



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS

VANDERLEI SEGATELLI

**Avaliação da expressão de biomarcadores relacionados à
hepatocarcinogênese em fígados cirróticos e não cirróticos, com
estudo imuno-histoquímico.**

Campinas

2017

VANDERLEI SEGATELLI

**Avaliação da expressão de biomarcadores relacionados à
hepatocarcinogênese em fígados cirróticos e não cirróticos, com
estudo imuno-histoquímico.**

*Tese apresentada à Faculdade de Ciências Médicas da
Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos
exigidos para a obtenção do título de Doutor em Ciências
Médicas, Área de Concentração Anatomia Patológica.*

ORIENTADORA:

Professora Doutora CECILIA AMÉLIA FAZZIO ESCANHOELA

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL
DA TESE DEFENDIDA PELO ALUNO VANDERLEI
SEGATELLI, E ORIENTADO PELA PROF. DRA.
CECILIA AMÉLIA FAZZIO ESCANHOELA.

Campinas

2017

Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s): Não se aplica.

ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-5588-8508>

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas
Ana Paula de Moraes e Oliveira - CRB 8/8985

Se37a Segatelli, Vanderlei, 1971-
Avaliação da expressão de biomarcadores relacionados à hepatocarcinogênese em fígados cirróticos e não cirróticos, com estudo imuno-histoquímico / Vanderlei Segatelli. – Campinas, SP : [s.n.], 2017.

Orientador: Cecília Amélia Fazzio Escanhoela.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Carcinoma hepatocelular. 2. Imuno-histoquímica. 3. Cirrose hepática. I. Escanhoela, Cecília Amélia Fazzio, 1958-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Evaluation of the expression of biomarkers related to hepatocarcinogenesis in cirrhotic and non-cirrhotic livers, with immunohistochemical study

Palavras-chave em inglês:

Hepatocellular carcinoma

Immunohistochemistry

Liver cirrhosis

Área de concentração: Anatomia Patológica

Titulação: Doutor em Ciências Médicas

Banca examinadora:

Cecília Amélia Fazzio Escanhoela [Orientador]

Raquel Silveira Bello Stucchi

Rita de Cassia Martins Alves da Silva

Liliana Aparecida Lucci de Angelo Andrade

Fabricio Passador-Santos

Data de defesa: 31-08-2017

Programa de Pós-Graduação: Ciências Médicas

BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE DOUTORADO

VANDERLEI SEGATELLI

Orientadora: PROFA. DRA. CECILIA AMÉLIA FAZZIO ESCANHOELA

MEMBROS:

- 1. PROFA. DRA. CECILIA AMÉLIA FAZZIO ESCANHOELA**
 - 2. PROFA. DRA. RAQUEL SILVEIRA BELLO STUCCHI**
 - 3. PROF. DR. FABRICIO PASSADOR-SANTOS**
 - 4. PROFA. DRA. RITA DE CASSIA MARTINS ALVES DA SILVA**
 - 5. PROFA. DRA. LILIANA APARECIDA LUCCI DE ANGELO ANDRADE**
-

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

A ata de defesa com as respectivas assinaturas dos membros da banca examinadora encontra-se no processo de vida acadêmica do aluno.

Data da defesa: 31 de agosto de 2017

DEDICATÓRIA

À minha família,

À minha esposa Ebe, meu amor e minha companheira, meu exemplo de amor pela vida.

Aos meus filhos Sophie e Matteo, minha inspiração e minha força para continuar a cada dia.

Vocês me fazem agradecer a Deus por cada minuto do milagre da vida.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

À minha orientadora Cecília,

Pela amizade, pela paciência e incansável incentivo, que tornaram possível a conclusão desta tese.

AGRADECIMENTOS

A todos os funcionários do Departamento de Anatomia Patológica da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, com especial menção à Ana Cláudia Sparapani Piazza e Arethusa Souza, do setor de imuno-histoquímica, pela contribuição técnica e à Maria do Carmo, da secretaria, pela paciência e apoio, sempre com carinho e bom humor.

Aos amigos e colaboradores do setor de imuno-histoquímica do Hospital Israelita Albert Einstein: Cris, Renata, Carol e Marcel.

À aluna de graduação da Faculdade de Medicina da UNICAMP e iniciação científica Luiza P. Leal, pela colaboração na coleta de dados clínicos dos casos.

À Dra. Cleide Aparecida Moreira Silva, do Departamento de Estatística da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, pelo apoio fundamental nas análises estatísticas.

Lembrete

Se procurar bem você acaba encontrando.

Não a explicação (duvidosa) da vida,

Mas a poesia (inexplicável) da vida.

Carlos Drummond de Andrade

RESUMO

Introdução: O carcinoma hepatocelular (CHC) é uma neoplasia complexa e heterogênea, comumente associada com doenças hepáticas crônicas e o desenvolvimento de cirrose. A hepatocarcinogênese é multifatorial e ocorre em múltiplas etapas, envolvendo fatores genéticos, epigenéticos e ambientais. A pesquisa de diferenças nos padrões de imunoexpressão de biomarcadores associados à hepatocarcinogênese entre carcinomas hepatocelulares que se originaram em fígados cirróticos e sem cirrose ainda é escassa na literatura mundial.

Objetivos: Avaliação de marcadores biológicos relacionados à hepatocarcinogênese, através de estudo imuno-histoquímico, em carcinomas hepatocelulares originados em fígados cirróticos e não cirróticos. **Materiais e**

métodos: Selecionados blocos de parafina contendo amostras de 25 casos de pacientes com CHC em fígados cirróticos de transplantes hepáticos (grupo A) e 25 casos de pacientes com carcinoma hepatocelular em fígados sem cirrose, diagnosticados em produtos de hepatectomias parciais ou nodulectomias (grupo B), independentemente do fator etiológico, sexo, cor, idade ou grupo étnico. A relação entre as variáveis clínicas e os marcadores imuno-histoquímicos (CK7, CK19, p53, p16, C-MET, beta-catenina, HSP-70, glutamina sintetase, glipican-3 e C-MYC) foi avaliada através dos testes Qui-Quadrado, Fisher ou Mann-Whitney, considerando-se $p < 0,05$ estatisticamente significativa. **Resultados:** O grupo B apresentou maior variação no tamanho neoplásico, maior associação com fatores de síndrome metabólica e maior imunoexpressão de glutamina-sintetase, em relação ao grupo A.

Conclusão: A imunoexpressão aumentada da glutamina-sintetase no grupo B pode estar associada com alterações vasculares e/ou alterações metabólicas. A glutamina sintetase pode ser um útil biomarcador nos CHC em “background” de síndrome metabólica.

Palavras-chave: Carcinoma hepatocelular; Imuno-histoquímica; Cirrose hepática.

ABSTRACT

Introduction: Hepatocellular carcinoma (HCC) is a complex and heterogenous malignancy, commonly associated with chronic liver disease and the development of cirrhosis. Hepatocarcinogenesis is multifactorial and occurs in multiple stages, involving genetic, epigenetic and environmental factors. Research into the differences in patterns of biomarker immunoexpression associated with hepatocarcinogenesis among hepatocellular carcinomas that originated in cirrhotic livers and non-cirrhotic livers is still scarce in the world literature. **Aims:** Evaluation of biological markers related to hepatocarcinogenesis in hepatocellular carcinomas originated in cirrhotic and non-cirrhotic livers using immunohistochemical study. **Materials and methods:** Paraffin blocks containing samples of 25 patients with HCC in cirrhotic livers from liver transplantations (group A) and 25 patients with hepatocellular carcinoma in noncirrhotic livers were selected. Patient diagnosis was made on products (resection specimens) of partial hepatectomy or nodulectomy (group B), irrespective of etiologic factor, gender, color, age or ethnic group. The relationship between clinical variables and immunohistochemical markers (CK7, CK19, p53, p16, C-MET, beta-catenin, HSP-70, glutamine synthetase, glypican-3 and C-MYC) was evaluated by the chi-square, Fisher's or Mann-Whitney tests, considering $p < 0.05$ statistically significant. **Results:** Group B showed greater variation in neoplastic size, greater association with metabolic syndrome factors and greater glutamine-synthetase immunoexpression in relation to group A. **Conclusion:** The increased immunoexpression of glutamine synthetase in group B may be associated with changes vascular and / or metabolic. Glutamine synthetase may be a useful biomarker in CHC in the background of metabolic syndrome.

Key words: Hepatocellular carcinoma; Immunohistochemistry; Liver cirrhosis.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<i>Figuras</i>	<i>Página</i>
Figura 1. Incidência estimada de câncer do fígado em 2012 (homens)	16
Figura 2. Mortalidade estimada de câncer do fígado 2012 (homens)	16
Figura 3. Graduação histológica de CHC (Edmondson-Steiner)	19
Figura 4. Sinalização molecular da beta-catenina	23
Figura 5. Padrões de imunexpressão da beta-catenina	24
Figura 6. Imunexpressão da glutamina-sintetase em fígado normal	26
Figura 7. Exemplos de imunexpressão de marcadores em TMAs	33
Figura 8. Imagem de TMA com imunexpressão positiva para p53	34
Figura 9. Avaliação da imunexpressão da glutamina-sintetase	35
Figura 10. Imagem de TMA do grupo B	38

<i>Gráficos</i>	<i>Página</i>
Gráfico 1. Incidência / mortalidade de câncer hepático (sexos)	17
Gráfico 2. Comparação do tamanho tumoral entre os grupos A e B	37
Gráfico 3. Imunexpressão da glutamina-sintetase entre grupos A e B	39
Gráfico 4. Imunexpressão dos biomarcadores GS, GPC3 e HSP70	39
Gráfico 5. Imunexpressão dos marcadores entre grupos A e B	40

LISTA DE TABELAS

<i>Tabelas</i>	<i>Página</i>
Tabela 1. Relação dos anticorpos utilizados no estudo	32
Tabela 2. Características clínicas e morfológicas dos grupos A e B	37

LISTA DE ABREVIATURAS

CHC: Carcinoma Hepatocelular

VHB: Vírus da Hepatite B

VHC: Vírus da Hepatite C

INCA: Instituto Nacional do Câncer

NS: Serino-Proteases

HGF: *Hepatocyte growth factor* (Fator de crescimento hepatocitário)

AMP: Adenosina Monofosfato

ATP: Adenosina Trifosfato

HSP: *Heat Shock Proteins*

GPC3: Glipican-3

GS: Glutamina-Sintetase

BC: Beta-Catenina

CK: Citoqueratina

DHGNA: Doença Hepática Gordurosa Não Alcoólica

EHNA / NASH: Esteato-Hepatite Não-Alcoólica (Nonalcoholic Steatohepatitis)

TMA: *Tissue Microarrays*

TACE: *Transcatheter Arterial Chemoembolization* (Quimioembolização transarterial)

SUMÁRIO

	<i>Página</i>
1. INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA	15
1.1 Carcinoma Hepatocelular: Aspectos epidemiológicos	15
1.2 Carcinoma Hepatocelular: Aspectos morfológicos	18
1.3 Carcinoma Hepatocelular: Carcinogênese	20
2. OBJETIVOS	29
3. METODOLOGIA	30
3.1 Desenho do estudo e casuística	30
3.2 Critérios de inclusão	30
3.3 Critérios de exclusão	30
3.4 Materiais e métodos	31
3.5 Análise estatística	35
4. RESULTADOS	36
5. DISCUSSÃO	41
6. CONCLUSÕES	44
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	45
8. APÊNDICES	53
9. ANEXOS	57

1. Introdução e Revisão da Literatura

1.1. Carcinoma Hepatocelular: Aspectos epidemiológicos

O carcinoma hepatocelular (CHC) é o tipo histológico mais frequente entre as neoplasias malignas primárias do fígado, sendo o quinto tipo de câncer mais comum e a segunda causa de morte por câncer relatado em todo o mundo. As regiões de alta incidência no mundo são a Ásia oriental, Sudeste asiático e África subsaariana. As taxas intermediárias predominam no Sul da Europa e na América do Norte, sendo que as mais baixas taxas de incidência ocorrem no Norte da Europa e no Sul da Ásia Central. O prognóstico para o câncer hepático é muito pobre, com razão geral de mortalidade para incidência de 0,95, e assim, os padrões geográficos de incidência e mortalidade são semelhantes (Figuras 1 e 2). Mundialmente, há maior incidência de CHC em homens, com relação entre homens e mulheres até cerca de 3:1 em algumas regiões (Gráfico 1). As variações de incidência de CHC dependem de fatores ambientais e sócio-econômicos, diretamente relacionados à exposição a fatores de risco que causam doença hepática crônica e ativação de diferentes vias de mecanismos moleculares (genéticos e epigenéticos) associadas à carcinogênese hepática. Por exemplo, nos países da África subsaariana e sudeste da Ásia observam-se altos índices de infecção pelo vírus da hepatite B (VHB) e contaminação por toxinas alimentares, sendo que na maioria do mundo ocidental prevalece a infecção pelo vírus da hepatite C (VHC) (1,2,3,4).

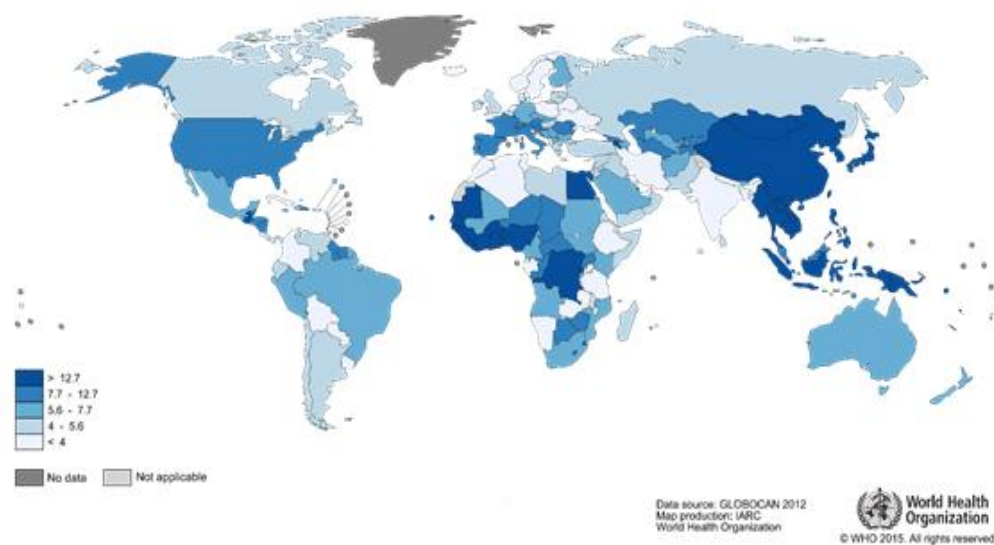


Figura 1. Incidência estimada de câncer do fígado em 2012 (homens). Taxas por 100.000 habitantes.

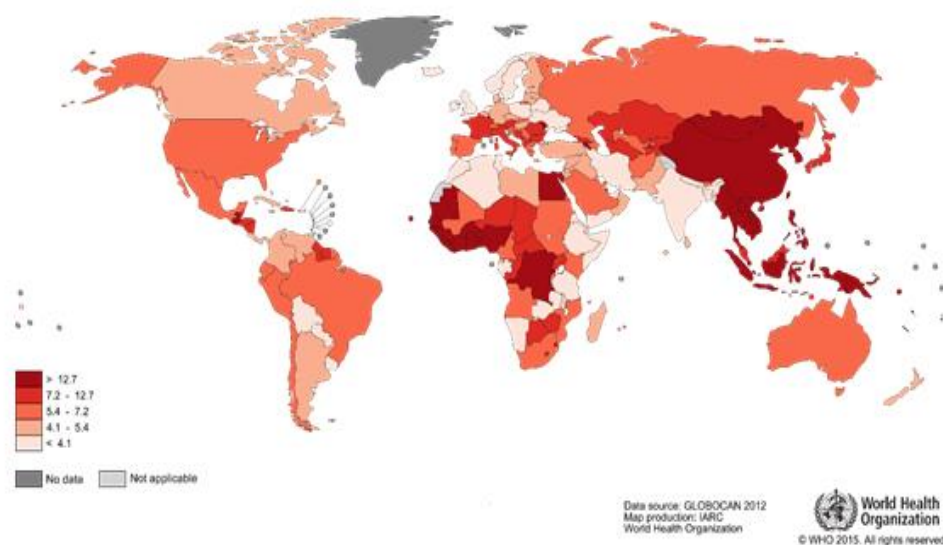


Figura 2. Mortalidade estimada de câncer do fígado 2012 (homens). Taxas por 100.000 habitantes.

O Brasil é considerado, em estudos epidemiológicos nacionais e internacionais, como país de grupo intermediário de prevalência de CHC e, segundo dados nacionais do Instituto Nacional do Câncer (INCA), o CHC ainda não se configura entre as dez neoplasias mais frequentes. No Brasil, a infecção pelo vírus

da hepatite C predomina nos casos de hepatites crônicas com desenvolvimento de cirrose e, conseqüentemente, é o fator etiológico mais associado ao desenvolvimento de CHC no sul e sudeste do país. A infecção pelo vírus da hepatite B predomina em algumas regiões do norte e nordeste do Brasil (5,6,7,8,9).

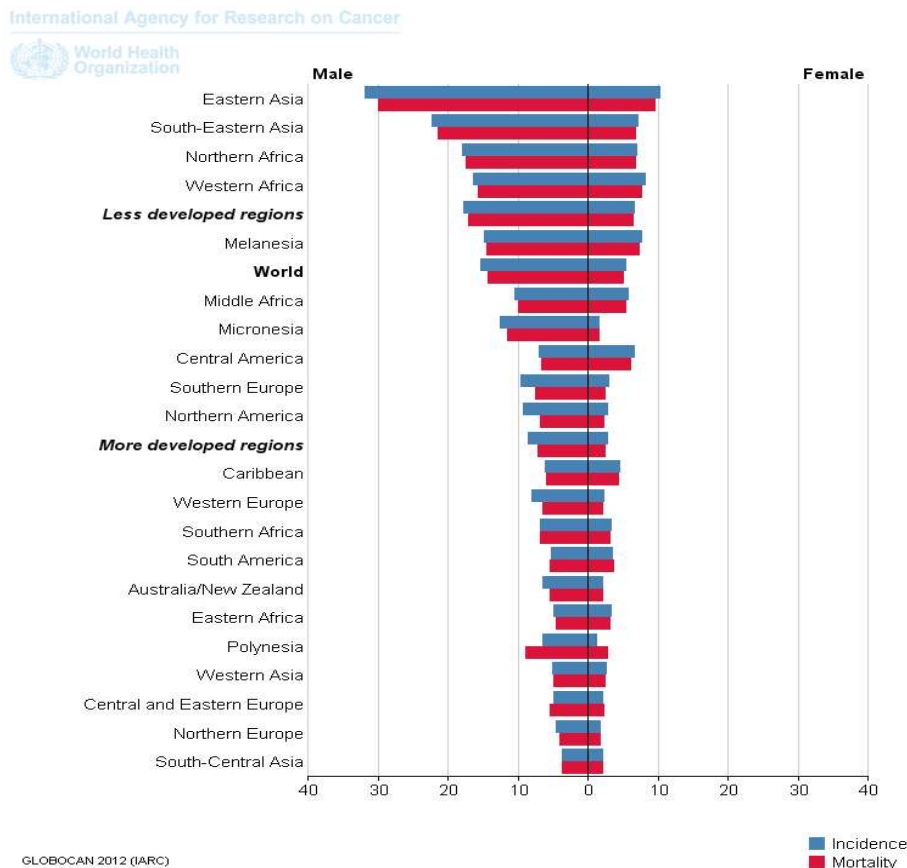


Gráfico 1. Relação entre incidência / mortalidade de câncer hepático, estimada entre homens e mulheres (2012).

O controle das infecções do vírus C e B, os avanços científicos no seguimento de pacientes com hepatopatias crônicas e cirrose, além de novos planejamentos terapêuticos clínicos e cirúrgicos contribuíram para a diminuição da mortalidade do CHC nos últimos anos, principalmente em países do sul da Europa e Ásia oriental. Entretanto, estudos recentes indicam taxas de incidência e mortalidade crescentes em países do norte da Europa, América do Norte e do Sul. Esses estudos refletem consequências de epidemias no mundo ocidental, principalmente de vírus C, nas décadas de 60 e 80, além de novas tendências epidemiológicas

desfavoráveis com o surgimento de novos fatores de risco, como o aumento do consumo de álcool e o aumento de sobrepeso e obesidade na população (10,11).

1.2. Carcinoma hepatocelular: Aspectos morfológicos

A primeira descrição científica do CHC foi realizada em um estudo de 200 autópsias em 1901 (12). Edmondson e Steiner publicaram em 1954 características morfológicas do CHC e criaram um sistema de graduação ainda utilizado até os dias de hoje. Nesse sistema o CHC pode apresentar quatro graus histológicos, levando em consideração, principalmente, características nucleares (Figura 3) (13,14). Atualmente, de acordo com a Organização Mundial da Saúde, em classificação de 2010, a graduação histológica do CHC é baseada em critérios de diferenciação tumoral, assim, graduado da seguinte forma:

- CHC bem diferenciado: mais comum em tumores < 2,0cm, mais raro em tumores avançados. Apresentam discretas atipias nucleares e leve aumento da relação entre núcleo e citoplasma. Predomina padrão arquitetural trabecular, podendo ocorrer áreas pseudo-glandulares. Padrão esteatótico ocorre frequentemente. Em tumores mais avançados áreas bem diferenciadas podem ocorrer na região periférica;
- CHC moderadamente diferenciado: mais comum em tumores > 3,0cm. Apresentam moderado aumento na relação núcleo:citoplasma. As células apresentam núcleos redondos com distintos nucléolos e abundante citoplasma eosinofílico. Predomina padrão arquitetural macrotrabecular com frequentes áreas pseudo-glandulares, podendo conter material proteináceo ou bile.
- CHC pouco diferenciado: extremamente raro em tumores pequenos ou em estágios iniciais. Predomina padrão arquitetural sólido, sem espaços vasculares-sinusoidais distintos. Observa-se moderado a acentuado pleomorfismo celular.
- CHC indiferenciado: as células neoplásicas contém pouco citoplasma, podendo o núcleo apresentar aspecto fusiforme. Predomina padrão compacto ou sólido.

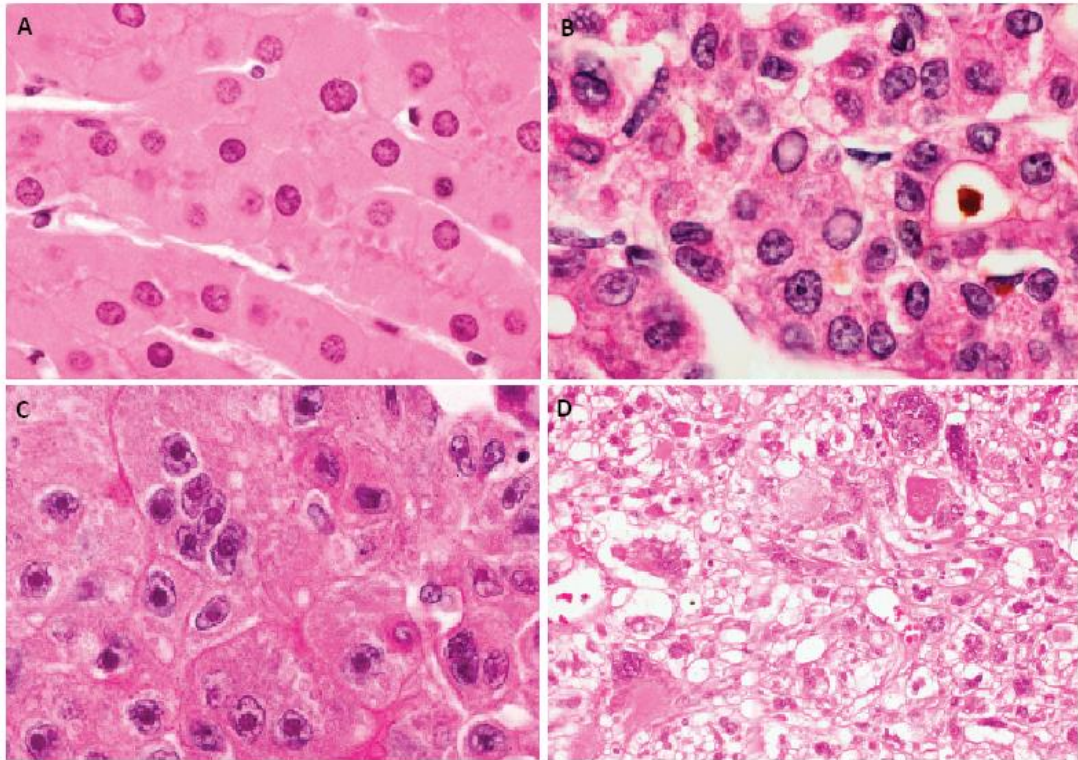


Figura 3. Graduação histológica de carcinoma hepatocelular (Edmondson-Steiner). A: grau 1, com células apresentando amplo citoplasma e núcleos regulares e redondos; B: grau 2, com células apresentando núcleos regulares e redondos, mas com discreta irregularidade e hiperchromatismo nuclear. Alguns nucléolos já podem ser evidentes; C: grau 3, onde há pronunciado hiperchromatismo e irregularidade nuclear, com nucléolos proeminentes; D: grau 4, com marcado pleomorfismo nuclear, com células gigantes anaplásicas (HE, *MacSween's Pathology of the Liver*, 5th edition).

Dentre os tipos histológicos de CHC predomina o padrão *clássico ou convencional*, composto por células poliédricas, semelhantes aos hepatócitos, com escasso estroma ricamente vascularizado e processo de capilarização sinusoidal. Pode apresentar variações citológicas como padrão pleomórfico (com frequentes células multinucleadas), células claras (citoplasma rico em glicogênio) e áreas esteatóticas. Tipos histológicos especiais incluem *carcinoma fibrolamelar*, que predomina em indivíduos mais jovens e apresenta hepatócitos com padrão oncotítico entremeados por estroma fibroso, *carcinoma fibroso (Scirrhou)* com abundante fibroesclerose estromal, *carcinoma linfo-epitelioma-like*, uma forma rara, apresentando padrão de crescimento sincicial entremeado por grande número de linfócitos maduros, *carcinoma sarcomatoide* onde predominam fatores citológicos sarcomatoides, com aspecto morfológico fusocelular, com prognóstico ruim e

carcinoma esteato-hepatítico, subtipo recentemente descrito, com características morfológicas semelhantes à esteato-hepatite, encontrados principalmente em um contexto de fígados com esteato-hepatite não-alcoólica, em pacientes com síndrome metabólica (15,16,17).

As lesões precursoras do CHC incluem alterações microscópicas focais e lesões macroscopicamente nodulares. *Focos displásicos* são áreas microscópicas expansivas caracterizadas por atipias hepatocelulares, podendo apresentar padrão morfológico de pequenas ou grandes células. *Nódulos displásicos* são lesões macroscopicamente detectáveis, que apresentam variáveis graus de displasia, muitas vezes com sinais de progressão do grau de displasia no mesmo nódulo (18,19,20).

1.3. Carcinoma Hepatocelular: Carcinogênese

O desenvolvimento de lesões pré-malignas ou displásicas e do carcinoma hepatocelular é multifatorial e heterogêneo, ocorrendo em múltiplas etapas, com envolvimento de diferentes mecanismos genéticos e epigenéticos, além do comprometimento de múltiplas vias supressoras tumorais (21,22). Os principais mecanismos moleculares ocorrem durante a evolução das doenças hepáticas crônicas e o desenvolvimento de cirrose. Dentre os principais fatores etiológicos da injúria hepática crônica e cirrose destacam-se os vírus hepatotrópicos B e C, alcoolismo crônico, ação de compostos tóxico-alimentares como as aflatoxinas, doenças metabólico-genéticas e doenças de depósitos como a Hemocromatose, Deficiência de alfa-1-antitripsina e Doença de Wilson (23).

Os vírus hepatotrópicos B e C estão envolvidos em várias etapas da hepatocarcinogênese. A integração do DNA do vírus B no hepatócito pode induzir instabilidade cromossômica, resultando em rearranjos ou deleções, ou ainda, pode ativar genes endógenos envolvidos na divisão celular. A integração do DNA viral ao genoma do hepatócito pode também codificar produtos, como a proteína HBX, 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 mecanismos

proliferativos celulares e anti-apoptóticos (24,25,26,27,28). A infecção pelo vírus da hepatite C é uma das principais causas de doença hepática avançada e CHC em todo o mundo. Embora o conhecimento sobre a virologia molecular da infecção pelo VHC tenha avançado muito, os mecanismos da progressão da doença levando à fibrose, cirrose e CHC ainda não são claros. Estudos experimentais e clínicos indicam que o VHC pode conduzir ao processo de hepatocarcinogênese diretamente através de suas proteínas e/ou indiretamente, através da indução da inflamação crônica do fígado. Proteínas virais específicas do VHC, como NS3, NS4B e NS5A, atuam como indutores na ativação do sinal intracelular, contribuindo para proliferação celular e na regulação de proto-oncogenes, como o *C-MYC*. Mesmo após a possibilidade de se erradicar a infecção pelo VHC através do tratamento antiviral de ação direta em um paciente, o risco de CHC persiste, embora biomarcadores específicos para estimar esse risco ainda estejam ausentes (29,30,31).

As aflatoxinas são produtos tóxicos carcinogênicos alimentares produzidos pelos fungos *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*, comumente encontrados em cereais na Ásia e África, que podem produzir mutações no gene supressor tumoral p53. Podem atuar como fator independente em etapas da hepatocarcinogênese ou atuar sinergicamente com outros fatores etiológicos como os vírus hepatotrópicos (32,33).

Recentes evidências indicam a participação direta ou indireta do *C-MYC* na regulação do ciclo celular, diferenciação, metabolismo, crescimento celular, apoptose, instabilidade genômica, imortalidade e angiogênese. O gene *C-MYC* está localizado na região cromossômica 8q24.1, fazendo parte da família de oncogenes *MYC*. A superexpressão do *C-MYC* pode induzir instabilidade cromossômica, produção de radicais livres e, aparentemente, é um dos oncogenes responsáveis pela imortalização celular, por ser um gene-chave na indução da atividade da telomerase (34,35).

Estudos na biologia molecular identificaram várias anormalidades genéticas envolvidas na hepatocarcinogênese. Os estudos demonstram que as alterações genéticas são muito variáveis em cada caso, como alterações de cariótipos, perda de heterozigosidade (LOH) ou perda nas regiões de genes supressores de tumor em diferentes cromossomos (8q, 1q, 7q, 8p, 11p, 16q,

17p), com consequente inativação desses genes e superexpressão de vários oncogenes (36, 37, 38).

A acumulação de alterações genéticas e epigenéticas pode alterar várias vias de sinalização. Dentre as principais vias de sinalização envolvidas na hepatocarcinogênese, destacam-se: *via Wnt*, com mutação da beta-catenina e ativação da glutamina-sintetase; *via C-MET*, fator de transcrição mesenquimal-epitelial, um receptor de tirosina-quinase, associado ao fator de crescimento hepatocitário (HGF), sendo que a desregulação dessa via promove crescimento, sobrevivência, migração e invasão tumoral; *via AMPK*, uma quinase heterotrimérica, ativada em condições de estresse celular (como hipóxia ou choque térmico), com aumento de AMP/ATP, regulando o ciclo celular e apoptose e atuando como correguladora de outros genes supressores tumorais, como p53 (39,40,41).

A cascata de sinalização Wnt é uma via importante de transdução de sinal em vários tipos de neoplasias em humanos, inclusive o CHC. A cascata de sinalização canônica Wnt controla o comportamento celular ao promover a ligação ao DNA de proteínas ativadoras da transcrição pertencentes às famílias TCF (*T cell factor*) e Lef-1 (*lymphoid enhancer factor-1*). Na ausência de sinalização da via Wnt, os níveis de beta-catenina citoplasmática são normalmente controlados por um complexo de destruição multiproteico, que conduz a beta-catenina para degradação em proteossomas. Este complexo é composto por um componente sequestrador, a axina ou a sua homóloga conductina (axina 2), que contém domínios de ligação à beta-catenina, o gene supressor tumoral APC e quinases. A principal função do complexo de destruição é promover a fosforilação, ubiquitinação e degradação da beta-catenina nos proteossomas (Figura 4A).

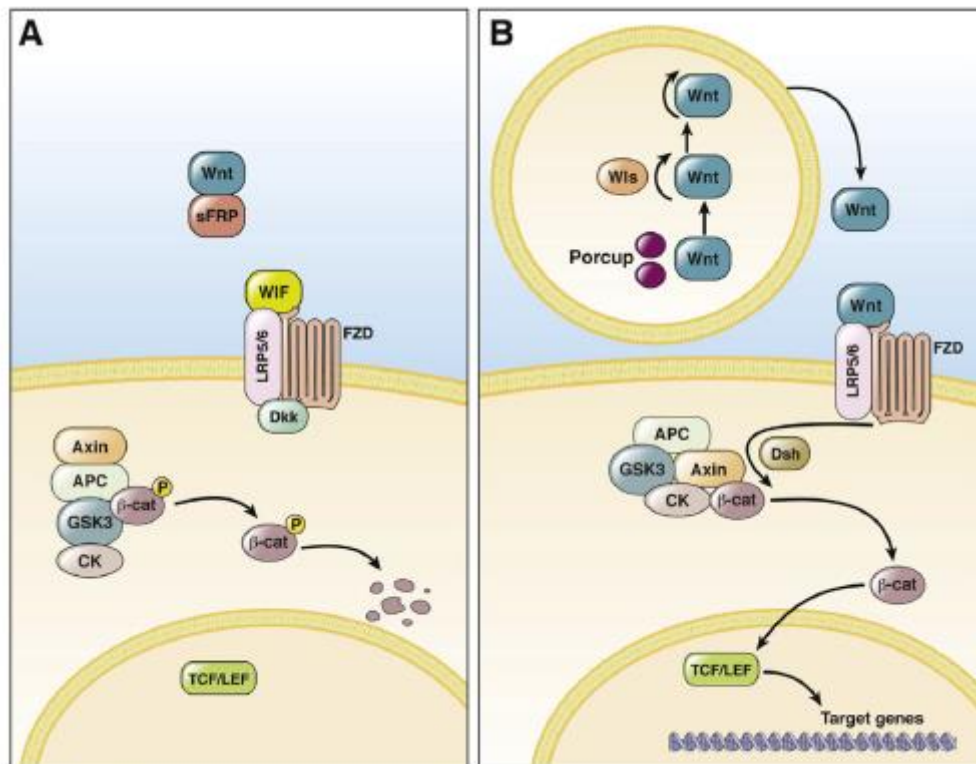


Figura 4. Ausência de sinalização da via Wnt, com degradação da beta-catenina (A); sinalização da via Wnt com ligação a receptores específicos da superfície celular, com ativação da proteína Dsh e inativação do complexo de destruição da beta-catenina (B). Fonte: Monga SP, *Gastroenterology*. 2015 Jun; 148(7): 1294-310 (42).

Quando as moléculas de sinalização Wnt se ligam aos seus receptores, que são membros da família *Frizzled* (um tipo de família de receptores celulares) é ativada uma cascata de sinalização, conduzindo à ativação de uma proteína designada por *Disheveled* (Dsh), que impede a formação do complexo de destruição da beta-catenina. Assim, há acúmulo de beta-catenina citoplasmática livre, podendo ser translocada para o núcleo celular, onde se liga a proteínas que atuam como fatores de transcrição, promovendo a ativação de outros genes-alvo e seus produtos como *C-MYC* e ciclina D1, inclusive *GLUL*, que codifica a glutamina-sintetase (Figura 4B). Nestes casos, há demonstração de imunoexpressão nuclear anômala ou aberrante da beta-catenina (Figura 5) (42).

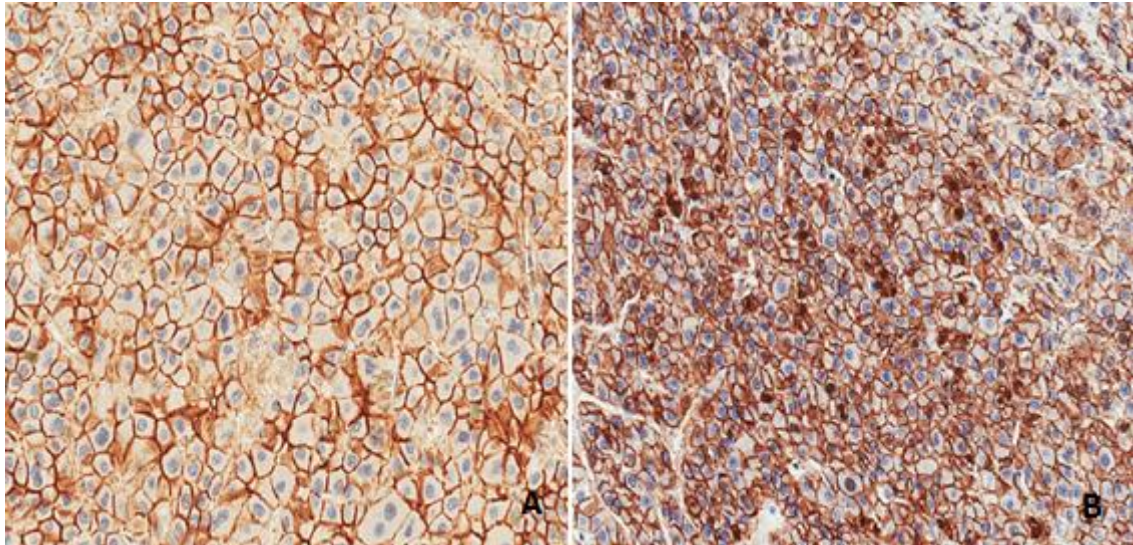


Figura 5: Padrões de imunoexpressão da beta-catenina: imunoexpressão habitual em padrão de membrana (A); imunoexpressão anômala em padrão nuclear (B) (*figuras exemplos de casos do atual estudo, 20x*).

O *TP53*, gene que codifica a proteína p53, é um dos mais estudados em tumores sólidos, com mutações identificadas em várias neoplasias nos seres humanos. Estudos indicam que o *TP53*, um gene supressor tumoral, está envolvido em etapas iniciais e tardias na hepatocarcinogênese. Interessantemente, proteínas virais podem inativar genes supressores tumorais. Por exemplo, na infecção crônica pelo vírus da hepatite B, a proteína X (HBX) se liga ao p53, inativando-o. Em eventos tardios, perda de heterozigosidade cromossômica é descrita em CHC com mutação de p53. Mutações do p53 foram detectadas no interior de CHC avançados, mas não na região subcapsular ou periférica destes nódulos ou em CHC precoce, sugerindo associação entre mutação de p53 e eventos tardios na progressão de CHC. As mutações do p53 são também encontradas com alta frequência em CHC induzido por aflatoxinas (43,44,45,46).

O HGF é um importante fator mitógeno para hepatócitos. O proto-oncogene *C-MET* codifica o receptor do HGF com atividade tirosina-quinase. Alguns modelos de estudos demonstram que as funções do HGF como fator hepatotrófico são várias, entre as quais intensificar a regeneração hepática e supressão da apoptose hepatocitária. O eixo HGF / *C-MET* está implicado na hepatocarcinogênese através de múltiplos mecanismos, com angiogênese tumoral, e muitos outros ainda estão sendo elucidados. A superexpressão de HGF e/ou *C-*

MET é observada em cerca de 30% de amostras de CHC humano. O valor prognóstico da superexpressão do *C-MET* e HGF nos casos de CHC é incerto. Embora alguns estudos não tenham demonstrado correlação entre a superexpressão do *C-MET* e características do tumor, como seu tamanho ou comportamento invasivo, ou ainda alteração dos níveis de HGF e sobrevida, outros estudos demonstram uma relação inversa entre superexpressão gênica com a sobrevida. Especificamente, em alguns estudos, a superexpressão do *C-MET* correlacionou-se com CHC pouco diferenciado, aumento de metástases e diminuição da sobrevida em cinco anos (47).

A fosforilação da proteína supressora tumoral Rb é normalmente inibida por quinases ciclina-dependentes (Cdk4 e Cdk6), as quais são controladas por várias proteínas inibidoras de quinases, como a p16, da família INK4a. A p16 também possui papel importante na regulação do ciclo celular. Muitos estudos indicam alterações epigenéticas, como metilações, da p16 em hepatocarcinogênese. Há indicações de que a p16 é inativada não apenas em CHC avançado, mas também em lesão pré-neoplásicas hepáticas (48).

O surgimento de novos marcadores moleculares é fundamental também para o diagnóstico de CHC. A análise anatomopatológica convencional não consegue atingir sensibilidade e especificidade suficientes para o diagnóstico de alguns casos de CHC pequenos ou em biópsias. Recentemente, estudos demonstraram a utilidade de novos marcadores imuno-histoquímicos, como Glipican-3 (GPC3), proteína de choque térmico 70 (HSP70) e glutamina-sintetase (GS), adicionados na rotina diagnóstica de CHC, que de uma forma prática, costuma apresentar imunoexpressão positiva para dois ou três destes marcadores (49,50).

A proteína de superfície da membrana celular Glipican-3, pertencente à família de proteoglicanas, expressa em tecido embrionários, mas silenciada em tecidos adultos, está envolvida com crescimento, diferenciação e migração celular. Apresenta superexpressão em CHC, em contraste com parênquima hepático não neoplásico normal ou cirrótico (51).

A glutamina-sintetase (GS) é uma enzima catalizadora do metabolismo do aminoácido não essencial glutamina, através da interação do glutamato e amônia. Sua síntese acontece primariamente no tecido muscular esquelético, mas também em outros órgãos como pulmões, fígado e cérebro. Estudos têm demonstrado que a GS pode influenciar uma variedade de funções e

vias de sinalização celular. Está envolvida na elaboração da expressão de genes relacionados com a síntese e degradação de proteínas, na proliferação celular, na ativação de vias envolvidas e na apoptose celular, além de modular a ativação de proteínas de estresse ou choque térmico (“heat shock proteins”: HSPs), que estão relacionadas com a resposta anti-apoptótica celular. No fígado normal, a GS apresenta imunopositividade em hepatócitos perivenulares centrais, ou zona 3 hepática (Figura 6). A GS é super-expressa em CHC, mas também apresenta imunopositividade difusa em alguns tipos de adenomas, imunopositividade mapa-*símile* ou padrão em mosaico nas hiperplasias nodulares focais e, além disso, pode apresentar imunopositividade aumentada em fígados cirróticos (52,53,54).

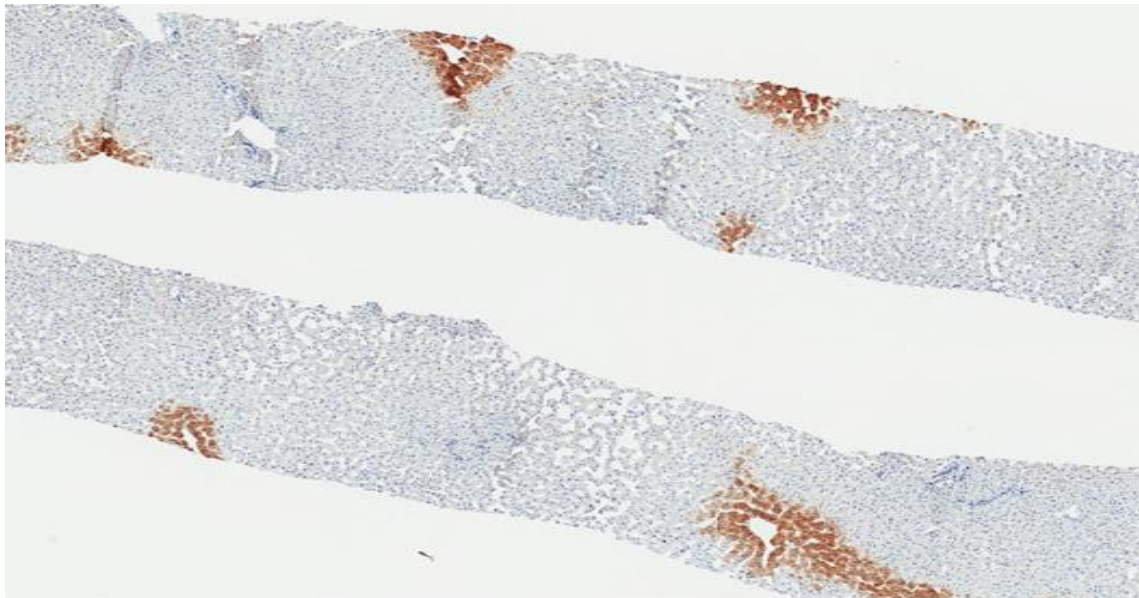


Figura 6. Imunopositividade habitual da GS em hepatócitos que envolvem a veia centrolobulillar em fígado normal (Imunohistoquímica: glutamina-sintetase, clone GS-6, 10x. Observação: figura de arquivo pessoal).

As proteínas de choque térmico (HSP) fornecem um mecanismo de defesa fundamental para proteger as células dos vários danos ambientais, em resposta a várias condições fisiológicas de estresse, incluindo etapas de carcinogênese. As funções da família HSP na carcinogênese têm sido implicadas na regulação da progressão do ciclo celular e apoptose, na resistência a drogas e como moduladoras da função de p53. As HSPs foram classificadas em seis famílias principais e designadas de acordo com o seu peso molecular aproximado: HSP100, HSP90, HSP70, HSP60, HSP40, e pequenas HSPs incluindo HSP27. Com base nas

suas funções reguladoras em apoptose celular, as HSPs estão divididas em dois grupos: pró-apoptóticas e anti-apoptóticas. Tanto a HSP70 como a HSP27 são potentes anti-apoptóticas e a sua superexpressão permite que as células sobrevivam em condições fisiológicas variáveis. Assim, podem participar na carcinogênese e modular a proliferação e sobrevivência de células tumorais através da regulação de vias apoptóticas. Há relatos sobre expressão de HSP70 em tumores malignos de vários sítios: mama, pulmão, cavidade oral, próstata e colo uterino. A maioria dos resultados publicados demonstraram superexpressão de HSP70 correlacionada com pior prognóstico e resistência ao tratamento. HSPs induzidas em resposta à inflamação crônica ou outras condições de estresse celular podem contribuir para a hepatocarcinogênese (55,56,57).

As citoqueratinas são proteínas que compõem os chamados filamentos intermediários presentes no citoesqueleto intracitoplasmático das células epiteliais. As citoqueratinas 7 e 19, marcadores de diferenciação colangiolar, hepatócitos imaturos e células progenitoras do fígado, são amplamente utilizadas para diagnóstico de colangiocarcinomas e carcinomas mistos, com diferenciação hepatocelular e colangiolar. Nos últimos anos, muitos estudos demonstraram a relevância prognóstica destes marcadores em neoplasias hepáticas. A imunoexpressão positiva dessas citoqueratinas em CHC indica pior prognóstico, com características clínico-patológicas desfavoráveis, como indiferenciação celular neoplásica, recorrência após tratamento e doença metastática (22, 58).

Estudos recentes tentam produzir classificações de subgrupos de adenomas e carcinomas hepatocelulares com alterações moleculares semelhantes, com vias de carcinogênese similares, associando características clínicas e anatomopatológicas, suscitando a criação de fatores prognósticos e, principalmente, visando melhores respostas a terapias-alvo (59,60,61).

Embora a grande maioria dos casos de CHC ocorra em pacientes com hepatopatias crônicas em estágio avançado de fibrose e transformação nodular da arquitetura parenquimatosa hepática, um número crescente de casos de CHC em fígados não-cirróticos têm sido descrito na literatura nos últimos anos em várias áreas do mundo, incluindo Estados Unidos, alguns países da Europa e Japão. A grande maioria desses relatos ou série de casos sugere uma forte associação entre o surgimento de CHC em fígados não-cirróticos em pacientes com doença hepática gordurosa não-alcoólica e um contexto clínico de

síndrome metabólica, com importância à obesidade e resistência insulínica no diabetes *mellitus* tipo 2 (62,63,64,65).

O surgimento de CHC em fígados não-cirróticos levanta a possibilidade do envolvimento de vias alternativas na hepatocarcinogênese ou diferentes fatores que possam causar a ativação de eventos moleculares precoces no desenvolvimento do câncer hepático.

Não está claro, mas aparentemente, as fases de desenvolvimento do câncer (iniciação, promoção e progressão) encontram um substrato na fisiopatogenia da doença hepática gordurosa não-alcoólica (DHGNA). A resistência à insulina com elevação e fatores de crescimento insulino-dependentes, como o IGF-1, estimulam a proliferação celular e inibição da apoptose. O aumento de estrógeno, que ocorre na obesidade, também está envolvido na proliferação hepatocelular. O estresse oxidativo celular pode—contribuir para mutações ou alterações epigenéticas de genes supressores tumorais, como o p53 e PTEN (66,67,68,69).

Outra observação parece ter fundamental importância. As células T CD4+ têm atividade supressora na formação de tumores por indução da senescência celular, diminuição da angiogênese e expressão de quimiocinas e citocinas que contribuem para a remodelação do microambiente necessário para uma regressão tumoral sustentada. Em condições normais, as células T CD4+ hepáticas e células apresentadoras de antígenos (macrófagos) reconhecem conjuntamente hepatócitos senescentes, contribuindo assim para a erradicação precoce de prováveis focos displásicos. Estudos indicam que na doença hepática gordurosa não-alcoólica há uma perda seletiva de linfócitos T CD4+. A presença intracelular de alguns metabólitos lipídicos como o ácido linoleico provoca a fosforilação oxidativa e disfunção mitocondrial em linfócitos T CD4+, com aumento dos níveis de espécies reativas de oxigênio (EROS) com danos oxidativos do DNA e apoptose celular. Assim, a perda seletiva desses linfócitos provocaria uma provável via para o desenvolvimento do CHC (70).

2. Objetivos

2.1. Objetivo geral

- Avaliação da imunoexpressão de marcadores biológicos associados à hepatocarcinogênese (citoqueratinas 7 e 19, proteínas 16 e 53, CMET, CMYC, Beta-catenina, HSP70, Glipican-3 e Glutamina-sintetase), em CHC originados em fígados cirróticos e não cirróticos.

2.2. Objetivos específicos

- Comparação da imunoexpressão dos marcadores biológicos utilizados neste estudo em CHC originados em fígados cirróticos e não cirróticos com aspectos morfológicos relacionados ao prognóstico (exemplos: graduação histológica, tamanho do tumor e presença de êmbolos neoplásicos).
- Comparação da imunoexpressão de marcadores biológicos utilizados neste estudo em CHC originados em fígados cirróticos e não cirróticos com aspectos clínicos, como alterações associadas à síndrome metabólica.
- Definição de possíveis diferenças na imunoexpressão dos marcadores utilizados neste estudo entre os CHC originados em fígados cirróticos e não cirróticos.

3. Metodologia

3.1. Desenho do estudo e casuística

A pesquisa consta de um estudo investigativo. Foram selecionados cinquenta (50) blocos de parafina arquivados no Departamento de Anatomia Patológica da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, entre 2009 e 2014, relativos a pacientes com diagnóstico de CHC clássico, diagnosticados em produtos de ressecção cirúrgica: nodulectomias, hepatectomias totais (transplantes) ou parciais; independentemente do fator etiológico, sexo, cor, idade ou grupo étnico.

Os casos foram divididos em dois grupos:

- Grupo A: vinte (25) casos de pacientes com CHC em fígado com cirrose;
- Grupo B: vinte (25) casos de pacientes com CHC em fígado sem cirrose.

3.2. Critérios de inclusão

Foram incluídos casos de pacientes com CHC clássico, diagnosticados no Departamento de Anatomia Patológica da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, em produtos de ressecção cirúrgica: nodulectomias, hepatectomias totais (transplantes) ou parciais; independentemente do fator etiológico, sexo, cor, idade ou grupo étnico.

3.3. Critérios de exclusão

Foram excluídos os casos cujos materiais biológicos nos blocos de parafina não apresentavam condições para o estudo, como amostras insuficientes, com fixação inadequada ou com predomínio de necrose tumoral ou necrose por tratamento neoadjuvante (alcoolização ou quimioembolização). Foram excluídos também casos com diagnóstico de carcinoma fibrolamelar, subtipo especial de carcinoma hepatocelular.

3.4. Materiais e métodos

As informações clínicas e características macroscópicas dos casos foram adquiridas nos prontuários dos pacientes e nos laudos anatomopatológicos. Para avaliação de síndrome metabólica foram utilizados critérios do *National Cholesterol Education Program – Adult Treatment Panel III* (71).

Para os dois grupos designados acima foram analisadas lâminas coradas com hematoxilina-eosina, dos arquivos do Departamento de Anatomia Patológica, para análise de características morfológicas e seleção de áreas para a realização de *tissue microarrays* (TMAs) dos carcinomas hepatocelulares para a análise imuno-histoquímica.

Em todos os TMAs foram realizados cortes histológicos de 3,0 a 4,0 micras de espessura. Posteriormente, tais cortes foram submetidos ao método de imuno-histoquímica, segundo protocolo do Laboratório de Imuno-histoquímica do Departamento de Anatomia Patológica da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP (Apêndice 1).

No estudo imuno-histoquímico foram utilizados anticorpos associados à ativação de algumas das vias mais importantes da hepatocarcinogênese, bem como marcadores de fatores prognósticos e preditivos (Tabela 1). Exemplos de padrão da imunoexpressão considerada positiva de alguns marcadores em TMAs do estudo estão presentes nas Figura 7 e 8.

Tabela 1. Lista de anticorpos utilizados no estudo

Anticorpo	Clone	Fabricante	Diluição	Imunoexpressão*
CK 7	OV-TL 12/30	DAKO	1:100	C / M
CK 19	RCK108	DAKO	1:200	C / M
P53	DO-7	DAKO	1:400	N
P16	E6H4	CINtec® Histology Kit	1:200	N / C
C-MET	C-28	Santa Cruz Biotechnology	1:100	C
BC	BC-1	DAKO	1:200	N
HSP70	C92F3A-5	Abcam	1:100	N / C
GS	GS-6	CellMark medical	1:500	C
Glipican-3	W-18	Santa Cruz Biotechnology	1:100	C / M
C-MYC	Y69	Abcam	1:500	N

Legenda: CK: Citoqueratina; BC: Beta-catenina; GS: Glutamina sintetase; N: nuclear; C: citoplasmática; M: membranosa.

** Padrão de imunoexpressão considerado positivo em nosso estudo.*

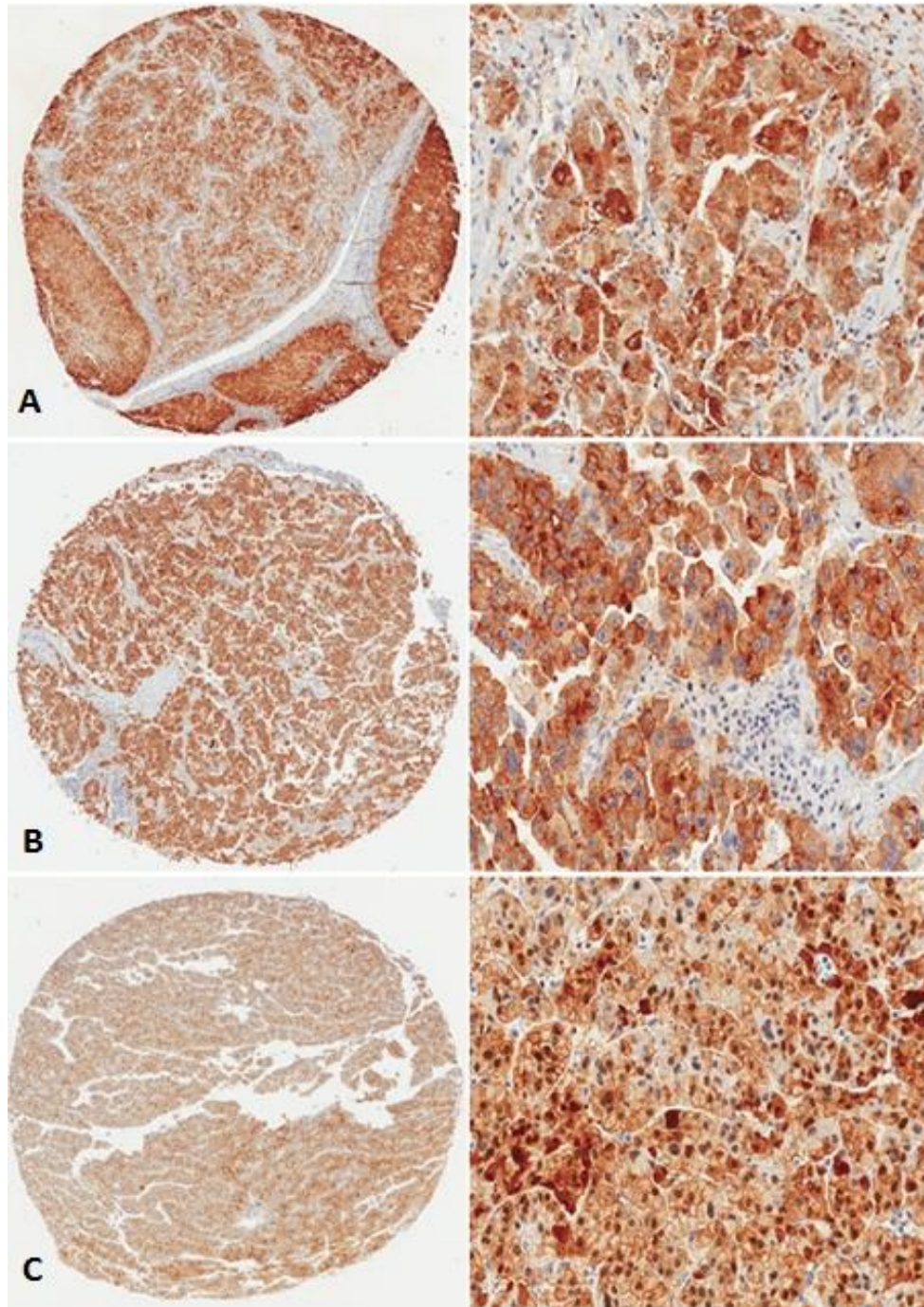


Figura 7: Exemplos da imunoexpressão de alguns marcadores imuno-histoquímicos utilizados em casos de CHC do estudo. A: TMA com área ampliada (40x) de caso com imunoexpressão positiva de C-MET; B: TMA com área ampliada (40x) de caso com imunoexpressão positiva do Glipican-3; TMA com área ampliada (20x) de caso com imunoexpressão positiva para HSP70.

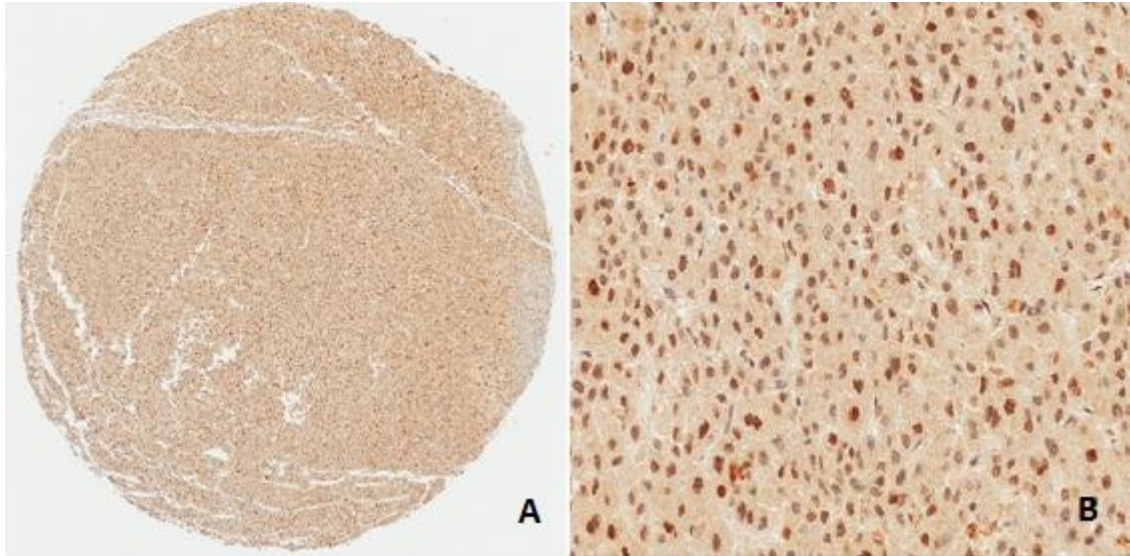


Figura 8: TMA (A) com imagem ampliada 20x (B) de caso com imunexpressão nuclear positiva para p53.

Na análise das reações do estudo imuno-histoquímico, nos cortes histológicos dos TMAs, foram considerados casos positivos qualquer positividade celular inequívoca, independentemente da avaliação de quantificação, levando em consideração o padrão de imunexpressão de cada anticorpo na célula alvo. Foram considerados casos negativos aqueles com ausência completa da imunexpressão do anticorpo ou casos de padrão de imunexpressão inconclusiva (Figura 9).

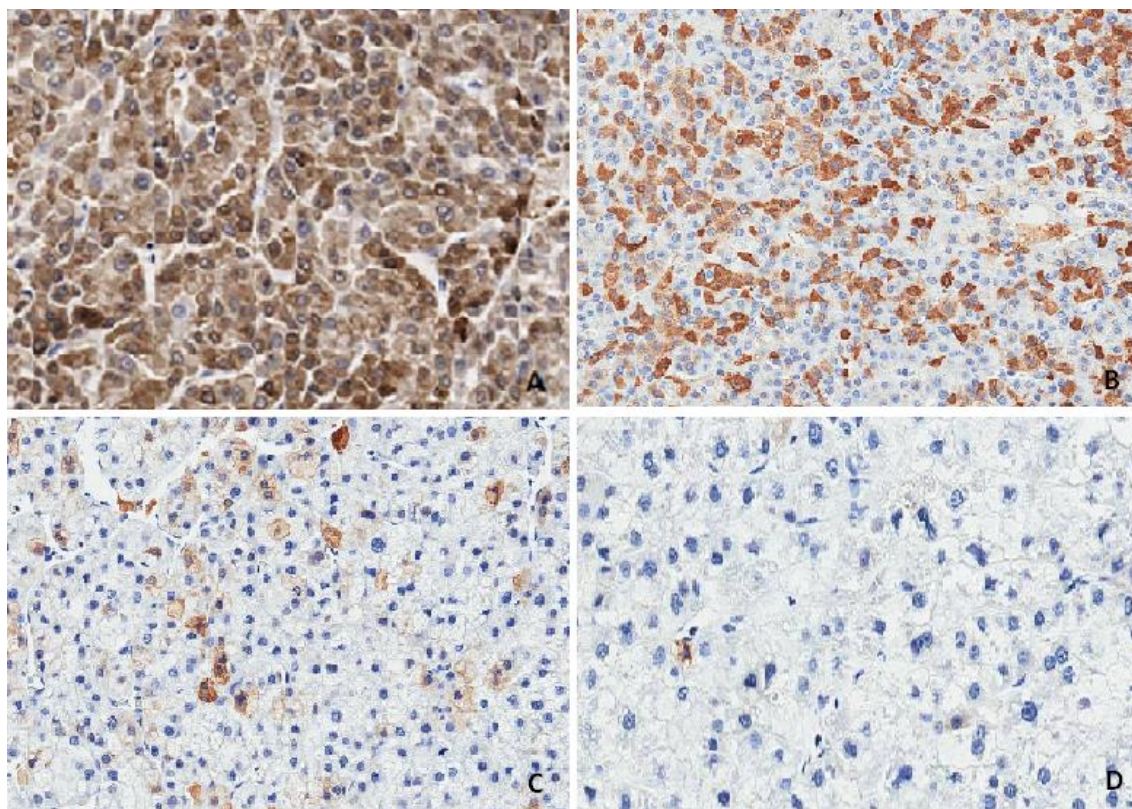


Figura 9. Exemplos da variação da análise da imunoexpressão da glutamina-sintetase no estudo. A, B e C: variação da imunoexpressão da glutamina-sintetase em casos considerados positivos (A: forte e difuso; B: moderado e focal; C: fraco e focal); D: imunoexpressão negativa para glutamina-sintetase (20x).

3.5. Análise estatística:

Foi realizada análise exploratória de dados através de medidas resumo (frequência, porcentagem, média, desvio padrão, mínimo, mediana e máximo). A comparação entre os grupos foi realizada através do teste de Mann-Whitney (variáveis numéricas), Qui-Quadrado ou exato de Fisher (variáveis categóricas).

Os fatores para diferenciação dos grupos foram avaliados através de regressão logística. Na análise múltipla o critério de seleção *stepwise* foi utilizado. A relação entre as variáveis clínicas e os marcadores foi avaliada através dos testes Qui-Quadrado, Fisher ou Mann-Whitney. Foi adotado como estatisticamente significativo $p < 0,05$. Foi utilizado programa computacional The SAS System for Windows (Statistical Analysis System), versão 9.4. SAS Institute Inc, Cary, NC, USA.

4. Resultados

Na análise estatística de variáveis numéricas entre os grupos observou-se idade média de $56,0 \pm 7,5$, com variação entre 42,0 e 70,0 anos de vida e $54,1 \pm 13,7$ com variação entre 31 e 77 anos de vida, nos pacientes com CHC em fígados cirróticos (grupo A) e pacientes com CHC em fígados não cirróticos (grupo B), respectivamente ($p = 0,43$). Observou-se também predomínio do sexo masculino (grupo A = 85% e grupo B = 77,3%, $p=0,70$) e raça branca (grupo A = 75% e grupo B = 80%, $p = 0,45$), entre os dois grupos estudados.

Em relação às características macro e microscópicas, as variáveis comparadas entre os grupos foram o tamanho das neoplasias, invasão vascular e o grau de diferenciação histológica. Observou-se diferença significativa entre os grupos em relação ao tamanho das neoplasias estudadas, com valores de média $2,9 \pm 1,1$, com variação de 0,7 a 6,7cm no maior eixo e $5,9 \pm 4,2$, com variação de 1,8 a 20,0cm no maior eixo, para os grupos A e B, respectivamente, com $p = 0,004$ (Gráfico 2). Nos dois grupos houve predomínio de CHC moderadamente diferenciado (80% e 84% nos grupos A e B, respectivamente, $p = 0,16$). Nos grupos estudados não foram observados carcinomas hepatocelulares pouco diferenciados ou indiferenciados. Não houve diferença significativa entre as variáveis estudadas e a presença de invasão vascular ($p > 0,05$). No grupo B prevaleceram alterações clínicas e laboratoriais associadas à síndrome metabólica (Grupo A: 20% e grupo B: 52%, $p = 0,034$) (Tabela 2).

Comparando-se o resultado da imunoexpressão dos marcadores estudados entre os dois grupos, a glutamina-sintetase apresentou maior expressão em carcinomas hepatocelulares do grupo B, originados em fígados sem cirrose (80% dos casos, grupo B) do que carcinomas hepatocelulares originados em fígados com cirrose (40% dos casos, grupo A), com $p = 0,004$ (Figura 10 e Gráfico 3).

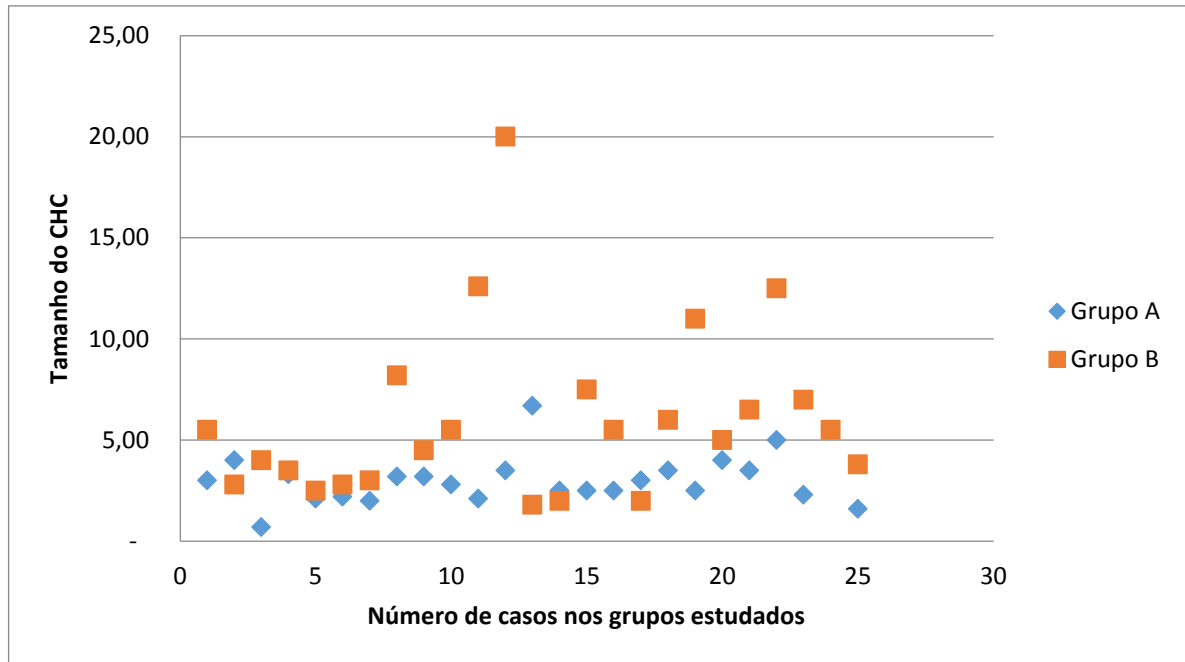


Gráfico 2. Comparação do tamanho tumoral entre os grupos A e B.

Tabela 2. Principais características clínicas e morfológicas dos grupos A e B

	Idade (anos)	Sexo	GH	Medida CHC (cm)	IV	SM ^(*)
	(M ± DP)	(M:F)	(BD, MD, PD)	(M ± DP)	(n)	(n)
Group A	56.0 ± 7.5	21: 04	4, 21 , 0	2.9 ± 1.1	9 (36%)	5 (20%)
Group B	54.1 ± 13.7	19: 06	5, 20 , 0	5.9 ± 4.2	10 (40%)	13 (52%)

Legenda: M ± DP: média ± desvio padrão; n: número de casos; M: masculino; F: feminino; GH: grau histológico; BD: bem diferenciado; MD: moderadamente diferenciado; PD: pouco diferenciado.

^(*) *Evaluation criteria of the National Cholesterol Education Program's Adult Treatment Panel III (NCEP-ATP III).*

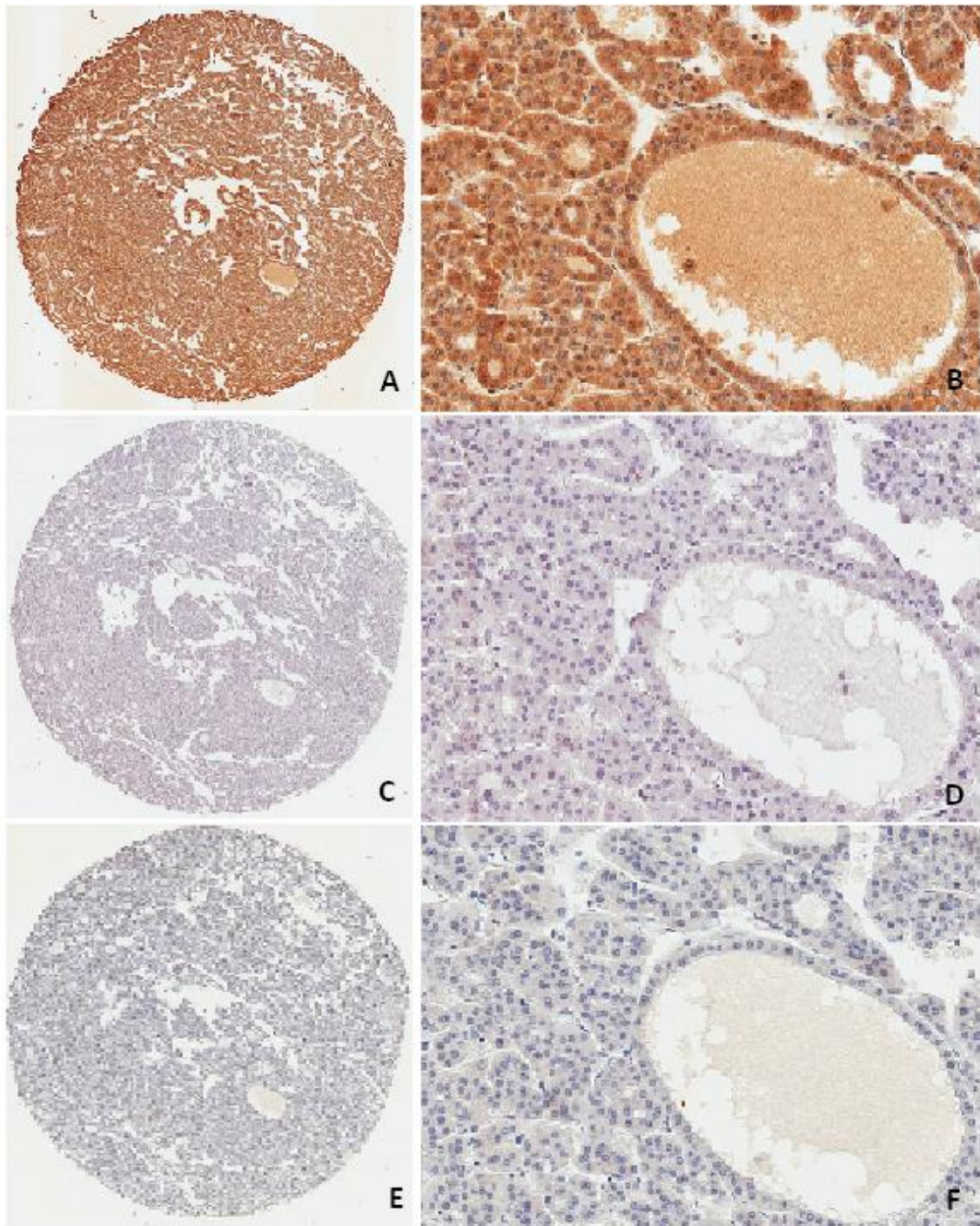


Figura 10: TMA do grupo B com amostra de CHC apresentando imunoexpressão positiva para glutamina-sintetase (A e B) e imunoexpressão negativa para HSP70 (C e D) e Glipican-3 (E e F).

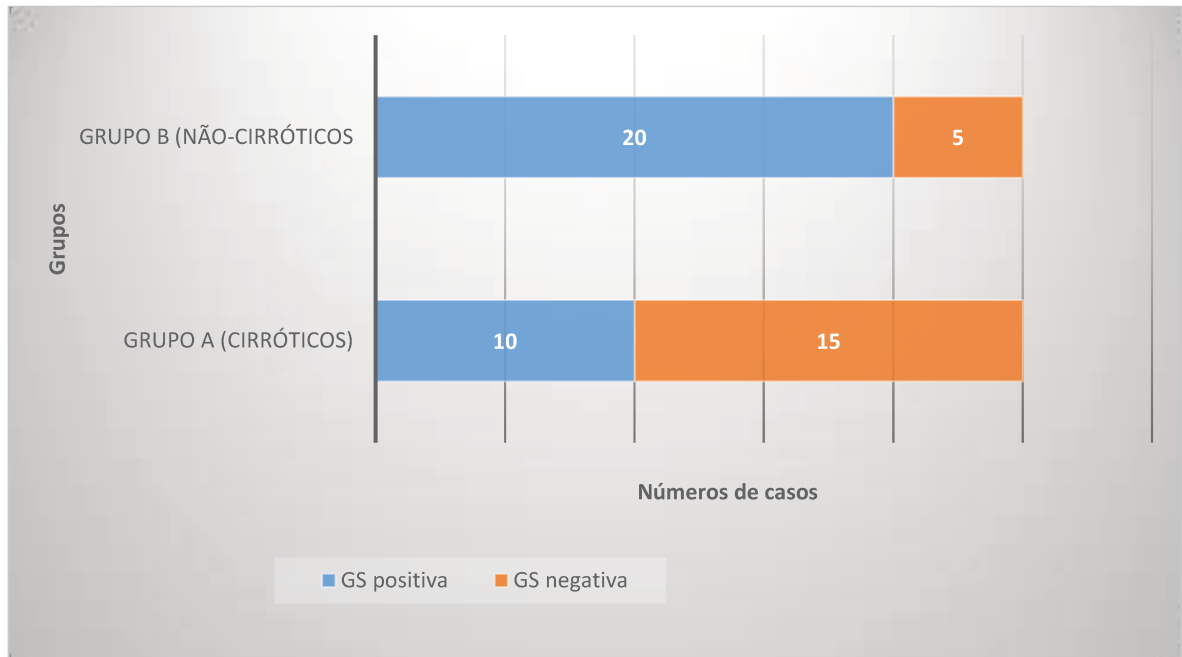


Gráfico 3. Comparação da imunoexpressão da Glutamina-sintetase (GS) entre os grupos A e B ($p=0,004$).

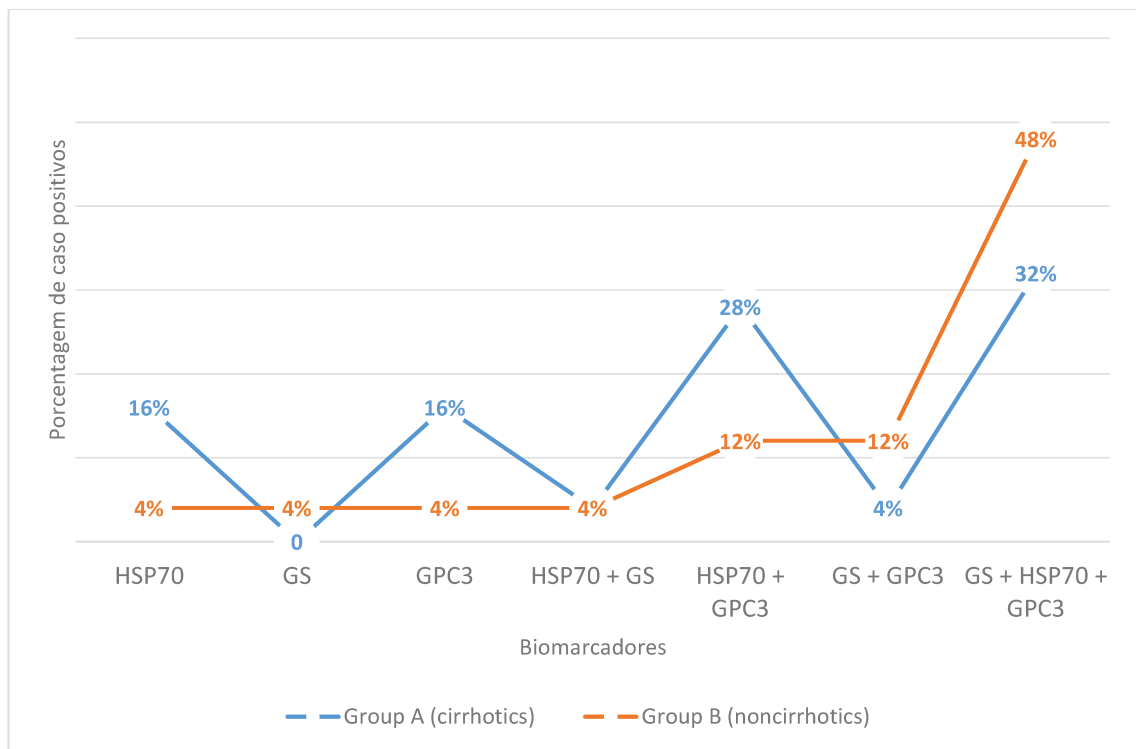


Gráfico 4: Comparação da imunoexpressão dos biomarcadores GS, GPC3 e HSP70 isolados ou em conjunto nos carcinomas hepatocelulares entre os grupos A e B. *GPC3: Glipican-3; GS: Glutamina-sintetase.*

Concordantemente com os resultados da literatura, como descrito na página 30, comparando-se a imunoexpressão da GS, GLP-3 e HSP-70, isoladamente ou em conjunto, observamos nos dois grupos estudados predomínio de casos de CHC com a imunoexpressão positiva para os três marcadores (Gráfico 4).

Os outros marcadores imuno-histoquímicos estudados não apresentaram imunoexpressão com diferenças estatisticamente significativas na comparação entre os grupos estudados (Gráfico 5). Observou-se ainda alta imunoexpressão de CK 7, HSP70, Glipican-3 e da proteína p53 nos CHC em ambos os grupos estudados.

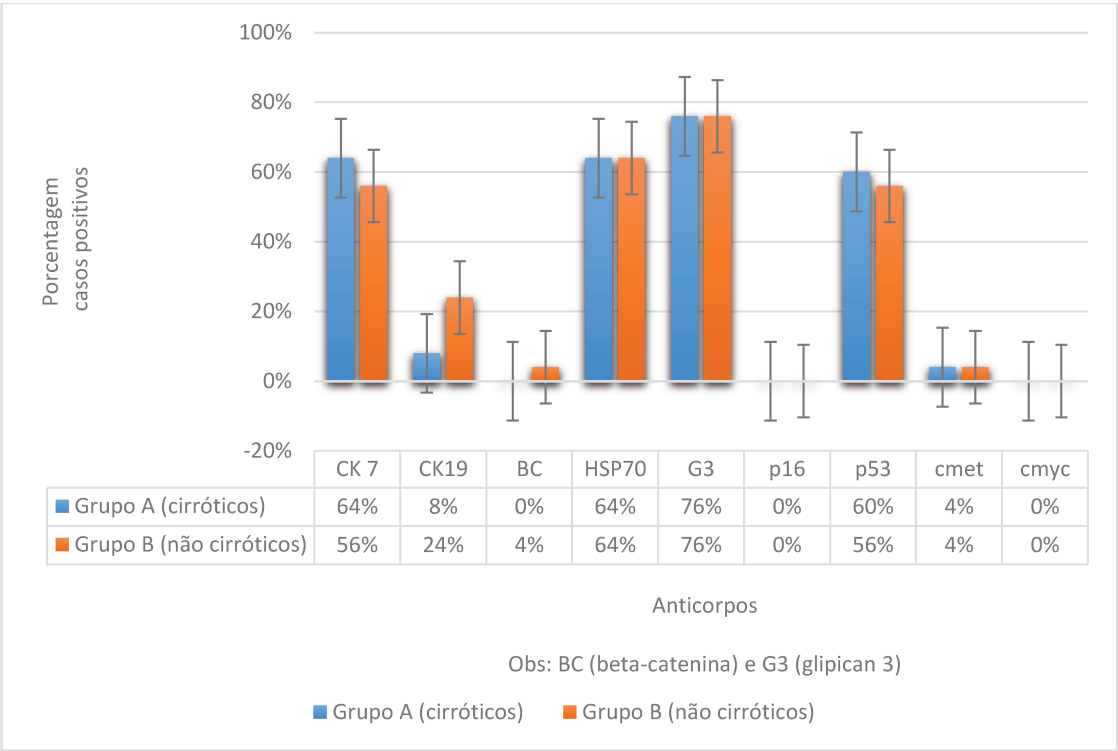


Gráfico 5. Comparação da imunoexpressão dos marcadores estudados que não apresentaram diferenças estatisticamente significativas ($p \geq 0,05$) entre os grupos A e B.

5. Discussão

As variações de incidência de CHC dependem de fatores ambientais e sócio-econômicos, diretamente relacionados à exposição a fatores de risco que causam doença hepática crônica. Em relação aos fatores etiológicos e epidemiológicos do CHC há duas observações importantes. Primeiramente é sabido que a maioria dos casos de CHC surge na presença de doença hepática crônica avançada, com fator etiológico conhecido, relacionada principalmente a infecção por vírus hepatotrópicos (vírus B e C) e abuso de álcool, ou ainda, em um contexto de alguns tipos de neoplasia adenomatosa pré-existente. Entretanto, em alguns casos, o surgimento de CHC permanece idiopático, como por exemplo, em casos de fígado sem doença hepática crônica ou em casos de cirrose idiopática. A outra observação é que um aumento da incidência de doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) e um aumento de novos casos de carcinoma hepatocelular têm sido documentados nos últimos anos em vários países bem desenvolvidos como nos Estados Unidos e Alemanha (72,73,74,75). Assim, há um coincidente aumento da incidência de DHGNA e CHC.

A DHGNA abrange um espectro de alterações morfológicas que variam desde esteatose simples focal até o desenvolvimento de esteato-hepatite não alcoólica (EHNA), com fibrose e inflamação. A EHNA é uma doença progressiva para cirrose e pode estar relacionada a muitos casos classificados como idiopáticos.

O diagnóstico de DHGNA tem aumentado nos últimos anos e possui como causa direta a associação de obesidade e um provável substrato genético. Nos dias atuais, a obesidade é considerada uma epidemia mundial. Em pacientes obesos a prevalência de DHGNA é estimada em 75 a 80% dos casos e, nesses casos, a doença está associada a complicações relacionadas a síndrome metabólica como hipertensão arterial, *diabetes mellitus* tipo II e dislipidemias (76,77).

Nos países industrializados, como nos Estados Unidos (EUA), a DHGNA vem sendo considerada há alguns anos a causa mais comum de doença hepática crônica, superando inclusive etiologias virais (78).

Recentemente, vários estudos indicam a contribuição da DHGND para o desenvolvimento de CHC em pacientes sem cirrose hepática. Como discutido na hepatocarcinogênese, o surgimento de CHC em fígados não-cirróticos

levanta a possibilidade do envolvimento de vias alternativas na hepatocarcinogênese ou diferentes fatores que possam causar a ativação de eventos moleculares precoces no desenvolvimento do câncer hepático (55, 79,80).

O CHC apresenta importante heterogeneidade morfológica e molecular. Nestes casos, o desenvolvimento de CHC em pacientes sem cirrose, provavelmente, apresenta uma associação de fatores já conhecidos das vias clássicas de hepatocarcinogênese e um conjunto de novos fatores intrínsecos à DHGNA e à EHNA, como a produção de espécies reativas de oxigênio com dano oxidativo ao DNA celular, elevação de fatores de crescimento insulino-dependentes, alterações hormonais (principalmente estrogênicas) e alterações imunológicas-inflamatórias.

Nos casos de CHC do grupo B (fígados não-cirróticos) de nosso atual estudo caracterizamos três resultados estatisticamente significativos: a) maior tamanho tumoral; b) maior presença de características clínicas e laboratoriais associadas à síndrome metabólica e provável DHGNA, uma tendência etiológica-epidemiológica mundial; c) maior imunoexpressão de glutamina-sintetase.

A maior variação de tamanho dos CHC presentes no grupo B reflete simplesmente características da amostragem no estudo. No grupo A foram utilizados CHC de pacientes com cirrose em produtos de transplante hepático, com acompanhamento por equipe multiprofissional e com utilização de critérios para a inclusão na lista de transplante, incluindo o tamanho do CHC. No grupo B foram utilizados CHC de segmentectomias e nodulectomias, com variação de história clínica e do diagnóstico.

Como descrito anteriormente, a glutamina-sintetase pode influenciar uma variedade de funções e vias de sinalização celular. A superexpressão da glutamina-sintetase pode estar associada à ativação de algumas das principais vias de sinalização, que contribuem para o aumento da capacidade da célula de sobreviver a alterações na sua homeostasia e danos oxidativos.

A via Wnt/beta-catenina é um dos mecanismos intracelulares de ativação da glutamina-sintetase. Estudos recentes indicam que podem ocorrer alterações epigenéticas em um contexto de DHGNA, com a ativação aberrante da via Wnt e superexpressão de glutamina-sintetase e, assim, esta última poderia ser um marcador em tumores hepáticos em um *background* de síndrome metabólica (81,82).

Um estudo recentemente publicado em 2016, por *Tsujikawa e colaboradores*, subclassificou carcinomas hepatocelulares em três grandes grupos, segundo características clínicas e alterações morfológicas, imuno-histoquímicas e moleculares: grupo que imuno-expressam marcadores biliares e de células progenitoras com pior prognóstico, grupo que imuno-expressam marcadores da via Wnt, ou seja, beta-catenina e/ou glutamina-sintetase com prognóstico intermediário e um grupo de carcinomas hepatocelulares sem imuno-expressão desses marcadores e que apresentam prognóstico favorável (83).

Concomitantemente, a imunoexpressão de glutamina-sintetase em carcinomas hepatocelulares pode indicar diferenças em algumas formas de terapias. Em outro estudo recente, observou-se que CHC com alta expressão de glutamina-sintetase pode apresentar resposta menos significativa a quimioembolização transarterial (TACE) adjuvante, como fator pior isolado na sobrevida dos pacientes (84).

Desta forma, as diferenças de imuno-expressão da glutamina-sintetase nos carcinomas hepatocelulares entre os grupos de pacientes cirróticos (grupo A) e sem cirrose (grupo B) podem indicar provável correlação etiológica com DHGNA, associada com fatores etiopatogênicos distintos. Além disso, a imunoexpressão da glutamina-sintetase, aparentemente, pode ser fator preditivo e prognóstico, podendo ser uma ferramenta útil, associada a outras características anátomo-clínicas, para seleção de pacientes na utilização de terapias-alvo e outros tratamentos de CHC.

6. Conclusões

1. Os marcadores biológicos associados à hepatocarcinogênese estudados podem ser facilmente avaliados através de estudo imuno-histoquímico nos carcinomas hepatocelulares originados em fígados cirróticos e não cirróticos.
2. Ao compararmos os resultados entre os grupos de estudo A e B (CHC originados em fígados cirróticos e CHC em fígados não cirróticos, respectivamente), somente a imunoexpressão da glutamina-sintetase demonstrou diferença estatisticamente significativa, sendo mais acentuada no grupo B.
3. Não houve diferença estatisticamente significativa entre a imunoexpressão dos diversos marcadores estudados e aspectos morfológicos relacionados ao prognóstico (graduação histológica, tamanho do tumor e presença de êmbolos neoplásicos) entre os dois grupos de estudo.
4. Observamos maior número de casos de pacientes com critérios para síndrome metabólica entre os CHC originados em fígados não cirróticos (grupo B).

7. Referências Bibliográficas

- 1- El-Serag H, Rudolph KL: Hepatocellular carcinoma: epidemiology and molecular carcinogenesis. *Gastroenterology*. 2007;132(7):2557-76.
- 2- Massarweh NN, El-Serag HB. Epidemiology of Hepatocellular Carcinoma and Intrahepatic Cholangiocarcinoma. *Cancer Control*. 2017; 24(3): 1073274817729245.
- 3- Bosch FX, Ribes J and Borrás J. Epidemiology of primary liver cancer. *Semin Liver Dis*. 1999; 19(3): 271-85.
- 4-Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray, F. GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11 [Internet]. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2013. Available from: <http://globocan.iarc.fr>
- 5- Instituto Nacional do Câncer. Estimativa 2008: Incidência de Câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA; 2008.
- 6- Bertolini DA, Pinho JRR, Saracni CP, et al. Prevalence of serological markers of hepatitis B virus in pregnant women from Paraná State, Brazil. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 2006;39(8),1083-90.
- 7- Chavez JH, Campana SG, HASS P. Panorama da hepatite B no Brasil e no estado de Santa Catarina. *Revista Panamericana de Salud Publica*. 2003;14(2),91-96.
- 8- Ferreira CT, Silveira TR. Hepatites virais: aspectos da epidemiologia e da prevenção. *Revista Brasileira de Epidemiologia*. 2004;7(4),473-82
- 9- Gonçalves CS, Pereira FE, Gayotto LC. Hepatocellular carcinoma in Brazil: report of a national survey. *Rev Inst Med Trop São Paulo*. 1997 May-Jun;39(3):165-70.
- 10- Bray F, Ren JS, Masuyer E, Ferlay J. Estimates of global cancer prevalence for 27 sites in the adult population in 2008. *Int J Cancer*. 2013 Mar 1;132(5):1133-45.
- 11- Bertuccio P, Turati F, Carioli G, Rodriguez T, La Vecchia C, Malvezzi M, Negri E. Global trends and predictions in hepatocellular carcinoma mortality. *J Hepatol*. 2017 Mar 21. pii: S0168-8278(17)30145-9.

- 12- Eggel H. Ueber das primäre carcinoma der leber. Beitr Pathol Anat. 1901; 30:506-604.
- 13- Edmondson H, Steiner P. Primary carcinoma of the liver: a study of 100 cases among 48900 necropsies. Cancer. 1954; 1:462-503.
- 14- Goodman ZD, Terracciano LM. Tumours and tumour-like lesions of the liver. In Burt AD; Portmann BC, Ferrell LD. MacSween's Pathology of the liver 5th ed. China: Elsevier; 2007.p.761-814.
- 15- Theise ND, Park YN, Curado MP, et al. Hepatocellular Carcinoma. In Bosman FT, Carneiro F, Hruban RH, Theise ND, eds. *WHO Classification of Tumours of the Digestive System*. Lyon, France: IARC Press; 2010, 205-16.
- 16- Salomao M, Yu WM, Brown RS Jr, Emond JC, Lefkowitz JH. Steatohepatic hepatocellular carcinoma (SH-HCC): a distinctive histological variant of HCC in hepatitis C virus-related cirrhosis with associated NAFLD/NASH. Am J Surg Pathol. 2010 Nov;34(11):1630-6.
- 17- Salomao M, Remotti H, Vaughan R, Siegel AB, Lefkowitz JH, Moreira RK. The steatohepatic variant of hepatocellular carcinoma and its association with underlying steatohepatitis. Hum Pathol. 2012 May;43(5):737-46.
- 18- International Working Party. Terminology of nodular hepatocellular lesions. Hepatology. 1995;22(3):983-93.
- 19- Hytioglou P, Park YN, Krinsky G, Theise ND. Hepatic Precancerous lesions and Small Hepatocellular Carcinoma. Gastroenterol Clin N Am. 2007; 36:867-87.
- 20- 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.
- 21- Weiskirchen R. Intratumor heterogeneity, variability and plasticity: questioning the current concepts in classification and treatment of hepatocellular carcinoma. Hepatobiliary Surg Nutr. 2016 Apr;5(2):183-7.
- 22-Walther Z, Jain D. Molecular pathology of hepatic neoplasms: classification and clinical significance. Patholog Res Int. 2011 Apr 7; 2011:403929.
- 23-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.

- 24- Shen HM, Ong CN. Mutations of the p53 tumor suppressor gene and ras oncogenes in aflatoxin hepatocarcinogenesis. *Mutat Res.* 1996; 366(1):23-44.
- 25- Rieswijk L, Claessen SM, Bekers O, van Herwijnen M, Theunissen DH, Jennen DG, de Kok TM, Kleinjans JC, van Breda SG. Aflatoxin B1 induces persistent epigenomic effects in primary human hepatocytes associated with hepatocellular carcinoma. *Toxicology.* 2016 Mar 28;350-352:31-9.
- 26- 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.
- 27- 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.
- 28- 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.
- 29- Becker AS, Lee TH, Butel JS, Slogle BL. Hepatitis virus X protein interferes with cellular DNA repair. *J Virol.* 1998;72(1):266-72.
- 30- 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.
- 31- 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.
- 32- Kwun HJ, Jung EY, Ahn JY, Lee MN, Jang KL. p53-dependent transcriptional repression of p21(waf1) by hepatitis C virus NS3. *J Gen Viral.* 2001; 82:2235-41.
- 33- Bandiera S, Billie Bian C, Hoshida Y, Baumert TF, Zeisel MB. Chronic hepatitis C virus infection and pathogenesis of hepatocellular carcinoma. *Curr Opin Virol.* 2016 Oct; 20:99-105.
- 34- Feitelson MA, Sun B, Satioglu Tufan NL, Liu J, Pan J, Lian Z. Genetic mechanisms of hepatocarcinogenesis. *Oncogene.* 2002; 21(16): 2593-604.
- 35- Dang CV. C-MYC target genes involved in cell growth, apoptosis, and metabolism. *Mol Cell Biol.* 1999;19:1-11.

- 36- Zheng K, Cubero FJ, Nevzorova YA. c-MYC-Making Liver Sick: Role of c-MYC in Hepatic Cell Function, Homeostasis and Disease. *Genes (Basel)*. 2017 Apr 19;8(4).
- 37- Kahng YS, Lee YS, Kim BK, Park WS, Lee JY, Kang CS. Loss of heterozygosity of chromosome 8p and 11p in the dysplastic nodule and hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol Hepatol*. 2003 Apr;18(4):430-6.
- 38- Kakar S, Chen X, Ho C, Burgart LJ, Adeyi O, Jain D, Sahai V, Ferrell LD. Chromosomal abnormalities determined by comparative genomic hybridization are helpful in the diagnosis of atypical hepatocellular neoplasms. *Histopathology*. 2009 Aug;55(2):197-205.
- 39- 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.
- 40- Shiraha H, Yamamoto K, Namba M. Human hepatocyte carcinogenesis (review). *Int J Oncol*. 2013;42(4):1133-8.
- 41- Bupathi M, Kaseb A, Meric-Bernstam F, Naing A. Hepatocellular carcinoma: Where there is unmet need. *Mol Oncol*. 2015 Oct;9(8):1501-9.
- 42- Monga SP. β -Catenin Signaling and Roles in Liver Homeostasis, Injury, and Tumorigenesis. *Gastroenterology*. 2015 Jun;148(7):1294-310.
- 43- Kondoh N, Wakatsuki T, Hada A, Shuda M, Tanaka K, Arai M, Yamamoto M. Genetic and epigenetic events in human hepatocarcinogenesis. *Int J Oncol*. 2001 Jun;18(6):1271-8.
- 44- Sakamoto M, Effendi K, Masugi Y. Molecular diagnosis of multistage hepatocarcinogenesis. *Jpn J Clin Oncol*. 2010 Sep;40(9):891-6.
- 45- Geng M, Xin X, Bi LQ, Zhou LT, Liu XH. Molecular mechanism of hepatitis B virus X protein function in hepatocarcinogenesis. - *World J Gastroenterol*. 2015 Oct 14;21(38):10732-8.
- 46- Kew MC. Aflatoxins as a cause of hepatocellular carcinoma. *J Gastrointest Liver Dis*. 2013 Sep;22(3):305-10.
- 47- Venepalli NK, Goff L. Targeting the HGF-cMET Axis in Hepatocellular Carcinoma. *Int J Hepatol*. 2013; 2013:341636.

- 48- Matsuda Y, Ichida T, Matsuzawa J, Sugimura K, Asakura H. p16(INK4) is inactivated by extensive CpG methylation in human hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology*. 1999;116(2): 394-400.
- 49- Tremosini S, Forner A, Boix L, et al. Prospective validation of an immunohistochemical panel (glypican 3, heat shock protein 70 and glutamine synthetase) in liver biopsies for diagnosis of very early hepatocellular carcinoma. *Gut*. 2012 Oct;61(10):1481-7.
- 50- Di Tommaso L, Destro A, Seok JY, 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.
- 51- Lo RC, Ng IO. Hepatocellular tumors: immunohistochemical analyses for classification and prognostication. *Chin J Cancer Res*. 2011 Dec;23(4):245-53.
- 52- Newsholme P, Procopio J, Lima MMR, Pithon-Curi TC, Curi R. Glutamine and glutamate - their central role in cell metabolism and function. *Cell Biochem Funct*. 2003; 21:1-9.
- 53- Bioulac-Sage P, Rebouissou S, Thomas C, et al. Hepatocellular adenoma subtype classification using molecular markers and Immunohistochemistry. *Hepatology* 2007; 46:740-8.
- 54- Long J, Wang H, Lang Z, et al. Expression level of glutamine synthetase is increased in hepatocellular carcinoma and liver tissue with cirrhosis and chronic hepatitis B. *Hepatol Int*. 2011 Jun;5(2):698-706.
- 55- Joo M, Chi JG, Lee H. Expressions of HSP70 and HSP27 in hepatocellular carcinoma. *J Korean Med Sci*. 2005 Oct;20(5):829-34.
- 56- Lim SO, Park SG, Yoo JH, et al. Expression of heat shock proteins (HSP27, HSP60, HSP70, HSP90, GRP78, GRP94) in hepatitis B virus-related hepatocellular carcinomas and dysplastic nodules. *World J Gastroenterol*. 2005 Apr 14;11(14):2072-9.
- 57- Gabai VL, Sherman MY. Interplay between molecular chaperones and signaling pathways in survival of heat shock. *J Appl Physiol*. 2002; 92:1743-8.
- 58- Roncalli M, Park YN, Di Tommaso L. Histopathological classification of hepatocellular carcinoma. *Dig Liver Dis*. 2010 Jul;42 Suppl 3:S228-34.
- 59-Bioulac-Sage P, Cubel G, Balabaud C, et al. Revisiting the pathology of resected benign hepatocellular nodules using new immunohistochemical markers. *Semin Liver Dis*. 2011; 31:91-103.

- 60- Tan PS, Nakagawa S, Goossens N, Venkatesh A, Huang T, Ward SC, Sun X, Song WM, Koh A, Canasto-Chibuque C, Deshmukh M, Nair V, Mahajan M, Zhang B, Fiel MI, Kobayashi M, Kumada H, Hoshida Y. Clinicopathological indices to predict hepatocellular carcinoma molecular classification. *Liver Int.* 2016 Jan;36(1):108-18.
- 61- Goossens N, Sun X, Hoshida Y. Molecular classification of hepatocellular carcinoma: potential therapeutic implications. *Hepat Oncol.* 2015;2(4):371-379.
- 62- Alexander J, Torbenson M, Wu TT, Yeh MM. Non-alcoholic fatty liver disease contributes to hepatocarcinogenesis in non-cirrhotic liver: a clinical and pathological study. *J Gastroenterol Hepatol.* 2013 May;28(5):848-54.
- 63- Giannini EG, Marengo S, Bruzzone L, Savarino V, et al. Hepatocellular carcinoma in patients without cirrhosis in Italy. *Dig Liver Dis.* 2013 Feb;45(2):164-9.
- 64- Adam AC, Faudou V, Paschen SA, et al. Hepatocarcinogenesis in non-cirrhotic liver is associated with a reduced number of clonal hepatocellular patches in non-tumorous liver parenchyma. *J Pathol.* 2012 Nov;228(3):333-40.
- 65- Trevisani F, Frigerio M, Santi V, Grignaschi A, Bernardi M. Hepatocellular carcinoma in non-cirrhotic liver: a reappraisal. *Dig Liver Dis.* 2010 May;42(5):341-7.
- 66- Ascha MS, Hanouneh IA, Lopez R, Tamimi TA, Feldstein AF, Zein NN. The incidence and risk factors of hepatocellular carcinoma in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology.* 2010 Jun;51(6):1972-8.
- 67- Tokushige K, Hashimoto E, Kodama K. Hepatocarcinogenesis in non-alcoholic fatty liver disease in Japan. *J Gastroenterol Hepatol.* 2013 Dec;28 Suppl 4:88-92.
- 68- Zoller H, Tilg H. Nonalcoholic fatty liver disease and hepatocellular carcinoma. *Metabolism.* 2016 Aug;65(8):1151-60.
- 69- Streba LA, Vere CC, Rogoveanu I, Streba CT. Nonalcoholic fatty liver disease, metabolic risk factors, and hepatocellular carcinoma: an open question. *World J Gastroenterol.* 2015 Apr 14;21(14):4103-10.
- 70- Weiskirchen R, Tacke F. Immune surveillance of liver cancer in non-alcoholic fatty liver disease: excess lipids cause CD4 T-cells loss and promote hepatocellular carcinoma development. *Hepatobiliary Surg Nutr.* 2016 Oct;5(5):433-437.

- 71- Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults. Executive Summary of The Third Report of The National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, And Treatment of High Blood Cholesterol In Adults (Adult Treatment Panel III). *JAMA*. 2001 May 16;285(19):2486-97.
- 72- Bertuccio P, Turati F, Carioli G, Rodriguez T, La Vecchia C, Malvezzi M4, Negri E. Global trends and predictions in hepatocellular carcinoma mortality. *J Hepatol*. 2017 Mar 21. pii: S0168-8278(17)30145-9.
- 73- Schütte K, Bornschein J, Malfertheiner P. Hepatocellular carcinoma-epidemiological trends and risk factors. *Dig Dis*. 2009;27(2):80-92.
- 74- Altekruse SF, McGlynn KA, Reichman ME. Hepatocellular carcinoma incidence, mortality, and survival trends in the United States from 1975 to 2005. *Clin Oncol*. 2009 Mar 20;27(9):1485-91.
- 75- Charlton MR, Burns JM, Pedersen RA, Watt KD, Heimbach JK, Dierkhising RA. Frequency and outcomes of liver transplantation for nonalcoholic steatohepatitis in the United States. *Gastroenterology*. 2011 Oct;141(4):1249-53.
- 76- Neuschwander-Tetri BA. Fatty liver and the metabolic syndrome. *Curr Opin Gastroenterol*. 2007 Mar;23(2):193-8.
- 77- Lewis JR, Mohanty SR. Nonalcoholic fatty liver disease: a review and update. *Dig Dis Sci*. 2010 Mar;55(3):560-78.
- 78- Yu AS, Keeffe EB. Elevated AST or ALT to nonalcoholic fatty liver disease: accurate predictor of disease prevalence? *Am J Gastroenterol*. 2003 May;98(5):955-6.
- 79- Mohamad B, Shah V, Onyshchenko M, Elshamy M, Aucejo F, Lopez R, Hanounieh IA, Alhaddad R, Alkhouri N. Characterization of hepatocellular carcinoma (HCC) in non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) patients without cirrhosis. *Hepatol Int*. 2016 Jul;10(4):632-9.
- 80- Schütte K, Schulz C, Poranzke J, Antweiler K, Bornschein J, Bretschneider T, Arend J, Rieke J, Malfertheiner P. Characterization and prognosis of patients with hepatocellular carcinoma (HCC) in the non-cirrhotic liver. *BMC Gastroenterol*. 2014 Jul 3; 14:117.
- 81- Tian Y, Wong VW, Wong GL, Yang W, Sun H, Shen J, Tong JH, Go MY, Cheung YS, Lai PB, Zhou M, Xu G, Huang TH, Yu J, To KF, Cheng AS, Chan HL. Histone Deacetylase HDAC8 Promotes Insulin Resistance and β -Catenin Activation in

NAFLD-Associated Hepatocellular Carcinoma. *Cancer Res.* 2015 Nov 15;75(22):4803-16.

82- Tian Y, Mok MT, Yang P, Cheng AS. Epigenetic Activation of Wnt/ β -Catenin Signaling in NAFLD-Associated Hepatocarcinogenesis. *Cancers (Basel)*. 2016 Aug 20;8(8).

83- Tsujikawa H, Masugi Y, Yamazaki K, Itano O, Kitagawa Y, Sakamoto M. Immunohistochemical molecular analysis indicates hepatocellular carcinoma subgroups that reflect tumor aggressiveness. *Hum Pathol.* 2016 Apr;50:24-33.

84- Zhang B, Liu K, Zhang J, Dong L, Jin Z, Zhang X, Xue F, He J. Glutamine synthetase predicts adjuvant TACE response in hepatocellular carcinoma. - *Int J Clin Exp Med.* 2015 Nov 15;8(11):20722-31.

8. Apêndices

8.1. Protocolo da técnica de imuno-histoquímica do Laboratório do Departamento de Anatomia Patológica da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP:

Primeira etapa: **desparafinização**.

- Mergulhar as lâminas na seqüência: Xilol I, Xilol II e Xilol III por 10 minutos cada, em temperatura ambiente;
- Álcool absoluto I, II, III (80%, 50% e 50%, respectivamente) em temperatura ambiente. Fazer várias lavagens de aproximadamente 30 segundos cada;
- Lavar em água corrente (5 minutos) e passar em água destilada;
- Bloqueio de peroxidase endógena: Incubar com 3 banhos de imersão de 5 minutos cada, em temperatura ambiente em H_2O_2 10 volumes;
- Lavagem em água corrente e destilada (5 minutos);
- Colocar em panela a vapor em tampão tris-EDTA ph 8,9 por 30 minutos a 95°C ou tampão citrato ph 6,0; Dependendo do marcador usa-se pepsina a 4%;
- Deixar esfriar por no mínimo 15 minutos;
- Lavar por 5 minutos em água destilada.
- Deixar as lâminas mergulhadas em PBS;
- Secar as lâminas com papel filtro, tomando cuidado para não danificar o fragmento;
- Pingar os anticorpos primários específicos, previamente diluídos em albumina Bovina. Incubar em câmara úmida durante 30 minutos a 37°C.
- Colocar na geladeira: *overnight*.

Segunda etapa: **coloração**.

- Retirar as lâminas da incubação com o anticorpo primário e fazer 3 lavagens em PBS de 5 minutos cada, a temperatura ambiente;
- Secar com papel de filtro e pingar o sistema de visualização;
- Sistema utilizado em nosso estudo: *Advance (Leica Biosystems)*;
- Incubar por 30 minutos a temperatura ambiente;

- Usar DAB líquido na proporção de 1,0 ml do tampão DAB para 1 gota do cromógeno. Homogeneizar e pingar sobre os cortes até que comece corar, então mergulhe a lâmina em água destilada fresca;
- Lavar em água corrente e passar água destilada;
- Contra corar com hematoxilina de Mayer;
- Passar por alguns segundos em água amoniacal;
- Lavar em água destilada;
- Desidratar, diafanizar e montar a lâmina / lamínula com Entellan.

8.2. Dados principais da casuística

Grupo A: fígados cirróticos

Sexo	Idade	T > lesão	Sorologias	SM	GH (WHO)
M	55	3,0 cm	VHC	não	1 (BD)
M	55	4,0 cm	VHC	não	2 (MD)
M	51	0,7 cm	VHC	sim	2 (MD)
M	63	3,3 cm	VHC	não	2 (MD)
M	57	2,1 cm	negativa	não	2 (MD)
M	45	2,2 cm	VHC	não	2 (MD)
M	54	2,0 cm	VHB + HIV + sífilis	não	1 (BD)
M	66	3,2 cm	VHC + sífilis	não	1 (BD)
M	53	3,2 cm	negativa	não	2 (MD)
F	46	2,8 cm	VHB	não	2 (MD)
F	42	2,1 cm	negativa	não	2 (MD)
M	52	3,5 cm	VHC	não	2 (MD)
M	61	6,7 cm	VHC	não	2 (MD)
M	65	2,5 cm	VHC	sim	2 (MD)
M	55	2,5 cm	VHC	sim	1 (BD)
M	70	2,5 cm	VHC	não	2 (MD)
M	58	3,0 cm	VHC	não	2 (MD)
F	67	3,5 cm	VHC	sim	2 (MD)
M	56	2,5 cm	VHC	não	2 (MD)
M	58	4,0cm	negativa	não	2 (MD)
M	59	3,5cm	VHC	não	2 (MD)
F	65	5,0cm	VHC	não	3 (MD)
M	56	2,3cm	negativa	sim	3 (MD)
M	56	5,5cm	VHC	não	2 (MD)
M	64	1,6 (10 lesões)	VHC	não	2 (MD)

Grupo B: fígados não cirróticos

Sexo	Idade	T > lesão	Sorologias	SM	GH (WHO)
M	42	5,5 cm	negativa	não	2 (MD)
F	41	2,8 cm	negativa	sim	2 (MD)
M	45	4,0 cm	negativa	sim	2 (MD)
M	54	3,5 cm	negativa	sim	2 (MD)
M	38	2,5 cm	negativa	não	2 (MD)
M	47	2,8 cm	negativa	sim	3 (MD)
M	49	3,0 cm	negativa	sim	2 (MD)
F	33	8,2 cm	VHC	não	3 (MD)
M	77	4,5 cm	negativa	sim	2 (MD)
M	61	5,5 cm	negativa	sim	2 (MD)
M	51	12,6 cm	negativa	não	3 (MD)
M	73	20,0 cm	negativa	sim	1 (BD)
F	42	1,8 cm	negativa	sim	2 (MD)
M	71	2,0 cm	negativa	não	1 (BD)
M	52	7,5 cm	negativa	não	2 (MD)
M	73	5,5 cm	negativa	sim	2 (MD)
M	62	2,0 cm	VHC	não	1 (BD)
M	58	6,0 cm	negativa	não	1 (BD)
F	31	11,0 cm	negativa	sim	3 (MD)
M	55	5,0 cm	negativa	não	2 (MD)
F	62	6,5 cm	negativa	sim	2 (MD)
M	50	12,5	negativa	não	2 (MD)
M	68	7,0cm	VHC	sim	2 (MD)
M	63	5,5cm	negativa	não	1 (BD)
F	57	3,8	VHC	não	2 (MD)

Legenda:


SM: Síndrome Metabólica.

GH (WHO): Grau histológico (*World Health Organization*).

9. Anexos

9.1. Aspectos éticos: aprovação do CEP

Início do estudo após parecer de aprovação do projeto de pesquisa pelo Comitê de Ética da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, através da Plataforma Brasil. Número do parecer: 556.827.

FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS - UNICAMP (CAMPUS CAMPINAS)											
PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP											
DADOS DO PROJETO DE PESQUISA Título da Pesquisa: Avaliação da expressão de biomarcadores relacionados à hepatocarcinogênese em fígados cirróticos e não cirróticos, através de estudo imuno-histoquímico. Pesquisador: Vanderlei Segatelli Área Temática: Versão: 1 CAAE: 26787014.5.0000.5404 Instituição Proponente: Hospital de Clínicas - UNICAMP Patrocinador Principal: Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP											
DADOS DO PARECER Número do Parecer: 556.827 Data da Relatoria: 25/02/2014 Apresentação do Projeto: Neste projeto propõe-se avaliar e comparar a imunoexpressão de marcadores biológicos, por meio de estudo imuno-histoquímico de carcinomas hepatocelulares (CHC) originados em fígados cirróticos e não cirróticos. Para isso, serão selecionados quarenta (40) blocos de parafina arquivados no Departamento de Anatomia Patológica da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, entre 2009 e 2013, relativos a pacientes com diagnóstico de CHC clássico, diagnosticados em produtos de ressecção cirúrgica: nodulectomia, hepatectomia total (transplantes) ou parcial; independentemente do fator etiológico, sexo, cor, idade ou grupo étnico, divididos em dois grupos: Grupo A: vinte (20) casos de pacientes com carcinoma hepatocelular e cirrose; Grupo B: vinte (20) casos de pacientes com carcinoma hepatocelular sem cirrose. As informações clínicas e características macroscópicas dos casos serão obtidas a partir dos prontuários dos pacientes e laudos anatomopatológicos. Para os dois grupos designados acima serão realizados tissue microarrays (TMAs) para estudo microscópico das características morfológicas e análise imuno-histoquímica com os seguintes anticorpos: Citoqueratinas 7 e 19, HSP70, Glipican 3, Glutamina-sintetase, p53, c-MET, HGF, CD133, p16 e Beta-catenina. Nos espécimes de TMAs emblocados em parafina, selecionados para este estudo, serão realizados cortes histológicos de 3 a 4 µm de espessura. Posteriormente, tais cortes serão submetidos ao											
<table style="width: 100%; border: none;"> <tr> <td style="border: none;">Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126</td> <td style="border: none;">CEP: 13.083-887</td> </tr> <tr> <td style="border: none;">Bairro: Barão Geraldo</td> <td style="border: none;"></td> </tr> <tr> <td style="border: none;">UF: SP</td> <td style="border: none;">Município: CAMPINAS</td> </tr> <tr> <td style="border: none;">Telefone: (19)3521-8936</td> <td style="border: none;">Fax: (19)3521-7187</td> </tr> <tr> <td colspan="2" style="border: none;">E-mail: cep@fcm.unicamp.br</td> </tr> </table>		Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126	CEP: 13.083-887	Bairro: Barão Geraldo		UF: SP	Município: CAMPINAS	Telefone: (19)3521-8936	Fax: (19)3521-7187	E-mail: cep@fcm.unicamp.br	
Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126	CEP: 13.083-887										
Bairro: Barão Geraldo											
UF: SP	Município: CAMPINAS										
Telefone: (19)3521-8936	Fax: (19)3521-7187										
E-mail: cep@fcm.unicamp.br											

FACULDADE DE CIÊNCIAS
MÉDICAS - UNICAMP
(CAMPUS CAMPINAS)



Continuação do Parecer: 556.827

método de imunohistoquímica, segundo o protocolo do Laboratório de Imuno-histoquímica do Departamento de Anatomia Patológica da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP.

Objetivo da Pesquisa:

Avaliar e comparar a imunexpressão de marcadores biológicos, por meio de estudo imuno-histoquímico de carcinomas hepatocelulares (CHC) originados em fígados cirróticos e não cirróticos.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Não há riscos ou benefícios para participantes, uma vez que o estudo utilizará tecido hepático já incluído em blocos de parafina e que fazem parte do arquivo da Anatomia Patológica do HC-UNICAMP. Os benefícios mencionados pelo pesquisador estão restritos aos conhecimentos que serão gerados pelo estudo.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

No projeto de pesquisa, propõe-se dispensa do TCLE, justificando-se que o estudo será realizado utilizando material biológico já colhido (tecido hepático já incluído em blocos de parafina) e mantido no arquivo da Anatomia Patológica do HC-UNICAMP.

"Este trabalho representa um estudo retrospectivo, utilizando cortes histológicos de tecidos humanos fixados em formalina e incluídos em blocos de parafina, arquivados no Departamento de Anatomia Patológica do HC/UNICAMP, provenientes de procedimento terapêutico cirúrgico (transplante) de pacientes diagnosticados com carcinoma hepatocelular. As identidades dos pacientes não serão divulgadas em momento algum, nem quaisquer características que possam identificá-los, mantendo-se rigoroso sigilo sobre os mesmos. Após a utilização dos blocos de parafina e prontuários, os mesmos serão devolvidos aos respectivos arquivos hospitalares, respeitando-se todos os direitos pertinentes aos pacientes. Declaramos que todos os dados obtidos serão utilizados para finalidade prevista no protocolo da pesquisa. Também declaramos o comprometimento a informar o paciente (ou familiar) na eventualidade da existência de algum novo dado decorrente deste projeto de pesquisa que possa de alguma forma, modificar seu prognóstico, tratamento ou que tenha implicações para seus familiares."

O pesquisador justifica o estudo na possibilidade de se encontrar diferenças nos padrões de imunexpressão de biomarcadores associados à hepatocarcinogênese entre carcinomas hepatocelulares que se originaram em fígados com doença hepática crônica e evolução para cirrose e carcinomas hepatocelulares que se originaram em fígados sem cirrose. Informa, ainda, que estudos semelhantes são escassos na literatura científica mundial e ausentes em nosso país.

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
Bairro: Barão Geraldo **CEP:** 13.083-887
UF: SP **Município:** CAMPINAS
Telefone: (19)3521-8936 **Fax:** (19)3521-7187 **E-mail:** cep@fcm.unicamp.br

FACULDADE DE CIÊNCIAS
MÉDICAS - UNICAMP
(CAMPUS CAMPINAS)



Continuação do Parecer: 556.827

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Foram apresentados:

1. Folha de rosto assinada pela coordenadora de assistência do Hospital de Clínicas da UNICAMP, Dra Antônia Teresinha Tresoldi e pelo pesquisador responsável. HC-UNICAMP indicado como instituição indicada como proponente;
2. Formulário da Plataforma Brasil preenchido com as informações básicas sobre o projeto.
3. Projeto completo.
4. Arquivo pdf denominado dispensa TCLE" justificando a solicitação de dispensa do TCLE.
5. Arquivo pdf denominado autorização departamento anatomia patológica."

Recomendações:

1. Recomenda-se dispensa do TCLE
2. No cronograma, observar que o início do estudo somente poderá ser realizado após aprovação pelo CEP, conforme compromisso do pesquisador com a resolução 446/12 CNS/MS.
3. Ao pesquisador cabe desenvolver o projeto conforme delineado, elaborar e apresentar os relatórios parciais e final, bem como encaminhar os resultados para publicação, com os devidos créditos aos pesquisadores associados e ao pessoal técnico participante do projeto (resolução 446/12).
4. Em estudos retrospectivos, caso o pesquisador encontre dados que possam modificar o prognóstico ou tratamento dos sujeitos de pesquisa, recomenda-se que tais informações sejam transmitidas aos participantes e/ou anexadas ao prontuário para conhecimento da equipe clínica.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não há inadequações.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Apresentar a este CEP, oportunamente, os relatórios parciais e final de atividades referentes ao presente projeto.

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
Bairro: Barão Geraldo **CEP:** 13.083-887
UF: SP **Município:** CAMPINAS
Telefone: (19)3521-8936 **Fax:** (19)3521-7187 **E-mail:** cep@fcm.unicamp.br

FACULDADE DE CIENCIAS
MEDICAS - UNICAMP
(CAMPUS CAMPINAS)



Continuação do Parecer: 556.827

CAMPINAS, 14 de Março de 2014

Assinador por:
Fátima Aparecida Bottcher Luiz
(Coordenador)

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
Bairro: Barão Geraldo **CEP:** 13.083-887
UF: SP **Município:** CAMPINAS
Telefone: (19)3521-8936 **Fax:** (19)3521-7187 **E-mail:** cep@fcm.unicamp.br

**9.2. Autorização para uso do acervo didático-científico do
Departamento de Anatomia Patológica FCM-UNICAMP**



AUTORIZAÇÃO

Autorizo o aluno Vanderlei Segatelli, regularmente matriculado no Curso de Pós-graduação em Ciências Médicas, orientado pela Profa. Dra. Cecilia A. F. Escanhoela, a retirar blocos e lâminas do Acervo Didático Científico do Departamento de Anatomia Patológica – FCM, tendo como finalidade o desenvolvimento do projeto de Doutorado, intitulado “*Avaliação da expressão de biomarcadores relacionados à hepatocarcinogênese em fígados cirróticos e não cirróticos, através de estudo imuno-histoquímico*”.

Campinas, 14 de janeiro de 2014


Profa. Dra. Patrícia Sabino de Matos
Chefe do Departamento de Anatomia Patológica
FCM/UNICAMP