

ELAINE CRISTINA DE ATAIDE

**“ANÁLISE DA SOBREVIDA E DA RECIDIVA NEOPLÁSICA EM
PACIENTES SUBMETIDOS A TRANSPLANTE DE FÍGADO POR
CARCINOMA HEPATOCELULAR:
ASSOCIAÇÃO COM PERFIL IMUNOHISTOQUIMICO E
CARACTERÍSTICAS TUMORAIS”**

***“ANALYSIS OF SURVIVAL AND NEOPLASM RECURRENCE IN
PATIENTS UNDERGOING LIVER TRANSPLANTATION FOR
HEPATOCELLULAR CARCINOMA: ASSOCIATION WITH
IMMUNOHISTOCHEMICAL PROFILE AND TUMOR
CHARACTERISTICS”***

CAMPINAS

2012



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS

ELAINE CRISTINA DE ATAIDE

**“ANÁLISE DA SOBREVIVÊNCIA E DA RECIDIVA NEOPLÁSICA EM PACIENTES
SUBMETIDOS A TRANSPLANTE DE FÍGADO POR CARCINOMA
HEPATOCELULAR: ASSOCIAÇÃO COM PERFIL IMUNOHISTOQUÍMICO E
CARACTERÍSTICAS TUMORAIS”**

**Orientadora: Profa. Dra. Ilka de Fátima Santana Ferreira Boin
Co-orientadora: Profa. Dra. Cecília Amélia Fazzio Escanhoela**

***“ANALYSIS OF SURVIVAL AND NEOPLASM RECURRENCE IN PATIENTS
UNDERGOING LIVER TRANSPLANTATION FOR HEPATOCELLULAR CARCINOMA:
ASSOCIATION WITH IMMUNOHISTOCHEMICAL PROFILE AND TUMOR
CHARACTERISTICS”***

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Cirurgia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas-UNICAMP, para obtenção do título de Doutora em Ciências.

Doctorate thesis presented to the Surgery Sciences Postgraduation Programme of the School of Medical Sciences of the University of Campinas to obtain Ph.D grade in Sciences.

**Este exemplar corresponde à versão final da tese defendida
pela aluna Elaine Cristina de Ataíde e orientada pela
Profa.Dra. Ilka F.S.F.Boin**Assinatura da Orientadora:

CAMPINAS, 2012

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
MARISTELLA SOARES DOS SANTOS – CRB8/8402
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
UNICAMP

At12a Ataíde, Elaine Cristina de, 1975-
Análise da sobrevida e da recidiva neoplásica em
pacientes submetidos a transplante de fígado por carcinoma
hepatocelular : associação com perfil imunohistoquímico e
características tumorais / Elaine Cristina de Ataíde. --
Campinas, SP : [s.n.], 2012.

Orientador : Ilka de Fátima Santana Ferreira Boin.
Coorientador: Cecília Amélia Fazzio Escanhoela.

Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de Campinas,
Faculdade de Ciências Médicas.

1. Fígado - Câncer. 2. Recorrência tumoral. 3.
Imunohistoquímica. I. Boin, Ilka de Fátima Santana
Ferreira. II. Escanhoela, Cecília Amélia Fazzio. III.
Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de
Ciências Médicas. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em inglês: Analysis of survival and neoplasm recurrence in patients undergoing liver transplantation for hepatocellular carcinoma: association with immunohistochemical profile and tumor characteristics.

Palavras-chave em inglês:

Liver cancer

Tumor recurrence

Immunohistochemical

Área de concentração: Fisiopatologia Cirúrgica

Titulação: Doutora em Ciências

Banca examinadora:

Ilka de Fátima Santana Ferreira Boin [Orientador]

Cecília Amélia Fazzio Escanhoela [Coorientador]

Nelson Adami Andreollo

Elinton Adami Chain

Renato Ferreira da Silva

Orlando Castro e Silva

Data da defesa: 08-08-2012

Programa de Pós-Graduação: Ciências da Cirurgia

BANCA EXAMINADORA DA TESE DE DOUTORADO

Aluna: ELAINE CRISTINA DE ATAIDE

Orientadora: Profa. Dra. ILKA DE FÁTIMA SANTANA FERREIRA BOIN

Co-Orientadora: Profa. Dra. CECÍLIA AMÉLIA FAZZIO ESCANHOELA

Membros:

1. Prof(a). Dr(a). Ilka de Fátima Santana Ferreira Boin -

2. Prof(a). Dr(a). Nelson Adami Andreollo-

3. Prof(a). Dr(a). Elinton Adami Chaim-

4. Prof(a). Dr(a). Renato Ferreira da Silva-

5. Prof(a). Dr(a). Orlando Castro e Silva-

**Programa de Pós-Graduação em Ciências da Cirurgia da
Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de
Campinas**

Data da defesa: 08/08/2012

Salmo 121:
Divino Protetor

*Levanto meus olhos para o céu
De onde me virá o socorro?
Meu auxílio vem do Senhor
Que fez o céu e a terra.
Não deixará que teu pé vacile,
Aquele que te guarda não dorme.
Não dorme nem cochila
O guarda de Israel.
O senhor é teu guarda,
Senhor é tua sombra e está a tua direita
De dia o sol não te fará mal,
Nem a lua de noite.
O Senhor te guardará de todo o mal,
Guardará a tua vida.
O senhor te protegerá
Em tua idas e vindas,
Desde agora e para sempre.*

Dedico este Trabalho...

*A quem clareia meus
passos no caminho da retidão e nunca me abandonou.*

*Aos meus amados Pai, Carlos Ataide, e Mãe, Floripa Alves Ataide, por sempre me
apoíarem em todas as situações, tendo sempre acreditado em mim,
renunciando a tantos sonhos para que os meus se realizassem. São eles
certamente o motivo de ser quem hoje sou.*

*Aos meus queridos irmãos Alan e
Fernanda pelo auxílio amigo e constante.*

A minha querida Tia Maria pela eterna atenção e carinho.

Agradecimentos

Agradecimento à minha orientadora Dra. Ilka F.S.F. Boin pela amizade e pela responsabilidade em minha formação cirúrgica e acadêmica.

À Dra. Cecília Amélia Fazzio Escanhoela pela amizade, pelo apoio inestimável e por ter aceitado ser minha co-orientadora nessa empreitada.

Agradecimento aos meus Professores de Cirúrgica do Aparelho Digestivo e Proctologia pela minha formação e estímulo em ser uma profissional constantemente melhor:

- Dr. Nelson Adami Andreollo
- Dr. Elinton Adami Chaim
- Dr. João José Fagundes
- Dr. Luiz Roberto Lopes
- Dr. Francisco Callejas Neto
- Dr. Claudio Saddy Rodrigues Coy
- Dra. Maria de Lourdes Setsuko Ayrizono
- Dr. Marco Antonio de Oliveira Peres
- Dr. José Carlos Pareja
- Dr. Luis Sérgio Leonardi
- Dr. Juvenal Ricardo Navarro Góes (in memoriam)

Aos residentes de Cirurgia do Hospital de Clínicas da Unicamp em especial aos da área de Cirurgia do Aparelho Digestivo, e à graduanda do sexto ano de medicina de 2011 Milena Garcia pelo apoio inestimável, amizade e auxílio.

Aos componentes da Unidade de Transplante Hepático do Hospital de Clínicas da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas:

Aos anestesistas:

- Prof. Dr. Adilson Roberto Cardoso
- Profa. Dra. Cristina Aparecida Arrivabene Caruy
- Dr. Giancarlo Marcondes
- Dr. Luiz Roberto Tazima
- Profa. Dra. Derly Conceição Munhoz
- Dra. Terezinha Mania de Azevedo
- Prof. Dr. Marcos Simoni Mello
- Dra. Emica Shimoazono

Às enfermeiras:

- Elisabete Yoko Udo
- Maria de Fatima Trovato Mei

Às instrumentadoras;

- Elisabete Calixto - exemplo de seriedade e profissionalismo.
- Liliane.Sanches Moura Tudisco

À infectologista;

- Prof. Dra. Raquel Silveira Stucchi querida amiga que muito me estimulou na fase final dessa jornada.

Aos gastroenterologistas;

- Prof. Dr. Jazon Romilson de Souza Almeida
- Prof. Dra. Elza Cotrim Soares
- Dr. Tiago Sevá-Pereira

Aos hemoterapeutas;

- Dra. Ângela Cristina Malheiros Luzo
- Dr. Fabricio Biscaro

À equipe da Unidade de Terapia Intensiva.

Às psicólogas:

- Dra. Maria Isabel Warwar
- Ana Maria Neder

À assistente social:

- Tereza Cristina Muncinato Portugal Bonaldo

Ao patologista:

- Prof. Dr. José Vassallo pelo apoio na realização desse trabalho, e ao importante auxílio na orientação.

À equipe do Laboratório de Pesquisa do Departamento de Anatomia Patológica:

- Ana Claudia Sparapani Piazza
- Arethusa de Souza
- Luzia Aparecida Magalhães Ribeiro Reis

À Câmara de Pesquisa – Serviço de Estatística - FCM, em especial à Cleide Aparecida Moreira Silva pela paciência e atenção.

Ao Serviço de Arquivo Médico do Hospital de Clínicas da Unicamp.

A auxiliar administrativa Deuselina Ventrilio Lopes.

Aos profissionais fisioterapeutas, nutricionistas e enfermeiros que auxiliaram nossos pacientes.

Aos nossos pacientes (in memoriam) e aqueles que ainda estão sob nossos cuidados no ambulatório.

Aos doadores e suas famílias pelo gesto de fraternidade, minha eterna gratidão.

Lista de Tabelas

Tabela 1: Descrição dos anticorpos utilizados na realização do perfil imunohistoquímico.....	29
Tabela 2: Distribuição das variáveis estudadas na população em estudo segundo a frequência e médias observadas.....	34
Tabela 3: Distribuição das variáveis estudadas em relação às características lesões: frequência e médias observadas.....	35
Tabela 4: Causas da hepatopatia crônica	36
Tabela 5: Causas de óbito encontradas neste estudo.....	37
Tabela 6: Sobrevida relacionada às variáveis categóricas.....	39
Tabela 7: Sobrevida observada relacionada às variáveis contínuas.....	40
Tabela 8: Associação da recidiva tumoral e variáveis categóricas estudadas.....	42
Tabela 9: Associação da recidiva e variáveis contínuas estudadas.....	43
Tabela 10: Perfil de distribuição dos marcadores imunohistológicos.....	46
Tabela 11: Correlação entre perfil imunohistoquímico e sobrevida.....	52
Tabela 12: Correlação entre perfil imunohistoquímico e aparecimento de recidiva tumoral.....	53
Tabela 13: Correlação entre perfil imunohistoquímico e grau histológico.....	54

Tabela 14: Correlação entre perfil imunohistoquímico e presença ou não de invasão vascular.	55
Tabela 15: Correlação entre perfil imunohistoquímico e AFP> 200ng/ml e AFP< de 200ng/ml.....	56
Tabela 16: Teste avaliando associação de Glipican3 e variáveis não categóricas estudadas (Mann-Whitney).....	58
Tabela 17: Teste avaliando associação de PCNA e variáveis não categóricas estudadas (Mann-Whitney).....	59
Tabela 18: Teste avaliando associação de HepaPar1 e variáveis não categóricas estudadas (Mann-Whitney).....	60
Tabela 19: Teste avaliando associação de Beta-catenina e variáveis não categóricas estudadas (Mann-Whitney).....	61
Tabela 20: Teste avaliando associação de CK19 e variáveis não categóricas estudadas (Mann-Whitney).....	62
Tabela 21: Teste avaliando associação de HSP70 e variáveis não categóricas estudadas (Mann-Whitney).....	63
Tabela 22: Teste avaliando associação de Glutamina Sintetase e variáveis não categóricas estudadas (Mann-Whitney).....	64
Tabela 23: Associação de CK7 e variáveis não categóricas estudadas pelo teste de Mann-Whitney.....	65
Tabela 24: Associação dos marcadores Glipican3, Glutamina sintetase, HSP70.....	66

Lista de Figuras

Figura 1: Bloco receptor de TMA (Arranjo em Matriz Tecidual) onde cada cilindro representa um paciente estudado.....	26
Figura 2: Bloco de TMA (Arranjo em Matriz Tecidual) e reprodução gráfica das lâminas confeccionadas a partir destes blocos, neste caso foram exemplificados o HeparPar1 (Hepatocyte paraffin 1) e Glipican3 (GPC3).....	26
Figura 3: Curvas de sobrevida para a recidiva (Kaplan- Meier).....	38
Figura 4 : Curva ROC analisando o tamanho do maior nódulo como fator discriminador de recidiva tumoral.....	44
Figura 5: – Curva ROC do número de nódulos para discriminar a recidiva tumoral.....	45
Figura 6 : Êmbolo vascular exibindo positividade citoplasmática ao Glipican3 (100X).....	47
Figura 7 : Êmbolo vascular exibindo positividade citoplasmática ao Glipican3, (640X).....	47
Figura 8: Positividade citoplasmática focal à Beta-catenina(640X).....	48
Figura 9: Positividade nuclear difusa ao HSP70 (640X).....	48
Figura 10: Positividade citoplasmática e nuclear à Glutamina sintetase (640X).....	49
Figura11: Positividade citoplasmática (padrão granular) difusa ao HepaPar1 (640X).....	49
Figura 12: Positividade citoplasmática e nuclear ao PCNA (640X).....	50
Figura 13: Positividade de membrana extensa e citoplasmática focal à CK19 (640X).....	50

Sumário

Símbolos, Siglas e Abreviaturas.....	xv
Resumo.....	xix
Summary.....	xxii
1. Introdução.....	01
1.1 Diagnóstico.....	03
1.2. Transplante Hepático e o CHC.....	04
1.3. Fatores de recidiva tumoral pós transplante por CHC.	07
1.4. O papel de biópsia no diagnóstico do CHC.....	09
1.5. Marcadores Imunohistoquímicos.....	11
1.5.1. HSP70 (Heat Shock Protein 70).....	11
1.5.2. Glipican3 (GPC3).....	12
1.5.3. Glutamina Sintetase.....	12
1.5.4. Beta-catenina.....	13
1.5.5. Citoqueratinas 7 e 19 (CK7 e CK19).....	13
1.5.6. HepPar1 (Hepatocyte paraffin 1).....	14
1.5.7. PCNA (Proliferating cell nuclear antigen).....	15
2. Objetivos.....	16
2.1. Objetivo Geral.....	16
2.2. Objetivos Específicos.....	16
3. Método.....	17
3.1. Critérios de inclusão.....	17
3.2. Critérios de exclusão.....	18
3.3. Coleta de dados clínicos.....	19
3.3.1- Dados do receptor.....	19
3.4. Protocolo de imunossupressão.....	21
3.5. População estudada.....	22

3.6. Avaliação do Explante.....	23
3.6.1. Graduação Histológica de Edmondson-Steiner	24
3.7. Confeções das Lâminas para Estudo Imunohistoquímico.....	25
3.7.1. Arranjo em Matriz Tecidual (Tissue Microarray- TMA)	25
3.7.2. Estudo imunohistoquímico.....	27
3.7.3. Marcadores Imunohistoquímicos	28
3.7.4. Interpretação dos Resultados Imunohistoquímicos.....	30
3.8. Comitê de Ética.....	30
3.9. Análise Estatística.....	30
4. Resultados.....	32
4.1. Avaliação Geral da População.....	32
4.2. Associação da Sobrevida e Outras Variáveis de Interesse.....	39
4.3. Associação da Recidiva Tumoral e Outras Variáveis em Estudo.....	41
4.4. Estudo dos Marcadores Tumoriais.....	46
5. Discussão.....	67
6. Conclusão.....	92
7. Referências Bibliográficas.....	94
8. Bibliografia e Normatizações.....	110
9. Anexos.....	111

Símbolos, Siglas e Abreviaturas

ABTO	Associação Brasileira de Transplante de Órgãos
ALT	Alanina aminotransferase
AFP	Alfa-fetoproteína
AST	Aspartato aminotransferase
AVC	Acidente vascular cerebral
CHC	Carcinoma hepatocelular
cm	Centímetro
CK7	Citoqueratina 7
CK19	Citoqueratina 19
CYA	Ciclosporina
CNCDO	Central Nacional de Captação e Distribuição de Órgãos
CTP	Classificação de Child-Turcotte- Pugh
DF	Disfunção do enxerto
DP	Desvio padrão
DPF	Disfunção primária do enxerto

EP	Erro padrão
FCM	Faculdade de Ciências Médicas
FK506	Tacrolimus
FPE	Falência primária do enxerto
g/dl	Gramas por decilitro
GS	Glutamina Sintetase
GPC3	Glipican3
HC	Hospital de Clínicas
HepaPar1	Hepatocyte Paraffin 1
HCV	Hepatite pelo vírus C
HBV	Hepatite pelo vírus B
HAI	Hepatite Autoimune
HE	Hematoxilina-Eosina
HSP70	Heat Shock Protein 70
IC	Intervalo de confiança
IMC	Índice de massa corporal
Kg	Quilograma

log_e	Logaritmo neperiano
MELD	Model for End-Stage Liver Disease
mEq/l	Miliequivalente por litro
m²	Metro quadrado
mg/dl	Miligramma por decilitro
min	Minuto
ml	Mililitro
mm	Milímetro
Na	Sódio
N	Frequência absoluta
ng/ml	Nano grama por mililitro
OR	Odds ratio
PCNA	Proliferating cell nuclear antigen
pmp	Por milhão de população
RGCT	Registro Cadastro Técnico
RNI	Relação normatizada internacional do tempo de protrombina
RNM	Ressonância Nuclear Magnética

ROC	Receiver operating characteristic
SAS	Statistical Analysis System
seg	Segundos
SCHC	Pequeno Carcinoma Hepatocelular
SNT	Sistema Nacional de Transplantes
TACE	Quimo embolização trans-arterial
TMA	Arranjo de Matriz Tecidual
TC	Tomografia Computadorizada
TOF	Transplante Ortotópico de Fígado
UI/l	Unidades internacionais por litro
UNICAMP	Universidade Estadual de Campinas
UNOS	United Network for Organ Sharing
UTH	Unidade de Transplante Hepático
US	Ultrassonografia
USA	United States of America
UTI	Unidade de Terapia Intensiva
Vs.	Versus

Resumo

Introdução: Apesar de sobrevida ao redor de 70% em cinco anos a recidiva do CHC vem suscitando cuidados com índices que variam na literatura entre 6% a 26%.

Muitos são os fatores atrelados ao maior risco de recidiva descritos na literatura, sem definição de qual o melhor método que poderia prever esse evento de alta letalidade.

Objetivo: Os objetivos desse estudo foram: avaliar a sobrevida e recidiva tumoral em pacientes submetidos a transplante hepático por CHC e investigar a imunexpressão dos marcadores imunohistoquímicos: HSP70, Glipican3, Glutamina sintetase, beta-catenina, CK7, Ck19, HepPar1 e PCNA, estudando sua associação com características tumorais e prognóstico de pacientes submetidos a transplante hepático por CHC.

Método: Foram estudados 90 pacientes portadores de CHC submetidos a transplante hepático de 1996 a 2010. Foram estudados fatores correlacionados ao aparecimento da recidiva neoplásica como: tamanho da maior lesão, número de lesões, grau histológico, presença de invasão vascular, nível de alfa-feto proteína (AFP) superior a 200 ng/ml e regime de imunossupressão. Foi estudada também a correlação da expressão dos marcadores imunohistoquímicos estudados com cada uma dessas mesmas variáveis.

A técnica de estudo imunohistoquímico foi o arranjo em matriz tecidual (TMA). A análise estatística utilizou testes de regressão uni e multivariadas, teste de Cox, teste de Qui-quadrado ou Fisher, teste de Mann-Whitney e para estudo de sobrevida foi utilizado o método de Kaplan Meyer.

Resultados: Foi observada recidiva em 7 pacientes (8%). O tempo de cirurgia, quantidade de concentrados de hemácias administrados, valor do MELD calculado no momento da cirurgia e a presença de recidiva foram associados à menor sobrevida.

Pacientes com recidiva tumoral apresentaram tendência à presença de invasão vascular, apresentaram maior número de nódulos e maiores nódulos.

Em relação aos marcadores imunohistoquímicos pacientes com glutamina sintetase positiva apresentaram tendência à menor sobrevida; e a presença de HepPar1 negativo apresentou correlação com o aparecimento de recidiva neoplásica. Pacientes com HSP70 positivo apresentaram maior prevalência do grau histológico III. Pacientes com Glipican3 positivo apresentaram nódulos maiores e presença de mais casos com AFP superior a 200 ng/ml. Pacientes com PCNA positivo apresentaram nódulos maiores. Pacientes com HepPar1 negativo apresentaram nódulos maiores e tendência a apresentar mais nódulos. Pacientes com beta-catenina positiva apresentaram maiores nódulos e presença de maior número de pacientes com grau histológico III. Pacientes com CK19 positivo demonstraram tendência a apresentar nódulos maiores ($p=0.05$). A associação entre beta-catenina e Glipican3 positivos demonstrou correlação com a presença

de nódulos maiores com maior evidência estatística do que quando avaliados separadamente ($p=0,003$).

Conclusão: Não foi possível a associação de nenhum desses marcadores com a sobrevida exceto pela presença de glutamina sintetase positiva que apresentou tendência à associação com piora da sobrevida. A imunoexpressão desses marcadores não se correlacionou com o tempo de aparecimento de recorrência tumoral, com exceção da do HepPar1, o qual, quando negativo, correlacionou-se com maior frequência de aparecimento de recidiva.

Entretanto, a maioria dos marcadores estudados apresentaram correlação com pelo menos uma das variáveis em estudo, confirmando nossa hipótese de que esses marcadores podem, sim, auxiliar na avaliação do prognóstico de pacientes submetidos a transplante hepático por CHC.

Summary

Introduction: Although overall survival rates have been around 70% after five years, recurrence of HCC has indices in literature ranging from 6 to 26%. There is no consensus therapy for treatment of HCC recurrence after liver transplantation that could lead to a significant increase in survival.

Many factors are linked to higher risk of recurrence in the literature, without defining the best method that could predict this highly lethal event.

Objective: The aim of this study was first to evaluate the survival and tumor recurrence in patients undergoing liver transplantation for HCC and second to evaluate immunoexpression of immunohistochemical markers: HSP70, Glipican3, Glutamin synthetase, Beta-Catenin, CK7, Ck19, HepPar1 and PCNA, which are capable of assessing the malignant cellular potential, studying its association with tumor characteristics and prognosis of patients undergoing liver transplantation for HCC.

Methods: We studied 90 patients who underwent liver transplantation from 1996 to 2010. We evaluated factors related to survival and tumor recurrence. Factors were also studied related to the onset of neoplastic recurrence as size of the largest lesion, number of lesions, histological grade, presence of vascular invasion, AFP level greater than 200 ng / ml and the immunosuppressive regimen. The correlation of expression of immunohistochemical markers studied was correlated with each of these variables.

The immunohistochemistry technique was the tissue matrix arrangement (TMA) and the statistical analysis used was regression testing univariate and multivariate, Cox test, chi-square or Fisher test and Mann-Whitney test, while for study of survival the Kaplan Meyer curve was used.

Results: The duration of surgery and recurrence was associated with shorter survival.

Patients with tumor recurrence tended to have the presence of vascular invasion, showing a higher number of nodules and larger nodules.

Regarding the presence of immunohistochemical markers glutamin synthetase showed a positive trend toward lower survival, and presence of HepPar1 negative correlated with the appearance of neoplastic recurrence.

HSP70 positive patients had higher prevalence of histologic grade III. Patients with positive Glipican3 showed larger lesions and more patients had AFP greater than 200 ng / ml. PCNA positive patients had bigger lesions. HepPar1 negative patients had larger lesions and tended to have more nodules. Patients with positive Beta-Catenin showed larger nodules and more histologic grade III. Patients with positive CK19 showed a tendency to have larger nodules. The association between Beta-catenin and Glipican3 showed positive association with larger nodules.

Conclusion: There was no statistical correlation of these markers and the specific disease survival except for the presence of glutamine synthetase which showed only a positive trend of association with survival. The immunoreactivity of these markers did not correlate with the time of appearance of a recurrent tumor, with the exception of the Hep-Par1, which, if negative, was correlated with higher frequency of occurrence of relapse. However, most of the markers studied showed

correlation with at least one of the variables studied, whether of characteristics of the population (AFP level, the presence of recurrence and survival time) or characteristics of the lesion (tumor number, the greater lesion size, presence of vascular invasion and degree of differentiation) confirming our hypothesis that these markers can indeed assist in assessing the prognosis of patients undergoing liver transplantation for HCC.

1. Introdução

O carcinoma hepatocelular (CHC) é a sexta maior causa de câncer no mundo, contabilizando mais de 500.000 mortes anualmente¹. É tido como a terceira causa de óbito por doença neoplásica, e a primeira de óbito em pacientes cirróticos¹.

Existem cerca de um milhão de casos novos de CHC ao ano¹⁻². A média de idade do acometimento tumoral no momento do diagnóstico situa-se entre a quarta e a sétima décadas de vida, com predomínio da quinta e da sexta décadas e do sexo masculino em relação ao feminino¹⁻⁵

O CHC é considerado uma doença com prognóstico reservado e em apenas 40% dos pacientes é passível de tratamento curativo no momento do diagnóstico¹⁻⁸.

A dificuldade no tratamento e alta mortalidade resultam basicamente de três fatores: primeiro, o CHC é associado, na grande maioria dos casos, à cirrose o que limita as opções terapêuticas; segundo, essa neoplasia é usualmente assintomática em estadios precoces e tem grande propensão à invasão vascular ou das vias biliares, mesmo quando esses tumores são ainda pequenos; terceiro, essas lesões têm se mostrado resistentes à maioria dos tratamentos convencionais com quimioterapia citotóxica^{2,3,7,8}.

O transplante de fígado nos últimos anos vem se mostrando uma boa opção terapêutica em casos selecionados dentro de critérios pré estabelecidos, apresentando sobrevida em torno de 70% em 5 anos. Ele tem se demonstrado

como conduta de escolha em pacientes cirróticos com diagnóstico de CHC, pois além de tratar a neoplasia em questão, também trata a doença de base^{1-3,8-12}.

Apesar de sobrevida ao redor de 70% em cinco anos a recidiva do CHC após a intervenção cirúrgica vem suscitando preocupação com índices que variam na literatura entre 6% a 26%⁸⁻¹².

A recorrência do CHC após transplante de fígado costuma ser mais agressiva quando comparada à recorrência após a ressecção hepática, provavelmente em virtude da presença da imunossupressão utilizada no pós-operatório¹³⁻¹⁵.

Não há terapia de consenso para tratamento de CHC recidivado após o transplante de fígado que possa promover aumento significativo na sobrevida. A média de sobrevida a partir do diagnóstico da recorrência é de apenas 12 meses, portanto a prevenção da recidiva tumoral, através de seleção minuciosa dos pacientes a serem transplantados é considerada ainda a conduta de escolha^{14,15}.

Muitos são os fatores atrelados ao maior risco de recidiva descritos na literatura: tamanho das lesões, número de nódulos, grau histológico da neoplasia, presença de microinvasão vascular, nível de alfa-feto proteína (AFP) acima de 200 ng/dl, regime de imunossupressão utilizado, entre outros¹⁴⁻¹⁶.

Ainda não se obteve consenso do melhor método que possa definir a resposta que um paciente, portador de CHC submetido a transplante de fígado, terá no pós-operatório. A associação de mais de um fator de mau prognóstico, biologia molecular e marcadores tumorais de proliferação e diferenciação celular surgem com resultados promissores^{1-3,16}.

1.1. Diagnóstico

O carcinoma hepatocelular caracteriza-se como uma neoplasia onde tanto o estadio da doença como a avaliação da reserva hepática devem ser considerados para definição da melhor proposta terapêutica, isso pois 89% dos pacientes com essa neoplasia apresentam hepatopatia crônica associada¹⁻³.

As causas mais frequentemente associadas à presença do CHC descritas na literatura são: hepatopatia crônica pelo vírus C e B, etilismo, hemocromatose e esteatohepatite¹⁷⁻²⁷.

Há uma década, os tumores hepáticos eram diagnosticados em fases avançadas e os doentes geralmente apareciam já com acentuada perda ponderal, anorexia e hepatomegalia. Com o avanço nos diagnósticos realizados por radio imagem, estes doentes vêm sendo encaminhados aos centros especializados mais precocemente.

Atualmente, 40% dos doentes têm seu diagnóstico firmado na fase assintomática, com programa de detecção precoce dos tumores hepáticos¹⁻⁵.

A realização de rastreamento com ultrassonografia (US) a cada seis meses é recomendado para pacientes cirróticos ou com outros riscos para desenvolvimento de CHC, promovendo precocidade no diagnóstico e impacto positivo na sobrevida^{1,2,28-30}.

Tem sido questionado o uso da AFP como marcador para CHC, no entanto, seu uso ainda é rotineiro em muitos serviços principalmente em protocolos de rastreamento devido a seu baixo custo¹⁻³.

Os exames de imagem de Tomografia Computadorizada (TC) ou Ressonância Nuclear Magnética (RNM) devem mostrar lesão hipervascularizada,

com captação de contraste na fase arterial e desaparecimento deste na fase venosa tardia, o chamado efeito de clareamento (“washout”)²⁸⁻³⁰. Tais imagens são muito típicas possibilitando o diagnóstico definitivo com especificidade próxima a 100% e sensibilidade em torno de 70%^{1-3,28-30}.

1.2. Transplante Hepático e o CHC

A possibilidade da realização do transplante ortotópico de fígado (TOF) no Ocidente como tratamento do CHC associado à cirrose revelou-se uma estratégia notável uma vez que trata simultaneamente o câncer e a condição que o predispõe⁸⁻¹⁵.

Em maio de 2006 foi publicada, no Brasil, a portaria nº 1160/GM, que modificou os critérios de distribuição de fígado de doadores cadáveres para transplante, implantando o critério de gravidade de estado clínico do paciente (MELD- *Model for End-Stage Liver Disease*)³¹⁻³³.

Esta portaria dispõe sobre a distribuição de doadores cadáveres para transplante, conforme critérios estabelecidos de acordo com a compatibilidade e identidade sanguínea ABO, quanto à compatibilidade anatômica e por faixa etária, quanto às prioridades e à gravidade clínica.

Pacientes com diagnóstico de CHC são avaliadas pela Comissão Técnica-Científica de cada Estado e, após deferimento, são inseridos com pontuação especial. A pontuação inicial nesse grupo será 20 pontos. Caso o paciente não seja transplantado após 90 dias em lista de espera, sua pontuação será automaticamente ajustada para 24 pontos no estado de São Paulo³³.

Para inclusão em lista de espera para transplante de fígado no Brasil os pacientes com CHC e cirrose devem obedecer aos critérios de Barcelona e de Milão³³.

O critério de Barcelona é dividido em critério anatomopatológico, radiológico e combinado³³.

O critério anatomopatológico é definido como a presença de CHC na biópsia hepática.

O critério radiológico exige duas imagens coincidentes, entre quatro técnicas (US com Doppler ou com contraste por microbolhas, CT, RNM ou arteriografia) que demonstrem lesão focal igual ou maior que dois centímetros, com hipervascularização arterial; ou um único método de imagem trifásico (CT helicoidal com multicanais ou RNM) que demonstre lesão focal igual ou maior que dois centímetros com padrão hemodinâmico de hipervascularização arterial e depuração rápida do contraste na fase portal ou de equilíbrio (washout)³³.

E por último o critério combinado: uma imagem que demonstre lesão focal igual ou maior que dois centímetros com hipervascularização arterial e níveis de AFP > 200 ng/ml³³.

O critério de Milão discorre sobre o tamanho das lesões diagnosticadas como CHC estando dentro desses critérios lesões únicas de até cinco centímetros em seu maior diâmetro ou, se múltiplas, até três lesões de três centímetros em seu maior diâmetro, excluída a presença de infiltração vascular e metástases à distância^{10,33}.

O transplante hepático gradualmente ganhou espaço em pacientes com diagnóstico de CHC, atualmente representando 25% das indicações de transplante na Europa, 30% na França e 34% nos EUA^{8-15,34}.

Inicialmente os resultados dos transplantes realizados por CHC foram desalentadores. Pacientes com grandes lesões e múltiplos nódulos foram submetidos a esse procedimento com alto grau de recidiva e sobrevida em cinco anos inferior a 40%^{10,34-37}.

Em 1993, Bismuth et al., demonstraram que pacientes com menos de três tumores, sendo eles menores de três centímetros, eram candidatos de eleição para realização de transplante, com sobrevida de 62% em cinco anos³⁸.

Surge então o conceito da realização de transplante para pacientes com CHC portadores de lesões menores que três centímetros.

Em 1996, esse conceito foi reforçado e sedimentado na literatura através do estudo de Mazzafero et al. que mostraram excelentes resultados em pacientes com CHCs solitários menores que cinco centímetros ou com até três nódulos de até três centímetros; esse critério passou a ser conhecido como Critério de Milão e a sobrevida nesses pacientes excede 70% em 5 anos¹⁰.

Esses dados confirmaram a clara indicação de transplante por CHC na prática clínica.

1.3. Fatores de recidiva tumoral pós-transplante por CHC

A recorrência de CHC após o transplante hepático até 1996 atingia índices de até 40%³⁵⁻³⁸. No entanto, com o início da utilização de critérios como o de Milão o risco de recorrência caiu para 10% a 15% em cinco anos^{1-3,10}.

Como já mencionado, não há terapêutica de consenso em CHC recidivado pós-transplante hepático que aumente a sobrevida ou promova a cura, portanto a prevenção de recorrência é a melhor opção.

Para isso iniciou-se um estudo minucioso na definição de fatores pré e pós o transplante que influenciariam no risco de recidiva.

Vários fatores puderam ser associados ao aparecimento da recidiva, tais como número^{39,40} e tamanho das lesões⁴⁰⁻⁴¹, invasão microvascular⁴²⁻⁴⁴, diferenciação celular^{44,45}, nível de AFP⁴⁶⁻⁵⁰ e regime de imunossupressão pós operatória⁵¹⁻⁵³.

A invasão micro vascular é tida como o maior fator prognóstico para recidiva de CHC⁴²⁻⁴⁴, infelizmente esse achado só pode ser concluído após avaliação do explante. Muitas vezes ela é subavaliada em estudos não minuciosos do órgão retirado (com a realização de poucos cortes durante esta avaliação). Além disso, como será explanado mais adiante, por aparecer associada a outras variáveis como tamanho do nódulo e grau de diferenciação tumoral, ela, muitas vezes, é excluída em estudos de regressão⁵⁴.

O mecanismo de invasão vascular foi investigada por Mitsunobu et al⁵⁵. no CHC: enquanto a artéria hepática responde pela nutrição do nódulo, o sistema portal funciona como vaso eferente, esses vasos eferentes confluem permitindo a

disseminação sistêmica do tumor, portanto a invasão seria pré-requisito para disseminação.

A recorrência hematogênica pode desenvolver-se por dois mecanismos: micro-metástases já presentes no momento do transplante ou disseminação neoplásica durante a cirurgia^{55,56}. Há relatos de células malignas encontradas em sangue de átrio direito e veia porta durante a hepatectomia em CHC⁵⁷.

O tamanho dos tumores, o número de nódulos, e grau de diferenciação das lesões tem sua importância no risco de recidiva atrelado à invasão vascular, ou seja, quanto maiores às lesões, maior o número ou menor grau de diferenciação há maior risco de invasão vascular e, portanto, de recidiva^{39,45,58,59}.

O tamanho dos nódulos, mais que o número de lesões, tem apresentado correlação direta com a presença da recidiva⁴¹, esse dado tem sido levado em consideração em consensos que avaliam a possibilidade de se ampliar o critério de Milão, dirigindo essa alteração para abranger pacientes com maior número de nódulos porém mantendo o critério atual em relação ao tamanho das lesões⁶⁰.

A AFP vem sendo utilizada amplamente na literatura como marcador tumoral há aproximadamente 40 anos. A participação desse marcador seria na regulação e crescimento de oncogenes, havendo evidência de seu papel promovendo crescimento de hepatócitos^{46,47,50}.

No entanto, recentemente estudos vêm definindo a AFP paulatinamente como um marcador com especificidade e sensibilidade deficientes com taxas aproximadas de 60% de sensibilidade e 70% de especificidade, suscitando vários esforços em diversos centros em busca de melhores marcadores^{49,61-64}.

A razão para a baixa sensibilidade e especificidade encontradas vem sendo atribuída aos avanços dos métodos de imagem, os quais hoje conseguem diagnosticar tumores menores que os encontrados no passado e que normalmente são associados a níveis de AFP dentro da normalidade⁴⁹.

Outros marcadores de valor prognóstico vêm sendo estudados, porém ainda sem evidência científica comprovada⁶¹⁻⁶⁵.

O perfil imunohistoquímico já consagrado na diferenciação entre nódulos displásicos e CHCs precoces vem demonstrando utilidade crescente em agregar informações sobre características de malignidade celular⁶⁵⁻⁷².

Muitos desses marcadores imunohistoquímicos, têm características que mantêm estreita relação com tamanho tumoral, grau de diferenciação, proliferação celular e invasão vascular, a maioria deles já tem sido estudada como definidora de prognóstico, e a associação de mais de um marcador parece ser alternativa acertada nessa definição⁶⁵⁻⁷².

1.4. O papel de biópsia no diagnóstico do CHC

A realização de biópsia era reservada apenas a casos atípicos onde os métodos de imagem não conseguiam definir o diagnóstico da lesão suspeita. Falsos negativos podiam alcançar até 30% dos casos em virtude de erros de punção ou ausência de achados histológicos específicos para CHC¹⁻³.

A falta de caracterização radiológica (hipercaptação de contraste na fase arterial e clareamento na fase tardia) ou mesmo a dúvida em relação à biópsia realizada em nódulos pequenos ocorre, na maioria das vezes, em virtude da existência de um tipo de nódulo neoplásico específico.

Pequenos CHCs (SCHC) menores ou iguais a dois centímetros de diâmetro são classificados em dois tipos principais: 1- SCHC nodular distinto e 2-SCHC nodular não distinto (ou CHC precoce)⁶⁴.

SCHC nodulares distintos são bem definidos, usualmente encapsulados, apresentam características radiológicas semelhantes às do CHC clássico, com hipervascularização na fase arterial tanto na TC como na RNM, não apresentando dificuldade no diagnóstico através desses métodos de imagem⁶⁴.

Já os CHCs precoces, ou SCHC nodular não distintos, apresentam-se mal definidos, clinicamente são hipo-vasculares, não são diagnosticados por métodos de imagem convencionais e não podem ser diferenciados de nódulos displásicos, principalmente os de alto grau. A invasão estromal é considerada o achado histopatológico de maior utilidade na diferenciação de nódulo displásico e CHC precoce, porém esse achado nem sempre é evidente⁶⁴.

Foi na tentativa de elucidar esse tipo de dúvida diagnóstica que cada vez mais vem se lançando mão do perfil imunohistoquímico.

Os achados da imunohistoquímica vêm colaborando de tal forma na caracterização das lesões e, inclusive, em relação a seu prognóstico, que as biópsias de nódulos suspeitos para CHC, que antigamente tinham papel exclusivo em para diagnóstico em casos de exceção, atualmente vem ganhando novo espaço na propedêutica do diagnóstico e tratamento desses nódulos⁶⁵⁻⁷³.

A combinação de marcadores como Glipican3 (GPC3), Heat Shock Protein (HSP70) e Glutamina Sintetase (GS) têm sido demonstradas como prova útil no diagnóstico da lesão suspeita para CHC, e a positividade de apenas dois desses marcadores apresenta sensibilidade de 72% e especificidade de 100% para a

presença dessa neoplasia^{66,69,72}. Outros marcadores também têm sido utilizados nessa avaliação de definição da etiologia ou agressividade de lesões compatíveis com CHC, tais como: PCNA, CK7, CK19, beta-catenina e HepPar1.

1.5. Marcadores Imunohistoquímicos

1.5.1. HSP70 (Heat Shock Protein 70)

HSP70 pertence à classe de proteínas implicadas na gênese tumoral, na regulação do ciclo de progressão celular e na proteção contra apoptose espontânea ou gerada por terapia antineoplásica^{66,69,72}.

A maioria dos CHCs são associados à hepatopatia crônica secundária à infecção pelo vírus da hepatite B ou C, ou a processo de inflamação crônica e fibrose; esses eventos funcionam como agentes de estresse celular promovendo a síntese de HSP70⁷⁴.

Ele é um potente anti-apoptótico e sua maior expressão permite a sobrevivência celular nas mais variadas condições, o que em segunda análise, poderia promover o aparecimento de lesões neoplásicas⁷⁵.

Chuma et al.⁷⁶ demonstraram que HSP70 tem o gene mais regulado entre um número de 12600 genes observados em CHCs precoces. Além disso ele é significativamente mais expresso em CHCs avançados em comparação à CHCs precoces⁷⁶.

1.5.2. Glipican3 (GPC3)

GPC3 é um membro da família proteoglicanos heparan sulfato altamente expresso em células de lesões compatíveis com CHC^{66,69,72,77-79}.

Estudos têm mostrado que GPC3 pode estimular o crescimento de células de CHC através de canais de sinalização celular como Wnt /Beta-catenina com papel na regulação da migração e adesão dessas células tumorais⁸⁰. Alguns estudos suportam a idéia de que essa proteína também promoveria proliferação e sobrevivência celular através da interação com fatores de crescimento insulina-like (IGF-2)^{78,79}.

1.5.3. Glutamina Sintetase

Glutamina sintetase catalisa a síntese de glutamina em fígado de mamíferos, essa síntese é restrita à hepatócitos adjacentes às vênulas terminais hepáticas^{81,82}. A glutamina é reconhecida como a maior fonte de energia utilizada por células tumorais^{81,82}.

De acordo com Osada et al.⁸³, pacientes com glutamina sintetase positiva apresentam maior incidência de recidiva tumoral após ressecções, e como a maioria dessas recidivas ocorreram em menos de dois anos, os autores sugeriram a presença de micro-metástases promovendo a recorrência nesses pacientes.

1.5.4. Beta-catenina

Em virtude de seu papel essencial na regulação e desenvolvimento celular desde a embriogênese até tecidos adultos a cascata Wnt/ β Catenina vem sendo objeto de várias pesquisas nas últimas duas décadas⁸⁴.

Muitos desses estudos determinaram a forte correlação entre o gene beta-catenina mutado e seu acúmulo nuclear detectado por métodos imunohistoquímicos⁸⁵.

Essa via de sinalização é indispensável no processo de desenvolvimento, diferenciação, proliferação, crescimento, sobrevivência, regeneração e remodelação celular⁸⁶.

Especificamente na biologia hepática ela apresenta vários papéis. No fígado em processo de desenvolvimento, participa no processo de proliferação de hepatoblastos e sua diferenciação, portanto a ativação aberrante dessa cascata pode propiciar proliferação exacerbada celular e conseqüentemente aparecimento de neoplasias⁸⁷.

1.5.5. Citoqueratinas 7 e 19 (CK7 e CK19)

Hepatócitos e colangiócitos, assim como outras células epiteliais, contém em seu citoplasma filamentos intermediários, o citoesqueleto, chamado de Citoqueratinas (CKs), também presentes em células tumorais. Diferentes células expressam diferentes combinações de citoqueratinas dependendo do órgão e grau de diferenciação celular^{73,88,89}.

Em fígado normal, hepatócitos expressam CK8 e CK18, enquanto colangiócitos expressam CK7 e CK19⁸⁸.

A presença de hepatócitos expressando CK7 e CK19 em lesão compatível com CHC sugere um processo de desdiferenciação celular de hepatócitos maduros em células progenitoras durante o processo carcinogênico⁸⁸⁻⁸⁹.

A presença dessas células imaturas fala a favor de pior prognóstico do CHC mostrando lesões com pior grau de diferenciação e mais invasão vascular⁸⁸⁻⁸⁹. Estudos evidenciam maior recorrência tumoral após transplante hepático em pacientes com CK19 positivos⁸⁹.

1.5.6. HepPar1 (Hepatocyte paraffin 1)

HepPar1 (Hepatocyte paraffin 1) foi desenvolvido em 1993, trata-se de um epitopo (menor porção de antígeno com potencial de gerar a resposta imune) encontrado na membrana de mitocôndrias de hepatócitos, e em mais nenhuma classe de células maduras⁹⁰.

Esse marcador apresenta sensibilidade moderada (75% a 90%) para CHC e aparece positivo também em hepatócitos normais. É comumente utilizado na distinção entre CHC, Colangiocarcinoma ou metástase hepática de outros sítios⁹¹.

Lesões com achado de HepPar1 negativo apresentam pior prognóstico se comparadas às com HepPar1 positivo. Chu et al⁹⁰. reportaram 100% de positividade do HepPar1 em lesões de grau histológico I e II, 84% de positividade no grau histológico III e apenas 50% de positividade no grau IV⁹⁰.

1.5.7. PCNA (Proliferating cell nuclear antigen)

PCNA (Proliferating cell nuclear antigen) é reconhecido como regulador essencial no ciclo de proliferação celular. Foi demonstrado que PCNA atua como cofator para DNA-polimerase na fase S e está envolvido no reparo de DNA durante sua síntese⁹². Tem sido utilizado na avaliação do grau de proliferação

celular como marcador em diferentes tipos de lesões neoplásicas, incluído o CHC⁹³.

Alguns autores demonstraram que a recorrência tumoral após ressecção hepática é menor em pacientes com PCNA negativo, e maior nas lesões com PCNA positivo⁹⁴.

Todos esses marcadores aqui descritos têm em comum a capacidade de avaliar o potencial de malignidade celular, seja sinalizando alteração na regulação do ciclo de progressão, diferenciação e regeneração das células como o HSP70, PCNA ou beta-catenina, seja avaliando o estímulo à proliferação, regulação da migração e adesão celular demonstrados pela presença de glipican3; seja demonstrando o maior aporte nutricional às células neoplásicas inferido pela presença da glutamina sintetase; ou ainda evidenciando desdiferenciação e indiferenciação celular pela presença de HepaPar1, CK7 ou CK19 .

Foi por essa capacidade de inferir sobre características celulares específicas e, por conseguinte, sobre características de malignidade das lesões compatíveis com CHC que eles foram escolhidos em nosso estudo para auxiliar no manejo de pacientes portadores de CHC e que necessitem de um transplante de fígado

.

2. Objetivos

2.1 Objetivo Geral

Avaliar a sobrevida e recidiva tumoral em pacientes submetidos a transplante de fígado em decorrência do carcinoma hepatocelular. Assim como as características tumorais encontradas.

2.2 Objetivos Específicos

- Verificar a frequência da imunoexpressão de marcadores Heat Shock Protein 70 (HSP70), Glipican3, Glutamina Sintetase, Beta-Catenina, Citoqueratina 7 (CK7), Citoqueratina 19 (CK19), Hepatocyte Paraffin 1 (HepPar1) e Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) na neoplasia nestes pacientes;
- Verificar a associação entre a imunoexpressão desses marcadores com as características macroscópicas e histológicas das neoplasias;
- Verificar a associação desses marcadores com tempo até o aparecimento de recorrência da neoplasia e do tempo de sobrevida.

3. Método

A corrente investigação foi realizada de modo exploratório, de coorte longitudinal, por intermédio de um banco de dados coletados de modo prospectivo de 1996 a dezembro de 2010 observando-se os pacientes submetidos a transplante de fígado por carcinoma hepatocelular (CHC).

As análises imunohistoquímicas deste estudo foram realizadas de modo experimental e prospectivo em 2011 e 2012 nas amostras teciduais coletadas dos explantes armazenados pelo Departamento de Anatomia Patológica do Hospital das Clínicas (HC) da Faculdade de Ciências Médicas (FCM) da Universidade Estadual de Campinas (Unicamp).

3.1 Critérios de inclusão

Os pacientes foram incluídos quando:

- Independentemente da raça ou do sexo, eram adultos (maiores de 18 anos) e foram submetidos a transplante de fígado pela técnica de *piggy-back* ou *convencional* (Calne e Williams⁹⁵, Tzakis et al.⁹⁶) sem levar em consideração o tipo de reconstrução venosa supra-hepática realizada.

- Receberam confirmação diagnóstica de CHC pela patologista da Unidade de Transplante Hepático do Hospital de Clínicas da Universidade Estadual de Campinas (UTH – HC – Unicamp).
- A quantidade de material em bloco de parafina foi suficiente para realização de nova coloração de Hematoxilina-Eosina (HE) e estudo imunohistoquímico.

3.2 Critérios de exclusão

Os pacientes foram excluídos se:

- Eram menores de 18 anos;
- Eram portadores de insuficiência hepática aguda grave;
- Receberam um enxerto duplo fígado-rim;
- Eram portadores de dextrocardia;
- Receberam um enxerto reduzido;
- Eram submetidos a re-transplante hepático;
- Não fosse possível a realização de uma das técnicas de coloração acima expostas;
- Havia impossibilidade de reconhecimento da arquitetura tumoral, para avaliação do padrão histológico de Edmonson-Steiner⁹⁷.

3.3. Coleta de dados clínicos

Os pacientes foram acompanhados desde a inclusão em lista pré transplante de fígado até a realização do mesmo, sendo esses pacientes seguidos no Ambulatório da UTH–HC–Gastrocentro-Unicamp até a ocorrência do óbito ou por solicitação de transferência para outro centro transplantador.

Todos os pacientes receberam o enxerto hepático de doadores cadáveres alocados e distribuídos através da Central Nacional de Doação e Captação de Órgãos – II de Ribeirão Preto (CNCDO-II) pertencente ao Sistema Estadual de Transplantes da Secretaria de Estado da Saúde do Estado de São Paulo.

A coleta de dados foi realizada imediatamente após a conclusão do transplante. Os exames laboratoriais dos receptores foram realizados no Laboratório de Patologia Clínica do Hospital de Clínicas da Unicamp seguindo-se protocolos por eles definidos.

3.3.1. Dados do receptor

a) As variáveis gerais coletadas do receptor foram:

- Nome
- Idade
- Registro hospitalar na instituição
- Sexo (masculino / feminino)
- Etiologia da hepatopatia crônica

- MELD no pré-operatório imediato
- Nível de AFP no pré operatório imediato e no pós operatório (maior ou menor que 200 ng/dl e de modo contínuo)
- Índice de Massa Corporal (IMC) em Kg/m²

b) As variáveis intra-operatórias, anotadas imediatamente após a cirurgia, foram:

- Tempo de isquemia quente (minutos);
- Tempo de isquemia fria (minutos);
- Tempo de cirurgia (minutos);
- Quantidade de concentrados de hemácias transfundidos em unidades.

c) As variáveis pós-operatórias foram:

- Registro da data da última visita ou do óbito até 30 de dezembro de 2010;
- Imunossupressão utilizada;
- Presença de recidiva do CHC e tempo até o evento (meses);
- Tempo de sobrevida (meses);

- Causa da morte (recidiva tumoral, recidiva da doença de base, metabólica, infecciosa, de causa cardiovascular, neoplasia outra que não CHC e secundária a rejeição crônica).

3.4. Protocolo de imunossupressão

Corticoterapia (Metilprednisolona):

- 400 mg após reperfusão com redução diária até 20 mg até o 14^o dia, 15 mg no 2^o mês, 10 mg no 3^o mês e com retirada até o 90^o dia com exceção dos portadores de doenças auto-imunes.

Tacrolimus (FK506):

- 0,05 a 0,1 mg/kg de 12/12 hs, com nível sanguíneo esperado de:
 - Dia 1 A Dia 90: 8 a 12 ng/ml
 - Acima de Dia 90: 5 a 10 ng/ml

Ciclosporina (CYA)

- 0,04 – 0,08 mg/kg/dia de 12/12 hs, com nível sanguíneo esperado de:
 - C0 (vale/antes da próxima tomada):
 - Até 30 dias → 200 – 400 ng/ml
 - 30 dias – 6 meses → 150 – 250 ng/ml
 - Acima de 6 meses → 80 – 150 ng/ml

- C2 (até 2 hs após a última tomada):
 - Até 30 dias → 800 – 1400 ng/ml
 - 30 dias – 6 meses → 600 – 800 ng/ml
 - Acima de 6 meses → 400 – 600 ng/ml

Micofenolato

Início quando receptor apresentava nível sérico :

- Acima de 30.000 plaquetas e de 3.000 leucócitos
 - Sódico: 180 – 360 mg em até 8/8 hs;
 - Mofetila: 500 mg em até 8/8 hs.

Sirolimo

Usado como terapia de resgate em casos de rejeição celular aguda cortico-resistente, rejeição celular crônica e casos de neoplasias.

- Dosagem de 1 a 2 mg ao dia .
- Níveis sanguíneos de 8 – 12 ng/ml

Everolimus

Usado como terapia de resgate para rejeição celular aguda cortico-resistente, rejeição celular crônica.

- Dosagem de: 1 a 2 mg ao dia
- Nível sanguíneo de 8 – 12 ng/ml

3.5 População estudada

A população inicial cuja avaliação do explante evidenciou a presença de CHC foi de 120 pacientes.

No entanto, em virtude de perda de material arquivado, e mesmo em alguns casos de ausência de neoplasia viável nos blocos estudados (escassez de material por estudos prévios, necrose da lesão por quimo embolização trans-arterial (TACE) ou alcoolização pré-operatória, o número final elegível para o estudo foi reduzido a 90 casos.

3.6. Avaliação do Explante

O estudo do explante foi avaliado à luz da macroscopia e microscopia sendo observados:

- Grau histológico do tumor segundo graduação histológica de Edmondson-Steiner⁹⁷;
- Tamanho do maior nódulo (em centímetros);
- Número de nódulos;
- Presença ou não de micro invasão vascular.

3.6.1. Graduação Histológica de Edmondson-Steiner

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 frequentes, com lumens variando de tamanho e preenchidos por bile ou por precipitado proteico.

Grau III: Núcleos maiores e mais hipercromáticos que aqueles encontrados no grau II, com nítido aumento da relação núcleo-citoplasmático. O citoplasma pode, eventualmente, ser menos granular e acidófilo que no grau II e frequentemente as formações luminares não contêm bile. Uma de suas principais características é a presença de células gigantes tumorais que são mais frequentemente observadas neste grau. Colapso e destruição 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 “out cell”.

3.7- Confecção das Lâminas para Estudo Imunohistoquímico

3.7.1- Arranjo em Matriz Tecidual (Tissue Microarray- TMA)

O arranjo em matriz tecidual (do inglês, tissue microarray- TMA) constitui um método que redistribui numerosos fragmentos cilíndricos teciduais de blocos de parafina convencionais (chamados blocos doadores) em um novo bloco (bloco receptor)⁹⁸⁻¹⁰¹.

Esse bloco compartimentalizado contém as várias amostras teciduais seguindo uma ordem pré-definida, permitindo assim o estudo da expressão de marcadores moleculares em larga escala com aproveitamento do material arquivado, de tempo e de custos¹⁰¹.

Cortes histológicos representativos de cada caso, corados por HE, foram analisados pela patologista e as áreas de interesse foram selecionadas nas lâminas. Essas áreas foram marcadas nos respectivos blocos de parafina doadores dos tecidos.

Cilindros de 3.0 mm de diâmetro das áreas marcadas nos blocos de parafina doadores (2 cilindros por caso) foram coletados através de agulha específica para o procedimento (Tissue-Tek® Quick-Ray, Tissue microarray system ref.8010) e transportados para os blocos de parafina receptor (TissueTek® Quick Ray ref.8018; 5x6 matrix of 3mm cores; Sakuda, Tokio) através de sistema manual, com intervalo de 2.0 mm entre os cilindros.

Cada cilindro amostral foi alocado numa posição do bloco receptor definida num sistema cartesiano de coordenadas.

Entre esses cilindros foram incluídos cilindros de outros tecidos como miocárdio, placenta e rim para orientar o início da leitura e o direcionamento das lâminas (cilindro indicador de leitura).

No total foram confeccionados 7 blocos de TMAs diferentes com 2 amostras de cada um dos 90 casos representativos de CHC. Figuras 1 e 2.

Figura 1: Bloco receptor de TMA (Arranjo em Matriz Tecidual) onde cada cilindro representa um paciente estudado.

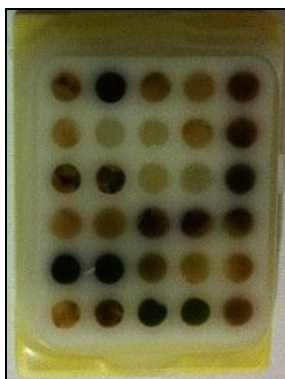
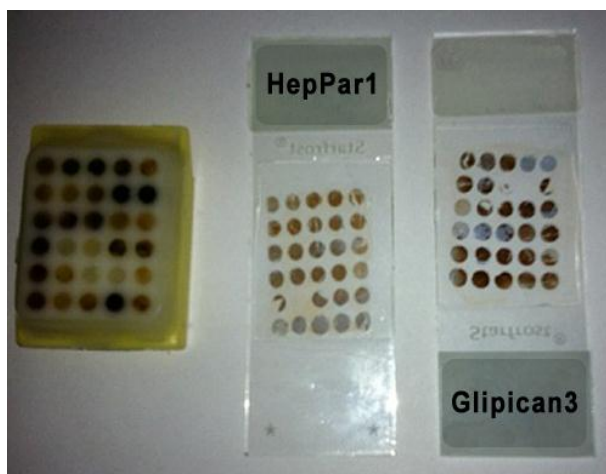


Figura 2: Bloco de TMA (Arranjo em Matriz Tecidual) e reprodução gráfica das lâminas confeccionadas a partir destes blocos, neste caso foram exemplificados o HeparPar1 (Hepatocyte paraffin 1) e Glipican3 (GPC3)



3.7.2. Estudo imunohistoquímico

O protocolo usado na técnica imunohistoquímica constou das seguintes etapas:

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

Bloqueio de peroxidase endógena: As lâminas são imersas por 15 minutos, à temperatura ambiente, em solução 3% de 10 ml de H₂O₂ e 90 ml de álcool metílico.

Recuperação antigênica: As lâminas são imersas em tampão citrato pH 6.0 por 3 minutos e 30 segundos, a partir de ebulição em panela de pressão. São postos para esfriar, em temperatura ambiente, por 15 minutos e lavados em água corrente. O tampão citrato pH 6.0 é composto por ácido cítrico monohidratado (2.1g) e água destilada (1000 ml).

Anticorpo primário: As lâminas são cobertas por solução diluída do anticorpo primário 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.

Revelação de Coloração: Utilizado em cada lâmina Kit de Revelação “Advanced HRP” DAKO código K4068. Lavagem das lâminas em PBS por 3 vezes de 5 minutos cada. Feita a revelação com Kit DAB DAKO código K3468.

Em seguida é realizada lavagem em água corrente durante 5 minutos. Contracorado com Hematoxilina de Mayer. Nova lavagem em água corrente. Passada em água amoniacal (1%) e nova lavagem em água corrente. Realizada desidratação por 3 álcoois sucessivos (álcool à 99%, álcool à 80% e álcool à 50%) e por três soluções de Xilol. Realizada a montagem com resina.

3.7.3. Marcadores Imunohistoquímicos

Foram avaliados 8 marcadores :

- Heat Shock Protein 70 (HSP70);
- Glipican3 (GPC3)
- Glutamina Sintetase (GS)
- Beta-Catenina
- Citoqueratina (CK 7)
- Citoqueratina (CK19)
- HepPar1 (Hepatocyte paraffin 1)
- PCNA (Proliferating cell nuclear antigen)

As especificações de cada um dos marcadores são expostos na Tabela 1.

Tabela1: Descrição do anticorpos utilizados na realização do perfil imunohistoquímico

Anticorpo	Origem	Clone	Diluição	Fornecedor / Código
Glipican3	Mouse monoclonal	1G12	1/100	Santa Cruz sc 65443 NY- USA
HSP70	Mouse monoclonal	C92F3A5	1/100	ABCAM ab47455 LA- USA
CK7	Mouse monoclonal	OV-TL 12/30		DAKO M7018 Tokio JP
Beta-catenina	Mouse monoclonal		1/100	DAKO M3539
Glutamina Sintetase	Rabbit polyclonal		1/400	ABCAM ab16802
CK19	Mouse monoclonal	RCK108	1/200	DAKO IS615
HepPar1	Mouse monoclonal	OCH1E5	1/400	DAKO IS624
PCNA	Mouse monoclonal	PC10	1/400	DAKO M0879

- Heat Shock Protein 70= HSP70; PCNA= Proliferating cell nuclear antigen; HepaPar1=Hepatocyte paraffin1; Citoqueratina 7= CK7; Citoqueratina19= CK19

3.7.4. Interpretação dos Resultados Imunohistoquímicos

Foi realizada uma avaliação da quantidade de hepatócitos imunorreativos em cada cilindro amostral.

Conforme convenção estabelecida para o presente estudo, em vista do volume amostral para melhor averiguação estatística, considerou-se que os marcadores eram positivos quando os mesmos se encontravam presentes em mais de 25% dos espécimes celulares no CHC da amostra do cilindro e negativos quando apareciam corando menos que 25% dos hepatócitos neoplásicos da amostra.

3.8. Comitê de Ética

O número do protocolo de aprovação do Comitê de Ética e Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas/Unicamp foi 363/2011

A carta de aceite encontra-se no Anexo 1.

3.9. Análise Estatística

A análise estatística foi realizada pelos membros da Comissão de Estatística da FCM-Unicamp.

Foi realizada análise descritiva com apresentação de tabelas de frequência das variáveis categóricas, com valores de frequência absoluta (n) e relativa (%), e medidas de posição e dispersão-média, desvio padrão, valores mínimo e máximo e mediana, para as variáveis numéricas.

Para comparação de proporções foi utilizado o teste Qui-quadrado ou o teste de Fisher, quando necessário.

Para comparação de medidas numéricas entre 2 grupos foi utilizado o teste de Mann-Whitney.

Para identificar fatores associados ao óbito foi utilizada a análise de regressão logística univariada e múltipla.

Para identificar fatores associados à sobrevida foi utilizada a análise de regressão de Cox univariada e múltipla.

A análise de sobrevida atuarial foi realizada utilizando-se o método de Kaplan-Meier e o teste de Breslow.

O processo de seleção de variáveis utilizado foi o “stepwise”.

Para determinação de valores de corte foi utilizada a curva ROC (Receiver Operator Characteristic) que expressa a relação entre a sensibilidade e especificidade de um determinado teste.

O nível de significância adotado para os testes estatísticos foi 5%.

O programa computacional utilizado foi SAS System for Windows (Statistical Analysis System), versão 9.2. SAS Institute Inc, 2002-2008, Cary, NC, USA

4. Resultados

4.1. Avaliação Geral da População

Foram avaliados 90 pacientes cirróticos submetidos a transplante hepático que tiveram confirmação diagnóstica de CHC na avaliação do explante com quantidade de material em bloco de parafina suficiente para realização de nova coloração de Hematoxilina-Eosina (HE) e imunohistoquímica para Glipican3, PCNA, HepPar1, Glutamina sintetase, HSP70, CK7, CK19 e Beta-catenina.

Os dados gerais dos pacientes estudados encontram-se no Anexo 2.

Dentre os 90 pacientes, 74 (82%) eram do sexo masculino e 16 (18%) do sexo feminino.

A idade média foi de $52,8 \pm 9,1$ anos.

A média de IMC foi de $26,9 \pm 4,15$ Kg/m² e o valor do MELD puro verificado no momento da cirurgia foi de 15 ± 5 .

A média do nível de AFP foi de $111,38 \pm 373,93$ ng/ml sendo que apenas 11 (12%) desses pacientes apresentavam AFP superior a 200ng/ml no momento da intervenção cirúrgica. Após a recidiva, a média do nível de AFP foi de 1900 ± 256 ng/ml.

A quimioterapia ou alcoolização pré-operatórios foram utilizadas em 22 (24%) pacientes.

A técnica utilizada na realização do transplante foi piggy-back em 60 (67%) pacientes e a convencional em 30 (33%) casos.

O tempo médio de cirurgia foi de $464,7 \pm 120,93$ minutos, sendo a média de concentrados de hemácias ministrados de $5,5 \pm 4,7$ unidades. O tempo médio de isquemia fria foi de 550 ± 120 minutos e o tempo médio de isquemia quente de 70 ± 40 minutos.

Em relação ao explante, a média do número de nódulos encontrada foi 3 ± 2 nódulos e a média de tamanho dos nódulos de $27,4 \pm 12,3$ mm.

Os graus histológicos I,II e III foram encontrados em 8 (9%) , 63 (70%) e 19 (21%) pacientes, respectivamente e a invasão microvascular foi observada em 25 (28%) pacientes.

As variáveis descritas estão esquematizadas na Tabela 2 e 3.

Tabela 2: Distribuição das variáveis estudadas na população em estudo segundo a frequência e médias observadas

Variáveis	
Sexo masculino /feminino (%)	74 (82%) / 16 (18%)
Idade (anos)	52,8 ± 9,1
IMC (kg/m²)	26,9 ± 4,2
MELD	14,9 ± 5,3
AFP (ng/ml)	111,38 ± 373,93
Pacientes com AFP>200ng/ml (%)	11 (12%)
Pacientes com tratamento pré operatório(%)	22 (24%)
Tempo de cirurgia (minutos)	464,7 ± 120,93
Concentrados de Hemácias (unidades)	5,5 ± 4,7
Isquemia Fria (minutos)	550 ± 120
Isquemia Quente (minutos)	70 ± 40
Paciente com Recidiva (%)	7 (8%)

AFP= Alfa-fetoproteína; MELD=Model for End-Stage Liver Disease; IMC=índice de massa corporal

Tabela 3: Distribuição das variáveis estudadas em relação às características das lesões: frequência e médias.

Variáveis	
Número de Nódulos	3 ±2
Tamanho dos Nódulos (mm)	27,4 ±12,3
Pacientes com Grau I (%)	8 (9%)
Pacientes com Grau II (%)	63 (70%)
Pacientes com Grau III (%)	19 (21%)
Pacientes com Invasão Angiolinfática (%)	25 (28%)

mm=milímetros

As causas da hepatopatia crônica estão descritas na Tabela 4.

Tabela 4: Etiologias das hepatopatias crônicas

Doença	Frequência	Porcentagem
HCV	61	67,78
HCV/Álcool	9	10,00
Álcool	7	7,78
Criptogênica	5	5,56
HBV	3	3,33
HBV/HCV	2	2,22
HAI	1	1,11
Hemocromatose	1	1,11
Álcool/HBV	1	1,11

HBV=hepatite por vírus B; HAI=hepatite autoimune; HCV=hepatite por vírus C,

Em relação à imunossupressão observamos que o tacrolimus foi utilizado por 63% dos pacientes, com nível sérico médio de 8,6 ±3,6mg/dl.

A ciclosporina foi utilizada em 34% dos pacientes, com nível sérico médio em C0 de $195 \pm 34,6$ ng/ml.

Micofenolato mofetila ou sódico foi utilizado em 54% dos pacientes como segundo imunossupressor.

O sirolimo foi utilizado em 5% dos pacientes com nível sérico médio de $11.7 \pm 3,7$ ng/ml e o everolimo, em 2% dos pacientes com nível sérico médio de $10,9 \pm 3,23$ mg/ml.

Não houve correlação estatística analisando tipo de imunossupressão utilizado e a presença de recidiva ou tempo de sobrevida. Não se observou, também, associação da dosagem do imunossupressor em relação à presença de recidiva e tempo de sobrevida.

Dos 90 pacientes estudados 54 evoluíram a óbito, sendo as etiologias desses óbitos discriminadas na Tabela 5.

Tabela 5: Etiologias dos óbitos encontrados nos 90 pacientes em estudo.

Causa	Frequência	Porcentagem
Recidiva Viral	12	21,8 %
Sepse	11	20 %
Rejeição celular crônica	9	16,4 %
Complicações Cardiovasculares	8	14,6 %
Recidiva de CHC	7	12,7 %
Metabólica	5	10,9 %
Neoplasias não CHC	2	3,6 %

CHC= carcinoma hepatocelular

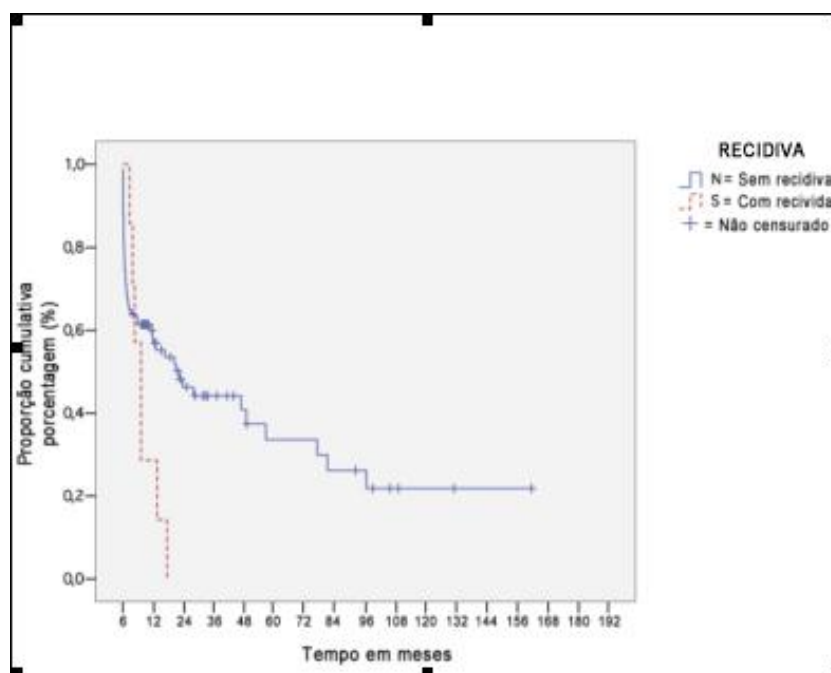
A recidiva tumoral foi diagnosticada em sete (8%) pacientes sendo os sítios de recorrência observados: em quatro pacientes no fígado implantado; em um, no pulmão; em um, em cérebro e pulmão e em um outro paciente, em múltiplos sítios (fígado, pulmão, peritônio e ossos).

Avaliando a sobrevida de pacientes com diagnóstico de recidiva, de acordo com o método de Kaplan Meier, observamos que não houve diferença significativa entre as duas distribuições. (Figura 3)

O tempo de sobrevida de pacientes com recidiva tumoral em 6 meses foi de 28,6% e em um ano após a cirurgia, de 14,3 %.

O tempo médio do aparecimento da recidiva foi de nove meses após a realização do transplante, e as respectivas recidivas foram à causa de óbito em todos estes pacientes. O tempo médio de sobrevida foi de seis meses após o diagnóstico da recorrência tumoral .

Figura 3: Curvas de sobrevida com e sem o aparecimento de recidiva (Kaplan- Meier)



4.2. Associação da Sobrevida e Outras Variáveis de Interesse

Estudando a relação entre a sobrevida e as variáveis categóricas: sexo, presença de recidiva, grau-histológico, presença de invasão vascular e AFP acima de 200 ng/dl, observou-se que pacientes com recidiva tumoral apresentaram menor sobrevida ($p=0.04$; teste de Qui-quadrado/Fisher) como observado na Tabela 6.

Tabela 6: Sobrevida relacionada às variáveis categóricas

Variáveis	Óbitos	Vivos	P
Sexo Feminino	9 (10%)	7 (8%)	0,6
Sexo Masculino	46 (51%)	28 (31%)	0,6
Com tratamento pré operatório	10 (11%)	12 (13%)	0,08
Pacientes com Grau I	5 (6%)	3 (3%)	1
Pacientes com Grau II	38 (42%)	25 (28%)	1
Pacientes com Grau III	12 (13%)	7 (8%)	1
Pacientes com recidiva	7 (8%)	0	0,04
Pacientes com AFP> 200ng/ml	5 (6%)	6 (7%)	0,3
Pacientes com invasão angiolinfática	18 (20%)	7 (8%)	0,2

AFP = alfa-fetoproteína;

Estudando a relação entre a sobrevida e as variáveis contínuas: idade, número de nódulos, tamanho do maior nódulo, nível de AFP, tempo de cirurgia, e valores de MELD, observou-se que pacientes com maior tempo de cirurgia apresentaram menor sobrevida ($p=0,02$; teste de Mann-Whitney) como pode ser visto na Tabela 7.

Tabela 7: Sobrevida relacionada às variáveis contínuas

Variáveis (%)	Óbitos	Vivos	P
Idade (anos)	52 ±10	53,9 ±7,4	0,5
Número de nódulos	3 ± 2	3 ± 2	0,4
Maior nódulo (em mm)	28,4 ± 4,1	25,8 ± 8,7	0,7
AFP (ng/ml)	193,18 ± 292,1	139,9 ± 478,7	0,6
IMC (Kg/m ²)	26,7 ± 3,8	27,3 ± 4,6	0,9
Tempo de cirurgia (min)	494,6 ± 116,1	417,7 ± 114,7	0,002
MELD	15,74 ± 5,6	13,6 ± 4,5	0,07

mm=milímetros; AFP=alfa-fetoproteína; IMC=índice de massa corporal; MELD=model for end stage liver disease.

Segundo regressão logística univariada para estudo do óbito evidenciou-se que a única variável com significado estatístico foi o tempo de cirurgia ($p=0,005$; $OR=1,006$), ou seja, cada minuto de cirurgia aumenta em 0,06% o risco de óbito.

Segundo análise de regressão logística múltipla os fatores para risco de óbito observados foram: tempo de cirurgia ($p=0,006$ $OR=1,006$); transfusão de concentrado de hemácias ($p=0,01$ $OR=1,16$) e MELD ($p=0,03$ $OR=1,108$), ou seja, a cada minuto de cirurgia o risco de óbito aumentou em 0,6%, a cada concentrado de hemácias transfundido houve um aumento de 16% no risco de óbito e a cada unidade de MELD aumentada o risco de óbito foi aumentado em 10,8%.

Estudando a relação do tempo de sobrevida (teste de regressão de Cox) e as variáveis: oito marcadores imunohistoquímicos estudados individualmente; sexo; recidiva; invasão vascular; grau histológico; nível de AFP acima de 200 ng/ml; tempo de cirurgia e MELD, apenas o tempo de cirurgia apresentou significância estatística ($p=0,03$; $HR=1,003$), ou seja, para cada minuto de cirurgia decorrido houve uma diminuição de 0,3% no tempo de sobrevida.

As análises realizadas usando a curva ROC para discriminar óbito não apresentaram significância estatística quando se analisou: tamanho do nódulo, número de nódulo ou o nível de AFP.

4.3. Associação da Recidiva Tumoral e Outras Variáveis em Estudo

Avaliando-se a presença de recidiva tumoral em relação às variáveis: sexo, grau histológico, invasão vascular, AFP acima de 200 ng/ml, observou-se que pacientes com achado de invasão vascular apresentaram tendência à recidiva tumoral ($p=0,09$; teste de Fisher), como pode ser visto na Tabela 8.

Tabela 8: Associação da recidiva tumoral e variáveis categóricas

Variáveis (%)	Sem Recidiva	Com Recidiva	P
Feminino	14 (16%)	2 (2%)	0,6
Masculino	69 (77%)	5 (6%)	0,6
Grau I	8 (9%)	0	0,4
Grau II	59 (66%)	4 (4%)	0,4
Grau III	16 (18%)	3 (3%)	0,4
Pacientes com invasão	21 (23%)	4 (4%)	0,09
Pacientes com AFP > 200 ng/ml	9 (10%)	2 (2,2%)	0,2

AFP=alfa-fetoproteína

Avaliando a presença de recidiva tumoral (agora segundo teste de Mann Whitney) em relação a variáveis: idade, número de nódulos, maior nódulo, níveis de AFP, observou-se que pacientes com maior número de nódulos apresentaram mais recidiva tumoral conforme descrito na Tabela 9.

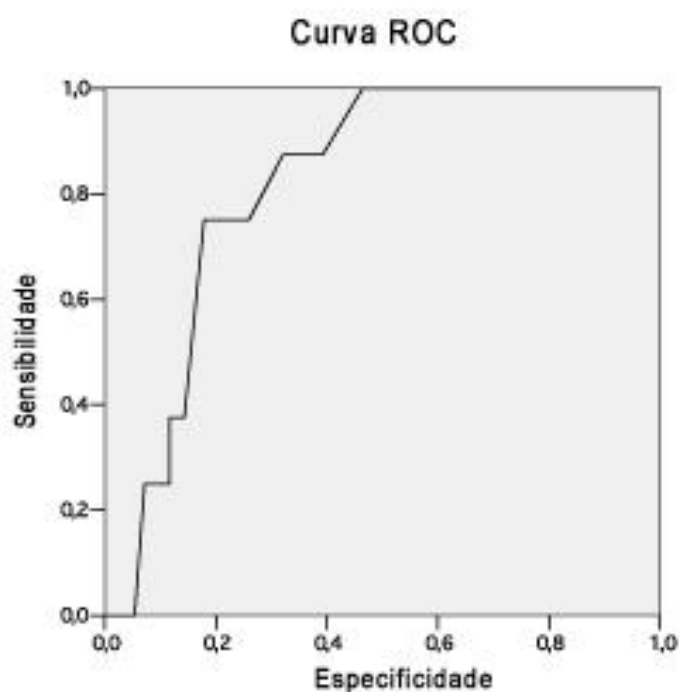
Tabela 9: Associação da recidiva e variáveis contínuas

Variáveis	Sem recidiva	Com recidiva	P
Idade (anos)	52,9 ± 9,0	51,3± 10,3	0,6
Número de nódulos	3 ± 2	4 ± 2	0,01
Maior nódulo (mm)	26,7 ± 12,4	36,3 ± 7,8	0,01
AFP (ng/ml)	103,2 ± 371,7	208,4 ± 416,0	0,46
IMC (Kg/m ²)	26,8 ± 4,0	28,8 ± 5,6	0,6
Tempo de cirurgia (min)	462,4 ± 119,7	492,9 ±141,6	0,3
MELD	15,12 ± 5,4	12,3 ± 3,17	0,2

mm=milímetros; AFP=alfa-fetoproteína; IMC=índice de massa corporal;
min=minutos;Meld=Model for End-Stage Liver Disease

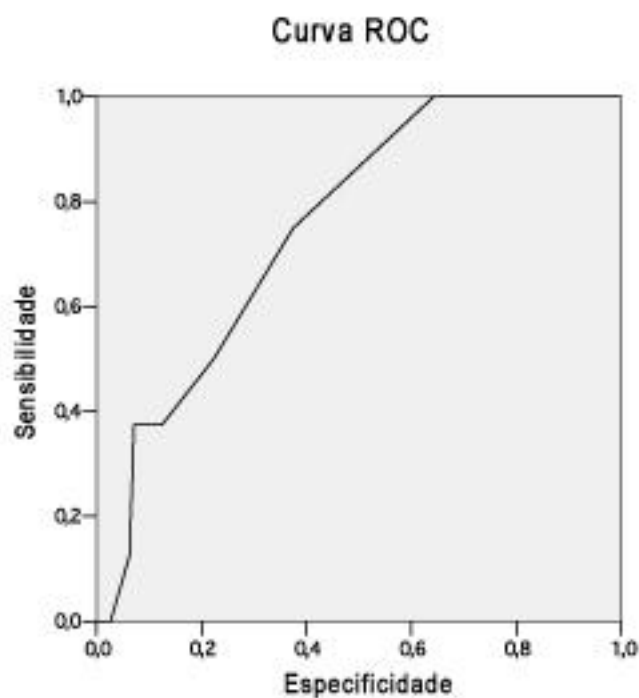
Segundo análise da curva ROC do tamanho do maior nódulo para discriminar recidiva tumoral, observou-se que o ponto de corte foi de 34,5 mm com sensibilidade de 75%, especificidade de 82,1% e acurácia de 82% como demonstrado na Figura 4.

Figura 4 : Curva ROC analisando o tamanho do maior nódulo como fator discriminador de recidiva tumoral.



Também na curva ROC, agora avaliando o número de nódulos na discriminação de recidiva, observou-se o ponto de corte de três nódulos com especificidade de 62,5%, sensibilidade de 75% e acurácia de 75,4%, como demonstrado na Figura 5.

Figura 5: Curva ROC do número de nódulos para discriminar a recidiva tumoral



4.4. Estudo dos Marcadores Tumorais

Os marcadores imunohistológicos se distribuíram como demonstrado na Tabela 10.

Tabela 10: Perfil de distribuição dos marcadores imunohistoquímicos

Marcador	Positivo	Negativo
Glipican3	33 (37.08%)	56 (62.92%)
Glutamina Sintetase	15 (16,67%)	75 (83.3%)
HSP70	18 (20.00%)	72 (80.00%)
Beta-catenina	32(35.56%)	58 (64.4%)
HepPar1	81 (91.01%)	8 (8.99%)
PCNA	31 (34.4%)	59 (65.56%)
CK7	62 (68.89%)	28 (31,11%)
CK19	37 (41.57%)	52 (58.43%)

HSP70= Heat Shock Protein 70; HepPar1= Hepatocyte paraffin 1; PCNA= Proliferating cell nuclear antigen; CK7= Citoqueratina 7; CK19= Citoqueratina 19

As lâminas obtidas em cada marcador estudado estão representadas da Figura 6 à Figura 13.

Figura 6 : Êmbolo vascular exibindo positividade citoplasmática ao Glipican3
(100X)

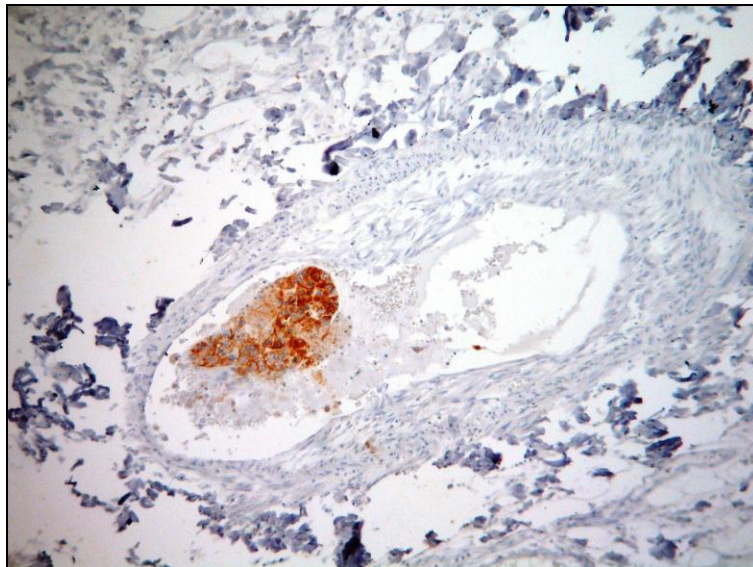


Figura 7 : Êmbolo vascular exibindo positividade citoplasmática ao Glipican3,
(640X)

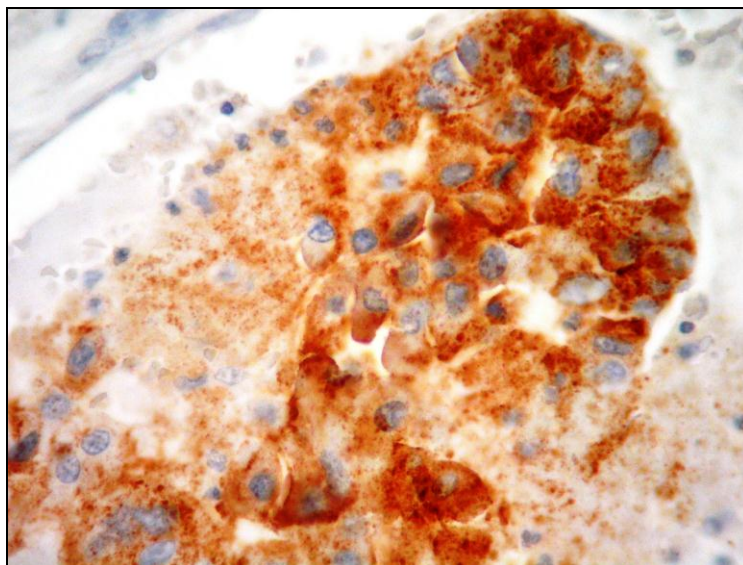


Figura 8: Positividade citoplasmática focal à Beta-catenina(640X)

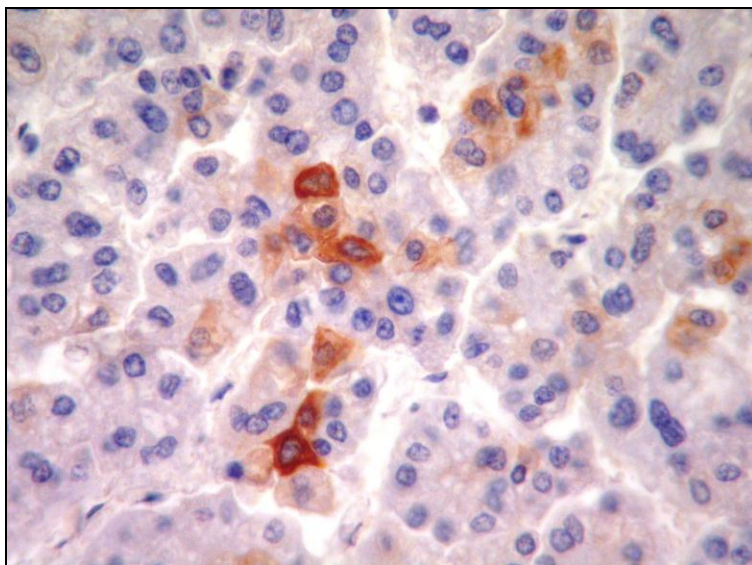


Figura 9: Positividade nuclear difusa ao HSP70 (640X)

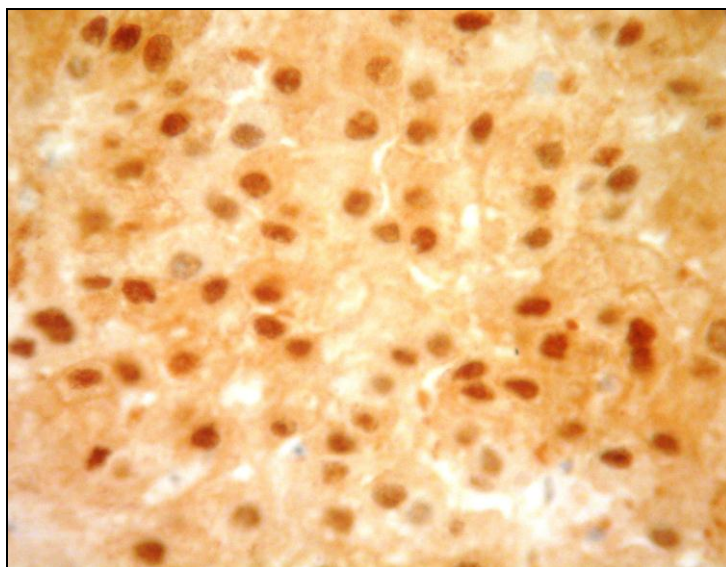


Figura 10: Positividade citoplasmática e nuclear à Glutamina sintetase (640X)

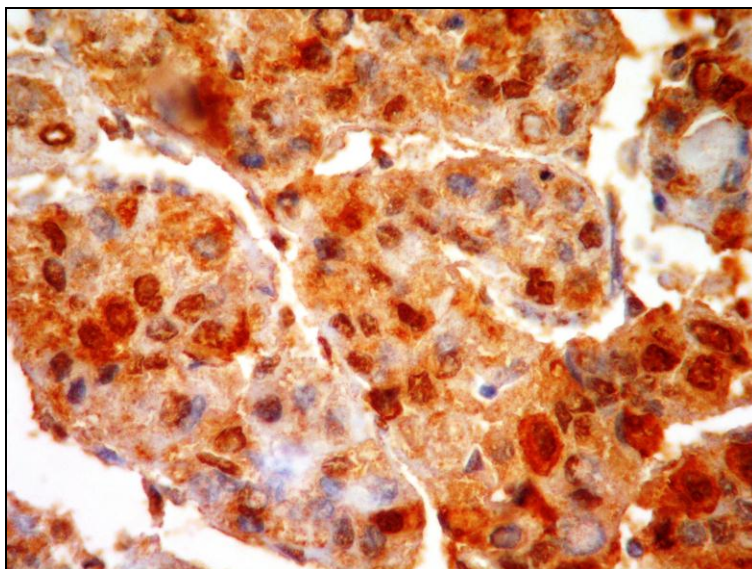


Figura 11: Positividade citoplasmática (padrão granular) difusa ao HepaPar1 (640X).

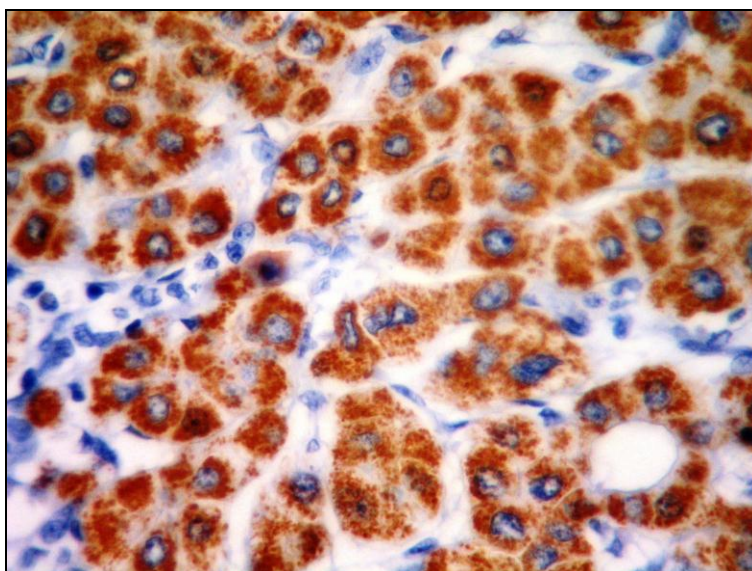


Figura 12: Positividade citoplasmática e nuclear ao PCNA (640X)

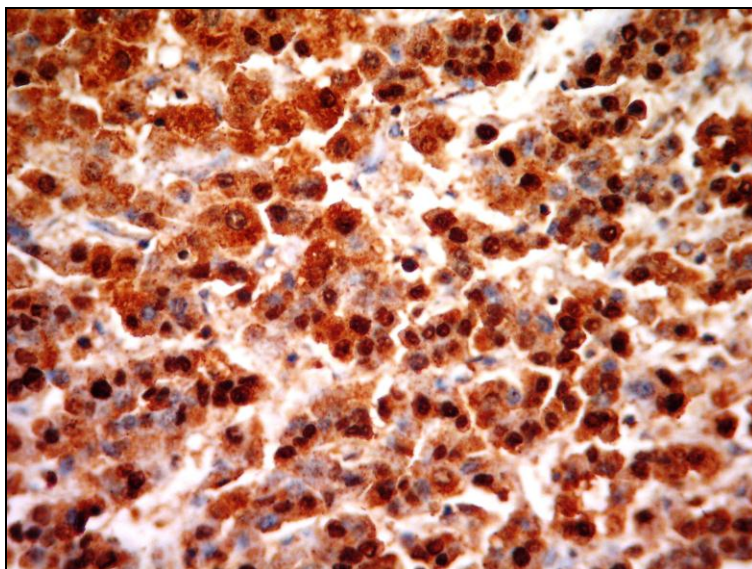
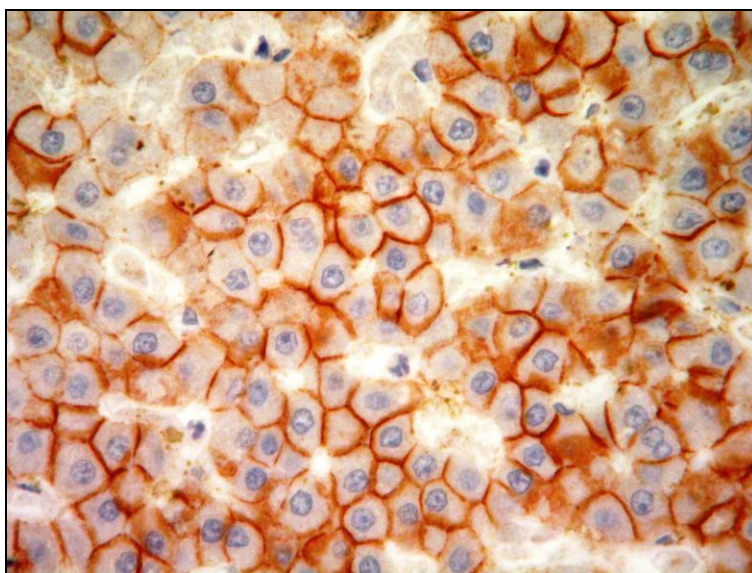


Figura 13: Positividade de membrana extensa e citoplasmática focal à CK19 (640X)



Estudando a sobrevida e os oito marcadores imunohistoquímicos não se evidenciou diferença estatística entre nenhum deles. No entanto, pacientes com glutamina sintetase positiva demonstraram tendência a apresentar menor sobrevida ($p=0,1$). Na tabela 11 observa-se essa distribuição de amostras com valor de p observado.

Avaliando a presença da recidiva e os oito marcadores em estudo pode-se observar que em pacientes com marcador HepPar1 negativo, houve maior prevalência de recidiva (Tabela 12).

Associando o grau histológico e os marcadores imunohistoquímicos foi observado a maior prevalência do Grau III em pacientes com HSP70 e beta-catenina positivos ($p=0,03$ e $p=0,01$, respectivamente) (Tabela 13)

Em relação à presença da invasão vascular e os oito marcadores estudados não se evidenciou diferença estatística entre as variáveis conforme descrita na Tabela 14.

Estudando a associação de nível de AFP superior a 200ng/ml e os oito marcadores estudados observou-se maior frequência de níveis de AFP superior a 200 ng/ml em pacientes com Glipican3 positivo ($p=0,01$) (Tabela 15).

Tabela 11: Correlação entre perfil imunohistoquímico e sobrevida

Marcador		Óbito	Vivo	p
Glipican3	Positivo	19 (57,58%)	14 (42,42%)	0,52
	Negativo	36(64,29%)	20(35,71%)	
GS	Positivo	12 (80,00%)	3 (20,00%)	0,10
	Negativo	43(57,33%)	32(42,67%)	
HSP70	Positivo	11 (61,11%)	7 (38,89%)	1,00
	Negativo	44 (61,11%)	28 (38,89%)	
PCNA	Positivo	17 (54,84%)	14 (45,16%)	0,37
	Negativo	38 (64,41%)	21 (35,59%)	
CK7	Positivo	37 (59,68%)	25 (40,32%)	0,92
	Negativo	17 (60,71%)	11 (39,29%)	
CK19	Positivo	21 (56,76%)	16 (43,24%)	0,52
	Negativo	33 (63,46%)	19 (36,54%)	
HepPar1	Positivo	49 (60,49%)	32 (39,51%)	0,70
	Negativo	6 (75,00%)	2 (25,00%)	
Beta-catenina	Positivo	16 (50,00%)	16 (50,00%)	0,15
	Negativo	39 (67,24%)	19 (32,76%)	

GS=glutamina sintetase; HPS70= Heat Shock Protein 70; PCNA= Proliferating cell nuclear antigen; CK7= Citoqueratina7; CK19= Citoqueratina19, HepPar1= Hepatocyte paraffin 1

Tabela 12: Correlação entre perfil imunohistoquímico e aparecimento de recidiva tumoral

Marcador		Sem recidiva	Com Recidiva	P
GS	Positivo	29(87,88%)	4 (12,12%)	0,41
	Negativo	53 (94,64%)	3 (5,36%)	
GS	Positivo	14 (93,33%)	1 (6,67%)	1,00
	Negativo	69 (92,00%)	6 (85,10%)	
HSP70	Positivo	16 (88,89%)	2 (11,11%)	0,62
	Negativo	67(93,06%)	5 (6,94%)	
PCNA	Positivo	27 (87,10%)	4(12,90%)	0.62
	Negativo	56 (94,92%)	3 (5,08%)	
CK7	Positivo	58 (93,55%)	3(6,45%)	0,67
	Negativo	25 (89,29%)	3 (10,71%)	
CK19	Positivo	34(91,89%)	3 (8,11%)	1,00
	Negativo	48 (92,31%)	4 (7,69%)	
HepPar1	Positivo	77 (95,06%)	4 (4,94%)	0,014
	Negativo	5 (62,50%)	3 (37,50%)	
Beta-Catenina	Positivo	29 (90,63%)	3 (9,38%)	0,69
	Negativo	54 (93,10%)	4 (6,90%)	

GS=glutamina sintetase; HPS70= Heat Shock Protein 70; PCNA= Proliferating cell nuclear antigen; CK7= Citoqueratina7; CK19= Citoqueratina19, HepPar1= Hepatocyte paraffin 1

Tabela 13: Correlação entre perfil imunohistoquímico e grau histológico

Marcador		Grau I	Grau II	GRAU III	P
Glipican3	Positivo	2 (6,06%)	21 (63,64%)	10 (30,30%)	0,25
	Negativo	6 (10,71%)	41 (73,21%)	9 (16,07%)	
GS	Positivo	2 (13,33%)	12 (80,00%)	1 (6,67%)	0,27
	Negativo	6 (8,00%)	51 (68,00%)	18 (24,00%)	
HSP70	Positivo	1 (5,56%)	9 (50,00%)	8 (44,44%)	0,03
	Negativo	7 (9,72%)	54 (85,71%)	11 (57,89%)	
PCNA	Positivo	5 (16,13%)	19 (61,29%)	7 (22,58%)	0,18
	Negativo	3 (5,08%)	44 (74,58%)	12 (20,34%)	
CK7	Positivo	5 (8,06%)	44 (70,97%)	13 (20,97%)	0,91
	Negativo	3 (10,71%)	19 (67,86%)	6 (21,43%)	
CK19	Positivo	4 (10,81%)	23 (62,16%)	10 (27,03%)	0,42
	Negativa	4 (7,69%)	39 (75,00%)	9 (17,10%)	
HepPar1	Positivo	8 (9,88%)	57 (70,37%)	16 (19,75%)	0,46
	Negativo	0 (0,00)	5 (62,5%)	3 (37,50%)	
Beta-catenina	Positivo	3 (9,38%)	17 (53,13%)	12 (37,5%)	0,015
	Negativo	5 (8,62%)	46 (79,31%)	7 (12,07%)	

GS=glutamina sintetase; HPS70= Heat Shock Protein 70; PCNA= Proliferating cell nuclear antigen; CK7= Citoqueratina7; CK19= Citoqueratina19, HepPar1= Hepatocyte paraffin 1

Tabela 14: Correlação entre perfil imunohistoquímico e presença ou não de invasão vascular.

Marcador		Sem invasão	Com invasão	P
Glipican3	Positivo	22 (66,67%)	11 (33,33%)	0,39
	Negativo	42 (75,00%)	14 (25,00%)	
GS	Positivo	13 (86,67%)	2 (13,33%)	0,21
	Negativo	52 (69,33%)	23 (30,67%)	
HSP70	Positivo	11 (61,11%)	7 (38,89%)	0,23
	Negativo	54 (75,00%)	18 (25,00%)	
PCNA	Positivo	22 (70,97%)	9 (29,03%)	0,84
	Negativo	43 (72,88%)	16 (27,12%)	
CK7	Positivo	46 (74,19%)	16 (25,81%)	0,78
	Negativo	20 (71,43%)	8 (28,57%)	
CK19	Positivo	27 (72,97%)	10 (27,03%)	0,85
	Negativo	37 (71,15%)	15 (28,85%)	
HepPar1	Positivo	59 (72,84%)	22 (27,16%)	0,68
	Negativo	5 (62,50%)	3 (37,50%)	
Beta-Catenina	Positivo	16 (50,00%)	16 (50,00%)	0,12
	Negativo	20 (62,50%)	12 (37,50%)	

GS=glutamina sintetase; HPS70= Heat Shock Protein 70; PCNA= Proliferating cell nuclear antigen; CK7= Citoqueratina7; CK19= Citoqueratina19, HepPar1= Hepatocyte paraffin 1

Tabela 15: Correlação entre perfil imunohistoquímico e AFP> 200ng/ml e AFP< de 200ng/ml

Marcador		AFP<200	AFP>200	P
Glipican3	Positivo	24 (72,73%)	9 (27,27%)	0,0018
	Negativo	54 (96,43%)	2 (3,57%)	
GS	Positivo	14 (93,33%)	1 (6,67%)	0,68
	Negativo	65 (86,67%)	10 (13,33%)	
HSP70	Positivo	17 (94,44%)	1 (5,56%)	0,45
	Negativo	62 (86,11%)	10 (13,89%)	
PCNA	Positivo	27 (87,10%)	4 (12,9%)	0,99
	Negativo	52 (88,14%)	7 (11,86%)	
CK7	Positivo	56 (90,32%)	6 (9,68%)	0,3
	Negativo	23 (82,14%)	5 (17,86%)	
CK19	Positivo	33 (89,19%)	4 (10,81%)	0,75
	Negativo	45 (86,54%)	7 (13,46%)	
HepPar1	Positivo	72 (88,89%)	9 (11,11%)	0,25
	Negativo	6 (75,00%)	2 (25,00%)	
Beta-Catenina	Positivo	26 (81,25%)	6 (18,75%)	0,18
	Negativo	39 (67,24%)	19 (32,76%)	

GS=glutamina sintetase; HPS70= Heat Shock Protein 70; PCNA= Proliferating cell nuclear antigen; CK7= Citoqueratina7; CK19= Citoqueratina19, HepPar1= Hepatocyte paraffin 1

Segundo teste não paramétrico de Mann Whitney, estudando os oito marcadores imunohistoquímicos (glipican3, glutamina sintetase, HSP70, Beta-catenina, HepaPar1, PCNA, CK7 e CK19) em relação às variáveis: idade, tempo de sobrevida, número de nódulos, tamanho dos nódulo, nível de AFP, tempo de cirurgia e valores de MELD evidenciou-se:

Pacientes com Glipican3 positivo apresentaram nódulos maiores (Tabela 16).

Tabela 16: Teste avaliando associação de Glipican3 e variáveis não categóricas (Mann-Whitney)

Variável	Glipican3	Média	dp	Valor de p
Idade	negativo	53,80	8,48	0,29
	positivo	50,97	10,00	
Tempo de sobrevida	negativo	22,39	34,48	0,35
	positivo	18,99	20,06	
Número de nódulos	negativo	2,96	2,60	0,58
	positivo	2,85	1,73	
Maior Nódulo	negativo	25,16	12,21	0,005
	positivo	31,41	11,86	
AFP	negativo	35,90	164,54	0,007
	positivo	242,69	560,58	
IMC	negativo	27,52	3,84	0,3
	positivo	26,04	4,56	
Tempo de Cirurgia	negativo	484,29	130,47	0,05
	positivo	429,24	96,30	
MELD	negativo	16,23	5,58	0,2
	positivo	12,69	4,06	

AFP=alfa-fetoproteína; IMC=índice de massa corporal; MELD= *Model for End-Stage Liver Disease*.

Pacientes com PCNA positivo apresentaram maiores nódulos (Tabela 17)

Tabela 17: Teste avaliando associação de PCNA e variáveis não categóricas (Mann-Whitney)

Variável	PCNA	Média	dp	Valor de p
Idade	negativo	53,39	8,59	0,39
	positivo	51,71	10,02	
Tempo de sobrevida	negativo	24,49	37,75	0,65
	positivo	19,47	23,65	
Número de nódulos	negativo	3,02	2,60	0,76
	positivo	2,77	1,61	
Maior Nódulo	negativo	25,62	12,44	0,04
	positivo	30,81	11,59	
AFP	negativo	125,69	435,22	0,57
	positivo	84,14	217,81	
IMC	negativo	26,88	3,70	0,90
	positivo	27,05	4,96	
Tempo de Cirurgia	negativo	470,85	129,57	0,78
	positivo	4453,06	103,52	
MELD	negativo	15,43	5,24	0,15
	positivo	13,90	5,36	

AFP=alfa-fetoproteína; IMC=índice de massa corporal; MELD= *Model for End-Stage Liver Disease*.

Pacientes com HepPar1 negativo apresentaram nódulos maiores (Tabela 18).

Tabela 18: Teste avaliando associação de HepaPar1 e variáveis não categóricas (Mann-Whitney)

Variável	HepPar1	Média	dp	Valor de p
Idade	negativo	50,38	8,16	0,32
	positivo	53,17	9,17	
Tempo de sobrevida	negativo	28,22	27,45	0,94
	positivo	23,17	34,36	
Número de nódulos	negativo	3,75	1,86	0,06
	positivo	2,83	2,33	
Maior nódulo	negativo	38,50	10,30	0,005
	positivo	26,43	12,11	
AFP	negativo	354,49	586,73	0,10
	positivo	88,71	344,76	
IMC	negativo	26,78	2,71	0,91
	positivo	26,90	4,28	
Tempo de Cirurgia	negativo	390,00	75,21	0,4
	positivo	473,02	122,79	
MELD	negativo	12,43	3,24	0,32
	positivo	15,07	5,41	

AFP=alfa-fetoproteína; IMC=índice de massa corporal; MELD= *Model for End-Stage Liver Disease*.

Pacientes com Beta-catenina positiva apresentaram maiores nódulos (Tabela 19).

Tabela 19: Teste avaliando associação de Beta-catenina e variáveis não categóricas (Mann-Whitney)

Variável	Beta-catenina	Média	dp	Valor de p
Idade	negativo	51,59	9,49	0,12
	positivo	55,03	7,98	
Tempo de sobrevida	negativo	27,90	39,72	0,72
	positivo	13,46	13,57	
Número de nódulos	negativo	2,91	1,89	0,40
	positivo	2,97	2,93	
Maior nódulo	negativo	24,47	9,27	0,003
	positivo	32,73	15,29	
AFP	negativo	92,37	397,27	0,16
	positivo	145,84	329,25	
IMC	negativo	26,95	4,26	0,93
	positivo	26,92	4,00	
Tempo de Cirurgia	negativo	481,21	127,32	0,13
	positivo	434,84	103,69	
MELD	negativo	15,01	4,63	0,24
	positivo	14,72	6,42	

AFP=alfa-fetoproteína; IMC=índice de massa corporal; MELD= *Model for End-Stage Liver Disease*.

Pacientes com CK19 positivos demonstraram tendência a apresentar nódulos maiores (Tabela 20).

Tabela 20: Teste avaliando associação de CK19 e variáveis não categóricas (Mann-Whitney)

Variável	CK19	Média	dp	Valor de p
Idade	negativo	53,52	8,83	0,56
	positivo	51,76	9,58	
Tempo de sobrevida	negativo	23,32	36,15	0,52
	positivo	22,59	30,17	
Número de nódulos	negativo	2,71	1,59	0,98
	positivo	3,27	3,04	
Maior nódulo	negativo	25,14	10,11	0,05
	positivo	30,78	14,53	
AFP	negativo	154,49	480,36	0,88
	positivo	53,69	111,18	
IMC	negativo	26,38	3,71	0,35
	positivo	27,76	4,76	
Tempo de Cirurgia	negativo	469,13	125,19	0,72
	positivo	458,11	117,79	
MELD	negativo	14,64	4,73	0,80
	positivo	15,46	6,01	

AFP=alfa-fetoproteína; IMC=índice de massa corporal; MELD= *Model for End-Stage Liver Disease*.

Pacientes com Glutamin sintetase, CK7, HSP70 positivos não apresentaram associação com as variáveis estudadas. (Tabelas 21, 22 e 23).

Tabela 21: Teste avaliando associação de HSP70 e variáveis não categóricas (Mann-Whitney)

Variável	HSP70	Média	dp	Valor de p
Idade	negativo	52,64	9,31	0,98
	positivo	53,50	8,33	
Tempo de sobrevida	negativo	25,02	36,53	0,80
	positivo	13,73	14,06	
Número de nódulos	negativo	2,67	1,74	0,25
	positivo	4,00	3,66	
Maior Nódulo	negativo	26,74	10,94	0,60
	positivo	30,08	16,97	
AFP	negativo	120,64	397,71	0,50
	positivo	74,35	263,83	
IMC	negativo	27,19	4,45	0,25
	positivo	25,92	2,49	
Tempo de Cirurgia	negativo	466,25	127,05	0,10
	positivo	458,61	95,39	
MELD	negativo	15,15	5,23	0,21
	positivo	13,91	5,63	

AFP=alfa-fetoproteína; IMC=índice de massa corporal; MELD= Model for End-Stage Liver Disease.

Tabela 22: Teste avaliando associação de Glutamina Sintetase e variáveis não categóricas (Mann-Whitney)

Variável	Glutamina Sintetase	Média	dp	Valor de p
Idade	negativo	53,04	9,23	0,52
	positivo	51,67	8,53	
Tempo de sobrevida	negativo	22,93	33,73	0,30
	positivo	21,92	33,52	
Número de nódulos	negativo	3,05	2,47	0,66
	positivo	2,33	0,98	
Maior Nódulo	negativo	26,79	11,80	0,75
	positivo	30,47	14,83	
AFP	negativo	116,19	387,00	0,60
	positivo	87,34	310,65	
IMC	negativo	27,09	4,32	0,73
	positivo	26,19	3,2	
Tempo de Cirurgia	negativo	460,60	125,69	0,38
	positivo	485,33	94,46	
MELD	negativo	14,77	5,48	0,34
	positivo	15,56	4,45	

AFP=alfa-fetoproteína; IMC=índice de massa corporal; MELD= Model for End-Stage Liver Disease.

Tabela 23: Associação de CK7 e variáveis não categóricas (teste de Mann-Whitney)

Variável	CK7	Média	dp	Valor de p
Idade	negativo	52,00	7,91	0,48
	positivo	52,94	9,65	
Tempo de sobrevida	negativo	22,77	34,84	0,87
	positivo	22,69	33,10	
Número de nódulos	negativo	3,07	2,85	0,94
	positivo	2,84	2,02	
Maior Nódulo	negativo	27,27	13,51	0,66
	positivo	27,26	12,08	
AFP	negativo	137,93	352,80	0,39
	positivo	99,45	385,27	
IMC	negativo	26,52	3,66	0,69
	positivo	27,27	4,34	
Tempo de Cirurgia	negativo	507,22	136,34	0,10
	positivo	444,27	109,33	
MELD	negativo	14,20	4,76	0,63
	positivo	15,30	5,53	

AFP=alfa-fetoproteína; IMC=índice de massa corporal; MELD= Model for End-Stage Liver Disease.

Agrupando os resultados obtidos dos marcadores imunohistoquímicos Glipican3, Glutamin Sintetase e HSP70 temos os dados observados na Tabela 24. Devido ao pequeno volume amostral dessas associações não foi possível estabelecer correlação estatística com as variáveis em estudo.

Tabela 24: Associação dos marcadores Glipican3, Glutamina sintetase, HSP70.

Marcadores	Frequência	Porcentagem
GLIPN/GLUN/HSP70N	38	42.70%
GLIPN/GLUN/HSP70P	10	11.24%
GLIPN/GLUP/HSP70N	6	6.74%
GLIPN/GLUP/HSP70P	2	2.25%
GLIPP/GLUN/HSP70N	21	23.60%
GLIPP/GLUN/HSP70P	5	5.62%
GLIPP/GLUP/HSP70N	6	6.74%
GLIPP/GLUP/HSP70P	1	1.12%

GLIPN= glipican3 negativo; GLIPP=glipican3 positivo; GLUN= glutamina negativo; GLUP=glutamina positivo; HSP70N= HSP70 negativo; HSP70P=HSP70

Já a associação entre Beta-catenina e Glipican3 positivos demonstrou associação com a presença de nódulos maiores ($p=0,003$) com maior evidência estatística se avaliados separadamente.

5. Discussão

Existem cerca de 1 milhão de casos novos de CHC ao ano¹⁻³. Sua incidência aumenta com a idade e é quatro a oito vezes mais comum em homens que em mulheres^{1-3,7}.

Como aproximadamente 90% de todos os CHC se desenvolvem associados à hepatopatia crônica, sua distribuição geográfica reflete a presença do vírus da hepatite B e C na população, havendo estimativas do aumento da incidência desse tumor no próximos 10 anos^{1-3,6,7}.

A maioria dos pacientes com diagnóstico de CHC, apresentam hepatopatia crônica como fator predisponente ao aparecimento dessa lesão. Em virtude da baixa reserva da função hepática e da presença de hipertensão portal o manejo desses nódulos é, muitas vezes, complicado impossibilitando a realização de grandes ressecções ou mesmo de terapias sistêmicas^{1,2,4-7}.

Em pacientes selecionados, o transplante de fígado tem se demonstrado como conduta de escolha, pois além de tratar a neoplasia em questão, também trata a doença de base associada. Atualmente representa 25% das indicações de transplante na Europa, 30% na França e 34% nos EUA^{1,6,8-10}.

Em nosso Serviço essa indicação perfaz 20% das indicações de transplante hepático.

No presente estudo foram avaliados 90 pacientes com diagnóstico confirmado de CHC no explante, sendo a média de idade, a distribuição entre os sexos e a etiologia da hepatopatia crônica compatíveis com a literatura^{1,2,6,10,14}.

Em nossa casuística, pacientes com valores maiores de MELD puro, verificado no momento da cirurgia, e maior número de transfusões de concentrados de hemácias apresentaram maior risco para óbito, fato este corroborado pela literatura^{9,11,14}.

Isso provavelmente ocorreu, pois pacientes com valores de MELD mais elevados apresentam piores condições cirúrgicas com maior gradiente de hipertensão portal, e conseqüentemente, maior risco de sangramento. Além disso, no pós-operatório apresentam pior resposta clínica, com insuficiência renal, necessidade de diálise, maior resposta inflamatória sistêmica, mais tempo de internação e maiores índices de infecção^{1,8,9,102}.

O tempo de cirurgia também foi associado à menor sobrevida, tanto em estudo de comparação de variáveis como em regressões logísticas, ou seja, pacientes que evoluíram a óbito apresentaram maior tempo médio de cirurgia e pacientes com maior tempo de cirurgia apresentaram maior risco para óbito. Esses achados, além de compatíveis com a literatura¹⁰³, são facilmente compreendidos uma vez que maiores tempos de cirurgias estão associados à maior manipulação cirúrgica, maior necessidade de transfusões sanguíneas e maior repercussão sistêmica no pós-operatório. Muitas vezes esses pacientes

apresentaram MELD mais elevado que, como mencionado anteriormente, também apresentou associação com a sobrevida.

Os valores de IMC nesse estudo, não apresentaram nenhuma correlação com as variáveis estudadas.

Já está sedimentada na literatura a influência da obesidade tanto como fator predisponente no aparecimento da cirrose como do CHC, havendo estudos associando pior grau da obesidade com a deterioração progressiva da função hepática²⁴⁻²⁶. No entanto, a média de IMC em nossa população foi relativamente baixa, não sendo possível a associação desse índice com nenhuma das variáveis estudadas (características tumorais, marcadores imunohistoquímicos, aparecimento da recidiva ou o tempo de sobrevida).

A terapias de neoadjuvância com TACE ou alcoolização, não puderam ser associadas a nenhuma das variáveis estudadas neste trabalho. Ainda não há consenso na literatura da efetividade desse tipo de tratamento¹⁰⁴⁻¹⁰⁶.

Em estudo realizado por Tsoulfas et al¹⁰²., foram observados 87 pacientes submetidos a transplante hepático por CHC divididos em dois grupos, pré e pós era MELD: antes da instituição do MELD apenas dois pacientes foram submetidos à quimio-embolização (procedimento pré-operatório de escolha no estudo) e, após a era MELD, 27 pacientes foram submetidos ao TACE, não havendo comprovação estatística da efetividade dessa conduta na comparação dos dois grupos.

Em nossa casuística, dos 22 pacientes submetidos à terapia neoadjuvante, nenhum apresentou recidiva tumoral, no entanto, esse dado não pôde ser definido

como fator preditivo para proteção de recorrência. O pequeno volume amostral (sete casos com recidiva) e o pouco tempo de acompanhamento, uma vez que a maioria desses pacientes foram transplantados em períodos inferiores a um ano após o tratamento (quimioembolização ou alcoolização), pode ter colaborado para a falta de evidência estatística¹⁰².

Imunossupressores utilizados no pós-operatório de transplante hepático visando diminuir o índice de rejeição ao novo órgão, são considerados promotores de oncogênese ou ao menos facilitadores do desenvolvimento neoplásico. Inibidores de calcineurina (ciclosporina ou tacrolimus) experimentalmente têm sido implicados no processo de oncogênese^{51,52}.

Existem algumas evidências que os efeitos do uso de tacrolimus no crescimento celular pode ser dose dependente. Em células Hep 3B, as quais derivam de CHC, o tacrolimus promoveu o crescimento celular em 12% em concentrações de cinco ng/ml e em 25% em concentrações de 25ng/ml⁵¹.

Vivarelli et al⁵². observaram que a dosagem do imunossupressor ciclosporina apresentou-se como preditor independente de recidiva tumoral durante o primeiro ano de pós-operatório. Altas doses de ciclosporina administradas durante o terceiro e décimo segundo mês de pós-operatório apresentavam-se atrelados ao baixo tempo livre de doença.

Estudos recentes vem reportando o uso de inibidores da m-TOR, sirolimo ou everolimus, após transplantes hepáticos por CHC no sentido de prevenir a recorrência tumoral¹⁰⁷.

Chinnakotla et al.¹⁸⁸ avaliando o regime de imunossupressão de 227 pacientes submetidos a transplante hepático por CHC observaram que aqueles com uso de sirolimo apresentaram sobrevida maior comparados a pacientes em uso de tacrolimus.

Toso et al.¹⁰⁹ avaliando 2491 pacientes submetidos a transplante hepático por CHC observaram maior tempo de sobrevida entre os que fizeram uso de sirolimo por pelo menos 6 meses.

Um viés em relação à utilização de inibidores da m-TOR nos primeiros pós-operatórios do transplante é a demonstração, em alguns relatos, do aumento da incidência de trombose de artéria quando essa medicação é empregada nos primeiros três meses pós cirúrgicos¹¹⁰.

Entretanto, apesar de parecer óbvio que a redução de imunossupressores ou mesmo sua adequação possa ser benéfica em pacientes submetidos a transplante hepático por CHC, surpreendentemente poucos estudos vem abordando esse tema, não havendo até o momento definição da terapêutica mais apropriada⁵².

Em nossa casuística de 90 pacientes submetidos a transplante hepático por CHC, a medicação de escolha até o ano de 2000 foi a ciclosporina, e após 2000, tacrolimus associado a inibidor de purina (micofenolato sódico ou mofetila).

A partir de 2008 iniciou-se o uso de sirolimo em casos onde houve rejeição não controlada com a primeira linha de imunossupressores empregados, em casos de pacientes submetidos a transplante hepático onde o CHC extrapolava os

critérios de Milão (após a avaliação do explante) ou ainda em pacientes com diagnóstico de neoplasias que não o CHC diagnosticados durante o acompanhamento.

Mais recentemente o uso de everolimo também tem sido empregado com indicações semelhantes à do sirolimo.

Não houve, no presente estudo, comprovação estatística na predição da recidiva ou na melhora da sobrevida em relação ao uso de nenhum desses imunossuppressores, assim como não houve diferença entre o tipo de imunossupressão utilizada e as variáveis estudadas.

Na presente população a recidiva tumoral foi observada em sete pacientes (8%), o que é compatível com a literatura^{111,112}.

A sobrevida dos pacientes com recidiva no sexto mês de pós-operatório foi de 28,6% e no primeiro ano foi de apenas 14,3%, no entanto, apesar de ser inferior à sobrevida do total de nossos pacientes com CHC, não houve diferença estatística entre essas duas sobrevidas provavelmente devido ao pequeno volume amostral da recorrência neoplásica, apenas sete casos. No entanto, no estudo de análise descritiva, a recidiva apresentou correlação com o aparecimento de óbito.

A baixa sobrevida do total de pacientes com CHC pôde ser atribuída ao tempo de espera em lista que leva à piora paulatina da reserva hepática desses pacientes. Ela traduz também a gravidade dessa população, que a despeito do advento da era MELD (sendo estes pacientes contemplados com a situação especial por se tratarem de portadores de CHC) são pacientes graves com altos

índices de complicações intra-operatórias e pós-operatórias como já referido. No entanto, como as causas dos óbitos não apresentaram nenhuma correlação com a neoplasia aqui em estudo, assim como o tempo de óbito foi muito próximo ao da intervenção cirúrgica, não pudemos estabelecer correlação entre essa sobrevida e as características tumorais.

O aparecimento da recidiva é proposto por Salizzoni et al.¹¹³ desenvolvendo-se por dois mecanismos: micro metástases já presentes no momento do transplante e disseminação neoplásica durante a cirurgia, havendo relatos de células malignas encontradas em sangue de átrio direito e veia porta durante a hepatectomia em CHC. Segundo esses mesmos autores não haveria disseminação tumoral sem invasão vascular, portanto a presença dessa invasão apresenta forte correlação com os índices de recidiva conforme esboçado adiante¹¹³.

Em nossa população o tempo médio do aparecimento da recidiva foi de nove meses após o transplante e o tempo médio de sobrevida após o diagnóstico da recidiva foi de apenas seis meses e as respectivas recidivas foram as causas de óbitos em cada um dos sete casos.

Esses dados confirmam a agressividade dos tumores recidivados que, com o advento da alocação através do sistema MELD (que privilegia a situação do CHC), mesmo os pacientes com tumores mais agressivos puderam ser transplantados pelo tempo mais breve em lista. Estudo realizado em transplantes

inter-vivos evidenciou que o menor tempo de espera em lista levava a maior índice de recorrência¹¹⁴.

Em muitos estudos, no entanto, os índices de recidiva diminuíram com o advento do MELD fato este explicado pela introdução do Critério de Milão que é utilizado na maior parte de centros transplantadores do mundo^{1,10,115}.

Muitos são os fatores atrelados ao maior risco de recidiva, descritos na literatura tais como: número e tamanho dos nódulos, invasão vascular, grau de diferenciação celular e nível de AFP^{40-45,115}.

AFP vem sendo utilizada amplamente na literatura como marcador tumoral há aproximadamente 40 anos, a maioria dos estudos sedimenta a participação desse marcador na regulação e crescimento de oncogênese, havendo evidência de seu papel promovendo crescimento de hepatócitos⁴⁸.

Embora os níveis de AFP possam ter importante papel no rastreamento de novas lesões, seu papel em diferenciar lesões benignas dos CHC propriamente ditos é controverso, pois apresenta altos índices de falso-positivos e falso-negativos, além de se manter elevada em casos de replicação viral⁴⁹.

Recentemente, estudos vêm definindo a AFP paulatinamente como um marcador com especificidade e sensibilidade deficientes com taxas aproximadas a 60% de sensibilidade e 70% de especificidade suscitando esforços em diversos centros em busca de melhores marcadores⁴⁹.

A AFP também tem sido motivo de estudo em centros de o todo mundo na avaliação de sua habilidade de predição de sobrevida ou recidiva tumoral pós transplante, valores de corte de 10ng/ml a 1000ng/ml têm sido avaliados, nenhum porém pode promover a adoção desse marcador como um critério de seleção adequado⁴⁷.

Em nossa casuística, no entanto, a média do nível de AFP após o aparecimento de recidiva tumoral no pós transplante foi de 1900 ng/ml, tornando-a útil no monitoramento dessa complicação pós-operatória¹¹⁶.

Pacientes com diagnóstico de CHC com níveis de AFP superiores a 200 ng/ml costumam apresentar tumores maiores, envolvimento bilobar, piores graus de diferenciação celular, trombose de porta e menor tempo médio de sobrevida^{48,116}. Isso, pelo menos em parte, acontece pela expressão da ephirin-A1 na molécula de AFP, um fator de angiogênese, e pela característica da AFP em possibilitar o escape das células tumorais de linfócitos responsáveis pela imunidade^{48,49}.

Em nossa casuística, entretanto, a AFP não demonstrou ser fator preditivo de recidiva tumoral, e também não apresentou correlação com tempo de sobrevida.

Em relação ao tamanho dos nódulos, Marelli et al.¹¹⁷ demonstraram em estudo de 100 pacientes submetidos a transplante hepático por CHC que na avaliação de multi-variáveis apenas o diâmetro do maior tumor era fator preditivo de recorrência, sendo o valor de corte de 35mm na avaliação do explante. A

sobrevida global de pacientes com nódulos inferiores a 35 mm mostrou-se superior à de pacientes com nódulos maiores.

Zimmerman et al.¹¹⁸ encontraram o diâmetro de 35mm dos nódulos de CHC como sendo fator preditivo para invasão vascular.

Shetty et al.¹¹⁹ evidenciaram que nódulos acima de 30mm apresentaram associação significativa com o aparecimento da recidiva.

Lohe et al.¹²⁰ mostraram haver comprometimento na sobrevida quando tumores atingiam diâmetros superiores a 50mm, não havendo alteração dessa sobrevida quando estudada sua relação quanto ao número de nódulos.

Dados publicados por Mazzafero et al.⁶⁰ através do projeto multicêntrico Metroticket, sugeriram que o diâmetro do maior nódulo seria mais importante que o número dos mesmos. Esses achados vem direcionando a literatura a sugerir a expansão dos critérios de Milão em relação ao número de nódulos e não em relação a seu diâmetro, fato corroborado pela melhora dos métodos radiológicos que irão possibilitar, cada vez mais, o diagnóstico de tumores menores anteriormente não descritos^{60,121}.

Em nossa casuística a média do tamanho do maior nódulo não apresentou significância estatística em relação ao tempo de sobrevida, no entanto, apresentou correlação robusta com a presença de recidiva, segundo a análise feita com a curva ROC, onde pacientes com nódulos maiores apresentaram mais recidiva. O ponto de corte para predição de recidiva no presente estudo foi de 34,5 mm, com

sensibilidade de 75%, especificidade de 82,1% e acurácia de 82%, confirmando a importância dessa variável^{41,118-120}.

Apesar do papel, nem sempre claro na literatura, a respeito da importância do número de nódulos, na presente casuística observou-se que os pacientes com maior número de nódulos apresentaram mais recidiva; a presença de três nódulos ou mais pôde prever o aparecimento de recidiva com especificidade de 62,5%, sensibilidade de 75% e acurácia de 75,4%, quando se aplicou a curva ROC, mostrando forte correlação.

Com esse achado temos opinião cautelosa em relação à expansão dos critérios de Milão, no que concerne ao número de nódulos; em nossa opinião o critério instituído por Mazzafero em 1996¹⁰ ainda parece ser o melhor modelo para nossa população.

A inter-relação entre tamanho do tumor, grau histológico e invasão vascular é bastante complexa, porém mantém entre si intrínseca relação.

Analizando essa inter-relação, Zavaglia et al.¹²² estudaram 155 pacientes submetidos a transplante hepático por CHC e observaram que indivíduos com pior grau de diferenciação celular apresentava sobrevida reservada: 44% em cinco anos. Paralelamente, pacientes com tumores bem diferenciados e sem invasão vascular apresentavam sobrevida de 97% em cinco anos¹²².

Esnaola et al.⁵⁹ reportaram que tumores maiores que quatro centímetros tinham o risco aumentado em três vezes para a presença de invasão vascular e tumores pouco diferenciados tinham esse mesmo risco aumentado em 6,3 vezes,

observação realizada em peças cirúrgicas após ressecção em pacientes cirróticos Child A.

Apesar de vários estudos demonstrarem que tanto o grau de diferenciação celular, tamanho e número de lesões, como a presença de invasão vascular possam corresponder a fatores de prognóstico de sobrevida pós-transplante hepático por CHC, em alguns relatos o papel da invasão vascular isolada permaneceu controverso⁴²⁻⁴⁴.

Jonas et al.⁴⁴ demonstraram, na avaliação de 120 pacientes, que a invasão vascular e o grau histológico foram fatores estatisticamente significativos levando à piora da sobrevida; nesse estudo apenas tumores pouco diferenciados maiores que cinco centímetros apresentaram invasão vascular.

Essa íntima relação entre grau histológico, número e tamanho das lesões e invasão vascular pode explicar por que a invasão vascular é muitas vezes eliminada como fator de significância em análises de multivariáveis^{44,54,59}.

No presente estudo, a presença de invasão vascular, apresentou apenas tendência como fator preditivo de recorrência tumoral o que pode ser justificado por se tratar de estudo de multivariáveis excluindo a invasão como fator de significância, e em virtude do baixo volume amostral das recidivas. Além disso, muitas vezes a presença da invasão vascular é subavaliada durante o estudo dos explantes.

Apesar da importância da invasão vascular e grau de diferenciação na predição do comportamento desses pacientes no pós-operatório, ela só é possível

no momento do estudo do explante o que os torna incompletos no que tange à avaliação pré-operatória.

A realização de biópsia hepática no pré-operatório é controversa, sendo relatadas complicações como sangramento e disseminação tumoral pelo trajeto da agulha com índices descritos de até 2,3%^{1,2,64}.

A acurácia da biópsia por aspiração com agulha fina para avaliação do grau de diferenciação tumoral é limitada pela heterogeneidade desses tumores que podem apresentar, numa mesma lesão, vários graus histológicos^{64,67}.

Em estudo realizado por Pawlik et al.¹²³ foram realizadas 120 biópsias hepáticas durante avaliação do pré-operatório de transplante hepático, os resultados obtidos foram comparados aos achados histopatológicos da avaliação do explante e não se observou concordância em relação à definição do grau histológico, além disso, o grau de diferenciação da avaliação do explante predizia a invasão tumoral mas o da biópsia hepática pré operatória não.

Na tentativa de contemplar todos esses achados na melhor predição do prognóstico de pacientes passíveis de serem submetidos a transplante hepático por CHC, novos métodos estão sendo aventados^{61,62}.

Apesar do número crescente de publicações nesse sentido permanece inconclusivo qual o melhor critério de estudo ou mesmo o mais completo. O que fica claro, na grande maioria dessas análises, é a carência de métodos, principalmente de marcadores que auxiliariam na avaliação da capacidade tumoral de diferenciação celular e angiogênese^{61,62}. Métodos esses passíveis de serem

avaliadas no pré-operatório com potencial de expansão dos critérios vigentes sem interferir na sobrevida ou prognóstico e principalmente prevenir o aparecimento da condição muitas vezes letal da recorrência tumoral.

Foi na tentativa de auxiliar na predição dessas características que, no presente estudo, se buscou analisar novos marcadores imunohistoquímicos correlacionando-os às características das lesões aqui descritas, à presença de recidiva e à sua influência em relação à sobrevida.

Como mencionado previamente, os achados de imunohistoquímica vem colaborando na caracterização das lesões e, inclusive, em relação a seu prognóstico⁶⁵⁻⁶⁷.

As biópsias de nódulos suspeitos para CHC, que antigamente tinham papel apenas em casos de exceção, atualmente vem ganhando espaço na propedêutica do diagnóstico e tratamento desses nódulos⁶⁴. O que poderia em segunda análise propiciar a avaliação de nódulos em pacientes a serem transplantados ainda no pré-operatório.

A combinação de marcadores como Glipican3 (GPC3), Heat Shock Protein (HSP70) e Glutamina Sintetase (GS) tem sido demonstrada como prova útil de malignidade da lesão e a positividade de apenas 2 desses marcadores apresenta acurácia de 72.9%, com sensibilidade de 72% e especificidade de 100% para diagnóstico de CHC⁶⁴⁻⁷².

Nós nos propusemos a estudar esses três marcadores assim como: Beta-catenina, PCNA, CK7, CK19, e HepPar1, também utilizados na avaliação da definição da etiologia ou agressividade das lesões compatíveis com CHC.

A Glutamina sintetase, já descrita, catalisa a síntese de glutamina em fígados de mamíferos⁸¹⁻⁸³.

A transformação neoplásica é acompanhada pelo aumento adaptativo da produção de nucleotídeos e de proteínas. As altas taxas de síntese de proteínas em tumores de rápido crescimento requerem contínuo suprimento de aminoácidos essenciais e não essenciais. A glutamina é reconhecida como a maior fonte de aminoácidos utilizada por células tumorais⁸².

O baixo nível de glutamina aumenta a meia vida da glutamina sintetase. Em lesões com hiper-metabolismo como o CHC, o nível de glutamina estaria baixo pela sua maior utilização na proliferação celular e, portanto, a glutamina sintetase apresenta-se aumentada nessas situações^{124,125}.

Pacientes com glutamina sintetase positiva apresentam maior incidência de recidiva tumoral após ressecções, e como a maioria dessas recidivas ocorreram em menos de dois anos, os autores sugeriram a presença de micro-metástases promovendo a recorrência nesses pacientes¹²⁶.

Em nossa casuística, pacientes com glutamina sintetase positiva tiveram tendência a apresentarem menor sobrevida, no entanto, mais nenhuma variável apresentou diferença estatística em relação a esse marcador, como maior número de nódulos, maiores nódulos, pior grau histológico, presença de invasão vascular

ou maior incidência de recidiva entre esses pacientes, portanto essa tendência estatística carece de maior volume amostral para poder ser comprovada.

HepaPar1, trata-se de um epitopo (menor porção de antígeno com potencial de gerar a resposta imune) encontrado na membrana de mitocôndrias de hepatócitos, e em mais nenhuma classe de células maduras⁹⁰.

Esse marcador apresenta sensibilidade moderada (75% a 90%) para CHC e aparece positivo também em hepatócitos normais. É comumente utilizado na distinção entre CHC, Colangiocarcinoma ou metástase hepática de outro sítio⁹¹.

Lesões com achado de HepaPar1 negativo apresentam pior prognóstico se comparadas com HepPar1 positivo, pois a presença de HepPar1 negativo sugere a presença de células mais indiferenciadas^{90,91}.

Tanto no estudo de Zimmerman et al.¹²⁷ como no de Kumagai et al.¹²⁸, evidenciou-se que o CHC pouco diferenciado apresentava positividade baixa para HepPar1 corroborando o achado de que lesões com esse marcador negativo apresentam pior prognóstico.

Em nossa população pacientes com HepPar1 negativo apresentaram maior prevalência de recidiva, maior número de nódulos e maiores nódulos.

Essa correlação por nós encontrada ainda não foi descrita na literatura. No entanto, o fato de células HepPar1 negativo apresentarem-se com características de maior indiferenciação celular facilmente pode explicar o maior tamanho que nódulos com esse perfil celular pode alcançar. Paralelo a isso, o maior número de

nódulos e inclusive o aparecimento da recidiva tumoral podem ocorrer por menor adesão que essas células indiferenciadas apresentam entre si e em relação ao arcabouço estrutural hepático, colaborando para a disseminação observada.

A presença de hepatócitos expressando CK7 e CK19 em lesão compatível com CHC também sugere um processo de desdiferenciação celular de hepatócitos maduros em células progenitoras durante o processo carcinogênico⁸⁸⁻⁸⁹.

A presença dessas células imaturas fala a favor de pior prognóstico do CHC mostrando lesões com pior grau de diferenciação e mais invasão vascular. Estudos evidenciam maior recorrência tumoral após transplante hepático em pacientes com CK19 positivos¹²⁹.

Durnez et al.⁸⁹ também demonstraram maior prevalência de recorrência após ressecções hepáticas em pacientes com CK19 e CK7 positivos.

Wu et al.¹³⁰ demonstraram que a sobrevida de pacientes portadores de CHC não submetidos a nenhum tipo de tratamento era menor em pacientes com CK7 e CK19 positivos.

Tem sido reportado também na literatura que pacientes com CK7 e CK19 exibem lesões com pior prognóstico, maior proliferação celular, e portanto, maior agressividade¹³⁰.

Em nossa população a presença de CK7 positivo não apresentou correlação com nenhuma das variáveis estudadas.

Pacientes com CK19 positivo apresentaram tendência ($p=0,05$) a apresentar maiores nódulos, conforme registrado na literatura, no entanto a falta de correlação com as demais variáveis sugere a necessidade de maior volume amostral.

PCNA é reconhecido com regulador essencial no ciclo de proliferação celular e tem sido utilizado na avaliação do grau de proliferação celular como marcador em diferentes tipos de lesões neoplásicas, incluído o CHC⁹³.

Alguns autores demonstraram que a recorrência tumoral após ressecção hepática é menor em pacientes com PCNA negativo em relação a pacientes com PCNA positivo¹³¹⁻¹³³.

Kimatoko et al.¹³¹ demonstraram a correlação direta entre estadios tumorais avançados e a presença de PCNA positivos em espécimes ressecados.

Adachi et al.¹³³ observaram correlação positiva entre tamanho tumoral e a presença de PCNA positivos.

Em nosso estudo, a presença de PCNA positivo também esteve associada à presença de lesões maiores, definindo bem seu papel, já descrito, de marcador de proliferação celular. A ausência de correlação com pior grau histológico e com a presença de recidiva possivelmente é oriunda do pequeno número amostral dessas duas populações; apenas 16 pacientes apresentaram grau histológico III e apenas sete à recidiva tumoral.

HSP70 pertence à classe de proteínas implicadas na gênese tumoral, na regulação do ciclo de progressão celular e na proteção contra apoptose espontânea ou gerada por terapia anti-neoplásica⁷⁴⁻⁷⁶.

Ele é um potente anti-apoptótico e sua maior expressão permite a sobrevivência celular nas mais variadas condições, o que em segunda análise poderia promover o aparecimento de lesões neoplásicas⁷⁴⁻⁷⁶.

HSP70 tem sido correlacionado com pior diferenciação celular, com maior proliferação celular, mais metástases linfonodais e maiores tamanhos tumorais¹³⁴.

Em nossa casuística pacientes com HSP70 positivos apresentaram maior prevalência do grau histológico III, apesar no pequeno volume amostral de pacientes com esse grau histológico, inferindo sua capacidade de definir pior comportamento tumoral.

A via de sinalização da beta-catenina é indispensável no processo de desenvolvimento, diferenciação, proliferação, crescimento, sobrevivência, regeneração e remodelação celular⁸⁴⁻⁸⁷.

Especificamente na biologia hepática ela apresenta vários papéis. No fígado em processo de desenvolvimento participa no processo de proliferação de hepatoblastos e sua diferenciação, portanto a ativação aberrante dessa cascata pode representar a proliferação exacerbada celular e concomitante neoplasia⁸⁵⁻⁸⁷.

Vários estudos têm demonstrado a participação da beta-catenina na hepatocarcinogênese⁸⁵⁻⁸⁷. O gene da beta-catenina mutado leva a seu acúmulo nuclear e consequente detecção por métodos imunohistoquímicos⁸⁵.

Wong et al.¹³⁵ demonstraram associação entre a presença de beta-catenina mutada e lesões com maiores diâmetros e com pior grau de diferenciação.

Laurent et al.¹³⁶ também demonstraram associação entre a presença de mutação na cascata de Beta-catenina e maiores tamanhos tumorais.

Monga et al.⁸⁷ demonstraram em pacientes com beta-catenina positivos a presença de lesões com mais invasão vascular e maiores diâmetros.

Em nossa população, pacientes com beta-catenina positiva apresentaram mais lesões com grau histológico III, e nódulos maiores, demonstrando que esse marcador pôde ser utilizado na avaliação da pior característica tumoral das lesões compatíveis com CHC.

A ausência de invasão vascular observada nesse marcador assim como em outros aqui descritos, pode refletir a subavaliação com a qual essa variável é descrita, muitas vezes a detecção da presença de invasão requer um volumoso número de cortes histológicos à sua procura que normalmente não são realizados na rotina. A importância com que essa variável vem sendo descrita nos últimos anos deve levar ao estímulo para que essa avaliação passe a ser mais criteriosa na maioria dos centros transplantadores.

GPC3 é um membro da família proteoglicanos heparan sulfato altamente expresso em células de lesões compatíveis com CHC⁷⁷⁻⁸⁰. Atualmente esse marcador tem ganhado espaço na diferenciação de nódulos displásicos de CHC⁸⁰.

Estudos têm mostrado que GPC3 pode estimular o crescimento de células de CHC através de canais de sinalização celular como Wnt /beta-catenina tendo papel na regulação da migração e adesão dessas células tumorais⁷⁸.

Alguns estudos suportam a ideia que essa proteína também promoveria proliferação e sobrevivência celular através da interação com fatores de crescimento insulina-like (IGF-2)^{78,79}.

A positividade maior de GPC3 tem sido reportada na maioria dos estudos na presença de CHC (70%) e ausentes em fígados sem essa neoplasia⁷⁸.

GPC3 também tem sido associado à piora do prognóstico uma vez que pacientes com glipican3 positivo tem sobrevida em cinco anos menor quando comparados à pacientes com GPC3 negativo¹³⁷.

Kwack et al.¹³⁸ demonstraram que GPC3 pode reduzir a adesão de células de CHC ao colágeno tipo 1 e à fibronectina, propiciando a migração celular e metástases.

Shirakawa et al.¹³⁷ demonstraram que GPC3 positiva esteve correlacionado com a pior diferenciação celular e com maior risco para óbito. Entre pacientes com GPC3 positivo a recorrência tumoral pós ressecções por CHC demonstrou-se mais precoce.

Em nossa casuística, a presença de GCP3 positivo esteve associada a níveis de AFP mais elevados e a maiores nódulos. Níveis de AFP elevados costumam estar associados à pior grau de diferenciação celular, tumores com maior diâmetro, envolvimento bilobar e menor tempo médio de sobrevida⁴⁸. Também já foi discutida a estreita relação do tamanho dos nódulos com a presença de invasão vascular, com pior grau de diferenciação e com maior índice de recidiva, portanto corroborando a literatura, constatamos a relação direta do pior comportamento tumoral em pacientes com GPC3 positivos em nossa população.

Em resumo, a presença de HepPar1 negativo apresentou correlação com maior incidência de recidiva, maiores nódulos e maior número de nódulos; glutamina sintetase positiva apresentou tendência a pior sobrevida; HSP70 positivo apresentou correlação com pior grau histológico; beta- catenina positiva demonstrou correlação com pior grau histológico e com maiores nódulos; Glipican3 positivo apresentou correlação com maiores nódulos e nível de AFP elevados; PCNA positivo evidenciou correlação com maiores nódulos e CK19 apresentou tendência a apresentar maiores nódulos, ou seja, isoladamente, quase todos os marcadores apresentaram correlação com as variáveis em estudo.

Na literatura não há avaliação como a descrita aqui considerando tantos marcadores ao mesmo tempo na definição do comportamento tumoral, sobrevida e recidiva neoplásica.

Nós nos propusemos a avaliar também a associação de mais de um desses marcadores como possível modelo de predição de pior comportamento tumoral, assim como realizou Boulac-Sage em sua associação entre Glipican3, Glutamina sintetase e HSP70, na definição da etiologia do CHC versus nódulo displásico⁶⁴.

Estudando a associação entre a positividade de pelo menos dois dos marcadores imunohistoquímicos Glipican3, Glutamina Sintetase e HSP70, não pudemos estabelecer nenhuma correlação positiva com as demais variáveis em estudo pois essas associações não apresentaram volume amostral passível de comparações.

O mesmo ocorreu quando se tentou associar outras combinações de imunoexpressão desses marcadores: não obtivemos volume amostral significativo, com exceção da associação entre beta-catenina e Glipican3 positivos, a qual demonstrou associação com presença de nódulos maiores com mais evidência estatística se avaliados separadamente, tornando essa associação útil na predição da malignidade dessas lesões, dado também não descrito ainda na literatura.

A maioria dos marcadores estudados apresentaram correlação com pelo menos uma das variáveis em estudo, seja ela populacional (nível de AFP, presença da recidiva tumoral e tempo de sobrevida) ou de características das lesões (número de tumores, tamanho da maior lesão, presença da invasão vascular e grau de diferenciação) confirmando nossa hipótese de que esses marcadores podem, sim auxiliar na avaliação do prognóstico de pacientes submetidos a transplante hepático por CHC.

A avaliação desses marcadores podem também nos auxiliar na adequação de critérios (na avaliação do paciente a ser transplantado por CHC) otimizando-os com intuito de diminuir os índices de recidiva, aumentar a sobrevida e quem sabe ainda contemplar pacientes que atualmente estão fora de proposta terapêutica por não se inserirem nos critérios vigentes, porém que apresentem um bom comportamento tumoral.

É evidente que para implementar a utilização na rotina desses marcadores muito ainda necessita ser estudado, um volume amostral maior poderá sedimentar os resultados aqui exibidos.

Inicialmente esses resultados poderão nos nortear a prever o prognóstico de determinado paciente auxiliando-nos na adequação de imunossuppressores apropriados a cada situação, pois, eles podem apresentar influência no aparecimento da recidiva, principalmente em pacientes com comportamento tumoral mais agressivo.

Posteriormente, a utilização desses marcadores, com as melhorias em suas técnicas de realização que o uso rotineiro certamente trará, poderá ser empregada no pré-operatório. A presença de resultados equivocados na biópsia por agulha com a utilização de marcadores imunohistológicos é comprovadamente menor, viabilizando a sua realização não somente em casos duvidosos como é atualmente empregada, mas também, no futuro, na definição do prognóstico de determinado pacientes auxiliando na programação do tratamento mais adequado.

6. Conclusão

A análise dos resultados obtidos permitem as seguintes conclusões:

O tempo de cirurgia e a presença de recidiva tumoral foram associados à menor sobrevida

Pacientes com maiores valores de MELD puro e maior necessidade de transfusão de concentrados de hemácias apresentaram maior risco para óbito.

Pacientes com nódulos maiores e/ou maior número de nódulos apresentaram correlação positiva com o aparecimento da recidiva, sendo que a presença de três nódulos ou mais pôde predizer o aparecimento dessa recorrência tumoral.

A presença de invasão vascular apresentou apenas tendência à correlação com o aparecimento de recidiva.

Em relação aos marcadores imunohistoquímicos não foi possível a associação de nenhum desses marcadores com a sobrevida doença específica, com exceção da presença de glutamina sintetase positiva que demonstrou tendência a piora da sobrevida.

A imunoexpressão destes marcadores não se correlacionou com o tempo de aparecimento de recorrência do tumor, com exceção da do HepPar1, o qual,

quando negativo, apresentou relação estatística positiva em relação ao número de doentes recidivados.

Entretanto, a maioria dos marcadores estudados apresentou correlação com pelo menos uma das variáveis em estudo, confirmando nossa hipótese de que esses marcadores podem, sim, auxiliar na avaliação do prognóstico de pacientes submetidos a transplante hepático por CHC.

7. Referências Bibliográficas

1. Forner A, Llovet JM, Bruix J. Hepatocellular carcinoma. *Lancet*. 2012 Mar 31;379(9822):1245-55.
2. Bruix J, Sherman M. Management of hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2005;42:1208–1236.
3. Rahbari NN, Mehrabi A, Mollberg NM, Müller SA, Koch M, Büchler MW, et al. Hepatocellular carcinoma: current management and perspectives for the future. *Ann Surg*. 2011 Mar; 253(3):453-69.
4. El-Serag HB, Marrero JA, Rudolph L, Reddy KR. Diagnosis and treatment of hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology*. 2008 May; 134(6):1752-63.
5. Franca AV, Elias JJ, Lima BL, et al. Diagnosis, staging and treatment of hepatocellular carcinoma. *Braz J Med Biol Rev* 2004; 37:1689–1705.
6. Bruix J, Sherman M, Llovet JM, et al. Clinical management of hepatocellular carcinoma. Conclusions of the Barcelona-2000 EASL conference. European Association for the Study of the Liver. *J Hepatol* 2001; 35:421–430.
7. Sherman M. Hepatocellular carcinoma: epidemiology, surveillance, and diagnosis. *Semin Liver Dis*. 2010 Feb; 30(1):3-16.
8. Llovet JM, Fuster J, Bruix J. Intention-to-treat analysis of surgical treatment for early hepatocellular carcinoma: resection versus transplantation. *Hepatology* 1999; 30:1434-1440.
9. Sala M, Varela M, Bruix J. Selection of candidates with HCC for transplantation in the MELD era. *Liver Transpl* 2004; 10(Suppl2):S4–S9.

10. Mazzaferro V, Regalia E, Doci R, et al. Liver transplantation for the treatment of small hepatocellular carcinomas in patients with cirrhosis. *N Engl J Med* 1996; 334:693–699.
11. Shetty K, Timmins K, Brensinger C, et al. Liver transplantation for hepatocellular carcinoma validation of present selection criteria in predicting outcome. *Liver Transpl* 2004;10: 911–918.
12. Yao FY, Ferrell L, Bass NM, et al. Liver transplantation for hepatocellular carcinoma: expansion of the tumor size limits does not adversely impact survival. *Hepatology* 2001; 33:1394–1403.
13. Clavien PA. Fifth forum on liver transplantation. *J Hepatol*. 2006 Jan; 44(1):11-2.
14. Maggs JR, Suddle AR, Aluvihare V, Heneghan MA. Systematic review: the role of liver transplantation in the management of hepatocellular carcinoma. *Aliment Pharmacol Ther*. 2012 May; 35(10):1113-34.
15. Zavaglia C, De Carlis L, Alberti AB, Minola E, Belli LS, Slim AO, et al. Predictors of long-term survival after liver transplantation for hepatocellular carcinoma. *Am J Gastroenterol*. 2005 Dec; 100(12):2708-16.
16. Cescon M, Ravaioli M, Grazi GL, Ercolani G, Cucchetti A, Bertuzzo V, et al. Prognostic factors for tumor recurrence after a 12-year, single-center experience of liver transplantations in patients with hepatocellular carcinoma. *J Transplant*. 2010; 1: 1-8.
17. Yu MW, Yang YC, Yang SY, et al. Hormonal markers and hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma risk: a nested case-control study among men. *J Natl Cancer Inst* 2001; 93:1644-1651.
18. Yoshizawa H. Hepatocellular carcinoma associated with hepatitis C virus infection in Japan: projection to other countries in the foreseeable future. *Oncology* 2002; 62(Suppl 1):8–17.
19. Armstrong GL, Alter MJ, McQuillan GM, Margolis HS. The past incidence of hepatitis C virus infection: implications for the future burden of chronic liver disease in the United States. *Hepatology* 2000; 31:777–782.

20. El-Serag HB, Mason AC. Risk factors for the rising rates of primary liver cancer in the United States. *Arch Intern Med* 2000; 160:3227–3230.
21. Beasley RP. Hepatitis B virus. The major etiology of hepatocellular carcinoma. *Cancer* 1988; 61:1942–1956.
22. Donato F, Tagger A, Gelatti U, et al. Alcohol and hepatocellular carcinoma: the effect of lifetime intake and hepatitis virus infections in men and women. *Am J Epidemiol* 2002; 155:323–331.
23. Wolk A, Gridley G, Svensson M, et al. A prospective study of obesity and cancer risk (Sweden). *Cancer Causes Control* 2001; 12:13–21.
24. Marrero JA, Fontana RJ, Su GL, Conjeevaram HS, et al. NAFLD may be a common underlying liver disease in patients with hepatocellular carcinoma in the United States. *Hepatology* 2002; 36:1349–1354.
25. Cotrim HP, Parana R, Braga E, Lyra L. Nonalcoholic steatohepatitis and hepatocellular carcinoma: natural history? *Am J Gastroenterol* 2000; 5:3018–3019.
26. Zen Y, Katayanagi K, Tsuneyama K, Harada K, Araki I, Nakanuma Y. Hepatocellular carcinoma arising in non-alcoholic steatohepatitis. *Pathol Int* 2001; 51:127–131.
27. Evans AA, Chen G, Ross EA, Shen FM, Lin WY, London WT, Eight-year follow-up of the 90,000-person Haimen City cohort: I. Hepatocellular carcinoma mortality, risk factors, and gender differences. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2002; 11:369–376.
28. Forner A, Vilana R, Ayuso C, et al. Diagnosis of hepatic nodules 20 mm or smaller in cirrhosis: prospective validation of the noninvasive diagnostic criteria for hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2008; 47(1):97–104.
29. Chen TH, Chen CJ, Yen MF, et al. Ultrasound screening and risk factors for death from hepatocellular carcinoma in a high-risk group in Taiwan. *Int J Cancer* 2002; 98:257–261.

30. Rode A, Bancel B, Douek P, et al. Small nodule detection in cirrhotic livers: evaluation with US, spiral CT, and MRI and correlation with pathologic examination of explanted liver. *J Comput Assist Tomogr* 2001; 25:327–336.
31. Brasil. Ministério da Saude. Critérios para cadastramento de candidatos a receptores de fígado-doador cadáver. Portaria nº 541 de 14 março de 2002. Disponível em: <http://dtr2001.saude.gov.br/sas/PORTARIAS/Port2002/Gm/GM-541.htm>.
32. Brasil.Ministério da Saude. Critérios para distribuição de fígado doador cadáver para transplante. Portaria nº 1160 de 29 de maio de 2006, publicada no Diário Oficial da União, nº103 de 31 de maio de 2006. Disponível em: <http://dtr2001.saude.gov.br/sas/PORTARIAS/Port2006/GM/GM-1160.htm>.
33. Brasil Ministério da Saúde. Nota técnica 01/2011 Fígado; de 25/05/2011; Sistema Estadual de Transplantes, Secretaria de Saúde do Governo do Estado de São Paulo. Disponível em: <http://dtr2001.saude.gov.br/sas/PORTARIAS/Port2006/GM/GM-1160.htm>.
34. Llovet JM, Bruix J. Novel advancements in the management of hepatocellular carcinoma in 2008. *J Hepatol*. 2008; 48 Suppl 1:S20-37.
35. Ringe B, Pichlmayr R, Wittekind C, Tusch G. Surgical treatment of hepatocellular carcinoma: experience with liver resection and transplantation in 198 patients. *World J Surg*. 1991 Mar-Apr; 15(2):270-85.
36. Moreno P, Jaurrieta E, Figueras J, Benasco C, Rafecas A, Fabregat J, Torras J, Casanovas T, Casais L. Orthotopic liver transplantation: treatment of choice in cirrhotic patients with hepatocellular carcinoma? *Transplant Proc*. 1995 Aug; 27(4):2296-8.
37. Iwatsuki S, Starzl TE, Sheahan DG, Yokoyama I, Demetris AJ, et al. Hepatic resection versus transplantation for hepatocellular carcinoma. *Ann Surg*. 1991 Sep; 214(3):221-8; discussion 228-9.
38. Bismuth H, Chiche L, Adam R, Castaing D. Surgical treatment of hepatocellular carcinoma in cirrhosis: liver resection or transplantation? *Transplant Proc*. 1993 Feb;25(1 Pt 2):1066-7.

39. Benckert C, Jonas S, Thelen A, et al. Liver transplantation for hepatocellular carcinoma in cirrhosis: prognostic parameters. *Transplant Proc* 2005; 37:1693–4.
40. Parfitt JR, Marotta P, Alghamdi M, et al. Recurrent hepatocellular carcinoma after transplantation: use of a pathological score on explanted livers to predict recurrence. *Liver Transpl* 2007; 13:543–51.
41. Pawlik TM, Delman KA, Vauthey JN, et al. Tumor size predicts vascular invasion and histologic grade: implications for selection of surgical treatment for hepatocellular carcinoma. *Liver Transpl* 2005; 11:1086–92.
42. Salizzoni M, Romagnoli R, Lupo F, et al. Microscopic vascular invasion detected by anti-CD34 immunohistochemistry as a predictor of recurrence of hepatocellular carcinoma after liver transplantation. *Transplantation* 2003; 76:844–848.
43. Lee HH, Joh JW, Park JH, et al. Microvascular tumor embolism: independent prognostic factor after liver transplantation in hepatocellular carcinoma. *Transplant Proc* 2005; 37:1251–1253.
44. Jonas S, Bechstein WO, Steinmuller T, et al. Vascular invasion and histologic grading determine outcome after liver transplantation for hepatocellular carcinoma in cirrhosis. *Hepatology* 2001; 33:1080–1086.
45. Tamura S, Kato T, Berho M, Misiakos EP, et al. Impact of histological grade of hepatocellular carcinoma on the outcome of liver transplantation. *Arch Surg.* 2001Jan; 136(1):25-30.
46. Kuromatsu R, Tanaka M, Tanikawa K. Serum alpha-fetoprotein and lens culinaris agglutinin-reactive fraction of alpha-fetoprotein in patients with hepatocellular carcinoma. *Liver* 1993; 13:177-182.
47. Trevisani F, D'Intino PE, et al. Serum alpha-fetoprotein for diagnosis of hepatocellular carcinoma in patients with chronic liver disease: influence of HBsAg and anti-HCV status. *J Hepatol.* 2001 Apr; 34(4):570-5.
48. Takahashi H, Saibara T, Iwamura S, Tomita A, Maeda T, Onishi S, et al. Serum alpha-L-fucosidase activity and tumor size in hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 1994; 19:1414-1417.

49. Soresi M, Magliarisi C, Campagna P, et al. Usefulness of alpha-fetoprotein in the diagnosis of hepatocellular carcinoma. *Anticancer Res.* 2003; 23: 1747-1753.
50. Tangkijvanich P, Anukulkarnkusol N, Suwangool P, et al. Clinical characteristics and prognosis of hepatocellular carcinoma: analysis based on serum alpha-fetoprotein levels. *J Clin Gastroenterol* 2000; 31: 302-308.
51. Schnitzbauer AA, Schlitt HJ, Geissler EK. Influence of immunosuppressive drugs on the recurrence of hepatocellular carcinoma after liver transplantation: a gap between basic science and clinical evidence. *Transplantation.* 2011 Jun 15; 91(11):1173-6.
52. Vivarelli M, Bellusci R, Cucchetti A, Cavrini G, et al. Low recurrence rate of hepatocellular carcinoma after liver transplantation: better patient selection or lower immunosuppression? *Transplantation.* 2002 Dec 27; 74(12):1746-51.
53. Miyagi S, Kawagishi N, Sekiguchi S, Akamatsu Y, et al. The relationship between recurrences and immunosuppression on living donor liver transplantation for hepatocellular carcinoma. *Transplant Proc.* 2012; 44(3):797-801.
54. Benckert C, Jonas S, Thelen A, Spinelli A, Schumacher G, Heise M, et al. Liver transplantation for hepatocellular carcinoma in cirrhosis: prognostic parameters. *Transplant Proc.* 2005 May; 37(4):1693-4.
55. Mitsunobu M, Toyosaka A, Oriyama T, Okamoto E, Nakao N. Intrahepatic metastases in hepatocellular carcinoma: the role of the portal vein as an efferent vessel. *Clin Exp Metastasis.* 1996 Nov; 14(6):520-9.
56. Yamanaka N, Okamoto E, Fujihara S, Kato T, et al. Do the tumor cells of hepatocellular carcinomas dislodge into the portal venous stream during hepatic resection? *Cancer.* 1992 Nov 1; 70(9):2263-7.
57. Koo J, Siu KF, et al. Recovery of malignant tumor cells from the right atrium during hepatic resection for hepatocellular carcinoma. *Cancer* 1982; 52: 1952-1956.
58. Tsai TJ, Chau GY, et al. Clinical significance of microscopic tumor venous invasion in patients with resectable hepatocellular carcinoma. *Surgery* 2000; 127:603-8.

59. Esnaola NF, Lauwers GY, Mirza NQ, Nagorney, et al. Predictors of microvascular invasion in patients with hepatocellular carcinoma who are candidates for orthotopic liver transplantation. *J Gastrointest Surg*. 2002 Mar-Apr;6(2):224-32.
60. Mazzaferro V, Llovet JM, Miceli R, Bhoori S, et al; MetroticketInvestigator Study Group. Predicting survival after liver transplantation in patients with hepatocellular carcinoma beyond the Milan criteria: a retrospective, exploratory analysis. *Lancet Oncol*. 2009 Jan;10(1):35-43
61. Taketa K, Okada S, Win N, Hlaing NK, Wind KM. Evaluation of tumor markers for the detection of hepatocellular carcinoma in Yangon General Hospital, Myanmar. *Acta Med Okayama* 2002; 56: 317-320.
62. Oka H, Saito A, Ito K, Kumada T, Satomura, et al. Multicenter prospective analysis of newly diagnosed hepatocellular carcinoma with respect to the percentage of Lens culinaris agglutinin-reactive alpha-fetoprotein. *J Gastroenterol Hepatol* 2001; 16: 1378-1383.
63. Okuda H, Nakanishi T, Takatsu K, Saito A, Hayashi N, et al. Comparison of clinicopathological features of patients with hepatocellular carcinoma seropositive for alpha-fetoprotein alone and those seropositive for des-gamma-carboxy prothrombin alone. *J Gastroenterol Hepatol* 2001; 16: 1290-1296.
64. Bioulac-Sage P, Balabaud C. Marker panels for the diagnosis of small hepatocellular carcinoma, a never-ending story. *Clin Res Hepatol Gastroenterol*. 2011 Sep; 35(8-9):513-5.
65. Sakamoto M, Mori T, Masugi Y, Effendi K, Rie I, Du W. Candidate molecular markers for histological diagnosis of early hepatocellular carcinoma. *Intervirology*. 2008;51 Suppl 1:42-5.
66. Tremosini S, Forner A, Boix L, Vilana R, et al. Prospective validation of immunohistochemical panel (glypican 3, heat shock protein 70 and glutamine synthetase) in liver biopsies for diagnosis of very early hepatocellular carcinoma. *Gut*. In press 2012

67. Varma V, Cohen C. Immunohistochemical and molecular markers in the diagnosis of hepatocellular carcinoma. *Adv Anat Pathol*. 2004 Sep; 11(5):239-49.
68. Llovet JM, Chen Y, Wurmbach E, Roayaie S, et al. A molecular signature to discriminate dysplastic nodules from early hepatocellular carcinoma in HCV cirrhosis. *Gastroenterology*. 2006 Dec; 131(6):1758-67.
69. Di Tommaso L, Destro A, Seok JY, Balladore E, et al. The application of markers (HSP70 GPC3 and GS) in liver biopsies is useful for detection of hepatocellular carcinoma. *J Hepatol*. 2009 Apr; 50(4):746-54.
70. Wee A. Diagnostic utility of immunohistochemistry in hepatocellular carcinoma, its variants and their mimics. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2006 Sep; 14(3):266-72.
71. Shafizadeh N, Kakar S. Diagnosis of well-differentiated hepatocellular lesions: role of immunohistochemistry and other ancillary techniques. *Adv Anat Pathol*. 2011 Nov;18(6):438-45. Review.
72. Di Tommaso L, Franchi G, Park YN, Fiamengo B, Destro A, et al. Diagnostic value of HSP70, glypican 3, and glutamine synthetase in hepatocellular nodules in cirrhosis. *Hepatology*. 2007 Mar;45(3):725-34.
73. Hoos A, Cordon-Cardo C. Tissue microarray profiling of cancer specimens and cell lines: opportunities and limitations. *Lab Invest*. 2001 Oct;81(10):1331-8.
74. Schmitt E, Gehrmann M, Brunet M, Multhoff G, Garrido C. Intracellular and extracellular functions of heat shock proteins: repercussions in cancer therapy. *J Leukoc Biol*. 2007 Jan; 81(1):15-27.
75. Calderwood SK, Khaleque MA, Sawyer DB, Ciocca DR. Heat shock proteins in cancer: chaperones of tumorigenesis. *Trends Biochem Sci*. 2006 Mar; 31(3):164-72.
76. Chuma M, Sakamoto M, Yamazaki K, Ohta T, Ohki M, et al. Expression profiling in multistage hepatocarcinogenesis: identification of HSP70 as a molecular marker of early hepatocellular carcinoma. *Hepatology*. 2003 Jan; 37(1):198-207.

77. Kandil DH, Cooper K. Glypican-3: a novel diagnostic marker for hepatocellular carcinoma and more. *Adv Anat Pathol*. 2009 Mar; 16(2):125-9.
78. Ho M, Kim H. Glypican-3: a new target for cancer immunotherapy. *Eur J Cancer*. 2011 Feb;47(3):333-8.
79. Ning S, Bin C, Na H, Peng S, Yi D, Xiang-hua Y, et al. Glypican-3, a novel prognostic marker of hepatocellular cancer, is related with postoperative metastasis and recurrence in hepatocellular cancerpatients. *Mol Biol Rep*. 2012 Jan; 39(1):351-7.
80. Yan B, Wei JJ, Qian YM, Zhao XL, et al. Expression and clinicopathologic significance of glypican 3 in hepatocellular carcinoma. *Ann Diagn Pathol*. 2011 Jun; 15(3):162-9.
81. Häussinger D, Graf D, Weiergräber OH. Glutamine and cell signaling in liver. *J Nutr*. 2001 Sep;131(9 Suppl):2509S-14S
82. Medina MA. Glutamine and cancer. *J Nutr*. 2001 Sep;131(9 Suppl):2539S-42S.
83. Osada T, Sakamoto M, Nagawa H, Yamamoto J, Matsuno Y, et al. Acquisition of glutamine synthetase expression in human hepatocarcinogenesis: relation to disease recurrence and ossible regulation by ubiquitin-dependent proteolysis. *Cancer*. 1999 Feb 15; 85(4):819-31.
84. White BD, Chien AJ, Dawson DW. Dysregulation of Wnt/ β -catenin signaling in gastrointestinal cancers. *Gastroenterology*. 2012 Feb; 142(2):219-32.
85. Nejak-Bowen KN, Monga SP. Beta-catenin signaling, liver regeneration and hepatocellular cancer: sorting the good from the bad. *Semin Cancer Biol*. 2011Feb; 21(1):44-58.
86. Dahmani R, Just PA, Perret C. The Wnt/ β -catenin pathway as a therapeutic target in human hepatocellular carcinoma. *Clin Res Hepatol Gastroenterol*. 2011Nov; 35(11):709-13.
87. Monga SP. Role of Wnt/ β -catenin signaling in liver metabolism and cancer. *Int J Biochem Cell Biol*. 2011 Jul;43(7):1021-9.

88. Uenishi T, Kubo S, Yamamoto T, Shuto T, Ogawa M, Tanaka H, Tanaka S, Kaneda K, Hirohashi K. Cytokeratin 19 expression in hepatocellular carcinoma predicts early postoperative recurrence. *Cancer Sci.* 2003 Oct;94(10):851-7.
89. Durnez A, Verslype C, Nevens F, Fevery J, et al. The clinicopathological and prognostic relevance of cytokeratin 7 and 19 expression in hepatocellular carcinoma. A possible progenitor cell origin. *Histopathology.* 2006 Aug; 49(2):138-51.
90. Chu PG, Ishizawa S, Wu E, Weiss LM. Hepatocyte antigen as a marker of hepatocellular carcinoma: an immunohistochemical comparison to carcinoembryonic antigen, CD10, and alpha-fetoprotein. *Am J Surg Pathol.* 2002 Aug; 26(8):978-88.
91. Lamps LW, Folpe AL. The diagnostic value of hepatocyte paraffin antibody 1 in differentiating hepatocellular neoplasms from nonhepatic tumors: a review. *Adv Anat Pathol.* 2003 Jan;10(1):39-43.
92. Ng IO, Lai EC, Fan ST, et al. Prognostic significance of proliferating cell nuclear antigen expression in hepatocellular carcinoma. *Cancer.* 1994 May 1; 73(9):2268-74.
93. Alenzi FQ, El-Nashar EM, Al-Ghamdi SS, et al. Original Article: Investigation of Bcl-2 and PCNA in Hepatocellular Carcinoma: Relation to Chronic HCV. *J Egypt Natl Canc Inst.* 2010 Mar;22(1):87-94.
94. Suehiro T, Matsumata T, 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.* 1995 Aug 1;76(3):399-405.
95. Calne RY, Williams R. Liver transplantation in man. I. Observations on technique and organization in five cases. *Br Med J.* 1968 Nov 30;4(5630):535-40.
96. Tzakis A, Todo S, Starzl TE. Orthotopic liver transplantation with preservation of the inferior vena cava. *Ann Surg.* 1989 Nov;210(5):649-52.
97. Edmondson HA, Steiner PE. Primary carcinoma of the liver: a study of 100 cases among 48,900 necropsies. *Cancer.* 1954 May;7(3):462-503.

98. Hoos A, Cordon-Cardo C. Tissue microarray profiling of cancer specimens and cell lines: opportunities and limitations. *Lab Invest.* 2001 Oct;81(10):1331-8.
99. Simon R, Sauter G. Tissue microarrays for miniaturized high-throughput molecular profiling of tumors. *Exp Hematol.* 2002 Dec;30(12):1365-72.
100. Simon R, Sauter G. Tissue microarray (TMA) applications: implications for molecular medicine. *Expert Rev Mol Med.* 2003 Oct 21;5(26):1-12.
101. Milanes-Yearsley M, Hammond ME, Pajak TF, et al. Tissue micro-array: a cost and time-effective method for correlative studies by regional and national cancer study groups. *Mod Pathol.* 2002 Dec; 15(12):1366-73.
102. Tsoulfas G, Kawai T, Elias N, Ko SC, et al. Long-term experience with liver transplantation for hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol.* 2011 Feb;46(2):249-56.
103. Farinati F, Giacomini A, Vanin V, Sergio A; Italian Liver Cancer (ITA.LI.CA) group. Liver transplantation for hepatocellular carcinoma in clinical practice: the lesson from a 20-year multicentre experience in Italy. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 2012 Feb; 24(2):195-202.
104. Livraghi T, Bolondi L, Lazzaroni S, et al. Percutaneous ethanol injection in the treatment of hepatocellular carcinoma in cirrhosis. A study on 207 patients. *Cancer* 1992;69: 925–929.
105. Livraghi T, Bolondi L, Buscarini L, et al. No treatment, resection and ethanol injection in hepatocellular carcinoma: a retrospective analysis of survival in 391 patients with cirrhosis. Italian Cooperative HCC Study Group. *J Hepatol* 1995; 22:522–526.
106. Ryu M, Shimamura Y, Kinoshita T, et al. Therapeutic results of resection, transcatheter arterial embolization and percutaneous transhepatic ethanol injection in 3225 patients with hepatocellular carcinoma: a retrospective multicenter study. *Jpn J Clin Oncol* 1997; 27:251–257.

107. Decaens T, Roudot-Thoraval F, Bresson-Hadni S, et al. Role of immunosuppression and tumor differentiation in predicting recurrence after liver transplantation for hepatocellular carcinoma: a multicenter study of 412 patients. *World J Gastroenterol*. 2006 Dec 7; 12(45):7319-25.
108. Chinnakotla S, Davis GL, Vasani S, Kim P, Tomiyama K, et al. Impact of sirolimus on the recurrence of hepatocellular carcinoma after liver transplantation. *Liver Transpl*. 2009 Dec; 15(12):1834-42.
109. Toso C, Merani S, Bigam DL, Shapiro AM, Kneteman NM. Sirolimus-based immunosuppression is associated with increased survival after liver transplantation for hepatocellular carcinoma. *Hepatology*. 2010 Apr;51(4):1237-43.
110. Campsen J, Zimmerman MA, Mandell S, Kaplan M, Kam I. A Decade of Experience Using mTor Inhibitors in Liver Transplantation. *J Transplant*. 2011 Jan;(5): 1-6.
111. Cescon M, Ravaioli M, Grazi GL, Ercolani G, Cucchetti A, et al. Prognostic factors for tumor recurrence after a 12-year, single-center experience of liver transplantations in patients with hepatocellular carcinoma. *J Transplant*. 2010;(2010):1-8.
112. Chok KS, Chan SC, Cheung TT, Chan AC, Fan ST, Lo CM. Late recurrence of hepatocellular carcinoma after liver transplantation. *World J Surg*. 2011 Sep; 35(9):2058-62.
113. Salizzoni M, Romagnoli R, Lupo F, David E, Mirabella S, et al. Microscopic vascular invasion detected by anti-CD34 immunohistochemistry as a predictor of recurrence of hepatocellular carcinoma after liver transplantation. *Transplantation*. 2003 Sep 15;76(5):844-8.
114. Sharma P, Welch K, Hussain H, Pelletier SJ, Fontana RJ, Marrero J, Merion RM. Incidence and risk factors of hepatocellular carcinoma recurrence after liver transplantation in the MELD era. *Dig Dis Sci*. 2012 Mar; 57(3):806-12.
115. Toso C, Mentha G, Majno P. Liver transplantation for hepatocellular carcinoma: five steps to prevent recurrence. *Am J Transplant*. 2011 Oct;11(10):2031-5.

116. Ataide EC, Boin IF, Almeida JR, et al. Prognostic factors for hepatocellular carcinoma recurrence: experience with 83 liver transplantation patients. *Transplant Proc.* 2011 May;43(4):1362-4.
117. Marelli L, Grasso A, Pleguezuelo M, Martines H, et al. Tumour size and differentiation in predicting recurrence of hepatocellular carcinoma after liver transplantation: external validation of a new prognostic score. *Ann Surg Oncol.* 2008 Dec;15(12):3503-11.
118. Zimmerman MA, Ghobrial RM, Tong MJ, Hiatt JR, et al. Recurrence of hepatocellular carcinoma following liver transplantation: a review of preoperative and postoperative prognostic indicators. *Arch Surg.* 2008 Feb;143(2):182-8.
119. Shetty K, Timmins K, Brensinger C, Furth EE, Rattan S, Sun W, et al. Liver transplantation for hepatocellular carcinoma validation of present selection criteria in predicting outcome. *Liver Transpl.* 2004 Jul;10(7):911-8.
120. Löhe F, Angele MK, Gerbes AL, Löhrs U, et al. Tumour size is an important predictor for the outcome after liver transplantation for hepatocellular carcinoma. *Eur J Surg Oncol.* 2005 Nov;31(9):994-9.
121. Kim YS, Lim HK, Rhim H, Lee WJ, et al. Recurrence of hepatocellular carcinoma after liver transplantation: patterns and prognostic factors based on clinical and radiologic features. *AJR Am J Roentgenol.* 2007 Aug;189(2):352-8.
122. Zavaglia C, De Carlis L, Alberti AB, Minola E, et al. Predictors of long-term survival after liver transplantation for hepatocellular carcinoma. *Am J Gastroenterol.* 2005 Dec;100(12):2708
123. Pawlik TM, Gleisner AL, Anders RA, Assumpcao L, et al. Preoperative assessment of hepatocellular carcinoma tumor grade using needle biopsy: implications for transplant eligibility. *Ann Surg.* 2007 Mar;245(3):435-42.
124. Souba WW. Glutamine and cancer. *Ann Surg.* 1993 Dec;218(6):715-28.
125. Kaiser S, Gerok W, Häussinger D. Ammonia and glutamine metabolism in human liver slices: new aspects on the pathogenesis of hyperammonaemia in chronic liver disease. *Eur J Clin Invest.* 1988 Oct;18(5):535-42.

126. Osada T, Sakamoto M, Nagawa H, Yamamoto J, et al. Acquisition of glutamine synthetase expression in human hepatocarcinogenesis: relation to disease recurrence and possible regulation by ubiquitin-dependent proteolysis. *Cancer*. 1999 Feb 15; 85(4):819-31.
127. Zimmerman RL, Burke MA, Young NA, Solomides CC, Bibbo M. Diagnostic value of hepatocyte paraffin 1 antibody to discriminate hepatocellular carcinoma from metastatic carcinoma in fine-needle aspiration biopsies of the liver. *Cancer*. 2001 Aug 25; 93(4):288-91.
128. Kumagai I, Masuda T, Sato S, Ishikawa K. Immunoreactivity to monoclonal antibody HepPar1, in human hepatocellular carcinomas according to histopathological grade and histological pattern. *Hepatol Res*. 2001 Jul; 20(3):312-319.
129. Uenishi T, Kubo S, Yamamoto T. Cytokeratin 19 expression in hepatocellular carcinoma predicts early postoperative recurrence. *Cancer Sci*. 2003 Oct;94(10):851-7.
130. Wu PC, Fang JW, Lau VK, et al. Classification of hepatocellular carcinoma according to hepatocellular and biliary differentiation markers. Clinical and biological implications. *Am J Pathol*. 1996 Oct;149(4):1167-75.
131. Kitamoto M, Nakanishi T, Kira S, Kawaguchi M, Nakashio R, et al. The assessment of proliferating cell nuclear antigen immunohistochemical staining in small hepatocellular carcinoma and its relationship to histologic characteristics and prognosis. *Cancer*. 1993 Sep 15;72(6):1859-65.
132. Ng IO, Lai EC, Fan ST, Ng M, et al. Prognostic significance of proliferating cell nuclear antigen expression in hepatocellular carcinoma. *Cancer*. 1994 May 1; 73(9):2268-74.
133. Adachi E, Hashimoto H, Tsuneyoshi M. Proliferating cell nuclear antigen in hepatocellular carcinoma and small cell liver dysplasia. *Cancer*. 1993 Nov 15; 72(10):2902-9.
134. Ciocca DR, Calderwood SK. Heat shock proteins in cancer: diagnostic,prognostic, predictive, and treatment implications. *Cell Stress Chaperones*. 2005 Summer; 10(2):86-103.

135. Wong CM, Fan ST, Ng IO. beta-Catenin mutation and overexpression in hepatocellular carcinoma: clinicopathologic and prognostic significance. *Cancer*. 2001 Jul 1;92(1):136-45.
136. Laurent-Puig P, Legoix P, Bluteau O, Belghiti J, et al. Genetic alterations associated with hepatocellular carcinomas define distinct pathways of hepatocarcinogenesis. *Gastroenterology*. 2001 Jun;120(7):1763-73.
137. Shirakawa H, Suzuki H, Shimomura M, Kojima M, Gotohda N, et al. Glypican-3 expression is correlated with poor prognosis in hepatocellular carcinoma. *Cancer Sci*. 2009 Aug; 100(8):1403-7.
138. Kwack MH, Choi BY, Sung YK. Cellular changes resulting from forced expression of glypican-3 in hepatocellular carcinoma cells. *Mol Cells*. 2006 Apr 30;21(2):224-8.
139. Shirakawa H, Suzuki H, Shimomura M, Kojima M, Gotohda N, et al. Glypican-3 expression is correlated with poor prognosis in hepatocellular carcinoma. *Cancer Sci*. 2009 Aug;100(8):1403-7.

8 .Bibliografia de Normatizações

FRANÇA, J.L.; BORGES, S.M.; VASCONCELLOS, A.C.; MAGALHÃES, M.H.A.

- Manual para normatização de publicações técnico-científicas. 4ªed.,

Editora UFMG, Belo Horizonte, 1998. 213p

Normas e procedimentos para publicação de dissertações e teses. Faculdades de Ciências Médicas, UNICAMP. Ed. SAD – Deliberação CCPG-001/98 (alterada 2006).

9. Anexos

Anexo1: Protocolo aprovação CONEP

 UNICAMP	FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA www.fcm.unicamp.br/fcm/pesquisa
CEP, 21/08/12 (Grupo III)	2ª VIA
PARECER CEP: N° 363/2011 (Este n° deve ser citado nas correspondências referente a este projeto). CAAE: 0307.0.146.000-11	
I - IDENTIFICAÇÃO:	
PROJETO: "FATORES PREDITIVOS DE RECIDIVA E TAXA DE SOBREVIVÊNCIA DO PACIENTES SUBMETIDOS A TRANSPLANTE HEPÁTICO POR CARCINOMA HEPATOCELULAR". PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Elaine Cristina de Ataíde INSTITUIÇÃO: Hospital de Clínicas/UNICAMP APRESENTAÇÃO AO CEP: 09/05/2011 APRESENTAR RELATÓRIO EM: 24/05/12 (O formulário encontra-se no site acima).	
II – OBJETIVOS.	
Verificar os fatores preditivos de recidiva e taxa de sobrevivência de pacientes submetidos a transplante hepático por carcinoma hepatocelular.	
III – SUMÁRIO.	
Este trabalho faz parte do projeto de doutoramento da pesquisadora. Trata-se de um coorte transversal retrospectivo, utilizando tecidos humanos, fixados em formalina e incluídos em blocos de parafina arquivados no Departamento da Anatomia Patológica/FCM, previamente retirados de pacientes submetidos a transplantes hepáticos, além de informações contidas nos prontuários, no período de 1997 a 2010. A pesquisadora assegura que a identidade de cada sujeito não será divulgada. A pesquisadora se responsabiliza pelos gastos previstos e possui (no anexo) as autorizações dos devidos departamentos para a realização da pesquisa. Por ser retrospectivo, há a solicitação da dispensa do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.	
IV - COMENTÁRIOS DOS RELATORES.	
Após análise crítica do protocolo não encontramos riscos ou prejuízos para os sujeitos da pesquisa (possibilidade e gravidade). Os autores do projeto se mostram com o compromisso de cumprir as exigências da Resolução 196/96 e suas complementares. O trabalho está elaborado dentro das normas éticas e científicas. O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido pode ser dispensado.	
V - PARECER DO CEP.	
O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, após acatar os pareceres dos membros-relatores previamente designados para o presente caso e atendendo todos os dispositivos das Resoluções 196/96 e complementares, resolve aprovar sem	

Comitê de Ética em Pesquisa - UNICAMP Rua: Tessália Vieira de Camargo, 126 Caixa Postal 6111 13083-887 Campinas - SP	FONE (019) 3521-8936 FAX (019) 3521-7187 cep@fcm.unicamp.br
---	---

- 1 -



restrições o Protocolo de Pesquisa, a dispensa do Termo do Consentimento Livre e Esclarecido, bem como todos os anexos incluídos na pesquisa supracitada.

O conteúdo e as conclusões aqui apresentados são de responsabilidade exclusiva do CEP/FCM/UNICAMP e não representam a opinião da Universidade Estadual de Campinas nem a comprometem.

VI - INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES.

O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (Res. CNS 196/96 – Item IV.1.f) e deve receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (Item IV.2.d).

Pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou (Res. CNS Item III.1.z), exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade do regime oferecido a um dos grupos de pesquisa (Item V.3.).

O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS Item V.4.). É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.

Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projeto do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial (Res. 251/97, Item III.2.e).

Relatórios parciais e final devem ser apresentados ao CEP, de acordo com os prazos estabelecidos na Resolução CNS-MS 196/96.

VII – DATA DA REUNIÃO.

Homologado na V Reunião Ordinária do CEP/FCM, em 24 de maio de 2011.

Prof. Dr. Carlos Eduardo Steiner
PRESIDENTE do COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
FCM / UNICAMP

ANEXO 2: Planilha com os dados gerais estudados.

caso	Nome	se xo	ida de	Data	tsv	S V	Gp3	pcna	G S	CK 7	CK 19	Hsp70	Heppar1	B cat	recid i	N nod	maior nod	grau	invas ão	AFP	IMC	T cir	meld	CH
1	MFS	M	31	19/12/96	22	O	P	P	N	P	P	N	P	N	N	1	47,0	1	N	2,3	22,86	480	15	6
2	EB	F	55	15/01/97	29	O	P	N	N	P	N	N	P	N	N	1	30,0	2	N	344,0	18,37	420	15	6
3	EGS	M	58	05/03/97	16 8	V		N	N	P	N	N	P	N	N	4	21,0	2	N	4,8	23,67	540	13	7
4	HR	M	57	12/09/98	0	O	N	N	N	N	N	P	P	N	N	3	18,0	2	N	4,5	25,48	540	14	12
5	DM	M	62	16/10/98	12	O	N	P	N	P	N	N	P	P	N	2	26,0	2	N	3,5	22,04	450	7	6
6	NS	F	17	24/10/98	21	O	P	N	N	P	P	N	P	N	N	3	36,0	2	N	55,0	23,12	510	10	6
7	VP	M	36	26/10/98	10 0	O	N	N	N	P	P	N	P	N	N	2	22,0	2	N	4,6	35,02	590	21	6
8	AB	M	57	08/12/98	25	O	N	N	N	P	N	N	P	N	N	5	28,0	2	S	5,3	30,74	420	15	7
9	AB	M	43	08/04/99	51	O	N	N	N	N	N	N	P	N	N	5	22,0	3	S	4,4	29,39	600	18	5
10	SB	M	48	25/06/99	80	O	P	N	N	N	N	N	P	N	N	4	33,0	2	S	5,9	25,71	540	7	0
11	JL	M	52	16/10/99	13 7	V	N	N	N	N	N	N	P	N	N	2	21,0	2	N	7,4	31,10	600	14	10
12	JS	M	46	08/06/00	1	O	N	N	P	N	N	N	P	N	N	3	45,0	2	N	1210,0	29,80	360	22	8
13	JV	M	42	18/08/00	0	O	N	P	N	P	N	N	P	N	N	4	12,0	3	N	6,0	21,91	480	14	7
14	RC	M	61	27/09/00	0	O	N	N	N	N	N	N	P	N	N	2	21,0	2	N	3,6	27,76	900	15	24
15	HS	M	62	26/03/01	7	O	N	P	N	N	N	N	P	N	S	6	47,0	2	S	256,9	33,46	660	16	21
16	CF	M	56	09/08/01	84	O	N	N	P	P	P	N	N	N	N	2	41,0	2	N	8,7	29,30	390	14	1
17	AG	M	43	05/09/01	11 4	V	N	N	N	N	N	N	P	N	N	1	21,0	2	N	1,4	26,99	705	16	6
18	TC	F	54	22/12/01	11 0	V	N	P	N	P	P	N	P	N	N	6	25,0	2	S	115,5	25,00	540	14	4
19	JÁ	M	54	26/02/02	6	O	N	N	N	P	P	N	P	N	N	1	8,0	1	N	9,0	24,74	480	14	1
20	SY	F	59	31/05/02	59	O	P	P	P		N	N	P	N	N	4	23,0	2	S	0,8	21,93	585	13	4
21	RG	F	30	12/06/02	0	O	N	P	P	N	N	N	P	N	N	1	17,0	1	N	6,5	19,48	660	18	15
22	ASBF	M	58	18/07/02	10 3	V	N	N	N	P	P	N	P	N	N	3	20,0	2	N	2,5	35,14	120	19	15
23	LF	M	59	27/11/02	0	O	N	N	N	P	N	N	P	N	N	1	12,0	2	S	10,9	32,87	720	17	14
24	LVS	M	51	17/02/03	96	V	N	N	P	P	N	N	P	N	N	2	21,0	2	S	5,6	32,70	420	15	0

caso	Nome	se xo	ida de	Data	tsv	S V	Gp3	pcna	G S	CK 7	CK 19	Hsp70	Heppar1	B cat	recid i	N nod	maior nod	grau	invas ão	AFP	IMC	T cir	meld	CH
25	BB	M	57	02/04/03	1	O	N	N	N	P	P	N	P	N	N	7	33,0	2	N	2,0	29,32	750	12	8
26	AMG	F	58	14/08/03	1	O	N	N	P	P	P	P	P	N	N	2	15,0	2	N	3,2	28,44	620	14	2
27	AFDS	M	63	05/09/03	2	O	N	N	P	N	N	P	P	N	N	1	20,0	2	N	4,5	24,56	390	17	3
28	EM	M	52	12/01/06	0	O	P	N	P	P	N	N	P	N	N	4	15,0	2	N	23,2	26,33	540	22	5
29	CAF	M	46	28/01/06	1	O	N	N	N	P	P	N	P	N	N	9	9,0	2	S	5,7	33,80	550	24	3
30	JRAV	M	56	28/07/06	49	O	P	N	N	P	N	N	P	N	N	2	30,0	2	N	12,2	25,25	480	15	2
31	PC	M	65	18/10/06	1	O	P	P	P	N	P	N	P	P	N	2	56,0	2	N	23,2	26,73	480	20	0
32	DB	M	52	23/10/06	51	V	P	P	P	P	P	P	P	P	N	2	55,0	2	N	1,2	24,46	525	9	3
33	MZ	M	54	03/11/06	14	O	P	P	P	N	P	N	N	P	S	3	45,0	2	N	1,2	25,47	510	8	0
34	AP	M	53	11/01/07	0	O	P	N	N	N	N	N	N	P	N	2	50,0	2	N	1451,0	24,82	360	13	6
35	ACS	M	53	29/03/07	7	O	P	P	N	P	P	N	P	N	S	4	25,0	2	N	5,5	38,00	540	11	4
36	MWS	M	60	04/04/07	46	V	P	P	N	P	P	N	P	P	N	5	30,0	2	N	424,0	33,06	540	11	8
37	AJF	M	45	22/05/07	1	O	N	P	P	P	P	N	P	P	N	2	16,0	1	N	4,3	27,02	540	21	3
38	ACA	M	45	24/05/07	0	O	P	N	N	P	P	N	P	P	N	1	33,0	2	N	6,7	32,14	600	22	8
39	YF	F	62	24/06/07	43	V	P	P	N	P	N	N	P	N	N	2	25,0	2	N	2,0	21,09	390	11	3
40	PR	M	64	29/10/07	39	V	N	N	N	P	N	N	P	P	N	1	23,0	2	N	4,5	25,76	420	21	7
41	BDMJ	M	48	23/12/07	0	O	N	N	P	P	P	N	P	N	N	1	38,0	2	N	5,9	26,12	480	13	13
42	RAR	M	47	22/02/08	35	V	P	P	N	P	P	P	P	N	N	1	35,0	2	N	2,8	25,26	450	15	1
43	JCS	M	52	07/03/08	34	V	N	N	N	N	N	N	P	P	N	1	27,0	3	N	3,1	20,15	360	12	2
44	LADS	M	55	13/03/08	0	O	N	N	N	N	N	N	P	N	N	2	27,0	2	N	7,5	26,89	390	6	0
45	MAD	M	60	13/04/08	33	V	N	N	N	P	N	N	P	N	N	2	21,0	2	N	4,4	24,22	515	11	5
46	MFS	M	46	16/04/08	33	V	P	P	N	P	P	N	P	N	N	1	20,0	2	N	3,4	20,96	345	8	0
47	RC	M	43	26/05/08	0	O	N	N	N	P	N	N	P	N	N	4	22,0	2	N	6,9	25,11	540	14	14
48	AAT	M	44	08/06/08	18	O	N	N	N	N	N	P	P	P	S	2	35,0	3	S	4,4	24,77	630	13	7
49	OAT	M	47	10/06/08	23	O	N	P	N	P	P	P	P	P	N	3	23,0	3	S	58,1	26,18	510	30	8
50	LABR	M	50	15/06/08	12	O	P	P	N	P	P	N	N	P	N	4	50,0	3	S	178,0	27,10	390	15	1
51	EGT	M	52	23/07/08	30	V	N	P	N	P	P	P	P	P	N	1	30,0	3	N	2,9	24,76	480	12	1
52	NF	F	65	20/08/08	5	O	N	N	N	P	N	N	P	N	S	3	30,0	2	N	4,8	23,71	450	13	4
53	ACS	M	45	02/09/08	3	O	P	N	N	P	P	N	N	N	S	7	35,0	3	S	56,7	24,24	420	16	3

caso	Nome	se xo	ida de	Data	tsv	S V	Gp3	pcna	G S	CK 7	CK 19	Hsp70	Heppar1	B cat	recid i	N nod	maior nod	grau	invas ão	AFP	IMC	T cir	meld	CH
54	MCB	M	58	30/09/08	14	O	N	N	N	P	N	N	P	N	N	4	9,0	2	N	7,5	29,07	360	30	2
55	NR	M	49	01/10/08	6	O	N	N	N	P	N	N	P	N	N	5	27,0	2	N	2,3	26,30	450	14	0
56	NZ	M	68	11/10/08	0	O	N	P	N	P	N	P	P	P	N	2	40,0	2	N	3,5	28,08	450	21	7
57	JCS	M	43	04/11/08	26	V	N	P	N	N	N	N		N	N	5	25,0	2	N	3,0	30,90	390	21	3
58	EGS	M	64	02/12/08	1	O	N	N	N	P	N	N	P	N	N	1	19,0	2	N	2,4	30,88	450	26	4
59	ACV	M	57	12/12/08	0	O	N	N	N	P	P	N	P	P	N	1	32,0	2	S	2,4	23,88	480	26	6
60	JNA	M	50	18/01/09	24	V	N	N	N	P	N	N	P	N	N	3	35,0	2	S	3,0	31,49	390	17	5
61	MSD	F	59	20/01/09	24	V	N	N	N	P	P	N	P	P	N	1	25,0	2	N	8,6	21,51	300	17	2
62	JOZ	M	53	27/01/09	23	V	N	P	N	P	P	N	P	N	N	2	20,0	2	N	4,1	28,83	420	22	2
63	ADO	M	59	19/02/09	23	V	N	N	N	N	N	N	P	N	N	1	9,0	12	N	2,7	29,00	600	23	4
64	TABL	F	55	26/02/09	0	O	N	P	N	N		P	P	N	N	2	20,0	2	N	4,4	25,39	480	8	8
65	AFP	M	52	26/04/09	17	O	P	N	N	N	N	P	P	N	N	7	20,0	3	S	3,4	21,20	450	13	1
66	RM	M	54	19/05/09	2	O	P	N	N	N	P	N	P	P	N	1	18,0	3	S	10,9	23,88	480	20	7
67	IAM	M	46	28/05/09	19	V	P	N	P	P	N	N	N	N	N	3	30,0	2	N	7,1	24,39	420	15	2
68	NGL	M	65	14/07/09	2	O	N	N	N	P	P	N	P	P	N	1	8,0	2	N	6,6	26,89	470	28	6
69	LMG	F	53	14/09/09	16	V	N	N	N	P	P	P	P	P	N	9	25,0	3	N	2,5	23,44	390	21	6
70	CAJF	M	59	25/09/09	12	O	N	N	N	P	P	P	P	P	N	7	80,0	3	S	5,0	30,25	390	11	21
71	NABS	F	53	20/11/09	14	V	P	N	N	N	N	P	P	P	N	5	2,5	2	S	26,5	24,98	360	8	5
72	MFRS	M	47	01/12/09	13	V	P	P	N	P	N	P	P	P	N	3	32,0	3	S	60,2	26,81	420	13	1
73	JPFC	F	70	03/12/10	0	O	N	P	N	P	N	P	P	N	N	1	22,0	1	N	14,9	25,11	390	14	10
74	CLBS	F	65	08/01/10	12	V	P	N	N	P	P	N	P	P	N	2	32,0	3	N	426,0	34,60	300	10	1
75	CCFS	M	54	10/02/10	3	O	N	N	N	N	N	N	P	P	N	2	50,0	2	S	113,0	25,46	600	11	4
76	FACS	M	50	18/02/10	11	V	N	N	N	N	P	P	P	P	N	15	32,0	2	N	7,1	25,35	540	8	6
77	ABS	M	46	05/03/10	0	O	N	N	N	P	N	N	P	N	N	3	30,0	3	S	2,0	25,71	540	15	6
78	MFCS	M	44	11/03/10	10	V	N	P	N	N	N	N	P	N	N	3	30,0	2	N	13,6	34,26	360	16	2
79	NPFS	M	48	22/03/10	2	O	P	P	N	P	N	N	P	N	N	1	26,0	2	N	2,6	22,04	360	12	7
80	IGS	M	68	23/03/10	9	V	N	N	N	P	N	N	P	P	N	1	21,0	2	N	3,0	24,91	330	14	4
81	JRES	M	58	24/03/10	9	V	P	N	N	N	P	N	P	N	N	2	24,0	3	N	255,9	21,91	360	12	2
82	MLGS	F	62	08/04/10	9	V	P	N	N	N	N	N	P	P	N	1	18,0	1	N	421,5	26,56	390	12	1

caso	Nome	se xo	ida de	Data	tsv	S V	Gp3	pcna	G S	CK 7	CK 19	Hsp70	Heppar1	B cat	recid i	N nod	maior nod	grau	invas ão	AFP	IMC	T cir	meld	CH
83	JCS	M	63	12/04/10	9	V	N	N	N	P	N	N	N	N	N	3	20,0	2	N	4,2	26,96	390	9	1
84	AVSS	M	39	01/05/10	8	V	P	N	N	P	N	N	P	N	N	1	33,0	2	N	2790,0	25,66	330	9	2
85	MMVN	M	60	07/05/10	8	V	P	P	N	P	P	N	P	P	N	3	36,0	3	S	262,5	26,12	410	13	5
86	LAM	M	50	20/05/10	0	O	P	N	P	P	N	N	P	N	N	3	20,0	3	N	4,5	26,06	360	12	12
87	CRS	M	44	23/05/10	7	V	N	P	N	P	P	N	P	P	N	1	25,0	1	N	2,7	35,82	390	9	8
88	AARC	F	36	21/10/10	4	O	P	P	N	P	N	P	N	P	S	6	37,0	3	S	1129,0	32,00	4	9	8
89	GECC	M	62	01/11/10	4	V	P	P	N	P	P	N	P	P	N	3	35,0	2	S	9,6	36,36	3	6	5
90	OVA	M	60	12/11/10	3	V	N	N	N	P	N	N	P	N	N	1	9,0	2	N	3,4	28,00	30	12	6

Tsv=tempo de sobrevida; sv=sobrevida; v=vivo; o=óbito; gp3=glipican3; pcna=Proliferating cell nuclear antigen; gs=glutamina sintetase; CK7=citoqueratina7; CK19=citoquertina19; HSP70= Heat Shock protein; HepPar1=Hepatocyte paraffin1; Bcat=beta-catenina; recidi=recidiva; n nod=numero de nódulo; maior nod=maior nódulo em mm; grau=grau histológico; AFP=alfafeto-proteína; IMC=índice de massa corporal, Tcir=tempo de cirurgia; MELD=model for end liver disease; CH=concentrado de hemácias.