caso-controle de variáveis clínicas, bioquímicas, sorológicas e histológicas. 1993, 181p. Dissertação de Tese de Doutorado – Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1993.
- CATALDO, C.; SOUCHIER, C.; VASSECROT, M.; CALISTI, A.; VAGNER-CAPODANO, A-M.; STAHL, A. Three-dimensional analysis of fibrillar centers and associated chromatin in the nucleolus of human oocytes in primordial follicles. **Biol. Cell**, v.54, n.2, p.91-194, 1985.

- CATTORETTI, G.; BECKER, M. H.; KEY, G.; DUCHROW, M.; SCHLUTER, C.; GALLE, J.; GERDES, J. Monoclonal antibodies against recombinant parts of the Ki-67 antigen (MIB1 and MIB3) detect proliferating cells in microwave-processed formalin-fixed paraffin sections. **J. Pathol.**, v.168, n.4, p.357-363, Dez. 1992.
- CAULET-MAUGENDRE, S.; PATEY, M.; GRANIER, E.; JOUNDI, A.; GENTILE, A.; CAULET, T. Quantitative analysis of cellular proliferative activity in 35 T-cell non-Hodgkin's lymphomas. Use of proliferating cell nuclear antigen and Ki-67 (MIB-1) antibodies and nucleolar organizer regions. **Anal Quant. Cytol. Histol.**, v.18, n.5, p.337-344, Oct. 1996.
- CELIS, J. E.; MADSEN, P. Increased nuclear cyclin/PCNA antigen staining of non S-phase transformed human amnion cells engaged in nucleotide excision DNA repair. **FEBS. Lett.**, v.209, n.2, p.277-283, Dez. 1986.
- CHANG, C. D.; OTTAVIO, L.; TRAVALI, S.; LIPSON, K. E.; BASERGA, R. Transcriptional and posttranscriptional regulation of the proliferating cell nuclear antigen gene. **Mol. Cell Biol.**, v.10, n.7, p.3289-3296, Jul. 1990.
- CHAPEL, F.; GUETIER, C.; CHASTANG, C.; RACHED, A. A.; MATHIEU, D.; TEPPER, M.; BEAUGRAND, M.; TRINCHET, J. Needle biopsy of hepatocellular carcinoma. Assessment of prognostic contribution of histologic parameters including proliferating cell nuclear antigen labeling and correlations with clinical outcomes. **Cancer**, v.77, n. 5, p.864-871, Mar. 1996.
- CHEN, M. F.; HWANG, T. L.; TSAO, K. C.; SUN, C. F.; CHEN, T. J. Flow cytometric DNA analysis of hepatocellular carcinoma: preliminary report. **Surgery**, v.109, n.4, p.455-458, Abr. 1991.
- CHIU, J. H.; KAO, H. L.; WU, L. H.; CHANG, H. M.; LUI, W. Y. Prediction of resection or survival after resection in human hepatomas by DNA flow cytometry. **J. Clin. Invest.**, v.89, n.2, p.539-545, Fev. 1992.

- CHIUSA, L.; GALLIANO, D.; FORMICONI, A.; DI PRIMIO, O.; PICH, A. High and low risk prostate carcinoma determined by histologic grade and proliferative activity. **Cancer**, v.79, n. 10, p.1956-1963, Mai. 1997.
- CHLEBOWSKI, R. T.; TONG, M.; WEISSMAN, J.; BLOCK, J. B.; RAMMING, K. P.; WEINER, J. M.; BATEMAN, J. R.; CHLEBOWSKI, J. S. Hepatocellular carcinoma. Diagnostic and prognostic features in North American patients. **Cancer**, v.51, n.12, p.2701-2706, Jun. 1983.
- COLOMBO, M. Hepatocellular carcinoma in cirrhotics. **Semin. Liver Dis.**, v.13, n.4, p.374-383, Nov. 1993.
- COLOMBO, M.; DE FRANCHIS, R.; DEL NINNO, E.; SANGIOVANNI, A.; DE FAZIO, C.; TOMMANSINI, M.; DONATO, M. F.; PIVA, A.; DI CARLO, V.; DIOGUARDI, N. Hepatocellular carcinoma in Italian patients with cirrhosis. **N. Engl. J. Med.**, v.325, n.10, p.675-680, Set. 1991.
- COLOMBO, M.; SANGIOVANNI, A. Etiology In: LIVRAGHI, T.; MAKUUSHI, M.; BUSCARINI, L. Diagnosis and treatment of hepatocellular carcinoma. London: GMM, 1997, p.17-25.
- COTRIM, H.; MOTA, E.; LEITE, L.; SILVA, L.; LYRA, L. A case-control study on the association of hepatitis B virus infection and hepatocellular carcinoma in Northeast Brazil. **Rev. Saúde Públ.**, v.26, p.301-305, 1992.
- COX D.R. Regression models and life tables. **J.R.Stat. Soc. B**, v.34, p.187-220, 1972.
- CROCÉ, L. S.; BERCICH, L.; SASSO, F.; MASUTTI, F.; MOLINO, R.; TIRIBELLI, C. Strategies in the study of hepatocellular carcinoma worldwide. **J. Surg. Oncol.**, v.3 (Suppl), p.37-39, 1993.
- CROCKER, J. Nucleolar organizer regions. **Curr. Top. Pathol.**, v.82, p.91-149, 1990.
- CROCKER, J.; EGAN, M. J. Correlation between NOR sizes and number in non-Hodgkin's lymphomas. **J. Pathol.**, v.156, n.3, p.233-239, Nov. 1988a.

- CROCKER, J.; MACARTNEY, J. C.; SMITH, P. J. Correlation between DNA flow cytometry and nucleolar organizer region data in non-Hodgkin's lymphomas. **J. Pathol.**, v.154, n.2, p.151-156, Fev. 1988b.
- CROCKER, J.; MCGOVERN, J. Nucleolar organizer regions in normal, cirrhotic, and carcinomatous livers. **J. Clin. Pathol.**, v.41, n.10, p.1044-1048, Out. 1988c
- CROCKER, J.; NAR, P. Nucleolar organizer regions in lymphomas. **J. Pathol.**, v.151, n.2, p.111-118, Fev. 1987d.
- CROSS, E. M.; CHAFFIN, W. W. Use of the binomial theorem in interpreting results of multiple tests of significance. **Educ. Psychol. Meas.**, v.42, p.25-34, 1982.
- DELAHUNT, B.; BATHWAITE, P. B.; NACEY, J. N. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) expression as a prognostic indicator for renal cell carcinoma: comparison with tumour grade, mitotic index and silver staining nucleolar organizer region numbers. **J. Pathol.**, v.170, n. 4, p.471-477, Ago. 1993.
- DE MENEZES, Y; DE FARIA, F. P.; SESSO, A. In human hepatocellular carcinoma cells the total membrane surface area of each major organelle is a particular allometric function of the cytoplasmic volume. A morphometric study. **J. Submicrosc. Cytol. Pathol.**, v.28, n.4, p.573-582, Out. 1996.
- DERENZINI, M.; TRERÈ, D. Importance of interphase nucleolar organizer regions in tumor pathology. **Virchows Arch. B. Cell Pathol. Incl. Mol. Pathol.**, v.61, n. 1, p.1-8, 1991.
- DERENZINI, M.; TRERÈ, D.; OLIVERI, F.; DAVID, E.; COLOMBATTO, P.; BONINO, F.; BRUNETTO, M. R. Is high AgNOR quantity in hepatocytes associated with increased risk of hepatocellular carcinoma in chronic liver disease? **J. Clin. Pathol.**, v.46, n.8, p.727-729, Ago. 1993.
- DIAMOND, D. A.; BERRY, S. J.; JEWETT, H. J.; EGGLESTON, J. C.; COFFEY, D. S. A new method to assess metastatic potential of human prostate cancer: relative nuclear roundness. **J. Urol.**, v.128, n.4, p.729-734, Out. 1982.

- DI BISCEGLIE, A. M.; RUSTGI, V. K.; HOOFNAGLE, J. H.; DUSHEIKO, G. M.; LOTZE, M.T. Hepatocellular carcinoma. **Ann. Int. Med.**, v.108, n.3, p.390-401, Mar. 1988.
- EBARA, M.; OHTO, M.; SHINAGAWA, T.; SUGIURA, N.; KIMURA, K.; MATSUTANI, S.; MORITA, M.; SAISHO, H.; TSUCHIYA, Y.; OKUDA, K. Natural history of minute hepatocellular carcinoma smaller than three centimeters complicating cirrhosis: a study in 22 patients. **Gastroenterology**, v.90, n.2, p.289-298. Fev. 1986.
- EBELT, J.; NEID, M.; TANNAPFEL, A.; WITZIGMANN, H.; HAUSS, J.; KOCKERLING, F.; WITTEKIND, C. Prognostic significance of proliferation markers in hepatocellular carcinoma (HCC). **Zentralbl. Chir.**, v.125, n.7, p.597-601, 2000.
- EDMONDSON, H.A.; STEINER, P.E. Primary carcinoma of the liver: a study of 100 cases among 48900 necropsies. **Cancer**, v.7, n.3, p.462-503, Mai. 1954.
- EGAN, M. J.; RAAFAT, F.; CROCKER, J.; SMITH, K. Nucleolar organizer region in fibrous proliferations of childhood and infantile fibrosarcoma. **J.Clin.Pathol.**, v.41, n.1, p.31-33, Jan.1988.
- ERLER, B. S.; CHEIN, K.; MARCHEVSKY, A. M. An image analysis workstation for the pathology laboratory. **Mod. Pathol.**, v.6, n.5, p.12-18. Set. 1993.
- EZAKI, T.; KANEMATSU, T.; OKAMURA, T.; SONODA, T.; SUGIMACHI, K. DNA analysis of hepatocellular carcinoma and clinicopathologic implications. **Cancer**, v.61, n.1, p.106-109, Jan. 1988.
- FAKAN, S.; HERNANDEZ-VERDUN, D. The nucleolus and the nucleolar organizer. **Biol.Cell**, v.56, n.3, p.189-206, 1986.
- FALKSON, G.; CNAAN, A.; SCHUTT, A. J.; RYAN, L. M.; FALKSON, H. C. Prognostic factors for survival in hepatocellular carcinoma. **Cancer Res.**, v.48, n.24 pt 1, p.7314-7318, Dez.1988.

- FATTOVICH, G.; GIUSTINA, G.; SCHALM, S. W.; HADZIYANNIS, S.; SANCHEZ-TAPIAS, J.; ALMASIO, P.; CHRISTENSEN, E.; KROGSGAARD, K.; DEGOS, F.; MOURA, M. C.; SOLINAS, A.; NOVENTA, F.; REALDI, G (THE EUROHEP STUDY ON HEPATITIS B VIRUS AND CIRRHOSIS). Occurrence of hepatocellular carcinoma and decompensation in western european patients with cirrhosis type B. **Hepatology**, v.21, n. 1, p.77-82, Jan. 1995.
- FARINATI, F.; CARDIN, R.; D'ERRICO, A.; DE MARIA, N.; NACCARATO, R.; CECCHETTO, A.; GRIGIONI, W. Hepatocyte proliferative activity in chronic liver damage as assessed by the monoclonal antibody MIB1 Ki67 in archival material: the role of etiology, disease activity, iron, and lipid peroxidation. **Hepatology**, v.23, n.6, p.1468-1475, Jun. 1996a.
- FARINATI, F.; DE MARIA, N.; MARAFIN, C.; HERSZENYI, L.; DEL PRATO, S.; RINALDI, M.; PERINI, L.; CARDIN, R.; NACCARATO, R. Unresectable hepatocellular carcinoma in cirrhosis: survival, prognostic factors, and unexpected side effects after transcatheter arterial chemoembolization. **Dig. Dis. Sci.**, v.41, n.12, p.2332-2339, Dec. 1996b.
- FIELDING, L. P.; FENOGLIO-PREISER, C.; FREEDMAN, L. S. The future of prognostic factors in outcome prediction for patients with cancer. **Cancer**, v.70, n. 9, p.2367-2377, Nov. 1992.
- FÓRUM SOBRE CARCINOMA HEPATOCELULAR NO BRASIL.** Sociedade Brasileira De Hepatologia, Florianópolis, 1995.
- FRANCO, D.; CAPUSSOTTI, L.; SMADJA, C.; BOUZARI, H.; MEAKINS, J.; KEMENY, F.; GRANGE, D.; DELLEPIANE, M. Resection of hepatocellular carcinomas: results in 72 European patients with cirrhosis. **Gastroenterology**, v.98, n.3, p.733-738, Mar. 1990.
- FRESNO, M.; MOLINA, R.; PÉREZ DEL RIO, U. M.; ALVAREZ, S.; DIAZ-IGLESIAS, J. M.; GARCIA, I.; HERRERO, A. p53 expression is of independent predictive value in lymph-node negative breast carcinoma. **Eur. J. Cancer**, v.33, n.8, p.1268-1274, Jul. 1997.

- FUJIMOTO, J.; OKAMOTO, E.; YAMANAKA, N.; TOYOSAKA, A.; MITSUNOBU, M.
Flow cytometric DNA analysis of hepatocellular carcinoma. **Cancer**, v. 67, n. 4, p.939-44, Fev. 1991.
- FURUHATA, T.; TOKINO, T.; URANO, T.; NAKAMURA, Y. Isolation of a novel GPI-anchored gene specifically regulated by p53: correlation between its expression and anti-cancer drug sensitivity. **Oncogene**, v.13, n.9, p.1965-1970, Nov. 1996
- GARCIAL, R. L.; COLTRERA, M. D.; GOWN, A. M. Analysis of proliferative grade using anti-PCNA/ solidus cyclin monoclonal antibodies in fixed, embedded tissues. **Am. J. Pathol.**, v.134, n. 4, p.733-739, Abr. 1989.
- GERDES, J. Ki-67 and other proliferation markers useful for immunohistological diagnostic and prognostic evaluations in human malignancies. **Semin. Cancer Biol.**, v.1, n.3, p.199-206, Jun. 1990.
- GERDES, J.; LEMKE, H.; BAISCH, H.; WACKER, H. H.; SCWAB, U.; STEIN, H. Cell cycle analysis of proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. **J. Immunol.**, v.133, n.4, p.1710-1715, Out. 1984.
- GERLACH, C.; SAKKAB, D. Y.; SCHOLZEN, T.; DALER, R.; ALISON, M. R.; GERDES, J. Ki-67 expression during rat liver regeneration after partial hepatectomy. **Hepatology**, v.26, n.3, p.573-578, Set. 1997.
- GIRI, D. D.; DUNDAS, S. A. C.; SANDERSON, P. R.; HOWAT, A. J. Silver binding nucleoli and nucleolar organizer regions in fine needle aspiration cytology of the breast. **Acta. Cytol.**, v.33, n.2, p.173-175, Mar-Abr. 1989.
- GIRI, D. D.; NOTTINGHAM, J. F.; LAWRY, J.; DUNDAS, S. A. C.; UNDERWOOD, J. C. Silver binding nucleolar organizer regions (AgNORs) in benign and malignant breast lesions: correlation with ploidy and growth phase by DNA flow cytometry. **J. Pathol.**, v.157, n. 4, p.307-313, Abr. 1989.

- GONÇALVES, C. S.; PEREIRA, F. E. L.; ZAGO, M. P.; MUSSO, C. Hepatocellular carcinoma in Espírito Santo State, Brazil. Some epidemiological aspects of 95 cases. **Dig. Dis. Sci.**, v.31, p.100S, 1986.
- GOODLAD, J.; CROCKER, J. ; MACARTNEY, J. C. Nucleolar ultrastructure in low- and high-grade non-Hodgkin's lymphomas. **J.Pathol.**, v.163, n.3, p.233-237, Mar. 1991.
- GRATZENER, H. G. Monoclonal antibody to 5-bromo-and 5-iododeoxyuridine: a new reagent for detection of DNA replication. **Science**, v.218, n.4571, p.474-476, Out. 1982.
- GRIOGINI, W. F.; D'ERRICO, A.; BIAGINI, G.; MAZZITONI, A.; BOLONDI, L.; LIOTTA, L. A. The capsule surrounding primary liver tumors: wherefrom its prognostic significance. **Int. J. Cancer**, v.45, n.4, p.637-643, Abr. 1990.
- GIUFFRE, G.; FULCHERI, E.; GUALCO, M.; FEDELE, F.; TUCCARI, G. Standardized AgNOR analysis as a prognostic parameter in endometrial carcinoma, endometrioid type. **Anal. Quant. Cytol. Histol.**, v.23, n.1, p.31-39, Fev. 2001.
- GUEDES E SILVA, L. P.; HAHN, M. D.; FILHO P. J. S.; GUEDES, A .F. A. M. Carcinoma hepatocelular: incidência no material de necrópsia do Hospital Universitário Antônio Pedro Niterói, Rio de Janeiro, Brasil. **Arq. Bras. Med.**, v. 58, p. 209-211, 1984.
- GUNTHER, L.; HUFNAGL, P.; WINZER, K. J.; GUSKI, H. Different proliferation patterns in breast cancer: AgNOR measurements in ER-negative and ER-positive tumor cells. **Anal. Cell Pathol.**, v. 20, n. 4, p.155-162, 2000.
- HABERLAND, C.; MARTIN, H.; GUSKI, H.; HUFNAGL, P.; VOGEL, S. AgNOR analysis of astrocytoma in childhood. **Zentralbl. Neurochir.**, v.57, n.1, p.5-11, 1996.
- HAFFNER, R.; OREN, M. Biochemical properties and biological effects of p53. **Curr. Opin. Gen. Dev.**, v.5, n. 1, p.84-90, Fev. 1995.

- HALL, P. A.; LANE, D. P. p53 in tumour pathology: can we trust immunohistochemistry? Revisited! **J. Pathol.**, v.172, n.1, p.1-4, Jan. 1994.
- HALL, P. A.; LEVISON, D. A.; WOODS, A. L.; YU, C. C.; KELOLOCK, D. B.; WATKINS, J. A.; BARNES, D. M.; GILLET, C. E.; CAMPLEJOHN, R.; DOVER, R.; WASEEM, N. H.; LANE, D. B. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) immunolocalisation in paraffin sections. An index of cell proliferation with evidence of deregulated expression in some neoplasms. **J. Pathology**, v.162, n.4, p.285-294, Dez. 1990.
- HARATAKE, J.; TAKEDA, S.; KASAI, T.; NAKANO, S.; TOKUI, N. Predictable factors for estimating prognosis of patients after resection of hepatocellular carcinoma. **Cancer**, v.72, n.4, p.1178-1183, Ago. 1993.
- HENDRICKS, J. B.; RAINER, R.; MUNAKATA, S. Computer-assisted and visual methods of assessing cellular proliferation in tissue sections from non-Hodgkin's lymphoma a comparison. **Anal. Quant. Cytol. Histol.**, v.17, n.6, p.383-388, Dez. 1995.
- HERMANEK, P.; HUTTER, R. V. P., SOBIN, L. H. **TNM atlas**. 4.ed. International Union Against Cancer. Berlin: Springer-Verlag, 1997, p. 115-135.
- HESLIN, M. J.; CORDON-CARDO, C.; LEWIS, J. J.; WOODRUFF, J. M.; BRENNAN, M. F. Ki-67 detected by mib-1 predicts distant metastasis and tumor mortality in primary, high grade extremity soft tissue sarcoma. **Cancer**, v.83, n.3, p.490-497, Ago. 1998.
- HODGSON, H. J. F. Fibrolamellar carcinoma. **J. Hepatol.**, v. 5, n. 2, p. 241-247, Out. 1987.
- HONDA, K.; SBISA, E.; TULLO, A.; PAPEO, P. A.; SACCONE, C.; POOLE, S.; PIGNATELLI, M.; MITRY, R. R.; DING, S.; ISLA, A.; DAVIES, A.; HABIB, N. A. p53 mutation is a poor prognostic indicator for survival in patients with hepatocellular carcinoma undergoing surgical tumour ablation. **Br. J. Cancer**, v. 77, n. 5, p.776-782, Mar. 1998.

- HORSFALL, D. J.; JARVIS, L. R.; GRIMBALDESTON, M. A.; TILLEY, W. D.; ORELL, S. R. Immunocytochemical assay for estrogen receptor in fine needle aspirates of breast cancer by video image analysis. **Br. J. Cancer**, v.59, n.1, p.129-134, Jan. 1989.
- HUFF, J. P.; ROOS, G.; PEEBLES, C. L.; HOUGHTEN, R.; SULLIVAN, K. E.; TAN, E. M. Insights into native epitopes of proliferating cell nuclear antigen using recombinant DNA protein products. **J. Exp. Med.**, v.172, n. 2, p.419-429, Ago.1990.
- HSU, H.C.; HUANG, A. M.; LAI, P. L.; CHIEN, W. M.; PENG, S. Y.; LIN, S. W. Genetic alterations at splice junction of p53 gene in human hepatocellular carcinoma. **Hepatology**, v.19, n.1, p.122-128, Jan.1994a.
- HSU, H. C.; PENG, S. Y.; LAI, P. L.; SHEU, J. C.; CHEN, D. S.; LIN, L. I.; SLAGLE, B. L.; BUTEL, J. S. Allelotype and loss of heterozygosity of p53 in primary and recurrent hepatocellular carcinomas: a study of 150 patients. **Cancer**, v.73, n.1, p.42-47, Jan. 1994b.
- IKEDA, K.; SAITOH, S.; TSUBOTA, A.; ARASE, Y.; CHAYAMA, K.; KUMUDA, H.; WATAMABE, G.; TSURUMARU, M. Risk factors for tumor recurrence and prognosis after curative resection of hepatocellular carcinoma. **Cancer**, v.71, n.1, p.19-25, Jan. 1993.
- IKEGUCHI, M.; SATO, N.; HIROOKA, Y.; KAIBARA, N. Computerized nuclear morphometry of hepatocellular carcinoma and its relation to proliferative activity. **J. Surg. Oncol.**, v.68, n.4, p.225-230, Ago. 1998.
- IMBERTI, D.; FORNARI, F.; SBOLLI, G.; BUSCARINI, E.; SQUASSANTE, L.; BUSCARINI, L. Hepatocellular carcinoma in liver cirrhosis. A prospective study. **Scand. J. Gastroenterol.**, v.28, n.6, p.540-544, Jun. 1993.
- ISHII, K.; SUGIMOTO, M.; MATSUKI, S.; MATAMA, S.; SHIBATA, H.; KUSANO, S. Is necrosis induction therapy relevant to hepatocellular carcinoma? Prognostic evaluation viewed from necrosing feature in HCC occluding the main portal vein after treatment with DBcAMP and MMC. **Am. J. Gastroenterol.**, v.87, n.1, p.118-123, Jan. 1992.

- ISHIZU, H. Flow cytometry analysis of the nuclear DNA content of hepatocellular carcinoma. **Jpn. J. Surg.**, v.19, n.6, p.662-673, Nov. 1989.
- IWATSUKI, S.; ROBERT, D.; BYERS, W.; SHAX, J. R.; STARZL, T. Role of liver transplantation in cancer therapy. **Ann. Surg.**, v.202, p.401-407, 1985.
- IZUMI, R.; SHIMIZU, K.; KIRIYAMA, M.; HASHIMOTO, T.; URADE, M.; YAGI, M.; MIZUKAMI, Y.; NONOMURA, A.; MIYAZAKI, I. Alpha-fetoprotein production by hepatocellular carcinoma is prognostic of poor patient survival. **J. Surg. Oncol.**, v.49, n. 3, p. 151-155, Mar. 1992.
- IZUMI, R.; SHIMIZU, K.; II, T.; YAGI, M.; MATSUI, O.; NONOMURA, A.; MIYAZAKI, I. Prognostic factors of hepatocellular carcinoma in patients undergoing hepatic resection. **Gastroenterology**, v.106, n.3, p.720-727, Mar. 1994.
- JAIN, S.; FILIPE, M.; HALL, P. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA): prognostic value in gastric carcinoma. **J. Clin. Pathol.**, v.44, n.8, p.655-659, Ago. 1991.
- JARVIS, L. R. A microcomputer system for video image analysis and diagnostic microdensitometry. **Anal. Quant. Cytol. Histol.**, v.8, n.3, p.201-209, Set. 1986.
- JARVIS, L. R. Adapting video technology for quantitative microscopy. **Acta. Stereol.**, v.6, p.299, 1987.
- JARVIS, L. R.; GRAFF, O. S.; WHITEHEAD, R. Correlation of nuclear ploidy with histology in adenomatous polyps of colon. **J. Clin. Pathol.**, v.40, n.1, p.26-33, Jan. 1987.
- JOHNSON, P. J.; WILLIAMS, R. Cirrhosis and the aetiology of hepatocellular carcinoma. **J. Hepatol.**, v.4, n.1, p.140-147, Fev. 1987.
- JOHNSON, P. J.; WILLIAMS, R. Serum alpha-fetoprotein estimations and doubling time in hepatocellular carcinoma: influence of therapy and possible value in early detection. **J. Natl. Cancer Inst.**, v.64, n.6, p.1329-1332, Jun. 1980.

- JOYCE, W. P.; FYNES, M.; MORAN, K. T.; GOUGH, D. B.; DERVAN, P.; GOREY, T. F.; FITZPATRICK, J. M. The prognostic value of nucleolar organizer regions in colorectal cancer: a 5-year follow-up study. **Ann. R. Coll. Surg. Engl.**, v. 74, n. 3, p. 172-177, Mai. 1992.
- KAKEJI, Y.; KORENAGA, D.; TSUJITANI, S.; HARAGUCHI, M.; MAECHARA, Y.; SUGIMACHI, K. Predictive value of ki-67 and argyrophilic nucleolar organizer region staining for lymph node metastasis in gastric cancer. **Cancer Res.**, v.51, n.13, p.3503-3506, Jul. 1991.
- KAKEJI, Y.; MAEHARA, Y.; ORITA, H.; EMI, Y.; ICHIYOSHI, Y.; KORENAGA, D.; SUGIMACHI, K. Argyrophilic nucleolar organizer region in endoscopically obtained biopsy tissue: a useful predictor of nodal metastasis and prognosis in carcinoma of the stomach. **J. Am. Coll. Surg.**, v. 182, n. 6, p. 482-487, Jun. 1996.
- KAPLAN, E. L.; MEIER, P. Nonparametric estimation from incomplete observations. **J. Am. Stat. Assoc.**, v.53, p.457-481, 1958.
- KASHALA, L. O.; CONNE, B.; KALENGAYI, M. M. R.; KAPANCI, Y.; FREI, P. C.; LAMBERT, P. H. Histopathologic features of hepatocellular carcinoma in Zaire. **Cancer**, v.65, n.1, p.130-134, Jan. 1990.
- KAWAI, Y.; TAKESHIGE, K.; NUNOME, M.; KURODA, H.; SUZUKI, H.; BANNO, K.; KOIDE, T.; KOBAYASHI, H.; OWA, Y.; KOIKE, A. Prognosis after hepatic resection in patients with hepatocellular carcinoma, estimated on the basis of the morphometric indices. **Cancer Chemother. Pharmacol.**, v. 33 Suppl:S24-28, 1994.
- KERNS, B. J.; JORDAN, P. A.; FAERMAN, L. L.; BERCHUCK, A.; BAST, R. C. JR.; LAYFIELD, L. J. Determination of proliferative index with MIB1 in advanced ovarian cancer using quantitative image analysis. **Am. J. Clin. Pathol.**, v.101, n.2, p.192-197, Fev. 1994.
- KEW, M. C. Cancer of the Liver. **Cur. Opin. Gastroenterol.**, v.202, p.202-206, 1995.

- KISHI, K.; SHIKATA, T.; HIROHASHI, S.; HASEGAWA, H.; YAMAZAKI, S.; MAKUUCHI, M. Hepatocellular carcinoma: a clinical and pathologic analysis of 57 hepatectomy cases. **Cancer**, v.51, n.3, p.542-548, Fev. 1983.
- KITAMOTO, M.; NAKANISHI, T.; KIRA, S.; KAWAGUCHI, M.; NAKASHIO, R.; SUEMORI, S.; KAJIYAMA, G.; ASAHARA, T.; DOHI, K. The assessment of proliferating cell nuclear antigen immunohistochemical staining in small hepatocellular carcinoma and its relationship to histologic characteristics and prognosis. **Cancer**, v. 72, n. 6, p. 1859-1865, Set. 1993.
- KLING, H.; LEPORE, W.; KRONE, W.; OLERT, J.; SAWATZTK, G. Chemical studies on the silver staining of nucleoli. **Experientia**, v.36, n.2, p.249-252, Fev. 1980.
- KONIECKI, J.; NUGENT, P.; KORDOWSKA, J.; BASERGA, R. Effect of the SV40 T antigen on the post-transcriptional regulation of the proliferating cell nuclear antigen and DNA polymerase- α genes. **Cancer Res.**, v.51, n.5, p.1465-1471, Mar. 1991.
- KRAGGERUD, S. M.; JACOBSEN, K. D.; BERNER, A.; STOKKE, T.; HOLM, R.; SMEDSHAMMER, L.; BORRESEN-DALE, A. L.; FOSSA, S. D. A comparison of different modes for the detection of p53 protein accumulation. A study of bladder cancer. **Pathol. Res. Pract.**, v.193, n.7, p.471-478, 1997.
- KREIPE, H.; WACKER, H. H.; HEIDEBRECHT, H. J.; HAAS, K.; HAUBERG, M.; TIEMANN, M.; PARWARESCH, R. Determination of the growth fraction in non-Hodgkin's lymphoma by monoclonal antibody Ki-S5 directed against a formalin-resistant epitope of the Ki-67 antigen. **Am. J. Pathol.**, v. 142, n. 6, p.1689-1694, Jun. 1993.
- KUBOTA, Y.; PETRAS, R. E.; EASLEY, K. A.; BAUER, T. W.; TUBBS, R. R. Ki-67 determined growth fraction versus standard staining and grading parameters in colorectal carcinoma: a multivariate analysis. **Cancer**, v. 70, n. 11, p. 2602-2609, Dez. 1992.

- KUNG, I. T.; CHAN, S. K.; FUNG, K. H. Fine-needle aspiration in hepatocellular carcinoma. Combined cytologic and histologic approach. **Cancer**, v. 67, n.3, p. 673-680, Fev.1991.
- LAI, C. L.; WU, P.C.; LAM, K. C.; TODD, D. Histologic prognostic indicators in hepatocellular carcinoma. **Cancer**, v.44, n.5, p.1677-1683, Nov. 1979.
- LAI, E. C. S.; NG, I. O. L.; NG, M. M. T.; LOK, A. S. F.; TAM, P. C.; FAN, S. T.; CHOI, T. K.; WONG, J. Long-term results of resection for large hepatocellular carcinoma: a multivariate analysis of clinicopathological features. **Hepatology**, v.11, n.5, p.815-818, Mai. 1990.
- LAI, E. C. S.; NG, I. O. L.; YOU, K. T.; CHOI, T. K.; MOK, F. P. T.; WONG, J. Hepatectomy for large hepatocellular carcinoma: the optimal resection margin. **World J. Surg.**, v.15, n.1, p.141-145, Jan-Fev. 1991.
- LAU, H.; FAN, S. T.; NG, I. O. L.; WONG, J. Long term prognosis after hepatectomy for hepatocellular carcinoma: a survival analysis of 204 consecutive patients. **Cancer**, v.83, n.11, p.2302-2311, Dez. 1998.
- LEE, C. S.; HWANG, L. Y.; BEASLEY, R. P.; HSU, H. C.; LEE, H. S.; LIN, T. Y. Prognostic significance of histologic findings in resected small hepatocellular carcinoma. *Acta. Chir. Scand.*, v.154, n.3, p.199-203, Mar. 1988.
- LEE, R. G. **Diagnostic liver pathology**. 1. ed., St Louis: Mosby-Year Book, p.430-450, 1994.
- LESTY, C.; CHLEQ, C.; CONTESSO, G.; JACQUILLAT, C. Nucleoli and AgNOR proteins in 32 cases of primary breast carcinoma. Spatial pattern of interactions between 50 clinical and histometric criteria. **Anal. Quant. Cytol. Histol.**, v. 14, n. 3, p. 175-186, Jun. 1992.
- LI, B.; LI, L.; SUN, X. Automatic image analysis of argentophil protein granule quantitative measurement on nucleolus area of limbus epithelial neoplasms. **Chung. Hua. Yen. Ko. Tsa. Chih.**, v.32, n.6, p.429-431, Nov. 1996.

- LIEBER, C. H.; GARRO, A.; LEO, M. A.; MAK, K. M.; WORNER, T. Alcohol and cancer. **Hepatology**, v.6, n. 5, p.1005-1019, Set-Out, 1986.
- LISCHWE, M. A.; SMATANA, K.; OLSON, M.O.J.; BUSCH, H. Proteins C23 and B23 are the major nucleolar silver staining proteins. **Life Sci.**, v.25, n.8, p.701-708, Ago. 1979.
- LORAND-METZE, I.; METZE, K. AgNOR cluster as a parameter of cell kinetics in chronic lymphocytic leukaemia. **J. Clin. Pathol: Mol.Pathol.**, v.49, p.357-360, 1996.
- LORAND-METZE, I.; CARVALHO, M. A.; METZE, K. Relationship between morphometric analysis of nucleolar organizer regions and cell proliferation in acute leukemias. **Cytometry**, v.32, n.1, p.51-56, Mai. 1998.
- MAEDA, T.; ADACHI, E.; KAJIYAMA, K.; TAKENAKA, K.; SUGIMACHI, K.; TSUNEYOSHI, M. Spindle cell hepatocellular carcinoma: a clinocopathologic and immunohistochemical analysis of 15 cases. **Cancer**, v.77, n.1, p.51-57, Jan. 1996.
- MAHOVLIC, V.; AUDY-JURKOVIC, S.; OVANIN-RAKIC, A.; BILUSIC, M.; VELDIC, M.; BABIC, D.; BOZIKOV, J.; DANILOVIC, Z. Digital image analysis of silver-stained nucleolar organizer region: associated proteins in endometrial cytologic samples. **Anal. Quant. Cytol. Histol.**, v.21, n.1, p.47-53, Feb. 1999.
- MARTIN, H.; GREINER, K.; BEIL, M.; HUFNAGL, P. The significance of the nucleolus organizer region antigen for the differentiation of laryngeal dysplasias and laryngeal carcinoma. **H.N.O.**, v. 44, n. 1, p. 22-26, Jan. 1996.
- MATHEWS, M. B.; BERNSTEIN, R. M.; FRANZA, B. R. JR.; GARRELS, J. I. Identity of the proliferating cell nuclear antigen and cyclin, **Nature**, v.309, n.5966, p374-376, Mai. 1984.
- MAYER, A.; TAKIMOTO, M.; FRITZ, E.; SCHELLANDER, G.; KOFLER, K.; JUDWIG, H. The prognostic significance of proliferating cell nuclear antigen, epidermal growth factor, and mdr gene expression in colorrectal cancer. **Cancer**, v.71, n.8, p.2454-2460, Mai. 1993.

- MCCORMICK, D.; HALL, P. A. The complexities of proliferating cell nuclear antigen. **Histopathology**, v.21, n.6, p.591-594, Dez. 1992.
- MCCORMICK, D.; YU, C.; HOBBS, C.; HALL, P. A. The relevance of antibody concentration to the immunohistological quantification of cell proliferation-associated antigens. **Histopathology**, v. 22, n. 6, p.543-547, Jun. 1993
- MCENTEE, G. P.; BATTS, K. A.; KATZMANN, J. A. Relationship of nuclear DNA content to clinical and pathologic findings in patients with primary hepatic malignancy. **Surgery**, v.111, n.4, p.376-379, Abr. 1992.
- MCLEAN, I. W.; SIBUG, M. E.; BECKER, R. L.; MCCURDY, J. B. Uveal melanoma: the importance of large nucleoli in predicting patient outcome: an automated image analysis study. **Cancer**, v.79, n. 5, p.982-988, Mar. 1997.
- MELCHIORRI, C.; BOLONDI, L.; CHIECO, P.; PAGNONI, M.; GRAMANTIERI, L.; BARBARA, L. Diagnostic and prognostic value of DNA ploidy and cell nuclearity in ultrasound-guided liver biopsies. **Cancer**, v.74, n.6, p.1713-1719, Set. 1994.
- MIES, S. & MASSAROLLO, P. C. B. Tratamento do hepatocarcinoma. In: Silva, L.C. da. **Hepatites agudas e crônicas**, 2.ed. São Paulo: Sarvier, 1995. p310-326.
- MILLER, T. P.; GROGAN, T. M.; DAHLBERG, S.; SPIER, C. M.; BRAZIEL, R. M.; BANKS, P. M.; FOUCAR, K.; KJELDSBERG, C. R.; LEVY, N.; NATHWANI, B. N. Prognostic significance of the Ki-67 associated proliferative antigen in aggressive non-Hodgkin's lymphomas: a prospective Southwest Oncology Group trial. **Blood**, v.83, n.6, p.1460-1466. Mar. 1994.
- MIRRE, C.; KNIBIEHLER, B. A reevaluation of the relationships between the fibrillar centers and the nucleolus-organizing regions in reticulated nucleoli: ultrastructural organization, number and distribution of the fibrillar centers in the nucleolus of the mouse Sertoli cell. **J. Cell Sci.**, v.55, p.261-276. Jun. 1982.
- MIYACHI, K.; FRITZLER, M. J.; TAN, E. M. Autoantibody to a nuclear antigen in proliferating cells. **J. Immunol.**, v. 121, n.6, p.2228-2234, Dez. 1978.

- MORITA, M.; KUWANO, H.; MATSUDA, H.; MORIGUCHI, S.; SUGIMACHI, K.
Prognostic significance of argyrophilic nucleolar organizer regions in esophageal carcinoma. **Cancer Res.**, v. 51, n 19, p.5339-5341, Out. 1991.
- MORIWAKI, H.; YASUDA, I.; SHIRATORI, Y.; UEMATSU, T.; OKUNO, M.; MUTO, Y.
Deletion of serum lectin-reactive α -fetoprotein by acyclic retinoid: a potent biomarker in the chemoprevention of second primary hepatoma. **Clin. Cancer Res.**, v.3, n.5, p.727-731, Mai. 1997.
- MORRIS, G. F.; MATHEWS, M. B. Regulation of proliferating cell nuclear antigen during the cell cycle. **J. Biol. Chem.**, v. 264, n. 23, p.13856-13864, Ago. 1989.
- MUNAKATA, S.; HENDRICKS, J. B. A multilabeling technique for simultaneous demonstration and quantitation of Ki-67 and nucleolar organizer regions (AgNORs) in paraffin-embedded tissue. **J. Histochem. Cytochem.**, v. 42, n.6, p.789-793, Jun. 1994.
- NAGASUE, N.; KOHNO, H.; CHANG, Y.; HAYASHI, T.; UTSUMI, Y.; NAKAMURA, T.
Androgen and estrogen receptors in hepatocellular carcinoma and the surrounding liver in women. **Cancer**, v.63, n.1, p.112-116, Jan. 1989.
- NAGASUE, N.; UCHIDA, M.; MAKINO, Y.; TAKEMOTO, Y.; YAMANOI, A.; HAYASHI, T.; CHANG, Y. C.; KOHNO, H.; NAKAMURA, T.; YUKAYA, H.
Incidence and factors associated with intrahepatic recurrence following resection of hepatocellular carcinoma. **Gastroenterology**, v.105, n.2, p.488-494, Ago. 1993.
- NAGASUE, N.; YAMANOI, A.; TAKEMOTO, Y.; KIMOTO, T.; UCHIDA, M.; CHANG, Y. C.; TANIURA, H.; KOHNO, H.; NAKAMURA, T. Comparison between diploid and aneuploid hepatocellular carcinoma: a flow cytometric study. **Br. J. Surg.**, v.79, n. 7, p.667-670, Jul. 1992.
- NAGASUE, N.; YUKUYA, H.; HAMADA, T.; HIROSE, S.; KANAHIMA, R.; INOKUCHI, K. The natural history of hepatocellular carcinoma. A study of 100 untreated cases. **Cancer**, v.54, n.7, p.1461-1465, Out. 1984.

- NAGASUE, N.; YUKUYA, H.; OGAWA, Y.; SASAKI, Y.; CHANG, Y. C.; NIIMI, K.
Clinical experience with 118 hepatic resections for hepatocellular carcinoma.
Surgery, v.99, n.6, p.694-702, Jun. 1986.
- NAGAO, T.; INOUE, S.; GOTO, S.; MIZUTA, T.; OMORI, Y.; KAWANO, N.;
MORIOKA, Y. Hepatic resection for hepatocellular carcinoma clinical features and
long-term prognosis. **Ann. Surg.**, v. 205, n.1, p.33-40, Jan. 1987.
- NAGAO, T.; INOUE, S.; YOSHIMI, F.; SODEYAMA, M.; OMORI, Y.; MIZUTA, T.;
KAWANO, N.; MORIOKA, Y. Post-operative recurrence of hepatocellular
carcinoma. **Ann. Surg.**, v.211, n.1, p. 28-33, Jan. 1990.
- NAGAO, T.; ISHIDA, Y.; YAMAZAKI, K.; KONDO, Y. Nucleolar organizer regions in
hepatocarcinoma related to the cell cycle, cell proliferation and histologic grade.
Path. Res. Pract., v.191, n.10, p.967-972, Out. 1995a.
- NAGAO, T.; KONDO, F.; SATO, T.; NAGATO, Y.; KONDO, Y. Immunohistochemical
detection of aberrant p53 expression in hepatocellular carcinoma: correlation with
cell proliferative activity indices, including mitotic index and MIB-1 immunostaining.
Hum. Pathol., v. 26, n.3, p.326-333, Mar. 1995b.
- NAKAE, S.; NAKAMURA, T.; IKEGAWA, R.; YOSHIOKA, H.; SHIRONO, J.;
TABUCHI, Y. Evaluation of nucleolar organizer region and proliferating cell nuclear
antigen in colorectal cancer. **J. Surg. Oncol.**, v.69, n.1, p.28-35, Set. 1998.
- NAKAJO, S.; YAMAMOTO, M.; TAHARA, E. Morphometric analysis of hepatocellular
carcinoma: diagnostic usefulness of numerical nuclear density and its ratio. **Nippon
Rinsho.**, v.50, n.10, p.2525-2529, Out. 1992.
- NAKAYAMA, K.; ABE, R. Argyrophilic nucleolar organizer region (AgNOR) area per
nucleus as a prognostic factor in breast cancer. **J. Surg. Oncol.**, v. 60, n. 3, p.160-
167, Nov. 1995.

- NG, I. O. L.; LAI, E. C. S.; FAN, S. T.; NG, M.; CHAN, A. S. Y.; SO, M. K. P. Prognostic significance of proliferating cell nuclear antigen expression in hepatocellular carcinoma. **Cancer**, v.73, n.9, p. 2268-2274, Mai.1994.
- NG, I. O. L.; LAI, E. C. S.; FAN, S. T.; NG, M.; CHAN, A. S. Y.; SO, M. K. P. Prognostic significance of pathologic features of hepatocellular carcinoma: a multivariate analysis of 278 patients. **Cancer**, v.76, n.12, p.2443-2448, Dez. 1995a
- NG, I. O. L.; LAI, E. C. S.; NG, M. M. T, FAN, S. T. Tumor encapsulation in hepatocellular carcinoma: a pathological study of 189 cases. **Cancer**, v.70, n.1, p.45-49, Jul. 1992.
- NG, I. O.; NA, J. I. A.; LAI, E. C.; FAN, S. T.; NG, M. M. Ki-67 antigen expression in hepatocellular carcinoma using monoclonal antibody MIB1. A comparison with proliferating cell nuclear antigen. **Am. J. Clin. Pathol.**, v.104. n.3, p.313-318, Set. 1995b
- NG, I. O.; NG, M. M.; LAI, E. C.; FAN, S. T. Better survival in female patients with hepatocellular carcinoma. Possible causes from a pathologic approach. **Cancer**, v. 75, n. 1, p.18-22, Jan. 1995c.
- NOMURA, F.; OHNISHI, K.; TANABE, Y. Clinical features and prognosis of hepatocellular carcinoma with reference to serum alpha-fetoprotein levels. Analysis of 606 patients. **Cancer**, v. 64, n.8, p.1700-1707, Out. 1989
- NONOMURA, A.; MIZZUKAMI, Y.; MATSUBARA, F.; NAKANUMA, Y. Identification of nucleolar organizer regions in non-neoplastic and neoplastic hepatocytes by the silver-staining technique. **Liver**, v.10, n.4, p.229-238, Ago. 1990.
- NORAZMI, M. N.; HOHMANN, A. W.; JARVIS, L. R.; SKINNER, J. M.; STOLL, P.; BRADLEY, J. The use of computer-assisted video image analysis in the enumeration of immuno-stained cells in tissue sections. **J. Immunol. Methods**, v.131, n.2, p.223-227, Ago. 1990.

- NORMAN, G.R. & STREINER, D.L. **PDQ statistics**, 2. ed., St. Louis, Mosby-Year Book, 1997. 152 p.
- NZEAKO, U.; GOODMAN, Z.D.; ISHAK, K. Comparision of tumor pathology with duration of survival of north american patients with hepatocellular carcinoma. **Cancer**, v.76, n.4, p.579-588, Ago, 1995.
- OCHS, R.; LISCHWE, M.; O'LEARY, P.; BUSCH, H. Localization of nucleolar phosphoproteins B23 and C23 during mitosis. **Exp. Cell Res.**, v.146, n.1, p.139-149, Jun. 1983.
- O'CONOR, G. I.; TATARINOV, Y. S.; ABELEV, G. I.; URIEL, J. A collaborative study for evaluation of a serologic test for primary liver cancer. **Cancer**, v.25, n.5, p.1091-1098, Mai. 1970
- OHNISHI, K.; IIDA, S.; IWAMA, S.; GOTO, N.; NOMURA, F.; TAKASHI, M.; MISHIMA, A.; KONO, K.; KIMURA, K.; MUSHI, H.; KOTOTA, K.; OKUDA, K. The effect of chronic habitual alcohol intake on the development of liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma: relation to hepatitis B surface antigen carriage. **Cancer**, v.49, n.4, p.672-677, Fev.1982.
- OKUDA, K. Early recognition of hepatocellular carcinoma. **Hepatology**, v.6, n.4, p.729-38, Jul-Ago.1986.
- OKUDA, K. Hepatocellular carcinoma: recent progress. **Hepatology**, v.15, n.5, p.948-963, Mai. 1992.
- OKUDA, K. Radiological diagnosis of hepatocellular carcinoma. **Ann. Acad. Med. Singapore**, v. 9, n.2, p. 222-227, Abr. 1980.
- OKUDA, K.; OHTSUKI, T.; OBATA, H.; TOMIMATSU, M.; OKAZAKI, N.; HASEGAWA, H.; NAKAJIMA, Y.; OHNISHI, K. Natural history of hepatocellular carcinoma and prognosis in relation to treatment. Study of 850 patients. **Cancer**, v.56, n.4, p.918-928, Ago. 1985;

- OKUDA, K. & OKUDA, H. Primary liver carcinoma. In: McINTYRE, N.; BENHAMOU, J.P.; BIRCHER, J.; RIZZETO, M.; RODES, J. **Oxford textbook of clinical hepatology**. Oxford: Oxford medical publication, 1991. p1019-1053.
- OKUDA, K. & KOJIRO, M. Small hepatocellular carcinoma. In: OKUDA, K.; ISHAK, K. G. **Neoplasms of the liver**. Tokyo: Springer-Verlag, 1987. p: 215-227.
- ORITA, T.; KAJIWARA, K.; NISHIZAKI, T.; IKEDA, N.; KAMIRYO, T.; AOKI, H. Nucleolar organizer regions in meningioma. **Neurosurgery**, v.26, n.1, p.43-46, Jan. 1990.
- ORSATTI, G.; GREENBERG, P. D.; ROLFES, D. B.; ISHAK, K. G.; PARONETTO, F. DNA ploidy of fibrolamellar hepatocellular carcinoma by image analysis. **Human Pathol.**, v. 25, n. 9, p. 936-939, Set. 1994.
- OLTHOFF, K. M.; MILLIS, J. M.; ROSOVE, M. H.; GOLDSTEIN, L. I.; RAMMING, K. P.; BUSUTTIL, R. W. Is liver transplantation justified for the treatment of hepatic malignancies? **Arch. Surg.**, v. 125, n.10, p.1291-1298, Out. 1990.
- OTTAVIO, L.; CHANG, C. D.; RIZZO, M. G.; TRAVALI, S.; CASADEVALL, C.; BASERGA, R. Importance of introns in the growth regulation of mRNA levels of the proliferating cell nuclear antigen gene. **Mol. Cell Biol.**, v.10, n.10, p. 303-309, 1990.
- OZAWA, K.; AOYAMA, H.; YASUDA, K.; SHIMAHARA, Y.; NAKATANI, T.; TANAKA, J.; YAMAMOTO, M.; KAMIYAMA, Y.; TOBE, T. Metabolic abnormalities associated with postoperative organ failure: a redox theory. **Arch. Surg.**, v.118, n.11, p.1245-1251, Nov. 1983.
- OZTURK, M.; BRESSAC, B.; PUISIEUX, A.; VOLKMANN, M.; BOZCALL, S.; MURA, J. B.; MONTE, S.; CARLSON, R.; BUM, H.; WARDS, J.; TAKAHASHI, H.; VON WEIZSÄCKER, F.; GALUN, E.; KAR, S.; CAN, B. I.; SCHRÖDER, C. H.; ERKEN, E.; VARINLI, S.; RUSTGI, V. K.; PRAT, J.; TODO, G.; KOCH, H. K.; LIAN, X. H.; TANG, Z. Y.; SHOUVAL, D.; LEE, H. S.; VYAS, G. N.; SAROSI, I. p53 mutation in hepatocellular carcinoma after aflatoxin exposure. **Lancet**, v.338, n.8779, p.1356-1359, Nov. 1991.

- PAK, M. W.; TO, K. F.; CHEN, M. H.; LO, S. Y.; LAM, P. K.; VAN HASSELT, C. A. Morphometric analysis of argyrophilic nucleolar organizer regions (AgNORs) in nasopharyngeal carcinoma. **Head Neck**, v. 22, n. 8, p. 760-764, Dez. 2000a.
- PAK, M. W.; TO, K. F.; LEUNG, S. F.; VAN HASSELT, C. A. Prognostic significance of argyrophilic nucleolar organizer regions in nasopharyngeal carcinoma. **Eur Arch. Otorhinolaryngol.**, v. 257, n. 9, p. 517-520, Nov. 2000b.
- PANIS, Y.; RIBEIRO, J.; CHRETIEN, Y. Y.; NORDLINGER, B. Dormant liver metastases an experimental study. **Br. J. Surg.**, v. 79, n. 3, p. 221-223, Mar. 1992.
- PAVELIC, Z. P.; PAVELIC, L.; LOWER, E. E.; GAPANY, M.; GAPANY, S.; BARKER, E. A.; PREISLER, H. D. C-myc, c-erbB2, Ki-67 expression in normal breast tissue and in invasive and noninvasive breast carcinoma. **Cancer Res.**, v. 52, n. 9, p.2597-2602, Mai. 1992.
- PENG, S. Y.; CHOU, S. P.; HSU, H. C. Association of downregulation of cyclin D1 and overexpression of cyclin E with p53 mutation, high tumor grade and poor prognosis in hepatocellular carcinoma. **J. Hepatol.**, v. 29, n. 2, p. 281-289, Ago. 1998.
- PIFFKO, J.; BANKFALVI, A.; OFNER, D.; RASCH, D.; JOOS, U.; SCHMID, K.W. Standardized demonstration of silver-stained nucleolar organizer regions-associated proteins in archival oral squamous cell carcinomas and adjacent non-neoplastic mucosa. **Mod. Pathol.**, v. 10, n. 2, p. 98-104, Fev. 1997.
- PLATE, K. H.; RÜSCHOFF, J.; MENNEL, H. D. Nucleolar organizer regions in meningiomas: correlation with histopathological malignancy grading, DNA cytometry and clinical outcome. **Anal. Quant. Cytol. Histol.**, v. 12, n. 6, p. 429-438, Dez. 1990.
- PLOTON, D.; MENAGER, M.; JEANNESSON, P.; HIMBER, G.; PIGEON, F.; ADNET, J. J. Improvement in staining and visualization of the argyrophilic proteins of the nucleolar organizer region at the optical level. **Histochem. J.**, v.18, n.1, p.5-14, Jan. 1986.

- POLLOK, A. Nucleolar organizer regions in exocrine pancreas in chronic pancreatitis and ductal adenocarcinoma. Diagnostic value and cytophysiologic correlate. **Gen. Diagn. Pathol.**, v. 142, n. 3-4, p. 199-209, Fev. 1997.
- QUEIROZ, A. C.; MOREIRA, D. E. Q.; ANDRADE, M. L. A. Displasia de células hepáticas. Lesão pré-maligna relacionada ao carcinoma hepatocelular e à infecção pelo vírus B da hepatite. **Arq. Gastroenterol.**, v. 24, p.80-83, 1987.
- RAILO, M.; NORDLING, S.; VON BOGUSLAWSKY, K.; LEIVONEN, M.; KYLLONEN, L.; VON SMITTEN, K. Prognostic value of Ki-67 immunohistochemical labelling in primary operable breast cancer. **Br. J. Cancer**, v.68, n.3, p.579-583, Set. 1993.
- RAYMOND, W. A.; LEONG, A. S. Nucleolar organizer regions relate to growth fractions in human breast carcinoma. **Hum. Pathol.**, v.20, n.8, p.741-746, Ago.1989.
- REW, D. A. Significance of aneuploidy. **Br. J. Surg.**, v.81, n.10, p.1416-1422, Out. 1994.
- RODE, J.; DHILLON, A. P. Neurone specific enolase and S100 protein as possible prognostic indicators in melanoma. **Histopathology**, v. 8, n. 6, p. 1041-1052, Nov. 1984.
- RODRIGUES, O. R.; ANTONANGELO, L.; YAGI, N.; MINAMOTO, H.; SCHMIDT JUNIOR, A. F.; CAPELOZZI, V. L.; GOLDENBERG, S.; SALDIVA, P. H.. Prognostic significance of argyrophilic nucleolar organizer region (AgNOR) in resected non-small cell lung cancer (NSCLC). **Jpn. J. Clin. Oncol.**, v. 27, n. 5, p. 298-304, Out. 1997.
- ROLFES, D. B. Fibrolamellar carcinoma of the liver. In: OKUDA, K.; ISHAK, K.G.. **Neoplasms of the liver**. Berlin: Springer-Verlag, 1988: p. 138-142.
- ROSELLINI, S. R.; ARIENTI, V.; NANNI, O.; UGENTI, F.; TASSINARI, M.; CAMPORESI, C.; BORIANI, L.; VERSARI, G.; COSTA, P. L.; AMADORI, D. Hepatocellular carcinoma. Prognostic factors and survival analysis in 135 Italian patients. **J. Hepatol.**, v. 16, n. 1-2, p.66-72, Set. 1992.

- RÜSCHOFF, J.; PLATE, K. H.; BITTINGER, A. Application of the AgNOR method to cell imprints. **J. Pathol.**, v.158, n.4, p.333, Ago. 1989.
- RÜSCHOFF, J.; PLATE, R.H.; CONTRACTOR, H.; KERNS, S.; ZIMMERMANN, R.; THOMAS, C. Evaluation of nucleolus organizer regions by automatic image analysis: a contribution to standardization. **J. Pathol.**, v.161, n.12, p.113-118, Jun. 1990.
- RÜSCHOFF, J.; ZIMMERMANN, R.; ULSHÖFER, B.; THOMAS, C. Silver-stained nucleolar organizer proteins in urothelial bladder lesions. **Path. Res. Pract.**, v.188, n.4-5, p.593-598, Jun. 1992.
- SAMPATANUKUL, P.; MIKUZ, G.; ISRASENA, S.; VAJARAPONGSE, K.; FEICHTINGER, H. Cytomorphologic and DNA cytometric features of hepatocellular carcinoma in fine needle aspirates. **Acta. Cytol.**, v. 41, n. 2, p.435-442, Mar-Abr. 1997.
- SATOH, K.; BUSCH, H. Silver staining of phosphothreonine in nucleolar and other phosphoproteins. **Cell. Biol. Int. Res.**, v.5, n. 9, p.827-828, Set. 1981.
- SCHWARTZ, M.E. Primary hepatocellular carcinoma. Transplant versus resection. **Sem. Liver Dis.**, v.14, n.2, p.135-9, Mai. 1994.
- SCORSONE, K. A.; ZHOU, Y. Z.; BUTEL, J. S.; SLAGLE, B. L. p53 mutations clusters at codon 249 in hepatitis B virus-positive hepatocellular carcinomas from China. **Cancer Res.**, v.52, n.6 , p.1635-1638, Mar. 1992.
- SELL, S.; HUNT, J. M.; DUNSDORF, H. A.; CHISARI, F. V. Synergy between hepatitis B virus expression and chemical hepatocarcinogens in transgenic mice. **Cancer Res.**, v.51, n.4, p.1278-85, Fev. 1991.
- SHAEFFER, J.; TEGELER, J. A.; KUBAN, D. A.; PHILPUT, C. B.; EL MADHI, A. M. Nuclear roundness factor and local failure from definitive radiation therapy for prostatic carcinoma. **Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.**, v.24, n.3, p.431-434. 1992.

- SHEU, J. C.; SUNG, J. L.; CHEN, D. S.; YANG, P. M.; LAI, M. Y.; LEE, C. S.; HSU, H. C.; CHUANG, C. N.; YANG, P. C.; WANG, T. H. Growth rate of asymptomatic hepatocellular carcinoma and its clinical implications. **Gastroenterology**, v. 89, n.2, p.259-266, Ago. 1985.
- SHIEH, Y. S.; NGUYEN, C.; VOCAL, M. V.; CHU, H. W. Tumor-supressor p53 gene in hepatitis C and B virus-associated in hepatocellular carcinoma. **Int. J. Cancer**, v.54, n.4, p.558-562, Jun. 1993.
- SHIINA, H.; IGAWA, M.; URAKAMI, S.; SHIRAKAWA, H.; ISHIBE, T. Comparison of ureteropelvic transitional cell carcinoma with bladder transitional cell carcinoma using an image analyzer. **Urol. Int.**, v.56, n. 3, p.163-8, 1996a.
- SHIINA, H.; URAKAMI, S.; SHIRAKAWA, H.; SHIGENO, K.; HIMENO, Y.; MIZUTANI, M.; IGAWA, M.; ISHIBE, T. Evaluation of the argyrophilic nucleolar organizer region, nuclear DNA content and mean nuclear area in transitional cell carcinoma of bladder using a quantitative image analyzer. **Eur. Urol.**, v. 29, n.1, p.99-105, 1996b.
- SHIMADA, M.; TAKENAKA, K.; FUJIWARA, Y.; GION, T.; KAJIYAMA, K.; MAEDA, T.; SHIRABE, K.; SUGIMACHI, K. Des-gama-carboxy prothrombin and alpha-fetoprotein positive status as a new prognostic indicator after resection for hepatocellular carcinoma. **Cancer**, v.78, n. 10, p.2094-2100, Nov. 1996;
- SHIMIZU, K.; IZUMI, R.; II, T.; MURAOKA, K. ; INOUE, T.; FUKUSHIMA, W.; SAKAMOTO, K.; TANI, T.; HASHIMOTO, T.; YAGI, M.; MIYAZAKI, I.; NONOMURA, A. Prognostic significance of nucleolar organizer regions in hepatocellular carcinoma . **Hepatology**, v.21, n.2, p.393-397, Fev. 1995.
- SHIMIZU, T.; USUDA, N.; YAMANDA, T.; SUGENOYA, A.; IIDA, F. Proliferative activity of human thyroid tumors evaluated by proliferating cell nuclear antigen / cyclin immunohistochemical studies. **Cancer**, v.71, n.9, p.2807-2812, Mai. 1993.

- SHIPMAN-APPASAMY, P.; COHEN, K. S.; PRYSTOWSKY, M. B. Interleukin2-induced expression of proliferating cell nuclear antigen is regulated by transcriptional and post-transcriptional mechanisms. **J. Biol. Chem.**, v. 265, n. 31, p.19180-19184, Nov. 1990.
- SHIRABE, K.; MATSUMATA, T.; ADACHI, E.; MAEDA,T.; SHIMADA, M.; TAKETOMI, A.; SUGIMACHI, K. Prognosis of well differentiated small hepatocellular carcinoma: is well differentiated hepatocellular carcinoma clinically early cancer? **Hepatogastroenterol**, v.42, n.6, p.923-930, Nov-Dez. 1995.
- SHIRATORI, Y.; SHIINA, S.; IMAMURA, M.; KATO, N.; KANAI, F.; OKUDAIRA, T.; TERATANI, T.; TOHGO, G.; TODA, N.; OHASHI, M.; OGURA, K.; NIWA, Y.; KAWABW, T.; OMATA, M. Characteristic difference of hepatocellular carcinoma between hepatitis B- and C- viral infection in Japan. **Hepatology**, v.22, n.4 pt 1, p.1027-33, Out. 1995.
- SHIRO, T.; SEKI, T.; NAITOH,Y.; INOUE, K.; OKAMURA, A. A correlation of argiophilic nucleolar organizer regions with stages of hepatocellular carcinoma. **Cancer**, v.71, n.1, p.44-49, Jan. 1993.
- SHIRO, T.; SEKI, T.; NAITOH, Y.; NAKAGAWA, T.; WAKABAYASHI, M.; ITOH, T.; SHIOZAKI, Y.; INOUE, K.; OKAMURA, A. Evaluation of the biological malignancy in hepatocellular carcinoma by argyrophilic nucleolar organizer region (AgNOR) staining: morphological study of AgNOR using image analyzer. **Nippon Shokakibyo Gakkai Zasshi**, v. 91, n. 3, p.267-278, Mar. 1994.
- SIDDIQUI, M. S.; SOOMRO, I. N.; KAYANI, N.; MUZAFFAR, S.; HASAN, S. H. Assessment of nucleolar organizer regions (NORs) in proliferative conditions of the liver. **Pathol. Res. Pract.**, v. 195, n.6, p.421-426, 1999.
- SIEGEL, S. & CASTELLAN, N. J. **Non-parametric statistic for the behavioral sciences**, 2. ed., New York: McGraw-Hill, 1988.

- SIITONEN, S. M.; ISOLA, J. J.; RANTALA, I. S.; HELIN, H. J. Intratumor variation in cell proliferation in breast carcinoma as determined by anti-proliferating cell nuclear antigen monoclonal antibody and automated image analysis. **Am. J. Clin. Pathol.**, v. 99, n. 3, p.226-231, 1993.
- SIVRIDIS, E.; SIMS, B. Nucleolar organizer regions: new prognostic variable in breast carcinomas. **J. Clin. Pathol.**, v.43, n.5, p.390-392, Mai. 1990.
- SJÖGREN, S.; INGANAS, M.; NORBERG, T.; LINDGREN, A.; NORDGREN, H.; HOLMBERG, L.; BERGH, J. The p53 gene in breast cancer: prognostic value of complementary DNA sequencing versus immunohistochemistry. **J. Natl. Cancer Inst.**, v.88, n.3-4, p.173-182, Fev. 1996.
- SMALLEY, S. R.; MOERTEL, C. G.; HILTON, J. F.; WEILAND, L. H.; WEIAND, H. S.; ADSON, M. A.; MELTON, L. J. 3RD; BATTS, K. Hepatoma in the noncirrhotic liver. **Cancer**, v.62, n.7, p.1414-1424, Out. 1988.
- SOONG, R.; ROBBINS, P. D.; DIX, B. R.; GRIEU, F.; LIM, B.; KNOWLES, S.; WILLIAMS, K. E.; TURBETT, G. R.; HOUSE, A. K.; IACOPETTA, B. J. Concordance between p53 protein overexpression and gene mutation in a large series of common human carcinomas. **Hum. Pathol.**, v. 27, n.10, p.1050-1055, Out. 1996.
- SOREIDE, O.; CZERNIAK, A.; BRADPIECE, H.; BLOOM, S.; BLUMGART, L. Characteristics of fibrolamellar carcinoma. **Am. J. Surg.**, v.151, n.4, p.518-523, Abr. 1986.
- STARZL, T. E.; IWATSUKI, S.; SHAW, B. W.; NALESNIK, M. A.; FARHI, D. C.; VAN THIEL, D. H. Treatment of fibrolamellar hepatoma with partial or total hepatectomy and transplantation of the liver. **Surg. Gynaec. Obst.**, v.162, n.2, p.145-148, Fev. 1986.
- STAVROPOULOS, N. E.; IOACKIM-VELOGIANNI, E.; HASTAZERIS, K.; KITSIOU, E.; STEFANAKI, S.; AGNANTIS, N. Growth fractions in bladder cancer defined by Ki-67: association with cancer grade category and recurrence rate of superficial lesions. **Br. J. Urol.**, v.2, n.5 pt 2, p.736-739, Nov. 1993.

- STEFANO, D. D.; MINGAZZINI, P. L.; SCUCCHI, L.; DONNETTI, M.; MARINOZZI, V. A comparative study of histopathology, hormone receptors, peanut lectin binding, Ki-67 immunostaining, and nucleolar organizer region associated proteins in human breast cancer. **Cancer**, v.67, n.2, p.463-471, Jan. 1991.
- STEVENS, W. R.; JOHNSON, C. D.; STEPHENS, D. H.; BATTS, K. P. CT findings in hepatocellular carcinoma: correlation of tumor characteristics with causative factors, tumor size, and histologic tumor grade. **Radiology**, v.191, n.2, p.531-537, Mai. 1994.
- SUEHIRO, T.; TAKASHI, M.; ITASAKA, H.; YAMAMOTO, K.; KAWAHARA, N.; SUGIMACHI, K. Clinicopathologic features and prognosis of resected hepatocellular carcinomas of varied sizes with special reference to proliferating cell nuclear antigen. **Cancer**, v.76, n.3, p.399-405, Ago. 1995.
- SUGIOKA, A.; TSUZUKI, T.; KANAI, T. Postresection prognosis of patients with hepatocellular carcinoma. **Surgery**, v.113, n.6, p.612-618, Jun. 1993.
- SUZUKI, T.; TAKANO, Y. Comparative immunohistochemical studies of p53 and proliferating cell nuclear antigen expression and argyrophilic nucleolar organizer regions in pancreatic duct cell carcinomas. **Jpn. J. Cancer Res.**, v.84, n.10, p.1072-1077, Out. 1993.
- TAKAGI, S.; CHEN, K. N.; SCHWARZ, R.; IWATSUKI, S.; HERBERMAN, R. B.; WHITESIDE, T. L. Functional and phenotypic analysis of tumor-infiltrating lymphocytes isolated from human primary and metastatic liver tumors and cultured in recombinant interleukin-2. **Cancer**, v.63, n.1, p.102-111, Jan. 1989.
- TANAI, M.; TOMIMATSU, M.; OKUDA, H.; SAITO, A.; OBATA, H. Immunohistochemical detection of proliferating cell nuclear antigen in hepatocellular carcinoma: relationship to histological grade. **J. Gastroenterol. Hepatol.**, v.8, n.5, p.420-425, Set-Out. 1993.
- TANAKA, T.; TAKEUCHI, T.; NISHIKAWA, A.; TAKAMI, T.; MORI, H. Nucleolar organizer regions in hepatocarcinogenesis induced by N-2-fluorenylacetamide in rats: comparison with bromodeoxyuridine immunohistochemistry. **Jpn. J. Cancer Res.**, v.80, n.11, p.1047-1051, Nov. 1989.

- TANNAPFEL, A.; GEISSLER, F.; KÖCKERLING, F.; KATALINIC, A.; HAUSS, J.; WITTEKIND, C. Apoptosis and proliferation in relation to histopathological variables and prognosis in hepatocellular carcinoma. **J. Pathol.**, v.187, n.4, p.439-445, Mar. 1999.
- TARAO, K.; OHKAWA, S.; SHIMIZU, A.; HARADA, M.; NAKAMURA, Y.; ITO, Y.; TAMAI, S.; HOSHINO, H.; OKAMOTO, N.; IIMORI, K.; INOUE, T.; KANISAWA, M. The male preponderance in incidence of hepatocellular carcinoma in cirrhotic patients may depend on the higher DNA synthetic activity of cirrhotic tissue in men. **Cancer**, v.72, n.2, p.369-374, Jul. 1993.
- TARAO, K.; SHIMIZU, A.; HARADA, M.; KUNI, Y.; ITO, Y.; TAMAI, S.; IIMORI, K.; SUGIMASA, Y.; TAKEMIYA, S.; OKAMOTO, T. Difference in the vitro uptake of bromodeoxyuridine between liver cirrhosis with and without hepatocellular carcinoma. **Cancer**, v.64, n.1, p.104-109, Jul. 1989.
- TARAO, K.; SHIMIZU, A.; HARADA, M.; OHKAWA, S.; OKAMOTO, N.; KUNI, Y.; ITO, Y.; TAMAI, S.; IIMORI, K.; SUGIMASA, I.; TAKEMIYA, S.; OKAMOTO, T.; INOUE, T.; KANISAWA, M. In vitro uptake of bromodeoxyuridine by human hepatocellular carcinoma and its relationship to histologic findings and biological behavior. **Cancer**, v. 68, n. 8, p.1789-1794, Out. 1991
- TERADA, T.; NAKAMURA, Y. Cell proliferative activity in adenomatous hyperplasia of the liver and small hepatocellular carcinoma: an immunohistochemical study demonstrating proliferating cell nuclear antigen. **Cancer**, v.70, n.3, p.591-598, Ago. 1992.
- TERAMOTO, T.; SATONAKA, K.; KITAZAWA, S.; FUJIMORI, T.; HAYASHI, K.; MAEDA, S. p53 gene abnormalities are closely related to hepatoviral infections and occur at a late stage of hepatocarcinogenesis. **Cancer Res.**, v.54, n.1, p.231-235, Jan. 1994.
- TERASAKI, T.; TERADA, T.; NAKANUMA, Y.; NONOMURA, A.; UNOURA, M.; KOBAYASHI, K. Argyrophilic nucleolar organizer regions and alpha-fetoprotein in adenomatous hyperplasia in human cirrhotic livers. **Am. J. Clin. Pathol.**, v. 95, n. 6, p. 850-857, Jun. 1990.

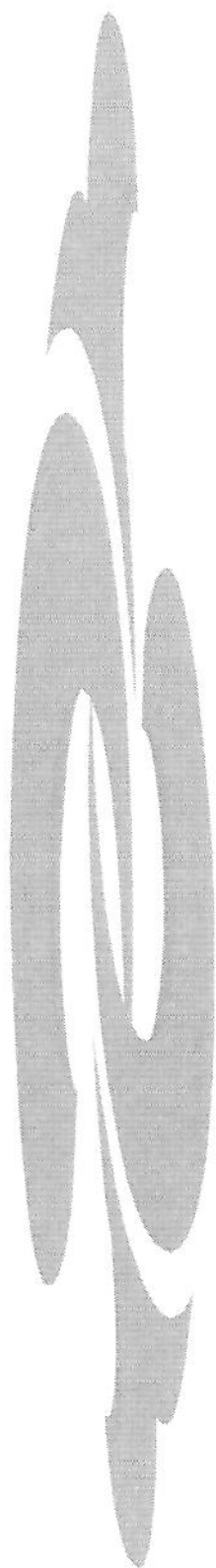
- THE LIVER CANCER STUDY GROUP OF JAPAN. Predictive factors for long term prognosis after partial hepatectomy for patients with hepatocellular carcinoma in Japan. **Cancer**, v.74, n.10, p.2772-2780, Nov. 1994.
- THE LIVER CANCER STUDY GROUP OF JAPAN. Primary liver cancer in Japan: clinicopathologic features and results of surgical treatment. **Ann. Surg.**, v.211, n.3, p.277-287, Mar. 1990.
- THE LIVER CANCER STUDY GROUP OF JAPAN. Primary liver cancer in Japan:sixth report. **Cancer**, v.60, n.6, p.1400-1411, Nov. 1987.
- THE LIVER CANCER STUDY GROUP OF JAPAN. The general rules for the clinical and pathological study of primary liver cancer. **Jpn. J. Surg.**, v.19, n.1, p.98-129, Jan. 1989.
- TOIKKANEN, S.; JOENSUU, H. AgNOR counts have no prognostic value in breast cancer. **J. Pathol.**, v.169, n.2, p.251-254, Fev. 1993.
- TORII, A.; NONAMI, T.; HARADA, A.; YASUI, M.; NAKAO, A.; TAKAGI, H. Extent of hepatic resection as a prognostic factor for small, solitary hepatocellular carcinomas. **J. Surg.Oncol.**, v. 54, n.1, p.13-17, Set. 1993.
- TOSCHI, L.; BRAVO, R. Changes in Cyclin / proliferating cell nuclear antigen distribution during DNA repair synthesis. **J. Cell. Biol.**, v.107, n.5, p. 1623-1628, Nov. 1988.
- TRERÈ, D.; CECCARELLI, C.; DANOVA, M.; DERENZINI, M. In vivo bromodeoxyuridine labelling index, AgNOR protein expression and DNA content in human tumours. **Eur. J. Histochem.**, v.40, n.1, p.17-26, 1996a
- TRERÈ, D.; FARABEGOLI, F.; CANCELLIERI, A.; CECCARELLI, C.; EUSEBI, V.; DERENZINI, M. AgNOR area in interphase nuclei of human tumours correlates with the proliferative activity evaluated by bromodeoxyuridine labelling and Ki-67 immunostaining. **J. Pathol**, v.165, p. 53-59, 1991.

- TREERÈ, D.; GRAMANTIERI, L.; SIRINGO, S.; MELCHIORRI, C.; BARBARA, L.; BOLONDI, L.; DERENZINI, M. In hepatocellular carcinoma AgNOR protein expression correlates with tumour mass doubling time. **J Hepatol.**, v. 24, n. 1, p.60-65, Jan. 1996b.
- TREVISAN, M.; GOES, J. R.; COY, C. The diagnostic value of Ag-NOR technique in colorectal cancer. **Arq. Gastroenterol.**, v. 35, n. 2, p. 89-94, Abr-Jun. 1998.
- TSAI, J. F.; CHANG, W. Y.; JENG, J. E.; HO, M. S.; LIN, Z. Y.; TSAI, J. H. Hepatitis B and C virus infection as risk factors for liver cirrhosis and cirrhotic hepatocellular carcinoma: a case-control study. **Liver**, v.14, n.2, p.98-102, Abr. 1994.
- TSUKUMA, H.; HIYAMA, T.; TANKA, S.; NAKAO, M.; YABUUCHI, T.; NAKANISHI, K.; FUJIMOTO, I.; INOUE, A.; YAMAZAKI, K.; KAWASHIMA, T. Risk factor of hepatocellular carcinoma among patients with chronic liver disease. **N. Engl. J. Med.**, v.328, n.25, p.1797-1801, Jun. 1993.
- UOZUMI, N.; TESHIMA, T.; YAMAMOTO, T.; NISHIKAWA, A.; GAO, Y. E.; MIYOSHI, E.; GAO, C. X.; NODA, K.; ISLAM, K. N.; IHARA, Y.; FUJII, S.; SHIBA, T.; TANIGUCHI, N. A fluorescent assay method for GDP-L-Fuc:N-acetyl-beta-D-glucosaminide alpha 1-6fucosyltransferase activity, involving high performance liquid chromatography. **J. Biochem. (Tokyo)**, v. 120, n.2, p.385-392, Ago. 1996a.
- UOZUMI, N.; TESHIMA, T.; YAMAMOTO, T.; NISHIKAWA, A.; GAO, Y. E.; MIYOSHI, E.; GAO, C. X.; NODA, K.; ISLAM, K. N.; IHARA, Y.; FUJII, S.; SHIBA, T.; TANIGUCHI, N. Purification and cDNA cloning of porcine brain GDP-L-Fuc:N-acetyl-beta-D-glucosaminide alpha 1-6fucosyltransferase. **J. Biol. Chem.**, v.271, n.2, p.27810-27817, Ago. 1996b.
- VAN DIERENDONCK, J. H.; WIJSMAN, J. H.; KEIJZER, R.; VAN DE VELDE, C. J. H.; CORNELISSE, C. J. Cell-cycle-related staining patterns of the anti-proliferating cell nuclear antigen monoclonal antibodies: comparison with BrdUrd labelling na Ki-67 staining. **Am. J. Pathol.**, v.138, n.5, p.1165-1172, Mai. 1991.

- VAN RENSBURG, S. J.; COOK-MOZAFFARI, P.; VAN SCHALKWYK, D. J.; VAN DER WATT, J. J.; VINCENT, T. J.; PURCHASE, I. F. Hepatocellular carcinoma and dietary aflatoxin in Mozambique and Transkei. **Br. J. Cancer**, v.51, n.5, p.713-26, Mai. 1985.
- VAUTHEY, J. N.; KLIMSTRA, D.; BLUMGART, L. H. A simplified staging system for hepatocellular carcinomas. **Gastroenterology**, v.108, n.2, p.617-618, Fev. 1995.
- VESALAINEN, S.; LIPPONEN, P.; TALJA, M.; KASURINEN, J.; SYRJANEN, K. Nuclear morphometry is of independent prognostic value only in T1 prostatic adenocarcinomas. **Prostate**, v.27, n.2, p.110-117, Ago. 1995.
- WAKABAYASHI, M.; SHIRO, T.; SEKI, T.; NAKAGAWA, T.; ITOH, T.; IMAMURA, M.; SHIOZAKI, Y.; INOUE, K.; OKAMURA, A. Lewis Y antigen expression in hepatocellular carcinoma: an immunohistochemical study. **Cancer**, v.75, n.12, p.2827-2835, Jun. 1995.
- WEISS, D. J. Factor analysis and counselling research. **J. Counsel Psychol.**, v.17, p.477-485, 1970.
- WEISS, D. J. Further considerations in applications of factor analysis. **J. Counsel Psychol.**, v. 18, p.85-92, 1971.
- WELLS, S. J.; DEROSE, P. B.; COHEN, C. Image cytometric comparison of proliferating cell nuclear antigen and MIB-1 staining in hepatocellular carcinoma and adjacent liver tissue. **Cytometry**, v. 26, n. 3, p. 198-203, Set. 1996.
- WILLIAMS, R. A.; RODE, J.; DHILLION, A. P.; JARVIS, L. R.; SKINNER, J. M.; JAMAL, O. Measuring S100 protein and neurone specific enolase in melanocytic tumours using video image analysis. **J. Clin. Pathol.**, v. 39, n. 10, p.1096-1098, Out. 1986
- WINTZER, H. O.; ZIPFEL, I.; SCULTE-MONTING, J.; HELLERICH, U.; VON KLEIST, S. Ki-67 immunostaining in human breast tumors and its relationship to prognosis. **Cancer**, v. 67, n. 2, p.421-428, Jan. 1991.

- WOOD, W.; RAWLINGS, M.; EVANS, H.; LIM, C. N. H. Hepatocellular carcinoma: importance of histologic classification as a prognostic factor. **Am. J. Surg.**, v.155, n.5, p.663-666, Mai. 1988.
- WU, J. D.; TSENG, H. H. The expression of proliferating cell nuclear antigen in hepatocellular carcinoma. **Zhonghua. Yi. Xue. Za. Zhi. (Taipei)**, v. 53, n.4, p.198-203, Abr. 1994.
- YAMAGUCHI, A.; TSUKIOKA, Y.; KUROSAKA, Y.; NISHIMURA, G.; KANNO, M.; YONEMURA, Y.; MIYAZAKI, I. Prognostic value of nucleolar organizer regions in endoscopically biopsied tissues of colorectal cancers. **Oncology**, v.50, n.2, p.121-126, Mar-Abr. 1993.
- YAMANAKA, N.; OKAMOTO, E.; KUWATA, K.; TANAKA, N. A multiple regression equation for prediction of posthepatectomy liver failure. **Ann. Surg.**, v. 200, n. 5, p.658-663, Nov. 1984.
- YAMASHITA, F.; TANAKA, M.; SATOMURA, S.; TANIKAWA, K. Prognostic significance of Lens culinaris agglutinin A-reactive alpha-fetoprotein in small hepatocellular carcinomas. **Gastroenterology**, v.111, n.4, p.996-1001, Out. 1996.
- YOKOYAMA, I.; TODO, S.; IWATSUKI, S.; STARZL, T. E. Liver transplantation in the treatment of primary liver cancer. **Hepatogastroenterology**, v.37, n.2, p.188-193, Abr. 1990.
- YONEMURA, Y.; KIMURA, H.; FUSHIDA, S.; TUGAWA, K.; NAKAI, Y.; KAJI, M.; FONSECA, L.; YAMAGUCHI, A.; MIYAZAKI, I. Analysis of proliferative activity using anti-proliferating cell nuclear antigen antibody in gastric cancer tissue specimens obtained by endoscopy biopsy. **Cancer**, v.71, n.8, p.:2448-2453, Abr. 1993.
- YU, C. C.; HALL, P. A.; FLETCHER, C. D. M.; CAMPLEJOHN, R. S.; WASSEM, N. H.; LANE, D. P.; LEVISON, D. A. Haemangiopericytomas: the prognostic value of immunohistochemical staining with a monoclonal antibody to proliferating cell nuclear antigen (PCNA). **Histopathology**, v.19, n.1, p.29-33, Jul. 1991.

- YUKI, K.; HIROHASHI, S.; SAKAMOTO, M.; KANAI, T.; SHIMOSATO, Y. Growth and spread of hepatocellular carcinoma. A review of 240 consecutive autopsy cases. **Cancer**, v.66, n.10, p.2174-2179, Nov. 1990.
- ZACZEK, M. Study of silver binding nucleolar organizer regions (AgNORs) in proliferative lesions of bronchi, colon and thyroid: semiautomatic computer image analysis. **Folia Med. Cracov.**, v. 37, n.1-2, p.67-88. 1996.
- ZACZEK, M.; DABROS, E.; SZOT, W.; CHLAP, Z. Silver-binding nucleolar organizer regions (AgNORs) in tumors of colon. **Pol. J. Pathol.**, v. 47, n. 4, p.195-200. 1996a.
- ZACZEK, M.; SZOT, W.; CHLAP, Z. Argyrophilic nucleolar organizer regions in proliferative lesions of the thyroid gland. **Anal. Quant. Cytol. Histol.**, v. 18, n.1, p.1-8, Fev. 1996b.
- ZALATNAI, A.; LAPIS, K.; FEHÉR, I. The nucleolar organizer regions in hyperplastic and tumourous lesions of the human liver. **Pathol. Res. Pract.**, v.189, n.5, p.536-541, Jun. 1993.
- ZIMMER, C.; GOTTSCHALK, J.; CERVOS-NAVARRO, J.; MARTIN, H.; BEIL, M.; JAUTZKE, G. Proliferative cell nuclear antigen (PCNA) in atypical and malignant meningiomas. **Path. Res. Pract.**, v.188, n.8, p.951-958, Dez. 1992.
- ZOLI, M.; MAGALOTTI, D.; BIANCHI, G.; GUELI, C.; MARCHESINI, G.; PISI, E. Efficacy of a surveillance program for early detection of hepatocellular carcinoma. **Cancer**, v.78, n.5, p.977-985, Set. 1996.



9. ANEXOS

Anexo A – Estadiamento do Carcinoma Hepatocelular segundo Okuda *et al.* (1985)

	Tamanho do tumor		Albumina		Bilirrubina		Ascite	
	>50%	<50%	<3 g/dl	>3 g/dl	>3 mg/dl	<3 mg/dl	(+)	(-)
Estágio	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)
I		(-)		(-)		(-)		(-)
II			1 ou 2 (+)					
III			3 ou 4 (+)					

(+): sinal de doença avançada

Anexo B - Dados clínicos dos pacientes.

Casos	HC	Sexo	Data de Nascimento	Idade
Paciente 1	6205141	M	26/05/1932	65,5
Paciente 2	6301159	F	11/08/1982	16,17
Paciente 3	5467601	M	22/11/1946	51,42
Paciente 4	6266799	M	22/07/1947	50,5
Paciente 5	4028185	F	18/03/1972	21,25
Paciente 6	3280904	M	04/10/1931	61,75
Paciente 7	4402632	M	02/07/1977	16,66
Paciente 8	4199465	M	04/11/1924	69,42
Paciente 9	4420020	M	05/06/1915	78,83
Paciente 10	4016645	F	08/03/1920	76,17
Paciente 11	5594543	M	11/03/1915	81,42
Paciente 12	5915709	M	21/06/1932	65
Paciente 13	5882998	F	23/06/1931	65,83
Paciente 14	6319772	M	03/09/1922	75,83
Paciente 15	3834979	M	14/01/1923	73,66
Paciente 16	5075763	M	02/07/1941	54,25
Paciente 17	1405425	M	08/07/1964	34,25
Paciente 18	5427849	M	07/02/1972	24,17
Paciente 19	5742251	M	02/09/1938	58,25
Paciente 20	5865910	M	13/03/1947	50,08
Paciente 21	5776006	M	11/09/1943	53,83
Paciente 22	6356663	M	12/03/1958	40,17
Paciente 23	6603173	M	04/08/1927	72,5
Paciente 24	6190241	F	29/07/1932	66,42
Paciente 25	3573054	M	18/10/1926	67,5
Paciente 26	5195343	M	16/03/1934	61,75
Paciente 27	5345702	M	29/06/1940	55,58
Paciente 28	6085155	M	25/01/1983	14,58
Paciente 29	6149781	M	27/08/1936	62,17
Paciente30	4178510	F	11/06/1908	85,33
Paciente 31	5408223	M	25/03/1944	52,25
Paciente 32	5596818	M	28/04/1941	57
Paciente 33	5609734	M	24/06/1959	37,25
Paciente 34	3905718	M	24/07/1963	29

HC = registro no Hospital de Clínicas da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas; (M = sexo masculino, F = sexo feminino)

Anexo C - Dados clínicos dos pacientes.

Casos	Data da coleta	Data do óbito	Óbito	Data do diagnóstico	Tamanho do tumor (cm)
Paciente 1	22/12/97	15/02/99	1	10/11/97	-
Paciente 2	28/10/98	-	0	18/05/98	1,3
Paciente 3	29/04/98	-	0	09/05/96	1,8
Paciente 4	13/02/98	-	0	09/02/98	9,2
Paciente 5	24/05/93	08/06/96	1	24/06/93	-
Paciente 6	09/07/93	09/07/93	1	06/11/91	5,0
Paciente 7	25/03/94	15/04/96	1	23/06/94	20,0
Paciente 8	15/04/94	09/11/97	1	25/03/94	-
Paciente 9	20/04/94	03/07/94	1	05/11/93	12,7
Paciente 10	27/05/96	-	-	08/05/96	7,0
Paciente 11	21/08/96	-	-	21/08/96	-
Paciente 12	14/05/97	02/11/98	1	30/04/97	18,0
Paciente 13	21/05/97	24/06/97	1	01/02/97	4,5
Paciente 14	23/06/98	12/12/98	1	23/06/98	-
Paciente 15	25/09/96	09/12/96	1	25/09/96	-
Paciente 16	16/10/95	24/09/96	1	16/10/95	-
Paciente 17	04/12/96	-	0	04/12/96	-
Paciente 18	16/04/96	05/06/97	1	29/03/96	12,0
Paciente 19	06/03/97	-	0	06/03/97	15,0
Paciente 20	16/04/97	-	0	27/01/97	3,1
Paciente 21	09/06/97	-	0	09/06/97	-
Paciente 22	25/05/98	26/06/98	1	24/03/98	8,0
Paciente 23	12/01/99	-	0	23/11/98	-
Paciente 24	21/12/98	-	0	28/11/98	-
Paciente 25	02/05/94	21/10/94	1	04/05/92	3,2
Paciente 26	13/12/95	16/04/99	-	01/07/95	10,0
Paciente 27	28/02/96	16/07/96	1	13/02/96	5,8
Paciente 28	18/09/97	26/04/98	1	05/09/97	-
Paciente 29	19/10/98	-	0	19/10/98	-
Paciente30	03/11/93	13/02/95	1	02/11/93	3,0
Paciente 31	03/07/96	04/07/96	1	04/01/96	4,7
Paciente 32	27/10/98	-	0	14/08/98	5,4
Paciente 33	30/08/96	27/09/96	1	16/08/96	7,0
Paciente 34	11/03/93	25/04/93	1	08/03/93	9,1

Óbito (1 = em ocorrendo falecimento do paciente; 0 = paciente vivo em 16/4/1999; - = dado não pode ser analisado); tamanho do tumor = tamanho tumoral à macroscopia ou calculado por ultrassom ou tomografia computadorizada (- = dado não pode ser analisado)

Anexo D - Padrão histológico primário e secundário e graduação histológica de Edmondson-Steiner clássica (1954) e modificada (1995).

Casos	P. Primário	P. Secundário	E-S	E-S Modificado
Paciente 1	T	T	1	1
Paciente 2	T	T	1	2
Paciente 3	T	T	1	2
Paciente 4	T	T	1	2
Paciente 5	T	PG	2	2
Paciente 6	T	PG	2	2
Paciente 7	T	PG	2	1
Paciente 8	T	T	2	1
Paciente 9	T	PG	2	2
Paciente 10	T	T	2	3
Paciente 11	T	T	2	1
Paciente 12	PG	T	2	2
Paciente 13	T	PG	2	3
Paciente 14	T	T	2	3
Paciente 15	T	T	2	2
Paciente 16	T	T	2	3
Paciente 17	T	T	2	3
Paciente 18	T	T	2	3
Paciente 19	T	T	2	3
Paciente 20	T	PG	2	3
Paciente 21	T	PG	2	3
Paciente 22	T	T	2	3
Paciente 23	T	T	2	2
Paciente 24	T	T	2	3
Paciente 25	T	T	3	4
Paciente 26	T	T	3	3
Paciente 27	T	T	3	4
Paciente 28	T	T	3	3
Paciente 29	T	T	3	3
Paciente30	T	T	3	4
Paciente 31	T	T	3	3
Paciente 32	T	T	4	4
Paciente 33	T	T	4	3
Paciente 34	T	T	4	3

P. Primário = padrão histológico (O. M. S.) predominante (T = trabecular, PG = pseudo-glandular); P. Secundário = padrão histológico (O. M. S.) secundário (T = trabecular, PG = pseudo-glandular); E-S = graduação de EDMONDSON-STEINER (1954) e E-S mod = graduação de EDMONDSON-STEINER modificada por NZEAKO *et al.*, 1995.

Anexo E - Parâmetros AgNORs

Casos	AreaNuclear _MEAN	AreaNuclear _CV	area AgNOR _MEAN	area AgNOR _CV
Paciente 1	23,140249	0,227077	6,071850	0,403791
Paciente 2	35,882252	0,358312	5,546550	0,420828
Paciente 3	38,179451	0,327428	7,924950	0,420452
Paciente 4	37,366650	0,246186	5,439800	0,477095
Paciente 5	62,437950	0,334221	5,182200	0,393636
Paciente 6	34,515652	0,324618	6,116300	0,402570
Paciente 7	32,888100	0,303152	6,310800	0,459324
Paciente 8	36,120800	0,460699	4,289300	0,614968
Paciente 9	31,180201	0,249300	7,262250	0,374607
Paciente 10	33,637249	0,346370	5,780200	0,487350
Paciente 11	26,512100	0,344375	4,178150	0,560344
Paciente 12	20,955050	0,242442	4,373000	0,429343
Paciente 13	39,452099	0,202582	3,531350	0,320350
Paciente 14	42,659698	0,472595	9,524800	0,557500
Paciente 15	24,368999	0,292140	4,054200	0,429745
Paciente 16	52,007801	0,411854	4,962700	0,592374
Paciente 17	45,440948	0,304534	6,584050	0,508731
Paciente 18	34,144150	0,403050	4,222100	0,563620
Paciente 19	48,726002	0,395387	2,661800	0,594943
Paciente 20	19,130449	0,253073	2,077500	0,350367
Paciente 21	26,704451	0,261261	9,706200	0,389122
Paciente 22	49,086601	0,615994	9,524800	0,689086
Paciente 23	22,676300	0,334221	3,076450	0,393636
Paciente 24	35,304249	0,395387	4,340150	0,594943
Paciente 25	54,934052	0,372095	8,901698	0,512391
Paciente 26	37,146648	0,381459	4,412450	0,619192
Paciente 27	53,079300	0,523595	6,351900	0,646915
Paciente 28	51,133999	0,283814	3,500050	0,478029
Paciente 29	31,127451	0,248600	4,773000	0,359721
Paciente30	75,221550	0,441142	2,811550	0,485184
Paciente 31	36,327950	0,380857	4,861950	0,451192
Paciente 32	59,249249	0,469110	6,783650	0,668777
Paciente 33	53,040550	0,401005	6,600050	0,516276
Paciente 34	29,561199	0,303152	2,811550	0,459324

AreaNuclear_MEAN = média de área nuclear em micrômetros²; AreaNuclear_CV = coeficiente de variância da área nuclear; area AgNOR_MEAN = área total de AgNORs em micrômetros²; area AgNOR_CV = coeficiente de variância da área total de AgNORs

Anexo F – Parâmetros AgNOR

Casos	%area AgNOR _MEAN	%area AgNOR _CV	n AgNOR _MEAN	n AgNOR _CV	%TAAG>7
Paciente 1	13,598200	0,334568	1,390	0,460628	0,000
Paciente 2	13,759950	0,334987	1,430	0,503151	0,115
Paciente 3	14,272750	0,365853	2,155	0,540710	0,230
Paciente 4	17,864901	0,375698	1,390	0,533856	0,475
Paciente 5	23,268400	0,318621	1,440	0,555381	0,920
Paciente 6	15,205900	0,294988	1,810	0,474139	0,140
Paciente 7	18,542700	0,352388	1,290	0,442998	0,305
Paciente 8	17,095249	0,394548	1,350	0,496765	0,390
Paciente 9	13,984150	0,328334	1,485	0,486709	0,040
Paciente 10	12,525850	0,347708	1,735	0,534213	0,120
Paciente 11	17,951000	0,366833	1,315	0,448290	0,175
Paciente 12	10,057450	0,360377	1,185	0,388400	0,005
Paciente 13	11,235250	0,299754	1,435	0,461177	0,025
Paciente 14	22,911751	0,415148	1,315	0,448290	0,685
Paciente 15	18,216400	0,319237	1,360	0,417249	0,090
Paciente 16	14,379600	0,378110	2,005	0,527967	0,500
Paciente 17	8,904350	0,430345	2,030	0,522429	0,105
Paciente 18	18,787849	0,451432	2,000	0,523326	0,365
Paciente 19	12,363200	0,370506	1,430	0,536250	0,300
Paciente 20	14,007550	0,279433	1,350	0,418433	0,005
Paciente 21	13,270450	0,318989	1,345	0,503312	0,010
Paciente 22	16,207600	0,421747	1,720	0,518577	0,470
Paciente 23	13,524200	0,318621	1,515	0,555381	0,010
Paciente 24	12,556750	0,370506	1,670	0,536250	0,075
Paciente 25	13,357100	0,396083	2,475	0,516125	0,485
Paciente 26	13,023900	0,462570	2,045	0,544343	0,210
Paciente 27	13,042300	0,457935	2,070	0,675443	0,350
Paciente 28	19,048901	0,410788	1,510	0,509919	0,745
Paciente 29	11,375100	0,320683	1,550	0,417912	0,005
Paciente30	15,447500	0,385304	1,895	0,611017	0,815
Paciente 31	8,267000	0,343765	1,815	0,509471	0,020
Paciente 32	9,566350	0,469071	2,205	0,502840	0,235
Paciente 33	12,704400	0,398178	1,655	0,576566	0,410
Paciente 34	9,697550	0,352388	2,640	0,442998	0,015

%area AgNOR_MEAN = média da relação da área total de AgNORs por área nuclear; %area AgNOR_CV = coeficiente de variância da relação da área total de AgNORs por área nuclear; n AgNOR_MEAN = média do número de AgNORS por núcleo; n AgNOR_CV = coeficiente de variância da média do número de AgNORS por núcleo; %TAAG $\geq$ 7 = percentagem de núcleos com área total de AgNORs maior ou igual a 7 micrômetros².

Anexo G- Correlações entre as variáveis (Teste de Spearman)

	Idade	Padrão	E-S Mod	E-S	A.Nuclear _MEAN	A.Nuclear _CV
Padrão	0,07985 (0,6535)					
E-S Mod	-0,0665 (0,7087)	-0,1711 (0,3333)				
E-S	-0,0089 (0,9603)	-0,06 (0,736)	0,59737 (1,91E-04)			
A. Nuclear _MEAN	-0,1931 (0,2738)	-0,275 (0,1154)	0,46143 (0,006)	0,35413 (0,03988)		
A. Nuclear _CV	0,04829 (0,7862)	-0,2573 (0,1417)	0,36773 (0,0324)	0,31275 (0,0717)	0,58286 (2,98E-04)	
area AgNOR _MEAN	-0,0885 (0,3094)	-0,0799 (0,3267)	-0,0596 (0,369)	-0,1044 (0,27831)	0,26986 (0,0613)	0,17355 (0,1631)
area AgNOR _CV	0,01253 (0,9439)	-0,0976 (0,5829)	0,28573 (0,10138)	0,2931 (0,0925)	0,49423 (0,003)	0,80739 (7,94E-09)
%area AgNOR _MEAN	-0,06081 (0,7326)	-0,22179 (0,2074)	-0,37545 (0,0287)	-0,35981 (0,0366)	0,05393 (0,7619)	0,10407 (0,558)
%area AgNOR _CV	-0,122 (0,492)	-0,0266 (0,8812)	0,37484 (0,0289)	0,36033 (0,0363)	0,58195 (3,06E-04)	0,66096 (2,09E-05)

Idade = idade do paciente; Padrão = padrão histológico (O.M.S.); E-S Mod = graduação histológica de Edmondson-Steiner modificada (1995); E-S = graduação histológica de Edmondson-Steiner (1954); A.Nuclear_MEAN = média de área nuclear em micrômetros²; A.Nuclear_CV = coeficiente de variância da área nuclear; area AgNOR_MEAN = área total de AgNORs em micrômetros²; area AgNOR_CV = coeficiente de variância da área total de AgNORs; %area AgNOR_MEAN = média da relação da área total de AgNORs por área nuclear; %area AgNOR_CV = coeficiente de variância da relação da área total de AgNORs por área nuclear; (nível de significância).

Anexo H - Correlações entre as variáveis (Teste de Spearman)

	Idade	Padrão	E-S Mod	E-S	A.Nuclear _MEAN	A.Nuclear _CV
n AgNOR	-0,1414	-0,2929	0,51879	0,48679	0,48891	0,3905
_MEAN	(0,4251)	(0,0928)	(1,67E-03)	(0,003)	(0,003)	(0,0224)
n AgNOR	-0,0997	-0,2929	0,32892	0,11075	0,6069	0,50783
_ CV	(0,575)	(0,0928)	(0,0575)	(0,5329)	(1,42E-04)	(0,0022)
Tamanho tumoral	-0,0689	0,33245	-0,252	0,01354	-0,3566	-0,1189
	(0,7667)	(0,1409)	(0,27036)	(0,95352)	(0,11254)	(0,6077)
RI	-0,048	-0,1863	0,53943	0,47975	0,21711	0,27477
	(0,7876)	(0,2914)	(9,94E-04)	(0,002)	(0,2174)	(0,1158)
%TAAG≥7	-0,1616	-0,2574	0,17332	0,14567	0,79434	0,59463
	(0,3613)	(0,1417)	(0,3269)	(0,41104)	(2,05E-08)	(2,08E-04)
PCNA-i	-0,0432	-0,1155	0,25867	0,09406	-0,1568	0,18305
	(0,8085)	(0,5153)	(0,1396)	(0,5967)	(0,3757)	(0,3001)
AgNORsize	-0,0475	0,13308	-0,4219	-0,3962	-0,0202	-0,1097
_MEAN	(0,7896)	(0,453)	(0,0129)	(0,0203)	(0,9098)	(0,5367)

Idade = idade do paciente; Padrão = padrão histológico (O.M.S.); E-S mod = graduação histológica de Edmondson-Steiner modificada (1995); E-S = graduação histológica de Edmondson-Steiner (1954); A.Nuclear_MEAN = média de área nuclear em micrômetros²; A.Nuclear_CV = coeficiente de variância da área nuclear; n AgNOR_MEAN = média do número de AgNORS por núcleo; n AgNOR_CV = coeficiente de variância da média do número de AgNORS por núcleo; Tamanho tumoral = medida do maior eixo do CHC à macroscopia ou por ultrassonografia e/ou tomografia computadorizada; RI = índice de Rüschoff; %TAAG≥7 = percentagem de núcleos com área total de AgNORS maior ou igual a 7 micrômetros²; PCNA-i = percentual de núcleos corados para PCNA por total de núcleos examinados em “hot spots”; AgNORsize_MEAN = tamanho médio de cada AgNOR por núcleo; (nível de significância).

Anexo I - Correlações entre as variáveis (Teste de Spearman)

	area AgNOR _MEAN	area AgNOR _CV	%area AgNOR _MEAN	%area AgNOR _CV	n AgNOR _MEAN
area AgNOR	0,11364				
_CV	(0,5222)				
%area AgNOR	0,00779	0,02032			
_MEAN	(0,9651)	(0,90916)			
% area AgNOR	0,2353	0,87587	-0,36986		
_CV	(0,18036)	(1,18E-11)	(0,03132)		
n AgNOR	0,13642	0,33134	-0,00947	0,4142	
_MEAN	(0,44168)	(0,05558)	(0,95758)	(0,01486)	
n AgNOR	0,0859	0,38018	0,03702	0,38553	0,49312
_CV	(0,62904)	(0,02654)	(0,8734)	(0,02432)	(0,003)
Tamanho tumor	-0,0747	0,28914	-0,37545	0,21572	-0,3119
	(0,74752)	(0,10181)	(0,02866)	(0,34764)	(0,1687)
RI	-0,5587	0,24054	-0,2987	0,22495	0,66743
	(5,95E-04)	(0,17056)	(0,08616)	(0,20084)	(1,62E-05)
%TAAG≥7	0,17977	0,54892	0,56966	0,58148	0,18912
	(0,30896)	(8,13E-03)	(4,37E-04)	(3,10E-04)	(0,08068)
PCNA-i	-0,3776	0,13836	0,01637	0,0101	0,14204
	(0,0277)	(0,43516)	(0,92676)	(0,95478)	(0,4229)
AgNORsize	0,82738	-0,1059	0,21957	-0,0293	-0,3748
_MEAN	(1,60E-09)	(0,55106)	(0,21212)	(0,86914)	(0,02896)

area AgNOR_MEAN = média da área total de AgNORs em micrômetros²; area AgNOR_CV = coeficiente de variância da área total de AgNORs; %area AgNOR_MEAN = média da relação da área total de AgNORs por área nuclear; %area AgNOR_CV = coeficiente de variância da relação da área total de AgNORs por área nuclear; n AgNOR_MEAN = média do número de AgNORS por núcleo; n AgNOR_CV = coeficiente de variância da média do número de AgNORS por núcleo; Tamanho tumoral = medida do maior eixo do CHC à macroscopia ou por ultrassonografia e/ou tomografia computadorizada; RI = índice de Rüschoff; %TAAG≥7 = percentagem de núcleos com área total de AgNORs maior ou igual a 7 micrômetros²; PCNA-i = percentual de núcleos corados para PCNA por total de núcleos examinados em “hot spots”; AgNORsize_MEAN = tamanho médio de cada AgNOR por núcleo; (nível de significância).

Anexo J – Correlação de Spearman

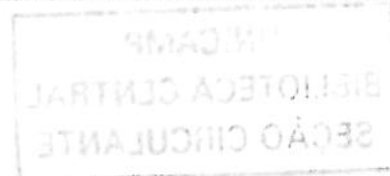
	n AgNOR _CV	Tamanho tumoral	RI	%TAAG≥7	PCNA-i
Tamanho tumoral	-0,1384 (0,54964)				
RI	0,34601 (0,045)	-0,267 (0,24204)			
%TAAG≥7	0,4904 (0,00322)	0,00584 (0,97992)	0,05013 (0,77826)		
PCNA-i	-0,0052 (0,97668)	0,03095 (0,89402)	0,39036 (0,02246)	-0,0863 (0,6273)	
AgNORsize_ MEAN	-0,1719 (0,33106)	0,20071 (0,38298)	-0,9056 (1,83E-13)	0,07902 (0,65684)	-0,4541 (0,00698)

n AgNOR_CV = coeficiente de variância da média do número de AgNORS por núcleo; Tamanho tumoral = medida do maior eixo do CHC à macroscopia ou por ultrassonografia e/ou tomografia computadorizada; RI = índice de Rüschoff; %TAAG≥7 = percentagem de núcleos com área total de AgNORS maior ou igual a 7 micrômetros²; PCNA-i = percentual de núcleos corados para PCNA por total de núcleos examinados em “hot spots”; AgNORsize_MEAN = tamanho médio de cada AgNOR por núcleo; (nível de significância).

Anexo L – Relação de casos e número de núcleos contados e positivos para PCNA

Casos	Sexo	PCNA +	n núcleos
Paciente 1	M	0	0
Paciente 2	F	9	312
Paciente 3	M	18	325
Paciente 4	M	18	320
Paciente 5	F	25	204
Paciente 6	M	123	247
Paciente 7	M	44	200
Paciente 8	M	24	218
Paciente 9	M	0	0
Paciente 10	F	54	213
Paciente 11	M	37	204
Paciente 12	M	13	200
Paciente 13	F	5	200
Paciente 14	M	12	163
Paciente 15	M	49	200
Paciente 16	M	17	200
Paciente 17	M	115	200
Paciente 18	M	144	155
Paciente 19	M	24	124
Paciente 20	M	130	220
Paciente 21	M	10	219
Paciente 22	M	50	99
Paciente 23	M	94	200
Paciente 24	F	142	223
Paciente 25	M	0	0
Paciente 26	M	42	200
Paciente 27	M	0	0
Paciente 28	M	19	120
Paciente 29	M	89	302
Paciente30	F	105	212
Paciente 31	M	60	218
Paciente 32	M	53	235
Paciente 33	M	0	0
Paciente 34	M	29	231

PCNA + = número de núcleos corados para PCNA; n núcleos = número de núcleos examinados em "hot spots"; Sexo (M = masculino, F= feminino).



Anexo M – Casos controle

Casos	AreaNuclear _MEAN	area AgNOR _MEAN	% area AgNOR _MEAN	n AgNOR _MEAN
controle 1	38,33 ($\pm$ 10,36)	4,22 ($\pm$ 1,72)	11,13 ($\pm$ 3,80)	1,42 ($\pm$ 0,57)
controle 2	28,52 ($\pm$ 7,94)	3,99 ($\pm$ 1,45)	14,23 ($\pm$ 3,95)	1,2 ($\pm$ 0,45)
controle 3	33,74 ($\pm$ 8,11)	4,05 ($\pm$ 1,44)	12,09 ($\pm$ 3,43)	1,23 ($\pm$ 0,46)
controle 4	32,52 ($\pm$ 9,46)	3,89 ($\pm$ 1,74)	11,97 ($\pm$ 4)	1,365 ($\pm$ 0,53)
controle 5	29,95 ($\pm$ 8,51)	3,61 ($\pm$ 1,31)	12,15 ($\pm$ 3,36)	1,25 ($\pm$ 0,48)
controle 6	32,41 ($\pm$ 7,82)	3,02 ($\pm$ 1,01)	9,48 ($\pm$ 2,69)	1,13 ($\pm$ 0,35)
controle 7	30,93 ($\pm$ 8,62)	3,66 ($\pm$ 1,33)	11,99 ($\pm$ 3,12)	1,34 ($\pm$ 0,55)
controle 8	24,94 ($\pm$ 6,12)	3,51 ($\pm$ 1,16)	14,34 ($\pm$ 4,27)	1,16 ($\pm$ 0,4)
controle 9	32,39 ($\pm$ 9,71)	3,58 ($\pm$ 1,53)	11,27 ($\pm$ 3,84)	1,295 ($\pm$ 0,52)

AreaNuclear_MEAN = média de área nuclear em micrômetros²; area AgNOR_MEAN = média da área total de AgNORs em micrômetros²; %area AgNOR_MEAN = média da relação da área total de AgNORs por área nuclear; n AgNOR_MEAN = média do número de AgNORS por núcleo; (desvio padrão).

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE