

**VANDERLEI SEGATELLI**

**Avaliação da angiogênese em transplantes hepáticos através  
do CD34 e CD105: comparação entre carcinoma hepatocelular,  
nódulos displásicos e nódulos regenerativos.**

**CAMPINAS**

**2010**

**VANDERLEI SEGATELLI**

**Avaliação da angiogênese em transplantes hepáticos através  
do CD34 e CD105: comparação entre carcinoma hepatocelular,  
nódulos displásicos e nódulos regenerativos.**

*Dissertação de Mestrado apresentada à Pós Graduação da Faculdade de  
Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas, para a obtenção  
do título de Mestre em Ciências Médicas, na área de Anatomia Patológica.*

***Orientadora: Profa. Dra. Cecília Amélia Fazzio Escanhoela***

**CAMPINAS**

**2010**

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

Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira – CRB-8ª / 6044

Segatelli, Vanderlei

Se37a      Avaliação da angiogênese em transplantes hepáticos através do CD34 e CD105: comparação entre carcinoma hepatocelular, nódulos displásicos e nódulos regenerativos / Vanderlei Segatelli. Campinas, SP : [s.n.], 2010.

Orientador : Cecília Amélia Fazzio Escanhoela

Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.

1. Angiogênese. 2. Carcinoma hepatocelular. I. Escanhoela, Cecília Amélia Fazzio. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

**Título em inglês : Evaluation of angiogenesis in liver explants by CD34 and CD105: comparative study between hepatocellular carcinoma, dysplastic nodules and regenerative cirrhotic nodules**

**Keywords:** • Angiogenesis  
• Carcinoma hepatocellular

**Titulação: Mestre em Ciências Médicas**  
**Área de concentração: Anatomia Patológica**

**Banca examinadora:**  
**Profa. Dra. Cecília Amélia Fazzio Escanhoela**  
**Profa. Dra. Vera Lúcia Nunes Pannain**  
**Prof. Dr. José Vassallo**

**Data da defesa: 22-02-2010**

---

## **Banca examinadora da Dissertação de Mestrado**

---

Vanderlei Segatelli

---

**Orientadora: Profa. Dra. Cecília Amélia Fazzio Escanhoela**

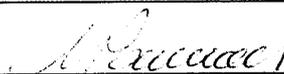
---

---

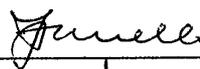
### **Membros:**

---

1. **Profa. Dra. Vera Lucia Nunes Pannain**



2. **Prof. Dr. José Vassallo**



3. **Profa. Dra. Cecília Amélia Fazzio Escanhoela**



Curso de pós-graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Ciências Médicas da  
Universidade Estadual de Campinas.

---

**Data: 22/02/2010**

---

## *DEDICATÓRIA E AGRADECIMENTOS*

## *Dedicatória*

*À minha esposa,*

*Minha amiga e companheira,*

*Ebe Christie de Oliveira*

*Meu amor.*

*Você é assim*

*Um sonho pra mim*

*E quando eu não te vejo eu penso em você*

*Em todas as horas*

*A minha melhor amiga é o meu amor*

Adaptado (Velha Infância - Tribalistas)  
Arnaldo Antunes, Carlinhos Brown, Davi Moraes, Marisa Monte e Pedro Baby

## *Agradecimento Especial*

À Profa. Dra. Cecília Amélia Fazzio Escanhoela,

*Pela disponibilidade na realização deste trabalho, me orientando  
nas encruzilhadas, sempre com entusiasmo, compreensão,  
alegria e paciência.*

## *Agradecimentos*

*À Profa. Dra. Liliana Aparecida Lucci De Angelo Andrade e ao Prof. Dr. José Vassallo, pelas sugestões que contribuíram para a realização deste trabalho.*

*À técnica de laboratório Luzia e ao biólogo Paulo Latuf Filho, do Laboratório de Patologia Molecular da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, pelo apoio na realização dos cortes histológicos, das colorações histoquímicas e técnica de imuno-histoquímica.*

*À Dra. Cleide Aparecida Moreira Silva pelo apoio fundamental nas análises estatísticas.*

*A todos os funcionários do Departamento de Anatomia Patológica da Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp, com especial menção a Maria do Carmo, pela paciência e apoio, sempre com carinho e bom humor.*

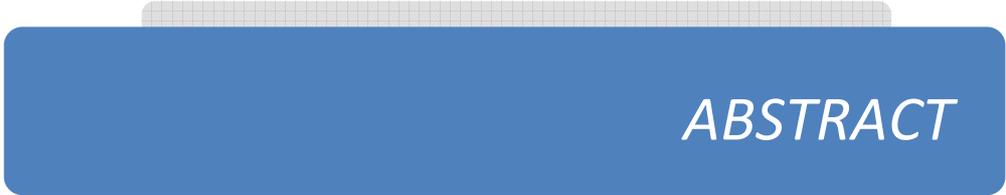
*“Fazer uma tese significa divertir-se... Uma tese bem feita é um produto de que se aproveita tudo.”*

*Umberto Eco*

*RESUMO*

## RESUMO

O carcinoma hepatocelular (CHC) destaca-se como uma das formas mais comuns de câncer no mundo, correspondendo a aproximadamente 90% das neoplasias primárias do fígado, sendo a cirrose seu mais importante fator de risco. A sua progressão, no entanto, depende de inúmeros fatores e, entre estes, a angiogênese assume papel fundamental, principalmente por ser o CHC um tumor altamente vascularizado. É sabido que tumores sólidos, ao atingirem volume de 1 a 2mm<sup>3</sup>, passam a ter seu crescimento dependente de neovascularização e no fígado esta se faz através de capilarização sinusoidal, processo pelo qual ocorrem alterações morfológicas nos sinusóides hepáticos, com perda das fenestrações e deposição de membrana basal. Neste estudo retrospectivo avaliamos a angiogênese, através dos marcadores imunohistoquímicos CD34 e CD105 (Endoglina), com determinação da densidade microvascular (DMV) em 44 produtos de hepatectomia total, compreendendo 44 nódulos neoplásicos (CHC), 44 nódulos regenerativos (NR) e 15 nódulos com características microscópicas de lesões pré-malignas (ou Nódulos Displásicos - ND), sendo 8 de baixo grau e 7 de alto grau. A avaliação compreendeu a determinação da DMV no centro e na periferia de todos os nódulos. Para análise estatística foi utilizada análise descritiva com apresentação de medidas de posição e dispersão para variáveis contínuas; para a comparação dos grupos foi utilizada a ANOVA, considerando-se  $p < 0,05$  estatisticamente significativa. O CD34 demonstrou positividade difusa no CHC, com valores médios da DMV de  $38,3 \pm 12,6$  e  $34,2 \pm 11,2$  no centro e periferia, respectivamente. Já o CD105 apresentou expressão sinusoidal predominantemente periférica no CHC, com valores médios da DMV de  $6,2 \pm 4,1$  e  $10,7 \pm 4,4$ , com diferenças significativas entre os grupos ( $p < 0,0001$ ). Também foram observadas diferenças na imunoexpressão entre os marcadores em NR ( $p < 0,0001$ ) e ND ( $p < 0,0019$ ). Concluímos que existem diferenças na imunoexpressão do CD34 e CD105 entre os nódulos benignos e malignos, com gradual aumento da neovascularização, bem caracterizado pelo CD34, devido ao processo de capilarização sinusoidal. O CD105, expresso em "subset" de microvasos neoformados, pode ser um indicador de diferenciação diagnóstica entre NR e CHC.



*ABSTRACT*

## ABSTRACT

Hepatocellular carcinoma (HCC) is one of the most common forms of cancer worldwide, accounting for about 90% of primary tumors of the liver. Cirrhosis is the most important risk factor for HCC. However, the progression of hepatocellular carcinoma is dependent on a number of factors. Among these factors, angiogenesis plays a major role, mainly because HCC is a highly vascular tumor. It is known that when solid tumors reach a volume of 1 to 2mm<sup>3</sup> their growth depends on neovascularization. In the liver, this occurs through sinusoidal capillarization, a process by which morphologic alterations occur in the hepatic sinusoids, with loss of fenestrations and basement membrane depositions. In this retrospective study, we evaluated angiogenesis by using immunohistochemical markers CD34 and CD105 (Endoglin), with determination of tumor microvessel density (MVD) in 44 products of total hepatectomy, including 44 malignant nodules (HCC), 44 regenerative nodules (RN) and 15 nodules with microscopic characteristics of preneoplastic lesions (or Dysplastic Nodules-DN), 8 being low-grade and 7 high-grade. The evaluation encompassed measurement of MVD in the center and periphery of all nodules. For statistical analysis, a descriptive analysis with measurements of position and dispersion for continuous variables was used. ANOVA was used for group comparison, considering  $p < 0.05$  as statistically significant. CD34 demonstrated a diffuse positivity in HCC, with median MVD values of  $38.3 \pm 12.6$  and  $34.2 \pm 11.2$  in the center and periphery, respectively. On the other hand, CD105 exhibited sinusoidal expression predominantly in the periphery of the HCC, with median MVD values of  $6.2 \pm 4.1$  and  $10.7 \pm 4.4$ , with significant differences between groups ( $p < 0.0001$ ). Differences in the immunoexpression between markers in RN ( $p < 0.0001$ ) and DN ( $p < 0.0019$ ) were also observed. In conclusion, there are differences in the immunoexpression of CD34 and CD105 between benign and malignant nodules, with a gradual increase in neovessel formation, well-characterized by CD34, due to a process of sinusoidal capillarization. CD105, expressed in a "subset" of newly formed microvessels may be an indicator of the diagnostic differentiation between RN and HCC.



*LISTAS*

## Lista de Abreviaturas

ATV: Área total vascular;

CHC: Carcinoma (s) hepatocelular (s);

CPE: Células progenitoras endoteliais;

CEP: Comitê de Ética e Pesquisa;

DNA: Ácido desoxirribonucléico;

DMV: Densidade (s) microvascular (s);

FD: Focos displásicos;

HBx: Proteína X do vírus da hepatite B;

IWP: International Working Party;

LCC: Large cell change (Alteração de grande células)

ND: Nódulo (s) displásico (s);

NR ou NC: Nódulo (s) regenerativo (s) ou Nódulo (s) cirrótico (s);

PBS: Phosphate buffered saline (Solução salina tamponada com fosfato);

PDGF: Platelet Derived Growth Factor (Fator de crescimento derivado de plaquetas;

RNA: Ácido ribonucléico;

SAS: Statistical analysis system (for Windows);

SCC: Small cell change (Alteração de pequenas células);

VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor (Fator de crescimento endotelial vascular)

VEGFR2: Receptor 2 do Fator de crescimento endotelial vascular;

VHB: Vírus da hepatite B;

VHC: Vírus da hepatite C;

TGF: Transforming Growth Factor (Fator transformador de crescimento).

## Listas de Ilustrações

	<b>Página</b>
<b>Quadros</b>	
Quadro 1 – Classificação dos Nódulos hepatocelulares – IWP	5
Quadro 2 – Lesões hepáticas pré-malignas e CHC pequeno	5
<b>Tabelas</b>	
Tabela 1 – Análise descritiva e comparação do CD34 entre grupos	21
Tabela 2 – Análise descritiva e comparação do CD105 entre grupos	23
Tabela 3 – Análise descritiva e comparação da contagem entre grupos no geral	24
Tabela 4 – Análise descritiva e comparação da contagem entre graus dos nódulos displásicos e grupos	27
<b>Gráficos</b>	
Gráfico 1 – Percentual dos fatores etiológicos da cirrose	19
Gráfico 2 – Percentual dos casos de CHC segundo a graduação histológica de Edmondson-Steiner	20
Gráfico 3 – “Box-plot” da quantificação em cada grupo nos CHC e NR	25
Gráfico 4 – “Box-plot” da quantificação segundo o grau do ND e grupos	28
Gráfico 5 – Comparação entre médias das DMV nos grupos dos ND de alto e baixo grau	28
<b>Figuras</b>	
Figura 1 – Análise quantitativa do número de vasos em imagem digitalizada pelo software <i>ImageLab 2000</i> . (Expressão de CD34 na região central de CHC)	16
Figura 2 – Imunoexpressão do CD34 na região central de CHC. 200x	22
Figura 3 – Imunoexpressão do CD105 na região periférica (esquerda) e central (direita) de CHC. 200x	23
Figura 4 – Imagens da mesma área em fígado cirrótico, comparando-se a imunoexpressão do CD105 em NR (acima) e do CD34 em NR (abaixo). 40x	26



## *SUMÁRIO*

<b>SUMÁRIO</b>	<b>Página</b>
<b>1-INTRODUÇÃO</b>	1
1.1 <i>Carcinoma Hepatocelular</i>	2
1.1.1 Incidência	2
1.1.2 Hepatocarcinogênese	2
1.1.3 Classificação e nomenclatura das lesões precursoras	4
1.2 <i>Angiogênese</i>	7
<b>2-OBJETIVOS</b>	10
<b>3-METODOLOGIA</b>	12
3.1 <i>Desenho do Estudo</i>	13
3.2 <i>Casuística</i>	13
3.3.1 Critérios de inclusão	14
3.3.1 Critérios de exclusão	14
3.3 <i>Estudo Morfológico</i>	14
3.4 <i>Estudo Imuno-histoquímico</i>	15
3.4.1 Técnica	15
3.4.2 Anticorpos angiogênicos utilizados	15
3.5 <i>Avaliação da Densidade Microvascular</i>	15
3.6 <i>Análise Estatística</i>	16
3.7 <i>Aspectos Éticos</i>	17
<b>4 RESULTADOS</b>	18
4.1 <i>Dados da amostra e características morfológicas</i>	19
4.2 <i>Dados do estudo imuno-histoquímico</i>	21
4.2.1 Análise quantitativa do anticorpo anti-CD34 nos CHC e NR	21
4.2.2 Análise quantitativa do anticorpo anti-CD105 nos CHC e NR	22
4.2.3 Análise quantitativa da comparação entre os anticorpos nos CHC e NR	24
4.2.4 Análise quantitativa da comparação entre os anticorpos nos ND	27
<b>5 DISCUSSÃO</b>	29
<b>6 CONCLUSÕES</b>	34
<b>7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	36
<b>8 APÊNDICES</b>	43

# *INTRODUÇÃO*

# **1- INTRODUÇÃO**

## **1.1 CARCINOMA HEPATOCELULAR**

### **1.1.1 INCIDÊNCIA**

O Carcinoma Hepatocelular (CHC) destaca-se como uma das formas mais comuns de câncer no mundo, com cerca de quinhentos mil a um milhão de novos casos por ano, respondendo por aproximadamente 90% das neoplasias primárias do fígado.<sup>1</sup> Sua incidência no mundo está diretamente relacionada a fatores que causam injúria hepática crônica, como nos países da África subsaariana e sudeste da Ásia, onde se observam altos índices de infecção pelo vírus da hepatite B (VHB).<sup>2</sup> No Brasil, segundo dados do INCA de 2008, o CHC não se configura entre as dez neoplasias mais freqüentes<sup>3</sup>, sendo considerado, em alguns estudos, como país de risco intermediário.

### **1.1.2 HEPATOCARCINOGENESE**

O desenvolvimento do CHC depende, entre outros, de fatores ambientais e sócio-econômicos, sendo possível observarmos variações de incidência em diferentes regiões geográficas no mundo<sup>4</sup>, certamente relacionadas à exposição a fatores de risco e diferentes vias de mecanismos moleculares associadas à carcinogênese hepática.

A maioria dos CHC origina-se em fígados com doenças crônicas, como hepatites virais B e C<sup>5,6</sup>, doença alcoólica e doenças metabólicas como a hemocromatose. O maior fator de risco para o desenvolvimento de CHC é a cirrose hepática.<sup>7,8</sup> Alguns fatores etiológicos isolados são bem conhecidos, como por exemplo, a ação de compostos tóxicos, como as aflatoxinas.<sup>9</sup>

A infecção crônica pelo vírus da hepatite B (VHB) é a causa mais comum de CHC em países asiáticos.<sup>2</sup> A infecção pelo VHB pode causar hepatite aguda, hepatite fulminante e hepatite crônica, sendo que esta última forma de apresentação da doença pode, em alguns casos, evoluir para cirrose. A base estrutural genômica do VHB é uma molécula de DNA circular. Nas infecções crônicas, a integração do DNA do VHB no genoma humano pode

induzir instabilidade cromossômica, resultando em rearranjos ou deleções, ou ainda, pode ativar genes endógenos envolvidos na divisão celular como a ciclina A e SERCA1, causando um descontrole na proliferação celular.<sup>10,11,12</sup> A integração do DNA viral ao genoma do hepatócito pode codificar produtos, como a proteína HBx<sup>13</sup>, que desenvolve uma variedade de funções biológicas, como a modulação da proliferação celular, através da sua interação com a proteína p53 e apoptose. O aumento da expressão da proteína HBx poderia desencadear mecanismo proliferativos celulares e anti-apoptóticos, relacionados ao desenvolvimento de CHC.<sup>14,15,16,17</sup>

No Brasil a infecção persistente pelo vírus da hepatite C (VHC) é o principal agente causador de hepatite crônica, cirrose e CHC<sup>19</sup>. Contrário ao VHB, o VHC é um RNA monofilamentar, e estudos indicam que sua ação não envolve integração com o genoma da célula hospedeira. Proteínas virais específicas, como o “core”, NS3, NS4B e NS5A, atuam como agentes importantes na hepatocarcinogênese viral, como indutores na ativação do sinal intracelular, contribuindo para proliferação celular e na regulação de proto-oncogenes, como o *c-myc*. Além disso, o processo de injúria celular com regeneração e cirrose, secundário à infecção e inflamação crônica causada pelo VHC, já é considerado um fator de risco para o processo de hepatocarcinogênese.<sup>20,21</sup>

As aflatoxinas são produtos tóxicos carcinogênicos alimentares produzidos pelos fungos *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*, comumente encontrados na Ásia e África, onde o vírus da hepatite B também é altamente prevalente. Embora as aflatoxinas sejam consideradas como fator independente na patogênese do CHC, produzindo mutações no gene supressor de tumor p53, a associação da infecção pelo vírus da hepatite B e a ação de aflatoxinas atuam sinergicamente, produzindo etapas importantes na hepatocarcinogênese.<sup>22,23</sup>

Estudos recentes demonstram a importância da biologia molecular no desenvolvimento e progressão do CHC. As alterações moleculares que levam ao aparecimento de lesões pré-neoplásicas ou displásicas, com presença dos chamados focos displásicos (FD) e nódulos displásicos (ND), são iniciadas em fígados cronicamente doentes, através de

alterações genéticas (mutações, deleções e perda ou ganho de material genético) e epigenéticas<sup>24</sup> (amplificações e “silenciamento” de genes).

Várias alterações estruturais envolvendo genes e cromossomos tem sido descritas em lesões pré-cancerosas e CHC, como perda de heterozigotidade. Mutações pontuais e outros tipos de alterações genômicas também tem sido descritas na hepatocarcinogênese, incluindo aquelas em genes supressores tumorais como p53, Rb1, beta-catenina, AX1N1, p16 e oncogenes como PIK3CA e *c-myc*<sup>25</sup>. A ativação da Telomerase, com consequente inibição da apoptose<sup>26</sup>, pode ser encontrada em fígados cirróticos, nódulos displásicos e no CHC.

A extensa heterogeneidade de alterações genéticas e epigenéticas nos CHC, associadas à relativamente baixa incidência de cada uma delas, sugere que lesões hepáticas pré-malignas e CHC sejam consequências de alterações que comprometam mais de uma via regulatória.

### **1.1.3 CLASSIFICAÇÃO E NOMENCLATURA DAS LESÃO PRECURSORAS**

Em 1901 foi realizada por Egel a primeira descrição científica do CHC, num estudo de 200 autópsias<sup>27</sup>. Em 1954, Edmondson e Steiner<sup>28</sup> descreveram as características morfológicas do CHC e criaram um sistema ainda utilizado de graduação histológica.

Como a evolução do CHC decorre de uma sequência de múltiplas etapas, muitas vezes com passagem por estágios pré-neoplásicos ou displásicos, tem-se buscado cada vez mais a identificação de lesões que demonstrem algum potencial em se transformarem em CHC. Do ponto de vista histológico, no entanto, há ainda muita dificuldade diagnóstica, tanto pela falta de critérios morfológicos unânimes, como pela grande confusão na nomenclatura, com várias classificações propostas.

Em 1994 foi proposta, pela International Working Party (IWP)<sup>29</sup>, uma classificação abrangendo vários termos que já haviam sido anteriormente introduzidos na literatura, incluindo-se outros, tais como focos e nódulos displásicos (Quadro 1). Em 2007, num consenso internacional com a participação de patologistas de diversos países, significativos avanços na terminologia de lesões pré-neoplásicas e neoplásicas pequenas foram alcançados<sup>30</sup> (Quadro

2). E mais recentemente, novo grupo de consenso reunido (International Consensus Group for Hepatocellular Neoplasia, 2009)<sup>31</sup> reviu alguns conceitos sobre estas lesões, porém manteve a nomenclatura proposta em 2007.

### Quadro 1 - CLASSIFICAÇÃO DOS NÓDULOS HEPATOCELULARES (IWP)

#### Lesões regenerativas

##### Nódulo regenerativo monoacinar

Hiperplasia nodular difusa sem septos fibrosos (Hiperplasia nodular regenerativa)  
Hiperplasia nodular difusa com septos fibrosos ou na cirrose

##### Nódulo regenerativo multiacinar

##### Hiperplasia segmentar ou lobar

##### Nódulo cirrótico

Nódulo cirrótico monoacinar  
Nódulo cirrótico multiacinar

##### Hiperplasia nodular focal

#### Lesões displásicas e neoplásicas

##### Adenoma hepatocelular

##### Focos displásicos

##### Nódulo displásico

Nódulo displásico, baixo grau  
Nódulo displásico, alto grau

##### Carcinoma Hepatocelular

Fonte: International Working Party

### Quadro 2 - Lesões hepáticas pré-malignas e CHC pequeno

#### Focos displásicos

- Foco expansivo de alteração de pequenas células
- Foco livre de ferro em fígado com hemocromatose

#### Nódulo displásico

- Nódulo displásico, baixo grau (sem atipias citoarquiteturais significativas)
- Nódulo displásico, alto grau (com atipia citológica ou arquitetural insuficiente para o diagnóstico de CHC)

#### Carcinoma hepatocelular pequeno

- Carcinoma hepatocelular precoce ( margens indistintas)
- Carcinoma hepatocelular pequeno distintamente nodular

Hytioglou *et al*  
Gastroenterol Clin N Am 2007;36:867-87.

Células hepáticas pré-malignas podem, portanto, formar desde focos displásicos (“clusters”), detectáveis apenas no exame microscópico, os quais, segundo a IWP, devem medir menos que 1,0mm. Podem compreender pequenos ou grandes hepatócitos atípicos, daí as denominações na literatura de alteração de pequenas células (SCC – *Small Cell Change*) e alteração de grandes células (LCC – *Large Cell Change*), sendo a evolução histológica SCC → CHC comumente descrita na literatura.<sup>32,33,34</sup> Já a relação de LCC com CHC é motivo de discordância na literatura, onde alguns autores relacionam estas alterações morfológicas a processos reparativos.<sup>35</sup>

Os nódulos displásicos (ND) podem ser detectados no exame macroscópico e exames de imagem e na literatura há consenso de que estes, tanto de alto como de baixo grau, sejam precursores do CHC. São lesões que apresentam achados sugestivos de população clonal, mas que ainda não apresentam atipias citoarquiteturais próprias do CHC.<sup>36,37,38</sup>

Já o CHC pequeno, definido por alguns grupos de estudo recentes e consensos<sup>29,31,39,40,41</sup> como lesão que deve medir menos que 2,0cm de diâmetro, pode ser classificado em:

- ❖ *CHC vagamente nodular* (CHC precoce): bem diferenciado, com margens indistintas, desprovido de cápsula fibrosa e que constantemente apresenta tratos portais.

- ❖ *CHC distintamente nodular*: bem ou moderadamente diferenciado, desprovido de tratos portais e que frequentemente apresenta cápsula fibrosa.

O CHC precoce é considerado precursor do CHC distintamente nodular. Neste tipo de CHC pequeno observa-se, na maioria das vezes, proliferação de células neoplásicas pequenas, sugerindo evolução de SCC, com alterações arquiteturais idênticas a outros CHC maiores. Por outro lado, o CHC distintamente nodular pode conter várias populações de células neoplásicas distintas, formando sub-nódulos<sup>42</sup>. O diagnóstico morfológico entre ND de alto grau e CHC pequeno pode ser difícil ou até impossível, principalmente em amostras de biópsias. A presença de invasão tumoral em tratos portais intranodulares foi considerada recentemente (consenso de 2009), como novo e importante critério para o diagnóstico diferencial entre NDAG

e CHC. Esta, no entanto, por vezes, é subjetiva, e a utilização de novos marcadores imunohistoquímicos ou moleculares, poderá ser útil num futuro próximo.

## 1.2 ANGIOGÊNESE

Angiogênese ou neovascularização é o processo de formação de novos vasos sanguíneos nos tecidos maduros, ocorrendo em diversos eventos fisiológicos e patológicos. Esta difere da vasculogênese, que é o desenvolvimento de vasos sanguíneos que ocorre durante a fase embrionária, iniciando-se a partir de uma rede vascular primitiva formada por células especializadas (angioblastos), precursoras das células endoteliais.

A angiogênese pode ocorrer através de vasos pré-existentes e pelo recrutamento de células progenitoras endoteliais (CPE), que podem se diferenciar em células endoteliais e células periendothelais.<sup>43</sup> O desenvolvimento de novos vasos sanguíneos é um fenómeno dinâmico, que envolve uma sequencia de etapas; esta se inicia com a produção de fatores de crescimento que exibem atividade angiogênica, estimulados por condições teciduais locais, como hipóxia e elevação de óxido nítrico.<sup>44</sup> O fator de crescimento endotelial vascular (VEGF – Vascular Endothelial Growth Factor) é um dos mais importantes fatores reguladores da angiogênese. A ativação desse fator ocorre após sua ligação nas células endoteliais, através de receptores específicos da tirosina-cinase, o receptor do tipo 2 do fator de crescimento endotelial vascular (VEGFR-2), desencadeando uma cascata de eventos que promovem aumento da permeabilidade vascular, crescimento e migração de células endoteliais, além de mobilização dos precursores de células endoteliais da medula óssea.<sup>45</sup>

Outros fatores de crescimento como as angiopoitinas, fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF - Platelet Derived Growth Factor) e fator transformador de crescimento  $\beta$  (TGF- $\beta$  – Transforming Growth Factor beta) participam no processo de estabilização dos tubos endoteliais neoformados e da transformação destes em estruturas vasculares elaboradas.<sup>46</sup>

Diferentemente do que ocorre em condições fisiológicas, a delicada modulação entre fatores pró e anti-angiogênicos na formação de novos capilares derivados de vasos pré-

existentes, está alterada no micro-ambiente tumoral, levando a um anormal crescimento vascular. Desta forma, a angiogênese está relacionada ao desenvolvimento, crescimento e progressão dos tumores.<sup>47</sup> Após os tumores sólidos atingirem um volume de 1,0 a 2,0 mm<sup>3</sup>, seu crescimento passa a ser dependente da neovascularização.<sup>48</sup>

Alguns marcadores endoteliais têm sido utilizados para o estudo da angiogênese neoplásica, como o VEGF, CD31, CD34, Fator VIII ou de von Willebrand e o CD105.

O antígeno CD34 é uma proteína transmembrana de cadeia única com 105-120kDa, encontrada na superfície de células endoteliais, que atua na ligação com receptores específicos de adesão celular. Foi primeiramente descrito como marcador de células progenitoras hematopoiéticas<sup>49</sup> e depois evidenciado em células endoteliais e tumores mesenquimais. Vários estudos tem demonstrado que marcadores endoteliais, em particular o CD34, são expressos difusamente nos microvasos do CHC e que seus níveis de expressão podem se correlacionar ao prognóstico dos pacientes.

O CD105 (Endoglina) também é uma proteína transmembrana, homodimérica, de 180 kDa, codificada pelo gene CD105 localizado no braço longo do cromossomo 9, expressada em células endoteliais humanas em proliferação. Uma das atuações do CD105 se relaciona à ligação com receptores existentes nas moléculas de TGF- $\beta$ .<sup>50</sup> Assim, o CD105 tem sido citado na literatura como um marcador de vasos neoformados, sendo utilizado como fator relacionado ao crescimento tumoral e prognóstico.<sup>51</sup>

A angiogênese pode, portanto, ser avaliada com a ajuda de marcadores imunohistoquímicos, seja através de análises qualitativas, como a verificação da intensidade da expressão de um determinado anticorpo ou através de análises quantitativas, como a Densidade Microvascular (DMV) e Área Total Vascular (ATV). A DMV resulta do valor médio da contagem do número de vasos em áreas mais vascularizadas ("hot spots"), enquanto que a ATV resulta do valor médio do volume total ocupado pelos vasos, também em "hot spots", de uma determinada área.<sup>52,53</sup>

O CHC é um tumor altamente vascularizado à angiografia e esta neovascularização se faz através de capilarização sinusoidal, processo pelo qual ocorrem alterações morfológicas nos sinusóides hepáticos, como perda das fenestrações e deposição

de membrana basal.<sup>54,55,56</sup> E como a capilarização sinusoidal ocorre progressivamente em NR e ND,<sup>57</sup> a avaliação da angiogênese em lesões pré-neoplásicas pode ser de grande valia na interpretação e diagnóstico das mesmas.



## *OBJETIVOS*

## **2- OBJETIVOS**

### **2.1 OBJETIVO GERAL**

2.1.1 Avaliar o valor diagnóstico da angiogênese em carcinomas hepatocelulares, nódulos displásicos de alto e baixo grau e nódulos regenerativos, através da mensuração da densidade microvascular em região central e periférica, com a imunoeexpressão dos anticorpos anti-CD34 e anti-CD105.

### **2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

2.2.1 Avaliar os padrões de imunomarcção dos anticorpos utilizados entre os carcinomas hepatocelulares, nódulos displásicos e nódulos regenerativos e tentar estabelecer um perfil qualitativo angiogênico nestas lesões.

2.2.2 Através da DMV, determinar os valores quantitativos angiogênicos destas lesões.

2.2.3 Comparar os dados obtidos, tanto qualitativos como quantitativos, buscando parâmetros angiogênicos que possam ser utilizados no diagnóstico diferencial entre estas lesões.



## *METODOLOGIA*

## **3- MATERIAL E MÉTODOS**

### **3.1 DESENHO DO ESTUDO**

A pesquisa consta de um estudo longitudinal, retrospectivo e investigativo, utilizando tecidos humanos previamente retirados dos pacientes para diagnóstico (produtos de transplantes hepáticos), fixados em formalina, incluídos em blocos de parafina e arquivados, bem como seus respectivos relatórios anatomopatológicos, além de informações clínicas contidas nos prontuários.

### **3.2 CASUÍSTICA**

Foram selecionados blocos de parafina de um grupo de 44 pacientes submetidos a transplante hepático, arquivados no Departamento de Anatomia Patológica da Faculdade de Ciências médicas da UNICAMP, no período entre 1996 e 2006, que continham diagnóstico de CHC nos explantes, com variação de tamanho entre 0,5 e 5,5 cm. Neste mesmo grupo foram avaliados 44 nódulos regenerativos no fígado cirrótico adjacente, distando pelo menos 0,5 cm do CHC e, ainda, 15 nódulos menores, medindo entre 0,5 e 1,3 cm, com características microscópicas de lesões pré-malignas ou displásicas (oito nódulos displásicos de baixo grau e sete de alto grau), não destacados à macroscopia, porém presentes nos cortes histológicos nos blocos do mesmo grupo de pacientes.

As informações clínicas e características macroscópicas dos casos foram adquiridas nos prontuários dos pacientes e nos laudos anatomopatológicos.

### **3.2.1- Critérios de inclusão:**

Foram incluídos casos de pacientes transplantados, com o diagnóstico de CHC e cirrose no fígado explantado.

### **3.2.2 Critérios de exclusão:**

Foram excluídos os casos cujos materiais biológicos nos blocos de parafina não apresentavam condições para o estudo, como amostras insuficientes ou com predomínio de necrose (tumoral, por alcoolização ou quimioembolização prévia).

## **3.3-ESTUDO MORFOLÓGICO**

O estudo histopatológico foi realizado em microscopia de luz, em cortes corados através da Hematoxilina-Eosina (H-E), Gomori (impregnação argêntica para fibras reticulínicas), tricrômico de Masson (para colágeno) e Azul da Prússia (Perls).

No estudo microscópico realizamos a graduação histológica de Edmondson-Steiner para todos os casos de CHC e selecionados nódulos regenerativos e displásicos no fígado cirrótico adjacente, estes últimos com dimensão igual ou superior a 0,5cm em seu maior eixo (protocolo utilizado neste estudo), os quais foram classificados de acordo com os critérios da IWP descritos anteriormente. Nos casos em que todo o bloco de parafina estava ocupado por lesão tumoral, outro bloco foi selecionado.

### **3.4-ESTUDO IMUNO-HISTOQUÍMICO**

#### **3.4.1- Técnica:**

Em todos os espécimes emblocados em parafina, selecionados para este estudo, foram realizados cortes histológicos de 3 a 4µm de espessura. Posteriormente, tais cortes foram submetidos ao método de imuno-histoquímica, segundo o protocolo do Laboratório de Imuno-histoquímica do Departamento de Anatomia Patológica da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP.

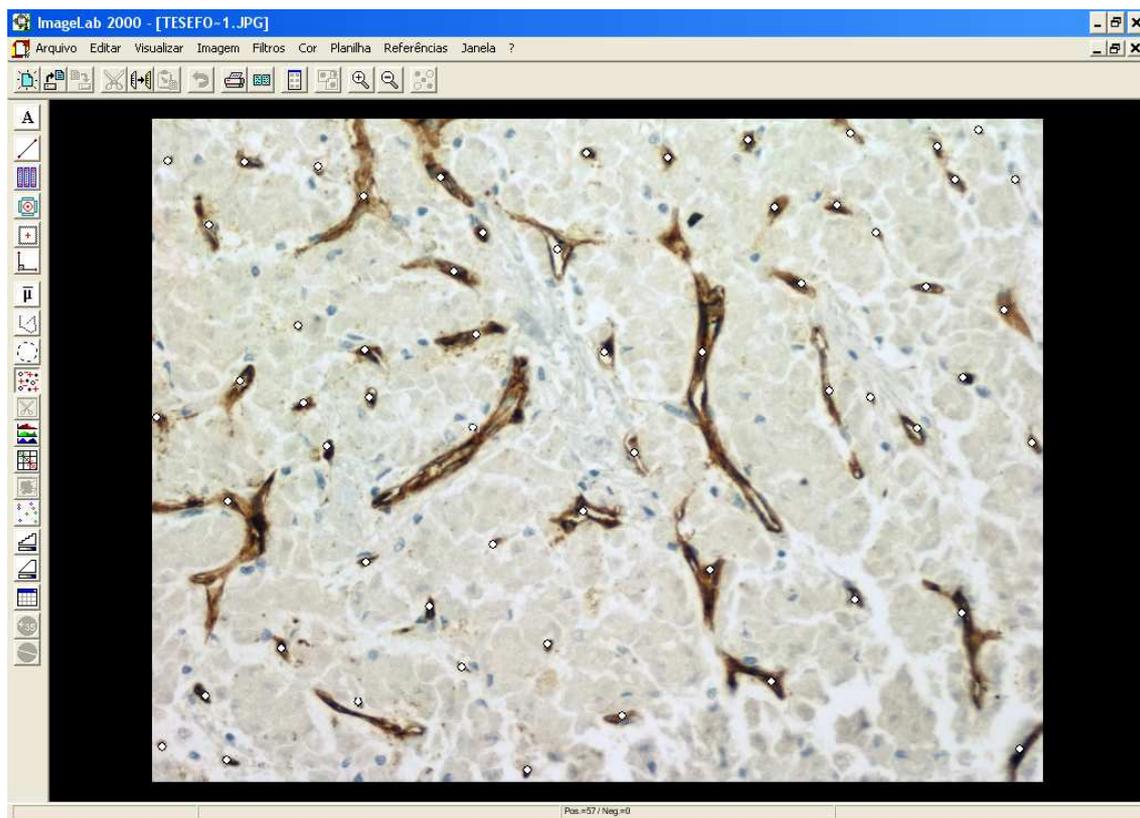
#### **3.4.2 Anticorpos angiogênicos utilizados:**

3.4.2.1 CD105 (Endoglina) – *Monoclonal*; Clone SN6h DAKO/USA M3527.

3.4.2.2 CD34 Classe II – *Monoclonal*; Clone QBEnd 10 DAKO/USA M7165.

### **3.5 AVALIAÇÃO DA DENSIDADE MICROVASCULAR**

Para a avaliação do índice angiogênico foi utilizada a contagem da Densidade Microvascular (DMV). Desta forma, na microscopia de luz (OLYMPUS BX41) sob aumento de 40x, foram selecionadas por dois observadores, três áreas bem vascularizadas na região periférica e três áreas bem vascularizadas na região central, de cada nódulo estudado (“hot spots”). Em seguida, em aumento de 200x, estas áreas foram fotografadas em formato JPEG em câmera digital Olympus acoplada ao microscópio. As imagens foram digitalizadas e a contagem dos vasos foi realizada com auxílio do software *ImageLab 2000*. Assim, o resultado foi expresso pelo número médio de vasos nas regiões periféricas e centrais em cada nódulo e para cada anticorpo utilizado. Foram considerados como unidades quaisquer vasos com lúmen, células isoladas ou grupos celulares imunomarcados separados dos microvasos adjacentes (Figura 1).



**Figura 1** – Análise quantitativa do número de vasos em imagem digitalizada pelo software *ImageLab 2000*. (Expressão de CD34 na região central de CHC).

### 3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

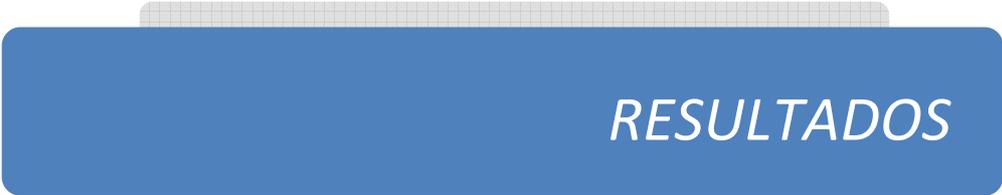
Os resultados obtidos dos valores das DMV dos CHC, NR e ND em planilhas eletrônicas Excel (*Microsoft® Office Windows Vista*) foram exportados e analisados estatisticamente pelo programa *SAS for Windows (Statistical Analysis System)*, versão 9.1.3. SAS Institute Inc, 2002-2003, Cary, NC, USA.

Foi utilizada análise descritiva com apresentação de medidas de posição e dispersão para variáveis contínuas. Para comparação dos grupos foi utilizada a ANOVA para

medidas repetidas com transformação por postos.<sup>58</sup> O nível de significância adotado para os testes estatísticos foi de 5%.

### **3.7 ASPECTOS ÉTICOS**

Este projeto de pesquisa foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa (CEP) da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas com registro número 638/2006.

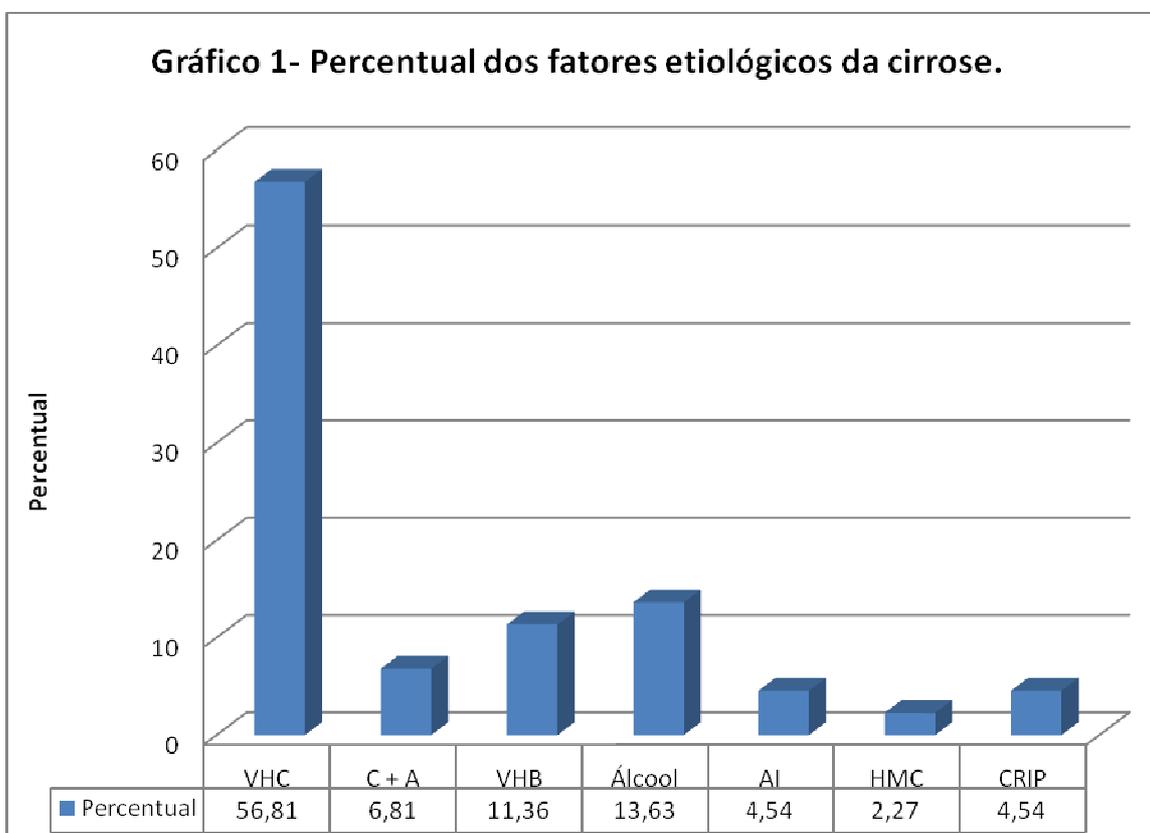


## *RESULTADOS*

## 4- RESULTADOS

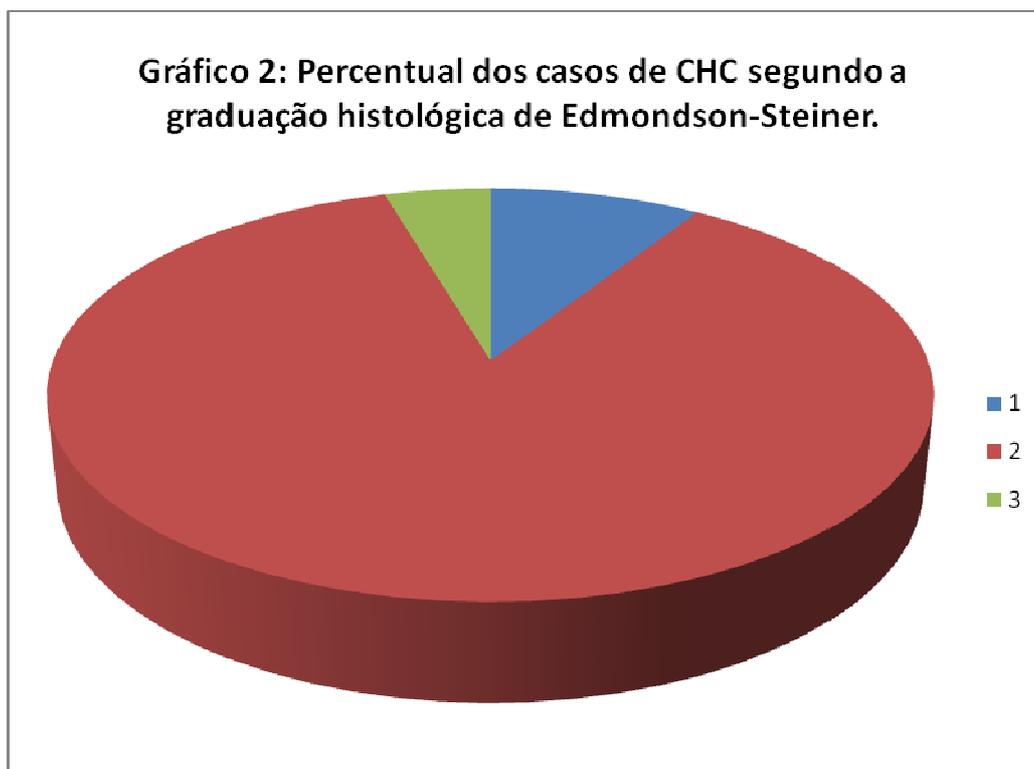
### 4.1 DADOS DA AMOSTRA E CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS

Entre os 44 casos estudados, a idade dos pacientes variou de 16 a 70 anos, com predomínio do gênero masculino (75%). O vírus da hepatite C, como agente isolado, foi o principal fator etiológico da cirrose neste estudo, com 56,81% dos casos (Gráfico 1 e Anexo 1).



**Legenda:** **VHC** - Vírus da Hepatite C; **C + A** - vírus da hepatite C associado ao Alcoolismo crônico; **VHB** - Vírus da Hepatite B; **Álcool** - Alcoolismo crônico; **AI** - hepatite Auto-Imune; **HMC** - Hemocromatose; **CRIP** - Criptogênica.

Segundo a graduação de Edmondson-Steiner, os CHC foram classificados como grau 2 histológico em 86,36% dos casos e nenhum caso foi classificado como grau 4 (Gráfico 2 e Anexo 1). O tamanho dos CHC variou entre 0,6 a 5,5cm. Os ND selecionados mediam entre 0,5 e 1,3cm e foram classificados histologicamente segundo os critérios da IWP como baixo grau (8 casos) e alto grau (7 casos).



**Legenda:** Graduação histológica de Edmondson-Steiner: graus 1, 2 e 3.

## 4.2- DADOS DO ESTUDO IMUNO-HISTOQUÍMICO

### 4.2.1 Análise quantitativa do anticorpo anti-CD34 nos CHC e NR

O CD34 demonstrou positividade difusa sinusoidal nos CHC (Figura 2), sem diferença significativa entre o centro e a periferia destes nódulos, com valores médios da DMV de  $38,3 \pm 12,6$  e  $34,2 \pm 11,2$  no centro e periferia, respectivamente. Nos NR houve maior expressão do CD4 na região periférica em relação à região central, com valores médios da DMV de  $16,3 \pm 4,3$  e  $7,5 \pm 4,3$ , respectivamente. O estudo estatístico demonstrou diferença significativa da expressão do CD34 entre CHC e NR. A média da DMV expressada pelo CD34 foi maior nos CHC, tanto na periferia quanto na região central, em relação aos NR (Tabela 1).

**Tabela 1** – Análise descritiva e comparação do CD34 entre grupos

Grupo	Variável	n	Média	DP	Mínimo	Mediana	Máximo
1	CD34TC	44	38,5	12,6	8,0	41,5	57,0
2	CD34TP	44	34,2	11,2	14,0	34,5	56,0
3	CD34NCc	44	7,5	4,3	3,0	6,0	18,0
4	CD34NCp	44	16,3	4,3	10,0	16,0	25,0

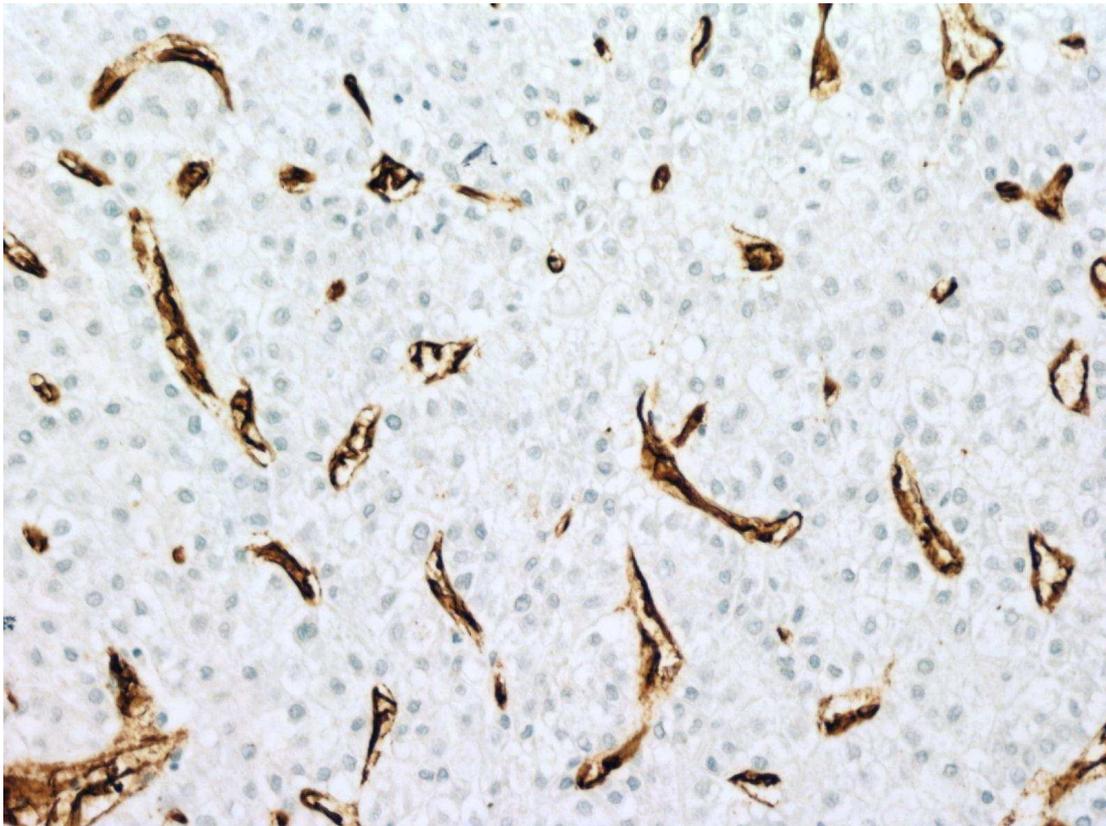
**Legenda:** TC – centro do tumor; TP – periferia do tumor; NCc – centro do nódulo cirrótico; NCp – periferia do nódulo cirrótico

Resultados da ANOVA para medidas repetidas com transformação por postos.

Efeito Grupo

p valor <0.0001

Grupos diferentes (teste de perfil por contrastes): 1 e 3; 1 e 4; 2 e 3; 2 e 4; 3 e 4



**Figura 2** – Imunoexpressão do CD34 na região central de CHC. (200x)

#### ***4.2.2 Análise quantitativa do anticorpo anti-CD105 nos CHC e NR***

O CD105 apresenta expressão sinusoidal predominantemente periférica nos CHC (Figura 3), com valores médios da DMV de  $6,2 \pm 4,1$  e  $10,7 \pm 4,4$  na região central e periférica, respectivamente. Nos NR se observa expressão difusa do CD105, com valores médios maiores da DMV na região central (Tabela 2).

**Tabela 2** – Análise descritiva e comparação do CD105 entre grupos

Grupo	Variável	n	Média	DP	Mínimo	Mediana	Máximo
1	CD105TC	44	6,2	4,1	2,0	5,0	18,0
2	CD105TP	44	10,7	4,4	3,0	9,0	22,0
3	CD105NCc	44	17,6	7,4	2,0	17,0	37,0
4	CD105NCp	44	12,5	4,9	5,0	11,5	25,0

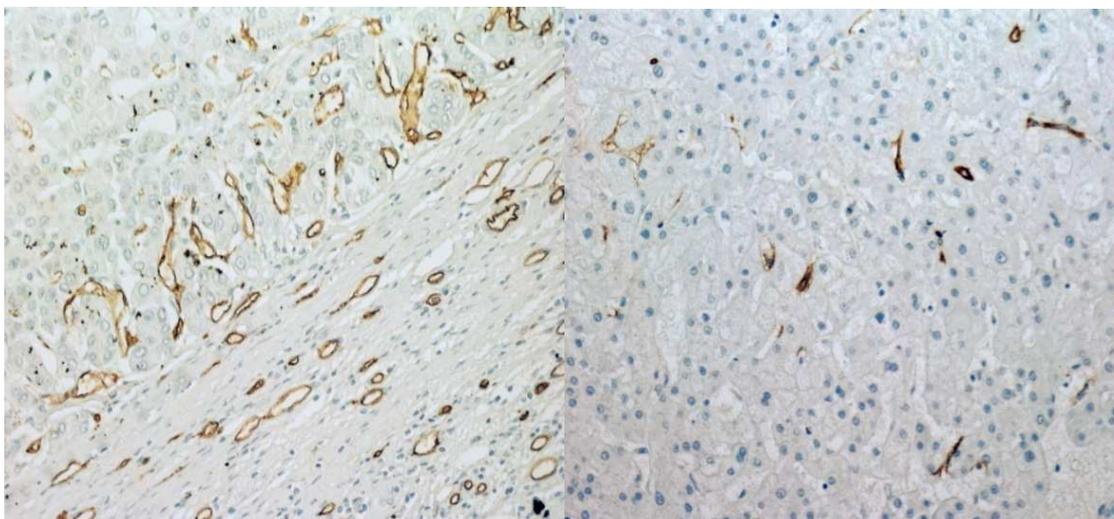
**Legenda:** TC – centro do tumor; TP – periferia do tumor; NCc – centro do nódulo cirrótico; NCp – periferia do nódulo cirrótico

Resultados da ANOVA para medidas repetidas com transformação por postos.

Efeito Grupo

p valor <0.0001

Grupos diferentes (teste de perfil por contrastes): 1 e 2; 1 e 3; 1 e 4; 2 e 3; 3 e 4



**Figura 3:** Imunoexpressão do CD105 na região periférica (esquerda) e central (direita) de CHC.(200x)

### **4.2.3-Análise quantitativa da comparação entre os anticorpos anti-CD34 e anti-CD105 nos CHC e NR**

Os resultados do estudo estatístico pela ANOVA nos testes de perfil por contrastes dos valores entre os grupos das tabelas 1 e 2 demonstram diferenças significativas entre os valores médios da DMV na comparação dos CHC e NR. Destacam-se nos CHC os valores médios da DMV expressados pela imunomarcção do CD34, que foram maiores tanto na região central, quanto na região periférica, em relação aos valores médios da DMV expressados pela imunomarcção do CD105 (Tabela 3 e Gráfico 3). Em contraste, nos NR, a expressão de CD105 na região central (Grupo 7) foi difusa nos sinusóides hepáticos (Figura 4) com valor médio da DMV igual a  $17,6 \pm 7,4$ , significativamente maior que o valor médio da DMV  $7,5 \pm 4,3$  marcada pelo CD34 (Grupo 5).

**Tabela 3** – Análise descritiva e comparação da contagem entre grupos no geral.

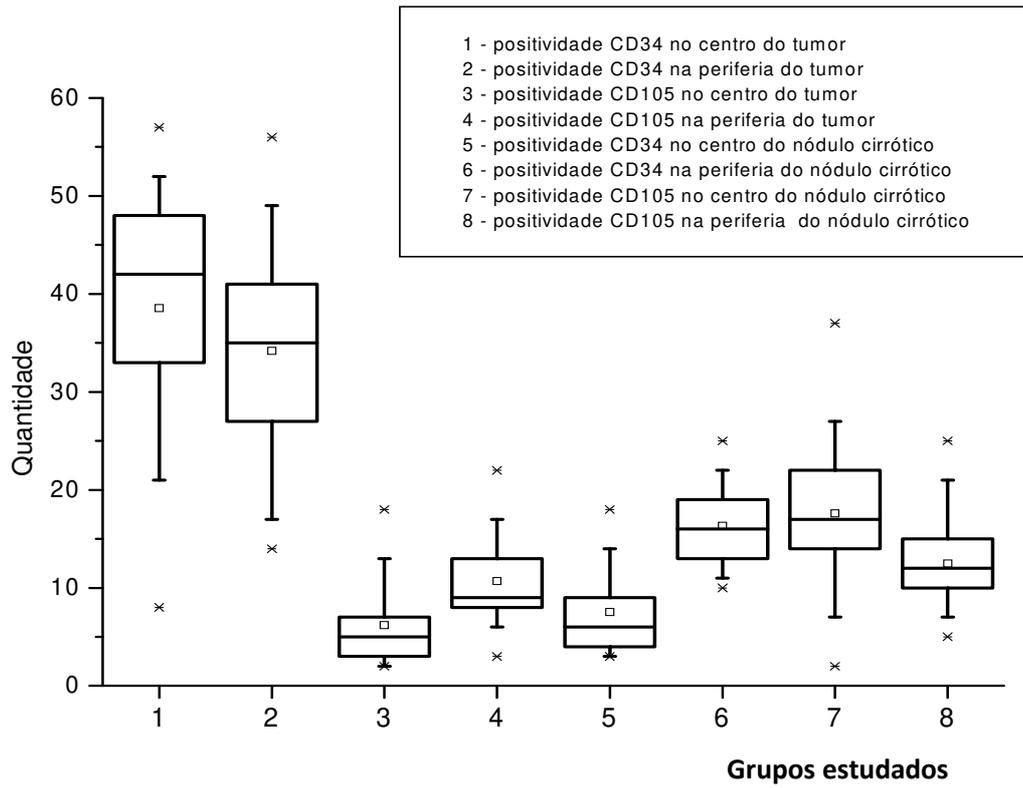
<b>Grupo</b>	<b>Variável</b>	<b>n</b>	<b>Média</b>	<b>DP</b>	<b>Mínimo</b>	<b>Mediana</b>	<b>Máximo</b>
1	CD34TC	44	38,5	12,6	8,0	41,5	57,0
2	CD34TP	44	34,2	11,2	14,0	34,5	56,0
3	CD34NCc	44	7,5	4,3	3,0	6,0	18,0
4	CD34NCp	44	16,3	4,3	10,0	16,0	25,0
5	CD105TC	44	6,2	4,1	2,0	5,0	18,0
6	CD105TP	44	10,7	4,4	3,0	9,0	22,0
7	CD105NCc	44	17,6	7,4	2,0	17,0	37,0
8	CD105NCp	44	12,5	4,9	5,0	11,5	25,0

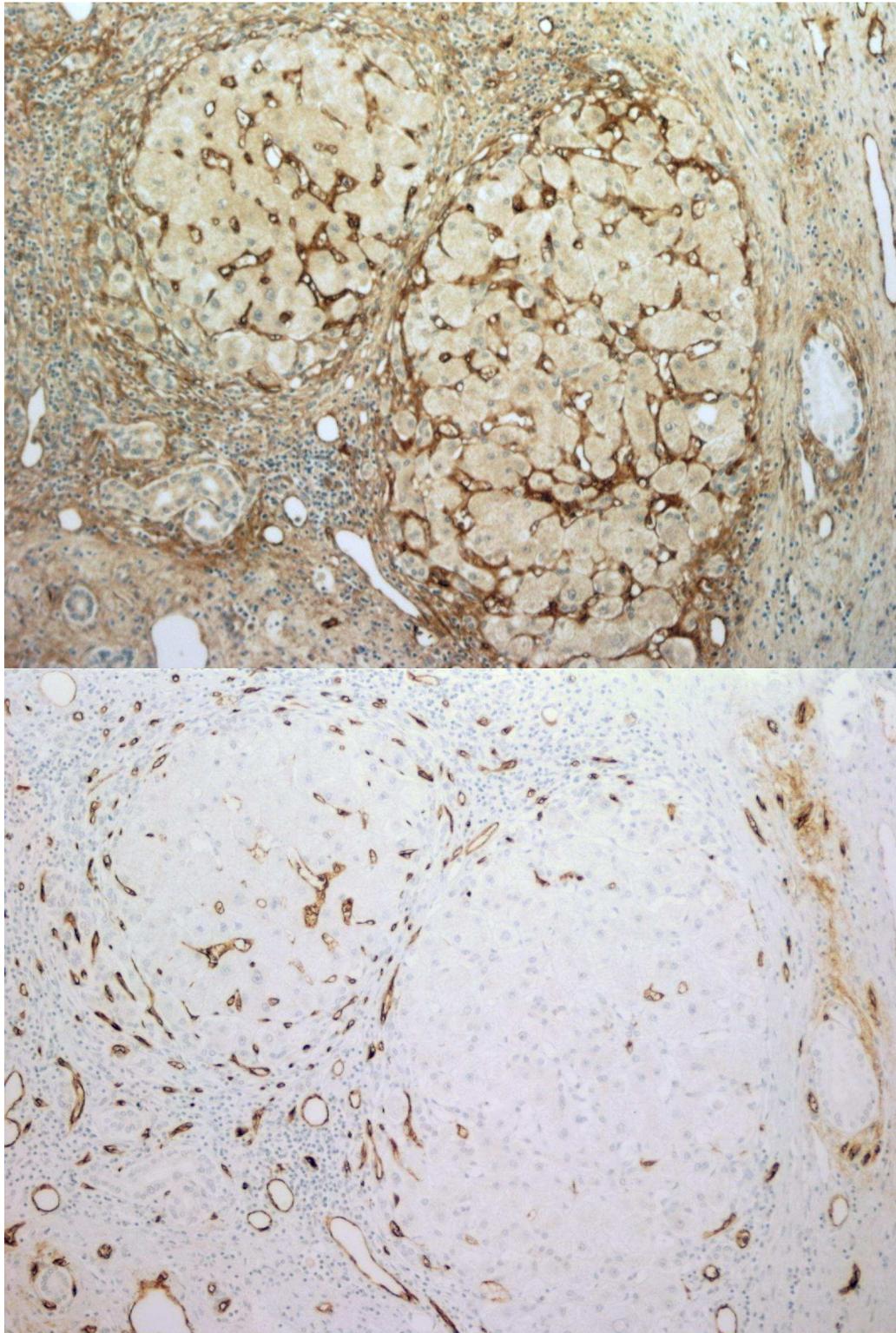
**Legenda:** TC – centro do tumor; TP – periferia do tumor; NCc – centro do nódulo cirrótico; NCp – periferia do nódulo cirrótico

Resultados da ANOVA para medidas repetidas com transformação por postos.

Efeito Grupo  
p valor <0.0001

**Gráfico 3:** Box-plot dos valores quantitativos dos marcadores imuno-histoquímicos CD34 e CD105 em cada grupo nos CHC (tumor) e NR (nódulos regenerativos ou cirróticos).





**Figura 4:** Imagens da mesma área em fígado cirrótico, comparando-se a imunoposição do CD105 em NR (acima) e do CD34 em NR (abaixo). 40x

#### 4.2.4 Análise quantitativa da comparação entre os anticorpos anti-CD34 e anti-CD105 nos nódulos displásicos (ND)

Em relação aos ND, houve diferença significativa entre os valores das médias da DMV nos ND de alto grau e ND de baixo grau, com  $p = 0,0019$ . Os valores médios da DMV pela imunomarcção dos anticorpos utilizados no estudo são maiores nas regiões periféricas, tanto dos ND de baixo grau (B), quanto nos ND de alto grau (A). Observam-se ainda valores médios da DMV maiores em todos os grupos estudados nos ND de alto grau (A) em comparação aos valores médios da DMV nos ND de baixo grau (Tabela 4 e Gráfico 4).

**Tabela 4** - Análise descritiva e comparação da contagem entre graus dos ND e grupos

Grau	Grupo	Variável	n	Média	DP	Mínimo	Mediana	Máximo
A	1	CD34CND	7	14,3	5,6	7,0	15,0	23,0
	2	CD34PND	7	22,7	7,0	17,0	22,0	37,0
	3	CD105CND	7	8,0	5,7	2,0	7,0	17,0
	4	CD105PND	7	15,0	4,4	8,0	15,0	21,0
B	1	CD34CND	8	9,9	4,3	6,0	8,5	18,0
	2	CD34PND	8	14,9	4,7	10,0	13,5	23,0
	3	CD105CND	8	6,6	5,2	2,0	3,5	15,0
	4	CD105PND	8	10,4	5,9	5,0	10,0	23,0

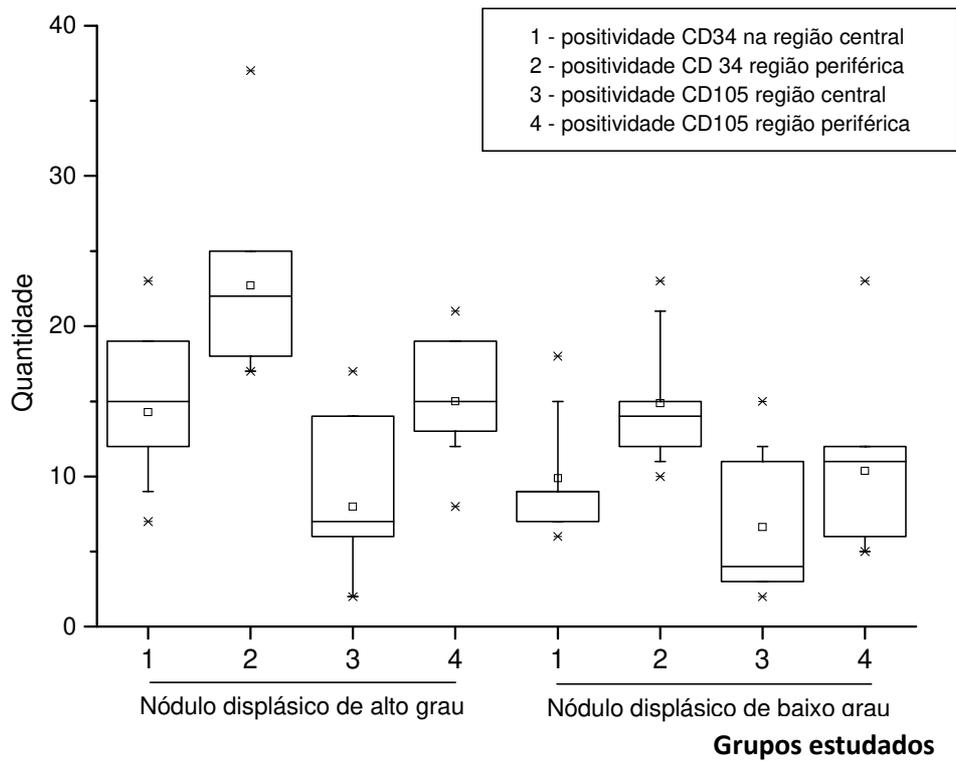
**Legenda:** CND – centro do nódulo displásico; PND – periferia do nódulo displásico

Resultados da ANOVA para medidas repetidas com transformação por postos.

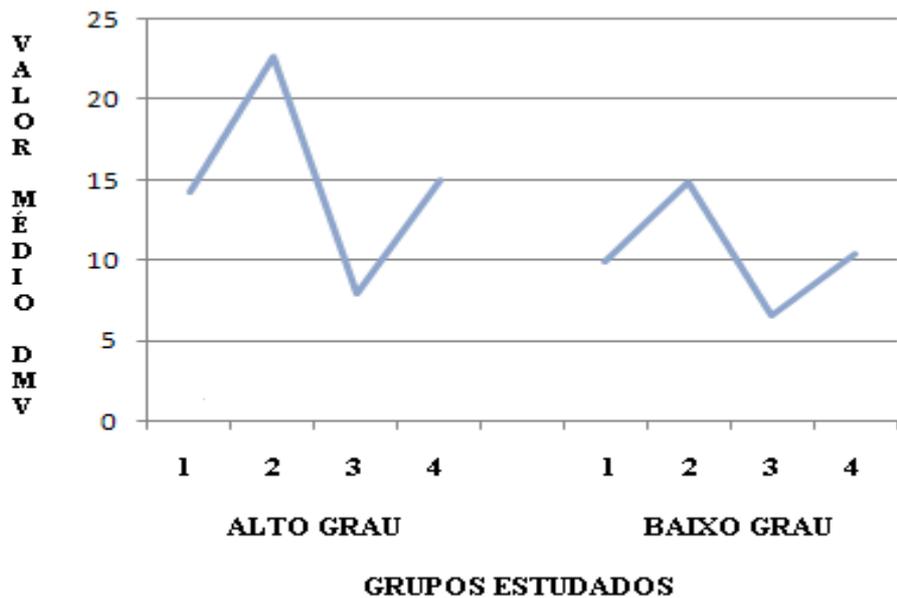
Efeito	p-valor
Grau	<b>0.0019</b>
Grupo	<b>&lt;0.0001</b>
Grau*grupo	0.5878

Entretanto, a análise da interação dos valores médios das DMV entre graus (A e B) e os respectivos grupos não demonstrou diferenças significativas, com  $p = 0,5878$ . Este fato pode ser visualizado na comparação entre os gráficos 4 e 5.

**Gráfico 4:** Box-plot da quantificação segundo o grau do ND e grupos



**Gráfico 5:** Comparação entre médias das DMV nos grupos dos ND de alto e baixo grau



**Legenda dos Gráficos 4 e 5:** Quadro acima



## *DISCUSSÃO*

## 4- DISCUSSÃO

Estudos patológicos recentes, baseados na análise cuidadosa de espécimes de fígados cirróticos, estabeleceram critérios de diagnóstico macro e microscópico para lesões pré-neoplásicas e CHC pequeno. Similarmente, estudos clínico-patológicos e avanços na biologia molecular ajudaram a entender algumas etapas da hepatocarcinogênese e provaram a evolução dos ND para CHC. Entretanto, as classificações de nódulos hepáticos continuam causando confusão nas interpretações diagnósticas no dia a dia do patologista, devido a critérios subjetivos.

Em quaisquer das classificações utilizadas atualmente, os critérios usados para distinção e comparação entre os nódulos pré-malignos hepáticos e os CHC precoces dependem de interpretações de cada examinador. Na classificação da IWP, por exemplo, são usados vários critérios subjetivos de avaliação morfológica, tais como hiper cromasia nuclear, irregularidades nos contornos nucleares, formações “pseudoglandulares” e basofilia citoplasmática. A utilização de critérios interpretativos pouco objetivos no diagnóstico de nódulos hepáticos pré-neoplásicos, pode influenciar no prognóstico e tratamento dos pacientes, bem como levar a falsas conclusões em estudos científicos. A pesquisa da angiogênese nestes nódulos pode criar novos critérios quantitativos para subclassificações, como padrões diferentes de densidade microvascular.

A preocupação em quantificar os resultados é uma preocupação antiga na patologia. Ainda no século XVII, alguns cientistas usavam grãos de areia e outros parâmetros para tentar mensurar estruturas microscópicas.<sup>59</sup> A partir do século passado foram desenvolvidos métodos de morfometria.<sup>60</sup> e alguns estudos recentes utilizam a dimensão fractal, uma forma de geometria não Euclidiana, para analisar a arquitetura vascular do CHC.<sup>61</sup>

Folkman (1971) foi um dos primeiros autores a desenvolver estudos sobre a angiogênese, propondo a participação do desenvolvimento da microcirculação no processo de crescimento tumoral e sugerindo técnicas de bloqueio desta neovascularização, como nova linha de terapêutica anti-neoplásica.<sup>62</sup> Assim, várias pesquisas tem sido realizadas para tentar

entender o papel da neovascularização no crescimento neoplásico, buscando fatores diagnósticos, prognósticos e terapêuticos.<sup>63,64,65</sup>

Algumas alterações vasculares podem ocorrer em estágios iniciais na hepatocarcinogênese. Alguns estudos correlacionam o surgimento e o aumento de artérias isoladas dentro de nódulos hepáticos como um indicador de processo neoplásico. Assim, o aumento de “arteriolização” pode sugerir uma progressão nas lesões pré-neoplásicas, facilitando o diagnóstico diferencial entre NR, ND e CHC.<sup>66,67</sup>

No CHC, ND e NR a neovascularização se faz através do processo de capilarização sinusoidal. Nos sinusóides de fígados normais não se observa a expressão significativa de marcadores endoteliais como o CD31 e CD34. Desta forma, a capilarização sinusoidal ocorre no fígado nos processos de injúria crônica e na evolução da hepatocarcinogênese<sup>68</sup>, com transformação fenotípica das células sinusoidais. As células sinusoidais que sofrem este processo de capilarização passam a expressar esses marcadores endoteliais.

Vários estudos têm demonstrado que marcadores endoteliais, em particular o CD34, são expressos difusamente nos microvasos do CHC e que seus níveis de expressão podem se correlacionar ao prognóstico dos pacientes. Poon *et al.* (2002) demonstraram, através de imuno-histoquímica pelo CD34, que a DMV de tumores que mediam até 5,0 cm de diâmetro foi um bom marcador de recorrência neoplásica após hepatectomia.<sup>69</sup>

Park *et al.*, estudando angiogênese em nódulos pré-neoplásicos hepáticos e carcinomas hepatocelulares, demonstraram o aumento da expressão imuno-histoquímica do CD34 na sequencia de nódulos regenerativos, displásicos e carcinomas hepatocelulares, devido à capilarização sinusoidal.<sup>57</sup> Como o CD34 é um marcador pan-endotelial, ou seja, marca tanto vasos em proliferação como também os pré-existentes, alguns autores tem preferido estudar a DMV de CHC com o auxílio do CD105, um marcador de neovascularização. Contudo, alguns resultados tem sido discrepantes e estas diferenças podem decorrer devido a diferentes métodos imuno-histoquímicos utilizados, fixação inadequada dos tecidos, diluições de anticorpos e experiência ou critérios de avaliação do patologista.

Yang *et al.* ao avaliarem, através de imuno-histoquímica, a imunomarcção de CD34 e CD105 em 113 casos de CHC, incluindo tecido hepático adjacente não tumoral, observaram forte positividade do CD105 na vascularização intra-tumoral e total ausência de imunomarcção no tecido adjacente não tumoral; o CD34 foi expresso tanto por células endoteliais do tecido hepático adjacente, como no tecido peri e intra-tumoral. A DMV do CD105 mostrou ser um indicador prognóstico relevante e independente de recorrência e metástases em CHC.<sup>70</sup>

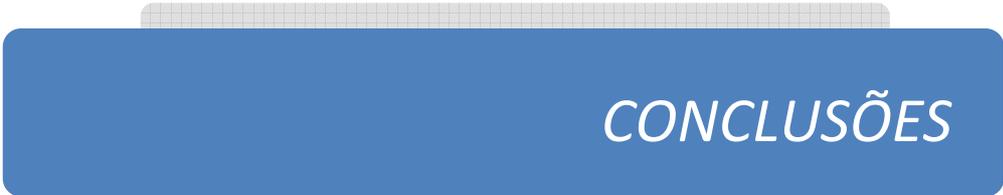
Yao *et al.* em estudo sobre a angiogênese em 105 pacientes, utilizando CD105, CD34 e VEGF, relatam a superioridade do CD105 em relação ao CD34 como marcador de neovascularização em carcinomas hepatocelulares, cuja DMV foi maior em tumores com tamanho igual ou superior a 5,0 cm.<sup>71</sup>

Em nosso estudo houve diferenças significativas na expressão do CD105 entre o CHC e NR, tanto na mensuração da DMV, quanto no padrão de marcação do anticorpo. O CD105 apresentou expressão sinusoidal predominantemente periférica nos CHC, com valores médios da DMV de  $6,2 \pm 4,1$  e  $10,7 \pm 4,4$  na região central e periférica, respectivamente. Nos NR observamos expressão difusa do CD105, com valores médios maiores da DMV na região central. Ho *et al.* obtiveram resultados semelhantes em estudo onde determinaram a DMV de 86 casos de CHC, bem como estudaram a vascularização do parênquima adjacente, através de imuno-histoquímica pela Endogлина (CD105). Os autores observaram baixos índices de DMV em “subset” de microvasos intra-tumorais, que se correlacionaram com maior frequência a tumores maiores e mais agressivos. Nas regiões adjacentes aos tumores, os autores observaram imunomarcção mais expressiva e difusa do CD105 em microvasos.<sup>72</sup>

Recentemente, Nakamura estudou a expressão do CD105 em 50 biópsias hepáticas adjacentes a CHC primário ou metástases de CHC. A expressão do CD105 foi negativa ou mínima na maioria das amostras de tecido peri-tumoral, com aumento significativo da Imunoexpressão deste marcador em amostras com hepatite crônica e cirrose.<sup>73</sup>

Nos ND, em nosso trabalho, o CD105 apresentou expressão sinusoidal predominantemente periférica, semelhante ao CHC, com DMV maior nos ND de alto grau.

Estes resultados indicam diferenças entre padrão de expressão e DMV do CD105 entre CHC e NR e entre CHC e ND, com resultados aparentemente análogos entre CHC e ND, principalmente de alto grau. Desta forma, o CD105 pode indicar um “subset” de microvasos na angiogênese dentro de etapas derradeiras na hepatocarcinogênese.



## *CONCLUSÕES*

## 5 CONCLUSÕES

- ✓ A expressão do CD34 nos nódulos regenerativos, nódulos displásicos e carcinoma hepatocelular, com índices angiogênicos progressivos, corrobora a importância do processo de capilarização sinusoidal na cirrose hepática e na evolução da hepatocarcinogênese a partir de nódulos pré-neoplásicos.
- ✓ A DMV através da imunomarcação com o CD34 foi significativamente maior em nódulos displásicos de alto grau e CHC quando comparada aos nódulos displásicos de baixo grau e nódulos regenerativos.
- ✓ A DMV através da imunomarcação pelo CD105 apresentou resultados qualitativos e quantitativos diferentes entre nódulos regenerativos e lesões pré-neoplásicas e neoplásicas, sugerindo ser o CD105 um marcador de neovascularização. Nos nódulos regenerativos houve expressão sinusoidal difusa, predominantemente central. Na evolução dos nódulos displásicos, e principalmente no CHC, se observou inversão da imunoexpressão deste anticorpo, com maior DMV periférica. Portanto, o CD105 pode ser um indicador de diferenciação diagnóstica entre nódulos regenerativos e CHC.
- ✓ Apesar de não se conseguir estabelecer um ponto de corte (“cut-off”) para os índices angiogênicos entre ND de baixo e alto grau, pelo pequeno número de casos, a média da DMV entre os ND de baixo grau foi sempre inferior a 15, com valor máximo de  $14,9 \pm 4,7$ .

## *REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

## 6- REFERÊNCIAS

1. Parkin DM. Global cancer statistics in the year 2000. *Lancet Oncol.* 2001 Sep;2(9):533-43.
2. Bosch FX, Ribes J, Díaz M, Cléries R. Primary liver cancer: worldwide incidence and trends. *Gastroenterology.* 2004;127(5 Suppl 1):S5-S16.
3. Instituto Nacional do Câncer. Estimativa 2008 – Incidência de Câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA; 2008.
4. Tsukuma H, Hiyama T, Tanaka S, Nakao M, Yabuuchi T, Kitamura et al. Risk factors for hepatocellular carcinoma among patients with chronic liver disease. *N Engl J Med.* 1993;328(25):1797-1801.
5. Heintges T, Wands JR. Hepatitis C virus: epidemiology and transmission. *Hepatology.* 1997 Sep;26(3):521-6.
6. Beasley RP, Hwang LY, Lin CC, Chien CS. Hepatocellular carcinoma and Hepatitis B virus: a prospective study of 22707 men in Taiwan. *Lancet.* 1981;2:1129-33.
7. Bruix J, Llovet JM. Hepatocellular carcinoma: is surveillance cost effective ? *Gut.* 2001 Feb; 48(2):149-50.
8. Anthony PP. Hepatocellular carcinoma: an overview. *Histopathology.* 2001;39(2):109-18.
9. Yu MC, Yuan JM. Environmental factors and risk for hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology.* 2004;127(5 Suppl 1):S72-8.
10. Brechot C, Pourcel C, Louise A. Presence of integrated hepatitis B virus DNA sequences in cellular DNA of human hepatocellular carcinoma. *Nature.* 1980;286:533-5.
11. Wang J, Chenivesse X, Henglein B, Bréchet C. Hepatitis B virus integration in a cyclin A gene in a hepatocellular carcinoma. *Nature.* 1990;343:555-7.
12. Chami M, Gozuacik D, Saigo K, Capiod T, Falson P, Lecoœur H et al. Hepatitis B virus related insertional mutagenesis implicates SERCA1 gene in the control of apoptosis. *Oncogene.* 2000;19:2877-86.
13. Feitelson MA, Duan LX. Hepatitis B virus X antigen in the pathogenesis of chronic infections and the development of hepatocellular carcinoma. *Am J Pathol.* 1997;150:1141-57.

14. Henkler F, Lopes AR, Jones M, Koshi R. Erk-independent partial activation of AP-1 sites by hepatitis B virus HBx protein. *J Gen Virol.* 1998;79:2737-42.
15. Pinhal MAS, Ugolini MR, Santos JPM, Taniguti LS. O papel da proteína HBx no desenvolvimento do hepatocarcinoma celular. *Arq Med ABC.* 2007;32(1):38-47.
16. Wang XW, Forrester K, Yeh H, Feitelson MA, Gu JR, Harris CC. Hepatitis B virus X protein inhibits p53 sequence-specific DNA binding, transcriptional activity, and association with transcription factor ERCC3. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1994;91:2230-4.
17. Becker AS, Lee TH, Butel JS, Slogle BL. Hepatitis virus X protein interferes with cellular DNA repair. *J Virol.* 1998;72(1):266-72.
18. Zhang X, Zhang H, Ye L. Effects of hepatitis B virus X protein on the development of liver cancer. *J Lab Clin Med.* 2006; 147(2): 58-66.
19. Nita ME, Alves VAF, Carrilho FJ, Ono-Nita SK, Mello ES, Gama-Rodrigues JJ. Molecular aspects of hepatic carcinogenesis. *Rev Inst Med Trop.* 2002;44(1):39-48.
20. Ghosh AK, Steele R, Meyer K, Ray R, Ray RB. Hepatitis C virus NS5A protein modulates cell cycle regulatory genes and promotes cell growth. *J Gen Virol.* 1999;80:1179-83.
21. Kwun HJ, Jung EY, Ahn JY, Lee MN, Jang KL. p53-dependent transcriptional repression of p21(waf1) by hepatitis C virus NS3. *J Gen Virol.* 2001;82:2235-41.
22. Smela ME, Currier SS, Bailey EA, Essigmann JM. The chemistry and biology of aflatoxin B(1): from mutational spectrometry to carcinogenesis. *Carcinogenesis.* 2001;22:535-45.
23. Shen HM, Ong CN. Mutations of the p53 tumor suppressor gene and ras oncogenes in aflatoxin hepatocarcinogenesis. *Mutat Res.* 1996;366:23-44.
24. Pang RW, Joh JW, Johnson PJ, Monden M, Pawlik TM, Poon RT. Biology of Hepatocellular carcinoma. *Ann Surg Oncol.* 2008;15(4):962-71.
25. Villanueva A, Newell P, Chiang DY, Friedman SL, Llovet JM. Genomics and signaling pathways in hepatocellular carcinoma. *Semin Liver Dis.* 2007;27(1):55-76.
26. Paradis V, Laurendeau I, Vidaud M, Bedossa P. Clonal analysis of macronodules in cirrhosis. *Hepatology.* 1998;28(4):953-8.
27. Eggel H. Ueber das primäre carcinoma der leber. *Beitr Pathol Anat.* 1901;30:506-604.

28. Edmondson H, Steiner P. Primary carcinoma of the liver: a study of 100 cases among 48900 necropsies. *Cancer*. 1954;1:462-503.
29. International Working Party. Terminology of nodular hepatocellular lesions. *Hepatology*. 1995;22(3):983-93.
30. Hytioglou P, Park YN, Krinsky G, Theise ND. Hepatic Precancerous lesions and Small Hepatocellular Carcinoma. *Gastroenterol Clin N Am*. 2007;36:867-87.
31. International Consensus Group for Hepatocellular Neoplasia. Pathologic Diagnosis of Early Hepatocellular Carcinoma: A Report of the International Consensus Group for Hepatocellular Neoplasia. *Hepatology*. 2009;49(2):658-64.
32. Makino Y, Shiraki K, Sugimoto K. Histological features of cirrhosis with hepatitis C virus for prediction of hepatocellular carcinoma development: a prospective study. *Anticancer Res*. 2000;20(5C):3709-15.
33. Libbrecht L, Craninx M, Nevens F. Predictive value of liver cell dysplasia for development of hepatocellular carcinoma in patients with noncirrhotic and cirrhotic chronic viral hepatitis. *Histopathology*. 2001;39(1):66-73.
34. Watanabe S, Okita K, Harada T, Kodama T, Numa Y, Takemoto T, et al. Morphologic studies of the liver cell dysplasia. *Cancer*. 1983;51:2197-205.
35. Lee RG, Tsamandas AC, Demetris AJ. Large cell change (liver cell dysplasia) and hepatocellular carcinoma in cirrhosis: matched case-control study, pathological analysis, and pathogenetic hypothesis. *Hepatology*. 1997;26(6):1415-22.
36. Hytioglou P. Morphological changes of early human hepatocarcinogenesis. *Semin Liver Dis*. 2004;24(1):65-75.
37. Theise ND, Park YN, Kogiro M. Dysplastic nodules and hepatocarcinogenesis. *Clin Liver Dis*. 2002;6(2):497-512.
38. Wada K, Kondo F, Kondo Y. Large regenerative nodules and dysplastic nodules in cirrhotic livers: a histopathology study. *Hepatology*. 1988;8(6):1684-8.
39. Sakamoto M, Hirohashi S, Shimosato Y. Early stages of multistep hepatocarcinogenesis: adenomatous hyperplasia and early hepatocellular carcinoma. *Hum Pathol*. 1991;22(2):172-8.

40. Kojiro M, Roskans T. Early hepatocellular carcinoma and dysplastic nodules. *Semin Liver Dis.* 2005; 25(2): 133-42.
41. Kojiro M, Nakashima O. Histopathologic evaluation of hepatocellular carcinoma with special reference to small early stage tumors. *Semin Liver Dis.* 1999;19(3):287-96.
42. Nakashima O, Sugihara S, Kage M. Pathomorphologic characteristics of small hepatocellular carcinoma: a special reference to small hepatocellular carcinoma with indistinct margins. *Hepatology.* 1995;22(1):101-5.
43. Kumar V, Abbas AK, Fausto N. In: *Tecido de Renovação e Reparação: Regeneração, Cicatrização e Fibrose. Robbins & Cotran Bases Patológicas das Doenças. 7ª edição. Elsevier;2005*
44. Wang L, Shi GG, Yao JC, Gong W, Wei D, Wu TT et al. Expression of endothelial nitric oxide synthase correlates with the angiogenic phenotype of and predicts poor prognosis in human gastric cancer. *Gastric Cancer.*2005;8(1):18-28.
45. El-Assal ON, Yamanoi A; Soda Y, Yamaguchi M, Igarashi M, Yamamoto A et al. Clinical significance of microvessel density and vascular endothelial growth factor expression in hepatocellular carcinoma and surrounding liver: possible involvement of vascular endothelial growth factor in the angiogenesis of cirrhotic liver. *Hepatology.*1998;27:1554-62.
46. Folkman J, Shing Y. Angiogenesis. *J Biol Chem.* 1992. Jun 5;267(16):10931-4.
47. Folkman J. What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent? *J Natl Cancer Inst.* 1990;82:4-6.
48. Folkman J. Role of angiogenesis in tumor growth and metastasis. *Semin Oncol.* 2002;29:6 (Suppl 16):15-18.
49. Molgaard HV, Spurr NK, Greaves MF. The hemopoietic stem cell antigen CD34 is encoded by a gene located on chromosome 1. *Leukemia.* 1989;3:773-6.
50. Duff SE, Li C, Garland JM, Kumar S. CD105 is important for angiogenesis: evidence and potential applications. *FASEB J.* 2003;17(9):984-92.
51. Yang LY, Lu WQ, Huang GW, Wang W. Correlation between CD105 expression and postoperative recurrence and metastasis of hepatocellular carcinoma. *Cancer.* 2006;6:110-121

52. Sharma S, Sharma MC, Sarkar C. Morphology of angiogenesis in human cancer: a conceptual overview, histoprognotic perspective and significance of neoangiogenesis. *Histopathology*. 2005; 46:481-89.
53. Vermeulen PB, Gasparini G, Fox SB, Colpaert C, Marson LP, Gion M et al. Second international consensus on the methodology and criteria of evaluation of angiogenesis quantification in solid human tumours. *Eur J Cancer*. 2002;38(12):1564-79.
54. Semela D, Dufour JF. Angiogenesis and hepatocellular carcinoma. *J Hepatol*. 2004;41:864-80.
55. Deli G, Jin CH, Mu R, Yang S, Liang Y, Chen D et al. Immunohistochemical assessment of angiogenesis in hepatocellular carcinoma and surrounding cirrhotic liver tissues. *World J Gastroenterol*. 2005;11:960-63.
56. Kin M, Torimura T, Ueno T, Inuzuka S, Tanikawa K. Sinusoidal capillarization in small hepatocellular carcinoma. *Pathol Int*. 1994;44:771-78.
57. Park YN, Yang CP, Fernandez GJ, Cubukcu O, Thung S, Theise ND. Neoangiogenesis and sinusoidal "capillarization" in dysplastic nodules of the liver. *Am J Surg Pathol*. 1998;22(6):656-62.
58. Montgomery, DC. Design and analysis of experiments. New York: John Wiley & Sons; 1991.
59. Meijer GA, Beliën JA, van Diest PJ, Baak JP. Origins of image analysis in clinical pathology. *J Clin Pathol*. 1997;50:65-70.
60. Mariuzzi GM, Collan YUI. Some reflections on the history, and presence of quantitative pathology. *Pathologica*. 1995;87:215-20.
61. Grizzi F, Franceschini B, Fiamengo B, Russo C, Dioguardi N. Vascular architecture: is it a helpful histopathological biomarker for hepatocellular carcinoma? *J Zhejiang Univ Sci B*. 2007; 8(4): 217-20.
62. Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med*. 1971 18;285(21): 1182-6.
63. Folkman J. Tumor angiogenesis. *Adv Cancer Res*. 1985;43:175-203.
64. Hlatky L, Hahnfeldt P, Folkman J. Clinical application of antiangiogenic therapy: microvessel density, what it does and doesn't tell us. *J Natl Cancer Inst*. 2002;94: 883-93.

65. Tanigawa N, Lu C, Mitsui T, Miura S. Quantitation of sinusoid-like vessels in hepatocellular carcinoma: its clinical and prognostic significance. *Hepatology*. 1997;26:1216-23.
66. Park YN, Kim YB, Yang KM, Park C. Increased expression of vascular endothelial growth factor and angiogenesis in the early stage of multistep hepatocarcinogenesis. *Arch Pathol lab Med*. 2000;124(7):1061-65.
67. Nascimento C, Bottino A, Nogueira C, Pannain V. Analysis of morphological variables and arterializations in the differential diagnosis of hepatic nodules in explanted cirrhotic livers. *Diagn Pathol*. 2007 Dec 21;2:51
68. Di Carlo I, Fraggetta F, Lombardo R, Azzarello G, Vasquez E, Puleo S. CD34 expression in chronic and neoplastic liver diseases. *Panminerva Med*. 2002;44(4):365-7.
69. Poon RT, Ng IO, Lau C, Yu Wc, Yang ZF, Fan STJ et al. Tumor microvessel density as a predictor of recurrence after resection of hepatocellular carcinoma: a prospective study. *J Clin Oncol*. 2002;20:775-85.
70. Yang L, Lu W, Huang G, Wang W. Correlation between CD105 expression and postoperative recurrence and metastasis of hepatocellular carcinoma. *BMC Cancer*. 2006;6:110.
71. Yao Y, Pan Y, Chen J, Sun X, Qiu Y, Ding Y. Endoglin (CD105) expression in angiogenesis of primary hepatocellular carcinomas: analysis using tissue microarrays and comparisons with CD34 and VEGF. *Ann Clin Lab Sci*. 2007;37(1):39-48.
72. Ho JW, Poon RT, Sun CK, Xue WC, Fan ST. Clinicopathological and prognostic implications of endoglin (CD105) expression in hepatocellular carcinoma and its adjacent non-tumorous liver. *World J Gastroenterol*. 2005;11(2):176-181.
73. Nakamura T. Changes in expression of bile canalicular CD10 and sinusoidal CD105 (endoglin) in peri-tumoral hepatic tissue. *Tumori*. 2009;95(4):495-500.



## *APÊNDICES*

<b>Caso</b>	<b>Fator etiológico</b>	<b>Idade</b>	<b>Tamanho CHC</b>	<b>Grau</b>	<b>Peso fígado</b>
1	VHC	32	1,5	2	770,0
2	VHC	55	3,0	2	1150,0
3	VHC + Álcool	58	2,3	3	1240,0
4	VHB	50	2,6	2	1380,0
5	VHC	53	0,8	1	1095,0
6	VHC	55	3,5	2	740,0
7	VHC	62	2,4	2	2590,0
8	Auto-imune	16	1,2	1	900,0
9	Álcool	36	1,3	2	1180,0
10	Álcool	54	1,5	2	1765,0
11	VHC	43	1,6	2	1715,0
12	VHC	48	2,5	2	1020,0
13	VHB	53	2,0	2	1375,0
14	VHC	52	2,1	2	755,0
15	Auto-imune	46	1,0	2	1710,0
16	VHC	43	1,0	2	950,0
17	Álcool	63	2,1	2	1040,0
18	VHC	65	1,7	2	1220,0
19	VHC + Álcool	44	2,0	2	1455,0
20	Álcool	54	2,5	2	960,0
21	VHC	54	2,5	2	645,0
22	VHC	41	0,8	1	1160,0
23	VHC	30	2,0	2	1220,0
24	VHB	58	1,8	2	840,0
25	Álcool	58	1,0	2	1000,0
26	VHC	60	2,5	2	640,0
27	Criptogênica	50	1,2	2	700,0
28	VHB	50	1,0	2	1000,0
29	VHC	59	1,5	2	680,0
30	VHC	65	2,0	2	700,0
31	VHC + Álcool	64	3,5	2	930,0
32	VHC	53	1,5	2	955,0

33	VHC	46	0,8	2	1070,0
34	VHC	48	2,5	2	900,0
35	VHC	57	2,0	2	1120,0
36	VHC	65	4,0	2	945,0
37	VHC	60	5,5	3	890,0
38	VHC	64	5,5	2	750,0
39	Álcool	60	3,0	2	1320,0
40	VHB	50	2,5	2	550,0
41	Criptogénica	58	2,5	2	860,0
42	Hemocromatose	62	1,8	1	645,0
43	VHC	70	4,5	2	700,0
44	VHC	54	1,2	2	1125,0