

DETECÇÃO IMUNOISTOQUÍMICA DAS ONCOPROTEÍNAS p21^{ras}, c-myc E p53 NO CARCINOMA HEPATOCELULAR E NO TECIDO HEPÁTICO NÃO-NEOPLÁSICO

Vera Lucia Nunes PANNAIN¹, Adriana Caroli BOTTINO¹, Raimunda Telma M. SANTOS², Henrique Sérgio M. COELHO³, Joaquim RIBEIRO-FILHO⁴ e Venâncio A. F. ALVES²

RESUMO - Racional - A hepatocarcinogênese é um processo no qual as alterações genéticas e epigenéticas são bem conhecidas em modelos animais, mas carece de estudos no homem. **Objetivos** - Analisar a frequência das oncoproteínas p21^{ras}, c-myc e p53 no carcinoma hepatocelular e no fígado não-neoplásico. Verificar ainda a associação destas oncoproteínas com os padrões e graus histológicos, assim como com as infecções pelos vírus das hepatites B e C. **Métodos** - Foi analisada por método imunistoquímico a detecção das oncoproteínas p21^{ras}, c-myc e p53 em 47 casos de carcinoma hepatocelular e no tecido não-neoplásico circunjacente ao tumor (40 casos). **Resultados** - As oncoproteínas p21^{ras}, c-myc e p53 foram detectadas, respectivamente, em 44,7%, 53,2% e 36,2% dos casos de carcinoma hepatocelular. A imunoreatividade do p21^{ras} e c-myc mostrou uma associação significativa. Contudo, não houve associação significativa entre a detecção do p21^{ras}, c-myc e p53 com os diferentes graus e padrões histológicos, nem tampouco com as infecções pelos vírus das hepatites B e C. A mesma associação significativa entre o p21^{ras} e c-myc foi encontrada no tecido não-neoplásico dos casos de cirrose em relação aos que não apresentaram cirrose, enquanto que o p53 foi negativo em todos os casos. **Conclusões** - A imunoreatividade das oncoproteínas p21^{ras}, c-myc e p53 corrobora evidências prévias de sua detecção no carcinoma hepatocelular, o que sugere poder haver participação destas proteínas na hepatocarcinogênese humana. A significativa associação entre as proteínas p21^{ras}, c-myc e p53 no carcinoma hepatocelular e na cirrose pode apontar uma interação entre as mesmas, sobretudo na hepatocarcinogênese pela via da cirrose.

DESCRIPTORIOS – Carcinoma hepatocelular. Fígado, patologia. Imunistoquímica. Proteínas de oncogene. Proteína p53. Proteína p21(ras) de oncogene.

INTRODUÇÃO

O carcinoma hepatocelular (CHC) está entre as neoplasias mais frequentes. Estima-se que 1.000.000 de novos casos surjam a cada ano no mundo⁽⁵⁾. Sua frequência varia em diferentes regiões, mostrando-se endêmico na Ásia e em algumas áreas do continente africano, onde fatores risco como a infecção pelo vírus da hepatite B (VHB) e a aflatoxina B1 estão sabidamente implicados. Contudo, além da variação na distribuição mundial decorrente de diferentes fatores de risco, a variação quanto à prevalência dos padrões macro e microscópicos também é encontrada, indicando que possivelmente o CHC seja uma neoplasia cujos mecanismos envolvidos possam diferir mundialmente. A carcinogênese hepática é um complexo processo que passa por acúmulos de alterações genéticas e epigenéticas bem conhecidas em modelos experimentais. A ativação dos oncogenes myc, ras, raf, fos e jun tem sido demonstrada na hepatocarcinogênese química em roedores e em linhagem de células do hepatoma. Todavia, há pouca evidência da sua participação no CHC humano^(3, 9, 26, 32). O

papel do p53 tem sido mais bem documentado^(12, 15, 16, 30), tendo como protótipo a mutação G-T na terceira base do códon 249, em decorrência dos metabólitos liberados pela contaminação dos alimentos pela aflatoxina B1⁽²¹⁾.

Na procura de maior conhecimento sobre a hepatocarcinogênese humana em nosso meio, estudou-se a expressão imunistoquímica das oncoproteínas p-21^{ras}, c-myc e p53 no CHC e no tecido circunjacente não-tumoral, com os objetivos de analisar a sua frequência e de verificar a associação destas oncoproteínas com o grau de diferenciação e padrão microscópico do CHC, assim como com a infecção pelos VHB e vírus da hepatites C (VHC).

MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo foi realizado em 47 casos de CHC provenientes do serviço de Anatomia Patológica do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho da Universidade Federal do Rio de Janeiro, RJ. A seleção dos casos para a inclusão neste estudo teve os seguintes critérios: não haver dúvida quanto ao diagnóstico

¹Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ); ²Laboratório de Imunistoquímica do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP; ³Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina da UFRJ; ⁴Departamento de Cirurgia da Faculdade de Medicina da UFRJ, Rio de Janeiro, RJ. Endereço para correspondência: Dra. Vera Lucia Pannain – Av. Canal de Marapendi, 1400 - bl.2/502 - 22631-050 - Rio de Janeiro, RJ. E-mail: pannain@hucff.ufrj.br

histológico de CHC, haver material disponível nos blocos em parafina, de forma que minimizasse o erro de amostragem e haver preservação do material tanto quanto ao processamento histológico, quanto a áreas representativas de neoplasia viável.

Os espécimes foram provenientes de biopsias (27), peças cirúrgicas (16) e necropsia (4). As informações referentes aos marcadores para os VHB e VHC (HBsAg, anti-HBs, anti-HCV-ELISA) foram obtidas dos prontuários dos pacientes. Na análise dos preparados histológicos foram empregadas as seguintes técnicas: hematoxilina-eosina, ácido periódico de Schiff, tricrômico de Masson e reticulina de Gomori. O tecido hepático não-neoplásico circunjacente ao tumor, foi representativo em 40 casos. Os CHC foram classificados segundo a OMS, quanto aos padrões histológicos⁽⁷⁾. Quando mais de um padrão estava presente, foram classificados como misto. Os graus histológicos foram agrupados como CHC bem diferenciados (graus I e II) e CHC pouco diferenciados (graus III e IV).

A pesquisa imunohistoquímica foi realizada no Laboratório de Imunohistoquímica do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP, empregando-se os anticorpos (Ac) monoclonais: anti-p21^{ras} clone NCC-ras-001, soro de camundongo que reconhece o epitopo carboxi terminal da proteína p21^{ras} entre os aminoácidos 126-140 (Dako A/S Dk), na diluição de 1:100; anti-c-myc clone 9E11, soro de camundongo contra peptídeo sintético, cuja seqüência representa os resíduos dos aminoácidos 408-420 (Novocastra Laboratories Ltd, Inglaterra), na diluição de 1:100; e anti-p53, clone DO7, soro de camundongo na diluição de 1:50 (Dako A/S Dk). Os cortes foram desparafinados e posteriormente hidratados. A recuperação antigênica ocorreu em solução de ácido cítrico 0,01M, pH 6,0, em duas incubações por 9 min, em forno de microondas. A atividade da peroxidase endógena foi bloqueada em solução de peróxido de hidrogênio, a 6% em etanol, em dois banhos de 5 min. Os cortes foram incubados com os Ac primários em câmara úmida a 4°C por 18 h. Seguiu-se a incubação do Ac secundário, conjugado com biotina, IgG de cavalo anti-camundongo ou IgG de suíno anti-coelho, de acordo com o Ac primário utilizado, em câmara úmida, a 37°C por 30 min. Entre as incubações foram feitas lavagens em tampão PBS, pH7,4. A reação foi detectada através da incubação com o sistema estreptoavidina-biotina-peroxidase (Strep AB complex/HRP, duet mouse/rabbit Dako S/A Dinamarca) na diluição de 1:500. A revelação deu-se com o substrato cromógeno (DAB 60 mg% em PBS + 2 mL de peróxido de hidrogênio a 10%), por 5 min a 37°C.

A freqüência e a associação entre as diferentes variáveis estudadas foram analisadas através do teste chi quadrado (χ^2), sendo definido como limite de significância o valor de $P < 0,05$.

RESULTADOS

A pesquisa do HBsAg ocorreu em 39 pacientes com CHC, sendo que 5 casos foram positivos, enquanto o anti-HBs foi pesquisado em 19 pacientes, com positividade em 6. O anti-HCV foi investigado em 37 pacientes e positivo em 15, sem evidências de co-infecção pelo VHB. Três pacientes apresentaram positividade para o anti-HBs e para o anti-HCV. Em 16 pacientes não havia quaisquer marcadores de infecção para os vírus B ou C.

O padrão histológico do CHC mais freqüente foi o trabecular (22 casos), seguindo-se o misto (18 casos) e o compacto (7 casos). Quanto ao grau de diferenciação histológica, os CHC bem diferenciados predominaram em relação aos pouco diferenciados, 32 e 15 casos, respectivamente. Nos casos nos quais se dispunha de tecido

não-neoplásico havia 24 pacientes com cirrose. Os resultados da imunorreatividade das oncoproteínas no CHC e no tecido perineoplásico podem ser observados nas Tabelas 1 e 2, respectivamente.

TABELA 1 - Imunorreatividade das oncoproteínas p21^{ras}, c-myc e p53 no carcinoma hepatocelular

	p21 ^{ras} +	c-myc+	p53+
Padrão histológico			
Trabecular	10/22 (45,5%)	11/22 (50%)	10/22 (45,4%)
Misto	8/18 (44,4%)	9/18 (50%)	4/18 (22,2%)
Compacto	3/7 (42,9%)	5/7 (71,4%)	3/7 (42,8%)
Grau histológico			
Bem diferenciado	13/22 (40,6%)	16/32 (50%)	10/32 (34,3%)
Pouco diferenciado	8/15 (53,3%)	9/15 (60%)	7/15 (26,6%)

TABELA 2 - Imunorreatividade das oncoproteínas p21^{ras}, c-myc e p53 em fígado não-tumoral

	p21 ^{ras} +	c-myc+	p53+
	26/40	15/40	0/40
Cirrótico	19/26 $P = 0,0006$	12/15 $P = 0,025$	0
Não-cirrótico	7/26	3/15	0

O padrão de reatividade da oncoproteína p21^{ras} (Figura 1) e do c-myc (Figura 2) foi difuso e exclusivamente citoplasmático, enquanto que a do p53 foi nuclear (Figura 3). Embora essas proteínas tenham apresentado uma variação na positividade entre os diferentes padrões e tipos histológicos, a mesma não teve significado estatístico (Tabela 1). Nos pacientes com sorologia positiva para o VHB e o VHC, a freqüência da p21^{ras}, c-myc e p53 foi a seguinte: pacientes HBsAg⁺: 4/5 p21^{ras}+, 4/5 c-myc⁺ e 1/5 p53⁺; pacientes anti-HBs⁺: 3/6 p21^{ras}+, 4/6 c-myc⁺, 4/6 p53⁺, sendo que destes, um também foi anti-HCV⁺; pacientes anti-HCV⁺: 6/15 p21^{ras}+, 8/15 c-myc⁺ e 5/15 p53⁺. As oncoproteínas acima também foram positivas nos pacientes com sorologia negativa para os vírus B e C, cuja freqüência variou de 7 para o p21^{ras}, 9 para o c-myc e 6 para o p53.

Ao analisar-se em conjunto a positividade destas proteínas no CHC observa-se que estes expressaram em 80% (38/47) ao menos uma oncoproteína, ocorrendo concomitância de pelo menos duas em 44,6% (21/47). Encontrou-se, ainda, associação estatisticamente significativa entre a imunodeteção das proteínas c-myc e a p21^{ras} ($P = 0,02$) e destas com o padrão trabecular ($P = 0,01$).

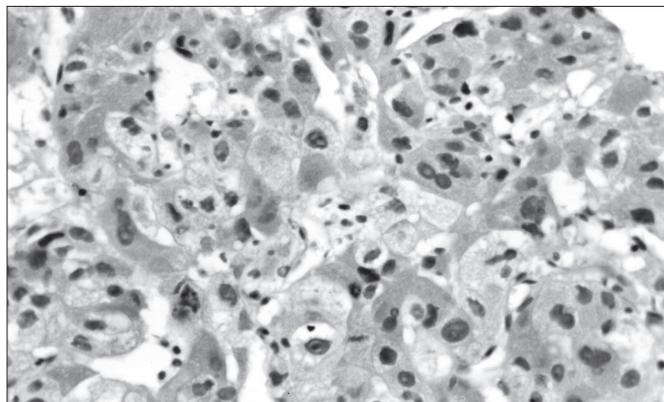


FIGURA 1 - Reatividade citoplasmática para p21^{ras}

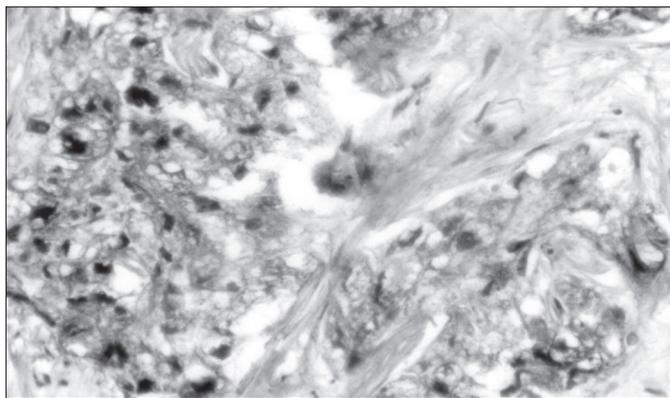


FIGURA 2 - Reatividade citoplasmática para c-myc

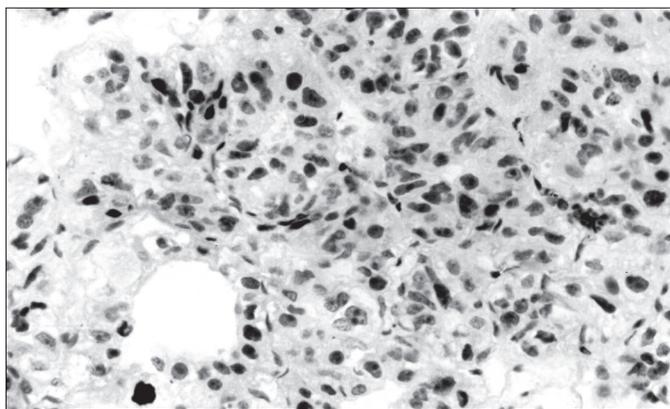


FIGURA 3 - Reatividade citoplasmática para p53

A análise da imunorreatividade das oncoproteínas p21^{ras} e c-myc no tecido não-tumoral mostra índices significativamente maiores nos fígados cirróticos (Tabela 2). Por outro lado, não foi detectada a imunorreatividade para o p53 em nenhuma amostra de tecido hepático não-neoplásico.

DISCUSSÃO

A participação do oncogene ^{ras} no ciclo celular normal resulta em divisão e proliferação celulares. Sua forma ativada pode decorrer da mutação de uma única base ou ainda devido à perda de um dos alelos⁽¹⁹⁾. No fígado, sua ativação tem sido relatada durante a regeneração hepática, após hepatectomia parcial⁽⁶⁾ e no CHC, cuja expressão imunohistoquímica varia de 60% a 7,1%^(13,29). Os resultados do presente estudo (44,7%) estão compreendidos dentro desta ampla faixa de variação, que pode em parte ser atribuída à diversidade dos Ac empregados. Adicionalmente, fatores não avaliados, como dieta e exposição a carcinógenos ambientais, devem ter diferente participação nas diversas regiões onde estes estudos foram realizados. A positividade em 4/5 de pacientes HBsAg positivos necessita de posterior avaliação em maior número de pacientes. Mesmo que o VHB não tenha participação direta na elevação da expressão do ^{ras} no CHC, a possibilidade deste gene estar implicado no início da transformação maligna do hepatócito não pode ser descartada. Não se encontrou associação entre a expressão desta oncoproteína com os demais parâmetros analisados, ou seja, padrões e graus histológicos. NONOMURA et al.⁽¹⁸⁾, não encontraram positividade nas lesões pouco diferenciadas.

Estudos mundiais de CHC em diversas regiões, incluindo algumas no Brasil, demonstraram predomínio do seu desenvolvimento em fígados cronicamente lesados, parecendo haver dois padrões distintos de carcinogênese, sejam os fígados previamente cirróticos ou não⁽¹⁷⁾.

Nos resultados do presente estudo, o p21^{ras} no tecido cirrótico circunjacente ao tumor (73%) teve diferença estatisticamente significativa quando comparada com o tecido não-cirrótico ($P = 0,0006$), o que parece factível sugerir o seu relevante papel na hepatocarcinogênese que ocorre através da cirrose.

O possível envolvimento do c-myc na carcinogênese hepática está restrito a algumas análises e tem sido sugerido, quer pela associação temporal entre a sua elevação e proliferação celular na regeneração hepática, quer pelo seu efetivo aumento no CHC^(1, 8, 27). Nos 47 casos estudados nesta série, detectou-se a sua presença em 25 (53,2%), com localização essencialmente citoplasmática, que pôde ser comprovada quando se substituiu, em alguns casos, o sistema estreptoavidina-biotina-peroxidase pela fosfatase alcalina. A perda da reatividade nuclear desta proteína pode ser atribuída ao processamento do material em formol e parafina⁽¹⁴⁾. Na presente análise, houve discreta prevalência nas lesões pouco diferenciadas, o que também foi encontrado por outros autores⁽¹⁰⁾, levando-os, inclusive, a propor que o c-myc seja indicador de pior prognóstico. Não se observou diferença significativa nos diferentes padrões histológicos, assim como nos casos VHB e VHC positivos, o que vai ao encontro dos resultados de outros autores quanto à infecção pelo VHB^(13,28). Corroborando os referidos resultados, há a observação de PASQUANELLI et al.⁽²²⁾, quanto à integridade estrutural deste gene em camundongos transgênicos infectados pelo VHB. Todavia, em relação ao VHC, RAY et al.⁽²⁴⁾, demonstraram que a proteína *core* do VHC regula a transcrição do c-myc, tornando possível, desta forma, seu envolvimento na desregulação do hepatócito normal e na hepatocarcinogênese.

A diferença entre a atividade do c-myc em fígados cirróticos e não-cirróticos também foi estatisticamente significativa ($P = 0,025$). A presença desta proteína, nestes casos de regeneração hepática, pode ser decorrente do maior índice mitótico encontrado nos hepatócitos em regeneração e a sua manutenção parece ter importante papel no desenvolvimento do CHC.

Diversos estudos têm evidenciado variação mundial na frequência de detecção do p53 em CHC e que a mesma está relacionada a fatores geográficos e ambientais. Esta mutação chega a 50% em certas regiões da África e da China^(21,25), enquanto que na Europa não ultrapassa 20%^(4, 11). Neste estudo, a expressão imunohistoquímica do p53 foi encontrada em 36,2% dos casos de CHC. Este resultado nos coloca ao lado de países onde a expressão deste gene é considerada intermediária, como por exemplo no Japão⁽¹⁵⁾. No Brasil, os resultados desta série assemelham-se aos 33,3% de ALVES et al.⁽²⁾, em São Paulo; entretanto, diferem dos 61,5% de PEREIRA et al.⁽²³⁾, da região sul. O fato de estes autores terem utilizado três diferentes anticorpos talvez justifique a divergência dos resultados acima. Não se verificou associação entre a positividade dos marcadores sorológicos virais, padrão e graus histológicos com a detecção do p53, embora tenha sido mais freqüente nas lesões pouco diferenciadas. Convém, ainda, atentarmos para a maior frequência da imunorreatividade em pacientes HBsAg e anti-HCV negativos. A realização de um estudo de genética molecular do p53 talvez venha a contribuir epidemiologicamente, caso esta mutação ocorra no códon 249, pois a mesma poderia ser atribuída à aflatoxina B1.

A detecção desta proteína não foi encontrada no fígado circunjacente ao tumor, o que se assemelha a outros resultados^(20,31), e permite sugerir a ocorrência tardia desta mutação.

Em resumo, os resultados deste estudo sugerem que na hepatocarcinogênese humana pode haver participação das oncoproteínas p21^{ras}, c-myc e p53 e que a freqüente associação do c-myc e da p21^{ras} denota possível interação entre as mesmas. Quanto ao p53, sua

freqüência foi intermediária, situando-se entre as descritas em países de alta e baixa incidência para o CHC, enquanto que na cirrose não foi detectado, o que sugere sua participação, principalmente, nos estágios tardios da hepatocarcinogênese. Já, o elevado percentual das oncoproteínas p21^{ras} e c-myc na cirrose pode apontar para a sua maior participação na carcinogênese hepatocelular pela via da cirrose do que naquela que ocorre *de novo* diretamente no fígado não-cirrótico.

Pannain VLN, Bottino AC, Santos RTM, Coelho HSM, Ribeiro-Filho J, Alves VAF. Immunohistochemical detection of p21^{ras}, c-myc and p53 oncoproteins in hepatocellular carcinoma and in non-neoplastic liver tissue. *Arq Gastroenterol* 2004;41(4):225-8.

ABSTRACT - Background - Genetic and epigenetic alterations have been described in animal hepatocarcinogenesis models but need to be studied in human being. **Aims** - To assess the immunoreactivity of p21^{ras}, c-myc and p53 oncoproteins in hepatocellular carcinoma and non neoplastic tissue. Association of the immunoreactivity of these markers with histological grades and patterns, hepatitis B and C were additionally studied. **Methods** - Detection of oncoproteins p21^{ras}, c-myc and p53 was performed immunohistochemically in hepatocellular carcinoma (47 cases) and surrounding non neoplastic liver tissue (40 cases). **Results** - Oncoproteins p21^{ras}, c-myc and p53 were detected in 44,7%, 53,2% and 36,2% of the hepatocellular carcinoma cases, respectively. The p21^{ras} and c-myc immunoreactivity has shown a significant association. However there was no association of p21^{ras}, c-myc and p53 detection with hepatitis B and C virus infections, histological grades and patterns. The same significant association between p21^{ras} and c-myc was observed in non-neoplastic tissue with cirrhosis when compared with tissue without it. The p53 immunoreactivity was negative in all non-neoplastic liver tissue samples. **Conclusions** - The immunoreactivity detection of p21^{ras}, c-myc and p53 corroborates previous evidence of their detection in hepatocellular carcinoma that suggest the participation of these proteins in human hepatocarcinogenesis. The significant association between p21^{ras} and c-myc oncoproteins in hepatocellular carcinoma and in cirrhosis can point to an interaction between them mainly, in hepatocarcinogenesis that occurs through cirrhosis.

HEADINGS - Carcinoma, hepatocellular. Liver, pathology. Immunohistochemistry. Oncogene protein. Protein p53. Oncogene protein p21 (ras).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Abou-Elella A, Gramlich T, Fritsch C, Gansler T. C-myc amplification in hepatocellular carcinoma predicts unfavorable prognosis. *Mod Pathol* 1996;9:95-8.
2. Alves VAF, Carrilho FJ, Wakamatsu A, Laudanna AA, Silva LC, Gayotto LCC. Immunohistochemistry of p53 in hepatocellular carcinoma in São Paulo, Brasil. *Hepatology* 1994;19:391.
3. Arbutnot P, Kew M, Fitschen W. C-fos and c-myc oncoprotein expression in human hepatocellular carcinomas. *Anticancer Res* 1991;11:921-4.
4. Challen C, Lunek J, Warren W, Collier J, Bassendine MF. Analysis of the p53 tumor-suppressor gene in hepatocellular carcinomas from Britain. *Hepatology* 1992;16:1362-6.
5. Dominguez-Malagón H, Gaytan-Graham S. Hepatocellular carcinoma: an update. *Ultrastruct Pathol* 2001;25:497-516.
6. Fausto N, Shank PR. Oncogen expression in liver regeneration and hepatocarcinogenesis. *Hepatology* 1983;3:1016-23.
7. Hirohashi S, Ishak KG, Kojiro M, Wanless IR, Theise ND, Tsukuma H, Blum HE, Deugnier Y, Laurent Puig P, Fischer HP, Sakamoto M. Hepatocellular carcinoma. In: Hamilton SR, Aaltonen LA, editors. *Tumors of the digestive system*. Lyon: IARC Press; 2000. p.159-72.
8. Huber BE, Thorgeirsson SS. Analysis of c-myc expression in a human hepatoma cell line. *Cancer Res* 1987;47:3414-20.
9. Ishikawa F, Takaku F, Hayashi K, Nagao M, Sugimura T. Activation of rat c-fos during transfection of hepatocellular carcinoma DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986;83:3209-12.
10. Kawate S, Fukusato T, Ohwada S, Watunuki A, Morishita Y. Amplification of c-myc in hepatocellular carcinoma: correlate with clinicopathologic features, proliferative activity and p53 overexpression. *Oncology* 1999;57:157-63.
11. Kress S, Jahn UR, Buchmann A, Bannash P, Schwarz M. P53 mutations in human hepatocellular carcinomas from Germany. *Cancer Res* 1992;52:3220-3.
12. Kubicka S, Trautwein C, Schrem H, Tilmann H, Manns M. Low incidence of p53 mutations in European hepatocellular carcinomas with heterogeneous mutation as a rare event. *J Hepatol* 1995;23:412-9.
13. Lee HS, Rajagopalan MS, Vyas GN. A lack of direct role of hepatitis B virus in the activation of ras and myc oncogenes in human hepatocellular carcinogenesis. *Hepatology* 1988;8:1116-20.
14. Loke SL, Neckers LM, Schwab G, Jaffe ES. C-myc protein in normal tissue. Effects of fixation on its apparent subcellular distribution. *Am J Pathol* 1988;131:29-37.
15. Nagao T, Kondo F, Sato T, Nagato Y, Kondo Y. Immunohistochemical detection of aberrant p53 expression in hepatocellular carcinoma. *Hum Pathol* 1995;26:326-33.
16. Nishida N, Fukuda Y, Kokuryu H, Toguchida J, Yandell DW, Ikenaga M, Imura H, Ishizaki K. Role and mutational heterogeneity of the p53 gene in hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* 1993;53:368-72.
17. Nita ME, Alves VA, Carrilho FJ, Ono-Nita SK, Mello ES, Gama-Rodrigues JJ. Molecular aspects of hepatic carcinogenesis. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 2002;44:38-48.
18. Nonomura A, Ohta G, Hayashi M, Izumi R, Watanabe K, Takayanagi N, Mizukami Y, Matsubara F. Immunohistochemical detection of ras oncogene p21 product in liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma. *Am J Gastroenterol* 1987;82:512-8.
19. Ogata N, Kamikura T, Asakura H. Point mutation, allelic loss and increased methylation of c-Ha-ras gene in human hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 1991;13:31-7.
20. Ojanguren I, Anza A, Castella E, Fernandez VA, Matt JL, Navas-Palacios JJ. P53 immunoreactivity in hepatocellular adenoma, focal nodular hyperplasia, cirrhosis and hepatocellular carcinoma. *Histopathology* 1995;26:63-8.
21. Ozturk M. P53 hotspot mutation in hepatocellular carcinoma after aflatoxin exposure. *Lancet* 1991;338:1356-9.
22. Pasquanelli C, Bhavani K, Chisari FV. Multiple oncogenes and tumor suppressor genes are structurally and functionally intact during hepatocarcinogenesis in hepatitis B virus transgenic mice. *Cancer Res* 1992;52:2823-9.
23. Pereira LMB, Mies S, Rydei ID, Leitão MR, Raia S. Mutação do p53 no carcinoma hepatocelular [resumo]. In: *Anais do 12o Congresso Brasileiro de Hepatologia*; 1993. p.43.
24. Ray RB, Lagging LM, MeyerK, Steele R, Ray R. Transcriptional regulation of cellular and viral promoters by the hepatitis C virus core protein. *Virus Res* 1995;37:209-20.
25. Scorsone KA, Zhou YZ, Butel JS, Slagle BL. P53 mutations cluster at codon 249 in hepatitis B virus-positive hepatocellular carcinomas from China. *Cancer Res* 1992;52:1635-8.
26. Sinha S, Webber C, Marshall CJ, Knowles MA, Proctor A, Barrass NC, Neal GE. Activation of ras oncogene in an aflatoxin-induced rat liver carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988;85:3673-7.
27. Tashiro F, Morimura S, Hayashi K, Makino R, Kawamura H, Horikoshi N, Nemoto K, Ohtsubo K, Sugimura T, Ueno Y. Expression of the c-Ha-ras and c-myc genes in aflatoxin-B1 induced hepatocellular carcinomas. *Biochem Biophys Res Commun* 1986 138:858-64.
28. Tiniakos D, Spandidos DA, Kakkana A, Pintzas A, Pollice L, Tiniakos G. Expression of ras and myc oncogenes in human hepatocellular carcinoma and non-neoplastic liver tissue. *Anticancer Res* 1989;9:715-22.
29. Tiniakos D, Spandidos DA, Yagnis M, Tiniakos G. Expression of ras and c-myc oncoproteins and hepatitis B surface antigen in human liver disease. *Hepatogastroenterology* 1992;40:37-40.
30. Volkman M, Hoffmann HJ, Meyer M, Hayashi IC, Maeda S. P53 overexpression is frequent in European hepatocellular carcinoma and largely independent of the codon 249 hot spot mutation. *Oncogene* 1994;9:195-204.
31. Wee A, Teh M, Raju GC. P53 expression in hepatocellular carcinoma in a population in Singapore with endemic hepatitis B virus infection. *J Clin Pathol* 1995;48:236-8.
32. Yuen MF, Wu PC, Lai VC, Lau JY, Lai CL. Expression of c-myc, c-fos and c-jun in hepatocellular carcinoma. *Cancer* 2001;91:106-12.

Recebido em 12/1/2004.
Aprovado em 2/7/2004.