Aloísio Souza Felipe da Silva

**Análise da expressão de EGFR e proteínas relacionadas em
carcinoma hepatocelular, tecido hepático circunjacente e
metástases : estudo clínico-patológico em autópsias**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do título
de Doutor em Ciências

Programa de Patologia

Orientador: Prof. Dr. Venâncio Avancini Ferreira Alves

São Paulo

2013

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Silva, Aloísio Souza Felipe da

Análise da expressão de EGFR e proteínas relacionadas em carcinoma hepatocelular,
tecido hepático circunjacente e metástases : estudo clínico-patológico em autópsias /
Aloísio Souza Felipe da Silva. -- São Paulo, 2013.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Patologia.

Orientador: Venâncio Avancini Ferreira Alves.

Descritores: 1.Receptor do fator de crescimento epidérmico 2.Carcinoma
hepatocelular 3.Autópsia 4.Metástase 5.Cirrose hepática

USP/FM/DBD-081/13

Aos meus pais, José Luis e Maria Cristina (in memorian)
A minha esposa Leika e nossos filhos Aline, Alberto e Leila
Aos meus sogros Tadakatsu e Yatiyo

Agradecimentos

Aos familiares e médicos assistentes dos pacientes deste estudo, que certamente em um momento difícil optaram pelo conhecimento, pela generosidade e pela busca da verdade.

Ao Prof. Dr. Venâncio Avancini Ferreira Alves pela orientação dedicada neste e em outros estudos e questões, há mais de 15 anos. Obrigado pela amizade e pelo exemplo.

À Profa. Dra. Maria Cláudia Nogueira Zerbini, por todo o apoio técnico, pessoal e profissional, pelas lições, exemplos, pelo incansável e valoroso trabalho no HU-USP e pelas sugestões e críticas no exame de qualificação.

A Alda Wakamatsu por todo o suporte impecável em imuno-histoquímica, nas questões administrativas do projeto, e pelas ótimas conversas ao longo do trabalho no LIM-14.

A Cinthya dos Santos Cirqueira pelo suporte e dedicação nas reações de hibridização *in situ*, nas questões administrativas do projeto e pelas discussões técnicas, muito produtivas e educativas.

À Profa. Thais Mauad pelo apoio no acesso ao material de autópsias e pela busca de altos padrões de qualidade no serviço.

Aos Profs. Drs. Evandro Sobroza de Mello e Valéria Lanzoni pelas críticas e sugestões no exame de qualificação.

Ao colega Iberê Cauduro Soares pelos ensinamentos na análise das reações de FISH.

Às funcionárias Zilah, Vera e Veluma pela ajuda na localização de relatórios, blocos e lâminas.

Aos amigos e doutores Leonardo Testagrossa, Mônica Stiepcich, Dani Ejzenberg e Tânia Bignardi pelo apoio e pelos importantes ensinamentos de quem já trilhou este caminho.

Às colegas patologistas do HU-USP Silvana Lovisolo e Cristiane Rúbia Ferreira, pelo apoio e conversas sobre a condição de médico pós-graduando do HU-USP.

Às colegas patologistas do HU-USP Fabiana Lima, Angélica Simões e Patrícia Piccirelli pelo apoio e cobertura de escalas que me permitiram caminhar com este trabalho.

Aos amigos Dr. Fernando P. Ferraz de Campos e bibliotecária Maria Alice de França Rangel Rebello, pela paciência e pelo entusiasmo no projeto *Autopsy and Case Reports*.

A Rosa Zanardi pelo apoio com as imagens e documentação.

Aos médicos patologistas e residentes do serviço de autópsias do HCFMUSP, que, com seu trabalho, geraram o material que permitiu a realização deste trabalho.

Aos demais colegas e funcionários do Serviço de Anatomia Patológica de HU-USP e do Setor de Anatomia Patológica do Grupo Fleury, pela paciência e apoio.

Aos meus pais, irmãos e familiares, por todo seu amor, dedicação e incentivo nesta vida.

Ao meu irmão Aníbal, mestre e doutor em Medicina Veterinária e minha prima Fernanda, mestra em Fonoaudiologia, pela amizade e por mostrarem formas de trilhar este caminho.

À minha sogra Yatiyo Miyahara, e meu sogro Tadakatsu Miyahara que, com seu apoio, permitiram as condições para que eu me dedicasse a este projeto.

E, sobretudo, à minha esposa Leika, e nossos filhos Aline, Alberto e Leila, para quem todo sacrifício é suportável.

Agradecimentos institucionais:

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio e fomento ao projeto de pesquisa “Análise da expressão de EGFR e de proteínas relacionadas no carcinoma hepatocelular avançado e tecido hepático circunjacente” (2008/58855-3) realizado entre Dezembro de 2008 e Março de 2011.

Ao Hospital Universitário da Universidade de São Paulo (HU-USP), nas pessoas dos professores Paulo Andrade Lotufo e Sandra Grisi, pela política de incentivo à titulação e à pesquisa.

"Podemos julgar o nosso progresso pela coragem de nossas perguntas e a profundidade de nossas respostas, nossa vontade de abraçar o que é verdadeiro em vez daquilo que nos faz sentir bem."

Carl Sagan (1934-1996)

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

Lista de Abreviaturas

Lista de Tabelas

Lista de Figuras

Resumo

Summary

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Considerações gerais sobre o carcinoma hepatocelular	3
1.1.1	Epidemiologia	3
1.1.2	Fatores de risco	3
1.1.2.1	Cirroze	4
1.1.2.2	Infecção pelo VHB	4
1.1.2.3	Infecção pelo VHC	5
1.1.2.4	Álcool	6
1.1.2.5	Aflatoxina	8
1.1.2.6	Outros fatores	9
1.1.3	Tendências na incidência e mortalidade	10
1.1.4	Sobrevida	12
1.1.5	Tratamento	12
1.2	Considerações gerais sobre o EGFR	14
1.2.1	EGFR: membro da família dos receptores do grupo ErbB / HER	14
1.2.2	EGFR no fígado normal e patológico	17
1.2.3	EGFR como alvo no tratamento do câncer	19
1.3	Papel do EGFR na patogênese do CHC	21
1.3.1	Evidências da importância do EGFR e sua via no CHC	21
1.3.2	Mecanismos de ativação do EGFR em CHC	22
1.4	Patologia do CHC	24
1.4.1	Classificação macroscópica	24
1.4.2	CHC pequeno e CHC precoce	25
1.4.3	Multifocalidade e multicentricidade	26
1.4.4	Padrões de disseminação	27

1.4.5	Grau histológico	28
1.4.6	Variantes histológicas	30
1.5	Aspectos gerais da classificação molecular do CHC	32
2	OBJETIVOS.....	35
2.1	Objetivo Geral.....	37
2.2	Objetivos Específicos.....	37
3	MÉTODOS.....	39
3.1	Ética em Pesquisa	41
3.2	Desenho do Estudo	41
3.3	Casuística	42
3.3.1	Autópsias e revisão de lâminas.....	42
3.3.2	Caracterização geral das autópsias (pré-seleção)	43
3.3.3	Obtenção de dados clínico-laboratoriais	46
3.4	Variáveis Anatomopatológicas.....	47
3.4.1	Peso do fígado	47
3.4.2	Cirrose.....	47
3.4.3	Número e tamanho dos nódulos	47
3.4.4	Padrão macroscópico.....	48
3.4.5	Grau histológico	48
3.4.6	Variantes histológicas	48
3.4.7	Padrão arquitetural.....	49
3.4.8	Invasão de grandes veias	49
3.4.9	Metástase à distância ou extra-hepática	49
3.5	Micromatrizes teciduais (TMA)	49
3.6	Reações imuno-histoquímicas.....	51
3.7	Avaliação das reações imuno-histoquímicas	55
3.7.1	Avaliação da expressão de EGFR e sistema de escore	55
3.7.2	Demais anticorpos.....	56
3.7.3	Avaliação imuno-histoquímica do tecido hepático não tumoral e elementos não hepatocitários.....	57
3.7.4	Grupo controle para expressão de EGFR	57
3.7.5	Análise de heterogeneidade.....	58

3.8	Reações de hibridização <i>in situ</i>	58
3.8.1	CISH.....	58
3.8.2	FISH.....	59
3.9	Análise Estatística.....	60
4	RESULTADOS.....	63
4.1	Dados epidemiológicos e anatomopatológicos gerais	65
4.2	Correlações clínico-patológicas na série de autópsias	72
4.3	Segregação de grupos com possíveis comportamentos biológicos ou fatores etiológicos distintos	76
4.3.1	CHC em mulheres	76
4.3.2	CHC em fígado não cirrótico	76
4.3.3	CHC em adultos jovens.....	78
4.3.4	CHC pequeno.....	78
4.4	Resultados da análise imuno-histoquímica.....	79
4.4.1	Análise preliminar dos padrões de reatividade de anticorpos anti-EGFR em CHC e tecido circunjacente	79
4.4.2	Marcadores com baixa expressão ou resultado negativo... ..	85
4.4.3	Padrões de reatividade geral dos anticorpos em CHC, metástases e tecido não tumoral.....	87
4.4.4	Imunomarcagem de EGFR e variáveis anatomopatológicas.....	96
4.4.5	EGFR, proliferação, apoptose e quinases.....	101
4.4.6	Associações entre os marcadores de perfil molecular e de vias de sinalização em CHC.....	104
4.4.7	Comparação da expressão dos marcadores nos tumores hepáticos e nas respectivas metástases extra-hepáticas (Avaliação da heterogeneidade entre os tumores de um mesmo paciente).....	106
4.4.8	Análise das proteínas relacionadas à sinalização intracelular pelo EGFR e marcadores relacionados à biologia do CHC em portadores de infecção pelo VHC.....	108
4.4.9	Avaliação do tecido não tumoral e associações às características do tumor e de disseminação.....	111
5	DISCUSSÃO	115
6	CONCLUSÕES	135

7	ANEXOS	141
7.1	Anexo A - Protocolos de padronização de hibridização <i>in situ</i>	143
7.2	Anexo B - Distribuição dos diferentes marcadores de acordo com o grau histológico.....	151
8	REFERÊNCIAS	153

LISTA DE ABREVIATURAS

AKT	Proteína quinase AKT
AP-1	Fator de transcrição AP-1 (“activator protein 1”)
AR	Anfirregulina
ATP	Adenosina trinucleotídeo fosfato
BcatM	Beta-catenina de membrana
BcatN	Beta-catenina nuclear
CAPPesq	Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa
Casp3	Caspase 3
CCND1	Gene CCND1 (ciclina D1)
CD8+	CD8 (“cluster of differentiation 8”) positivas
<i>c-fos</i>	Fator transcrição c-fos
CHC	Carcinoma hepatocelular
CID	Classificação internacional de doenças
CISH	Hibridização <i>in situ</i> cromogênica
<i>c-jun</i>	Fator transcrição c-jun
CK19	Queratina 19
CKD1	Ciclina D1
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DP	Desvio padrão
EGF	Fator de crescimento epidérmico (do inglês)

EGFR	Receptor do fator de crescimento epidérmico (do inglês)
ErbB / HER	Gene ErbB / HER
ERK	“Extracellular signal-regulated kinases”
FISH	Hibridização <i>in situ</i> por fluorescência
FMUSP	Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
Grb2	“Growth fator receptor-bound protein 2”
HB-EGF	Fator de crescimento EGF-símile ligado a heparina (do inglês)
HCFMUSP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP
HGF	Fator de crescimento hepatocitário
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
HR	Herregulina
IGF	Fator de crescimento semelhante a insulina
JNK	“c-jun NH ₂ -terminal protein kinase”
Kb	kilobase
LIM-14	Laboratório de investigação médica 14
MAPK	“Mitogen-Activated Protein Kinase”
Met	Receptor Met
mRNA	RNA mensageiro
MTA1	“Manual Tissue Microarrayer”
myc	Fator de transcrição myc
n.s.	não significativa
NASH	Esteatohepatite não alcoólica (do inglês)

pH	Potencial hidrogeniônico
Raf	Proteína Raf (do inglês “Rapidly Accelerated Fibrosarcoma”)
Ras	Proteína Ras (do inglês “Rat sarcoma”)
Shc	“Src homology and collagen homology protein”
SOS	“Son of sevenless protein”
SSC	Tampão salina-sódio citrato (do inglês)
TGF α	Fator de transformação de crescimento alfa (do inglês)
TGF- β	Fator de transformação de crescimento beta (do inglês)
TMA	Micromatrizes teciduais (do inglês)
<i>v-erbB</i>	vírus da eritroblastose aviária
VHB	Vírus da hepatite B
VHC-	Sorologia para vírus da hepatite C negativa
VHC	Vírus da hepatite C
VHC+	Sorologia para vírus da hepatite C positiva
Vim	Vimentina
Wnt	Via Wnt

LISTA DE TABELAS

Tabela 1:	Características dos anticorpos utilizados	53
Tabela 2:	Detalhes das reações imuno-histoquímicas	54
Tabela 3:	Características das sondas de CISH e padronização das reações.....	59
Tabela 4:	Características das sondas de FISH e padronização das reações.....	60
Tabela 5:	Sumário dos dados clínicos e epidemiológicos em 80 autópsias com CHC	66
Tabela 6:	Sumário dos dados anatomopatológicos em 80 autópsias com CHC.....	68
Tabela 7:	Frequência e distribuição de invasão de grandes veias e metástases extra-hepáticas.....	70
Tabela 8:	Grupos com diferenças significativas de peso médio do fígado	72
Tabela 9:	Dados clínico-patológicos selecionados em homens e mulheres.....	73
Tabela 10:	Distribuição de casos com metástases extra-hepáticas segundo variáveis anatomopatológicas.....	75
Tabela 11:	Variáveis anatomopatológicas selecionadas e grau histológico.....	75
Tabela 12:	Distribuição dos casos segundo sexo e faixa etária	79
Tabela 13:	Comparação dos resultados obtidos com os diferentes anticorpos – EGFR em CHC e tecido não tumoral	80
Tabela 14:	Comparação de anticorpos – Escores de expressão de EGFR em CHC intra-hepático	81
Tabela 15:	Resultados dos diferentes marcadores na população geral do estudo.....	88

Tabela 16: Análise da expressão de EGFR por escores em 25 amostras pareadas.....	97
Tabela 17: EGFR em CHC e dados clínico-patológicos principais	99
Tabela 18: Associações entre EGFR, proliferação, apoptose e quinases em CHC	102
Tabela 19: Associações entre EGFR, proliferação, apoptose e quinases em metástases.....	102
Tabela 20: Distribuição dos casos de CHC pelo grau segundo expressão de EGFR, Ag Ki67, caspase 3 e quinases	103
Tabela 21: Associações entre expressão de marcadores biológicos em CHC	105
Tabela 22: Correlação geral de expressão entre CHC hepático e metástases.....	107
Tabela 23: Concordância de expressão entre CHC intra-hepático e metástases.....	107
Tabela 24: Dados clínico-patológicos em cirróticos com CHC em VHC+ e VHC-	109
Tabela 25: Comparação da expressão de marcadores em tecido cirrótico não tumoral versus tecido tumoral (VHC+ e VHC-): casos/total (%)	110
Tabela 26: Distribuição das amostras de tecido não tumoral conforme a população de células perissinusoidais vimentina(+) e proliferação ductular (CK19) – 26 amostras	111
Tabela 27: Associações selecionadas com células perissinusoidais vimentina (+)	112
Tabela 28: Relação entre reação ductular e metástases extra-hepáticas – 26 amostras	112
Tabela 29: Padrões de expressão de EGFR por imuno-histoquímica em lesões hepáticas e fígado normal em humanos:.....	118

LISTA DE FIGURAS

Figura 1:	Distribuição de 648 casos de autópsia pré-selecionados.....	45
Figura 2:	Fluxograma de casos de autópsia incluídos no estudo (2003 a 2009)	45
Figura 3:	Características histológicas (grau e arquitetura).	71
Figura 4:	Variante histológica e disseminação.	71
Figura 5:	Padrões de marcação dos anticorpos anti-EGFR respectivamente nos tecidos tumoral (T), metastático (M) e cirrose (C).....	83
Figura 6:	Padrão de marcação do EGFR (PharmDx) basolateral (A, 400x) e canalicular (B, 400x) em CHC.	84
Figura 7:	Padrão “dot” perinuclear do EGFR (DAK-H1-WT).....	84
Figura 8:	Marcação para MAPKAPK2.	86
Figura 9:	Ausência de marcação para pEGFR(Tyr1173) e Controle positivo ..	86
Figura 10:	Ausência de marcação para Herceptest (HER2) e Controle positivo 3+ (mama).....	86
Figura 11:	Expressão de Ag Ki67.	89
Figura 12:	Expressão de vimentina em componente indiferenciado	89
Figura 13:	Padrão de expressão de CK19.....	90
Figura 14:	Expressão focal de CK19 em componente indiferenciado metastático em pulmão	90
Figura 15:	Padrão de expressão de Caspase 3.	91
Figura 16:	Padrão de expressão de Ciclina D1.	91
Figura 17:	Padrão de expressão de mTOR.	92
Figura 18:	Padrão de expressão de Met.....	92

Figura 19: Padrão de expressão de ERK1.	93
Figura 20: Padrão de expressão de ERK2.	93
Figura 21: Padrão de expressão de p53.....	94
Figura 22: Padrão de expressão de Beta-catenina.	94
Figura 23: Marcação endotelial 3+ de pMAPK em metástase de CHC e Controle interno positivo (glomérulos) no TMA.....	95
Figura 24: Expressão e Hiperexpressão de EGFR em fígado normal, patológico, CHC e metástases.....	97
Figura 25: Imunomarcação de EGFR PharmDx e grau histológico	100
Figura 26: Expressão de EGFR em controles normais.....	100
Figura 27: Reação ductular em fígado circunjacente.....	113
Figura 28: Células vimentina(+) perissinusoidais.	113

RESUMO

Silva ASF. *Análise da expressão de EGFR e proteínas relacionadas em carcinoma hepatocelular, tecido hepático circunjacente e metástases : estudo clínico-patológico em autópsias* [tese] São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2013.

OBJETIVOS: Analisar a expressão de EGFR, proteínas da via de sinalização ou relacionadas aos seus efeitos em carcinoma hepatocelular (CHC) primários, metastáticos e em tecido hepático não tumoral em autópsias. Correlacionar os achados a dados clínico-patológicos e marcadores de classes moleculares. Avaliar a heterogeneidade de expressão em CHC metastáticos e fatores de disseminação extra-hepática.

MÉTODOS: Oitenta autópsias de pacientes com CHC ao exame foram incluídas em estudo retrospectivo transversal. Foram analisados sexo, idade, raça, etilismo, infecção por vírus da hepatite B (VHB) e C (VHC), infecção pelo HIV, tratamento prévio, causas básica e imediata de óbito, peso do fígado, cirrose, número e tamanho dos nódulos, padrão macroscópico, grau histológico, variantes histológicas, padrão arquitetural, invasão de grandes veias e metástases extra-hepáticas. Imuno-histoquímica foi realizada em micromatrizes teciduais para pesquisa de EGFR, pEGFR(Tyr 1173), HER2, ERK1/2, MAPKAPK-2, pMAPK, Ag Ki67, caspase 3, citoqueratina 19 (CK19), mTOR, ciclina D1, Met, vimentina, p53 e beta-catenina. A expressão de EGFR foi avaliada em intensidade (0-3+) e distribuição (0-100%) em um sistema de escores de 0 a 300. Hiperexpressão foi definida para escores ≥ 200 . Amostras de fígado normal foram incluídas como controles. Amostras de CHC primário foram pareadas às suas metástases e consideradas concordantes quando na mesma categoria de expressão. No tecido não tumoral foram semi-quantificadas a reação ductular expressando CK19 e a densidade da população de células estromais perissinusoidais pela vimentina. Estatística foi realizada através dos testes do qui-quadrado ou exato de Fisher ao nível de significância de 0,05. Para as correlações de escores e variáveis categóricas foi utilizado o coeficiente de Spearman.

RESULTADOS: Foram incluídos 62 casos do sexo masculino e 18 do sexo feminino ($58,1 \pm 10,9$ anos). Infecção pelo VHC foi a principal causa em 49% (39/80), seguida por etilismo em 30% (24/80) e infecção por VHB em 19% (15/80). Cirrose foi identificada em 90% (72/80) dos casos. Os tumores mostraram-se avançados em 95% (76/80). Invasão de grandes veias foi detectada em 19% (15/80) e metástases extra-hepáticas em 38% (30/80). MAPKAPK2, pEGFR (Tyr1173) e HER2 tiveram expressão fraca ou ausente. A expressão de EGFR foi mais frequente no fígado não neoplásico (26/26) ($P < 0,05$) – e nos controles normais (8/8) do que nas amostras tumorais primárias (60/75) e nas metástases (12/17). Nenhuma amostra dos controles apresentou hiperexpressão de EGFR, a qual foi mais frequente na cirrose (65% - 17/26) do que nos tumores avançados (36% - 26/72) ($P < 0,05$). EGFR hiperexpresso foi mais frequente nos tumores de grau 1/2 ($P < 0,01$) e

nos casos com menos de quatro nódulos hepáticos ($P = 0,014$). A expressão de EGFR correlacionou-se à expressão de caspase 3 ($P < 0,01$). A expressão das quinases ERK1 e ERK2 foi correlacionada à proliferação celular pelo Ag Ki67 ($P < 0,01$), porém não ao escore de expressão de EGFR. CK19, p53 e beta-catenina nuclear foram correlacionaram-se às lesões de maior grau e a maiores taxas de proliferação celular ($P < 0,01$). Met, EGFR e caspase 3 foram correlacionados a lesões mais diferenciadas. Vimentina teve forte correlação com CK19 ($P < 0,01$). A concordância de expressão entre tumores hepáticos e respectivas metástases variou de 50 a 85%. Para o EGFR foi de 61%. A expressão endotelial 2-3+ de pMAPK foi mais frequente nas metástases ($P = 0,09$). A disseminação extra-hepática foi mais frequente nos casos com baixa densidade de células perissinusoidais positivas para vimentina ($P = 0,054$) e nos casos sem reação ductular no tecido não neoplásico ($P = 0,095$). **CONCLUSÕES:** O EGFR tem papel relevante nas etapas iniciais e intermediárias do CHC, sendo sua expressão reduzida nas formas avançadas. Diferentes classes de CHC podem estar associadas a ativação da via do EGFR. A presente análise imuno-histoquímica ampla parece validar pelo menos dois grupos de CHC que nesta série de autópsias parecem ter sido separados pelo grau histológico. Confirma-se a hiperexpressão das quinases como evento importante na progressão tumoral, porém não necessariamente associada à hiperexpressão de EGFR. A heterogeneidade de expressão entre o CHC primário e suas metástases variou de 15 a 45%.

Descritores: 1.Receptor do Fator de Crescimento Epidérmico 2.Carcinoma Hepatocelular 3.Autópsia 4.Metástase 5.Cirrose Hepática

SUMMARY

Silva ASF. *Analysis of the expression of EGFR and related proteins in hepatocellular carcinoma, surrounding liver tissue and metastases : a clinicopathological study in autopsies*. [thesis] São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2013.

OBJECTIVES: To analyze the expression of EGFR and proteins related to its signaling pathway or to its effects in hepatocellular carcinoma (HCC), metastases and surrounding liver tissue in a series of autopsies. To correlate expression patterns to clinicopathological data and other markers of molecular classification. To assess the heterogeneity of expression in metastatic HCC and factors related to extrahepatic spread. **METHODS:** Eighty autopsies of patients with HCC were included in a cross-sectional retrospective study. We analyzed gender, age, race, alcohol intake, infection with hepatitis B (HBV) and C virus (HCV), HIV infection, prior treatment, basic and immediate causes of death, the weight of the liver, cirrhosis, number and size of nodules, gross pattern, histological grade, histological variants, architectural pattern, invasion of large veins and extrahepatic metastases. Immunohistochemistry was performed on tissue microarrays to survey EGFR, pEGFR(Tyr 1173), HER2, ERK1/2, MAPKAPK-2, pMAPK, Ag Ki67, caspase 3, cytokeratin 19 (CK19), mTOR, cyclin D1, Met, vimentin, p53 and beta-catenin. EGFR expression was evaluated in intensity (0-3+) and distribution of membrane staining (0-100%) in a 0 – 300 score. Overexpression was defined for scores ≥ 200 . Normal liver samples were included as controls. Intra-hepatic HCC samples were matched to their respective metastases and expression was considered concordant when they were assigned to the same category. Ductular reaction expressing CK19 and the density of perisinusoidal vimentin positive stromal cells were semi-quantified in non-tumor tissue. Statistics was performed using the chi-square or Fisher exact test at a significance level of 0.05. For the correlations of scores and categorical data we used the Spearman coefficient. **RESULTS:** Sixty-two males and eighteen females were included (age 58.1 ± 10.9). HCV was the major cause in 49% (39/80), followed by alcoholism in 30% (24/80) and HBV infection in 19% (15/80). Cirrhosis was identified in 90% (72/80) and advanced tumors in 95% (76/80). Large vein invasion was detected in 19% (15/80) and extra-hepatic metastases in 38% (30/80). MAPKAPK2, pEGFR (Tyr1173) and HER2 expression were weak or absent. The EGFR expression was more frequent in non-tumoral liver (26/26) ($P < .05$) and in normal controls (8/8) than in primary HCC tumor samples (60/75) and in metastatic HCC (12/17). No samples taken from the controls showed overexpression of EGFR, which was more common in cirrhotic tissue (65% - 17/26) than in advanced tumors (36% - 26/72) ($P < 0.05$). EGFR overexpression was more frequent in grade 1/2 tumors ($P < 0.01$) and in cases with less than four hepatic nodules ($P = 0.014$). EGFR expression was correlated to the expression of caspase 3 ($P < 0.01$). The expression of the kinases ERK1 and ERK2 was correlated to Ag Ki67 cell proliferation index (P

<0.01), but not to the EGFR expression score. CK19, p53 and nuclear beta-catenin were correlated to high grade lesions and to higher rates of cell proliferation ($P < 0.01$). Met, EGFR and caspase 3 were correlated with more differentiated lesions. Vimentin was strongly correlated with CK19 ($P < 0.01$). The concordance of expression between liver tumors and their metastases ranged from 50 to 85% (61% for EGFR). The 2-3+ expression of pMAPK in tumor endothelial cells was more common in metastases ($P = 0.09$). Extrahepatic dissemination was more frequent in cases with low density of vimentin positive perisinusoidal cells ($P = 0.054$) and in cases with no detectable ductular reaction in non-neoplastic tissue ($P = 0.095$).

CONCLUSIONS: EGFR plays an important role in the early and intermediate stages of HCC progression, with lower expression in advanced tumors. Different classes of HCC may be associated with activation of EGFR. The present comprehensive immunohistochemical approach seems to validate at least two molecular classes of HCC, and histological grade seems to be able to discriminate these groups. We herein confirmed overexpression of kinases as a key event in tumor progression, but not necessarily associated with overexpression of EGFR. The heterogeneity of expression between primary HCC and its metastases ranged from 15 to 45%.

Keywords: 1.Epithelial growth factor receptor 2.Hepatocellular Carcinoma 3.Autopsy 4.Metastasis 5.Liver cirrhosis

1 INTRODUÇÃO

1.1 Considerações gerais sobre o carcinoma hepatocelular

1.1.1 Epidemiologia

Atualmente o carcinoma hepatocelular (CHC) é a quinta neoplasia maligna mais frequente no mundo e terceira causa de mortalidade dentre os tumores sólidos (mais de 500 mil mortes por ano).¹ A China isoladamente responde por mais da metade dos casos.² O CHC apresenta incidência crescente nos Estados Unidos e Europa, em virtude da alta prevalência de infecção pelos vírus da hepatite B (VHB) e C (VHC). Além dos novos casos diagnosticados de infecção por VHC, a hepatopatia alcoólica, o diabetes e a obesidade também contribuem para o aumento de incidência no ocidente.³ A América do Sul em geral e o Brasil em particular são considerados regiões de baixa incidência.⁴

1.1.2 Fatores de risco

Os principais fatores de risco para o surgimento do CHC são as infecções pelo VHB e VHC, o consumo de álcool, a exposição à aflatoxina B1, tabagismo, doenças relacionadas à síndrome metabólica (diabetes, obesidade e doença gordurosa de fígado) e a sobrecarga de ferro.⁵

1.1.2.1 Cirrose

A cirrose hepática corresponde a um ou mais estádios muito avançados de várias doenças hepáticas causadas por muitos destes fatores, particularmente as hepatites virais e as alterações metabólicas hepáticas. Os ciclos repetidos de atividade necroinflamatória, regeneração e fibrose aumentam a probabilidade de mutação espontânea e dificultam o reparo do DNA, contribuindo para a carcinogênese^{6,7} Assim, a ocorrência do CHC no contexto da cirrose hepática é a regra geral. No Brasil, levantamento feito por Gonçalves et al mostrou que 71% dos CHC ocorreram associados à cirrose.⁴ Mais recentemente, Carrilho et al mostraram associação entre CHC e cirrose em 98% dos casos em levantamento multicêntrico nacional com 1405 pacientes.⁸

1.1.2.2 Infecção pelo VHB

A infecção pelo VHB é o fator de risco predominante na África subsaariana e no sudeste asiático. Nestas regiões o CHC pode surgir em pacientes jovens, portadores de infecção adquirida durante o parto ou logo após o nascimento, frequentemente em fígado não cirrótico (50 a 75%).⁵

O mecanismo da carcinogênese relacionada ao VHB, embora ainda não completamente conhecido, envolve a integração do DNA viral ao DNA hospedeiro com efeitos diretos e indiretos, além daqueles relacionados à inflamação e cirrose. Embora não seja um oncovírus (uma vez que não apresenta nenhum oncogene em sua sequência de DNA), a integração

direta do VHB ao genoma do hospedeiro, além de contribuir para a persistência viral, parece induzir certa instabilidade genética que confere vantagem de crescimento a algumas populações de hepatócitos no contexto da inflamação crônica. O principal mecanismo indireto envolve a expressão da proteína X da hepatite viral B, uma proteína predominantemente citoplasmática que contribui para a carcinogênese relacionada ao VHB por múltiplos mecanismos que incluem modulação de vias de sinalização celular, transativação de vários genes relacionados ao crescimento celular, inibição da apoptose e resposta celular ao dano do DNA.⁶

1.1.2.3 Infecção pelo VHC

Especialmente no ocidente (Europa e América do Norte) e no Japão, onde predomina a infecção pelo VHC, a maioria dos CHC (70 a 90%) ocorre no contexto do fígado cirrótico.⁹ A infecção pelo VHC é o principal fator de risco no Brasil, associado a 54% dos casos.⁸

Os mecanismos pelos quais o VHC leva ao CHC, embora ainda muito pouco esclarecidos, parecem estar relacionados à instalação da cirrose hepática.¹⁰ Estabelecida a cirrose, a taxa anual de aparecimento de CHC é de 4 a 7%.¹¹ O VHC é um RNA vírus incapaz de se integrar ao genoma do hospedeiro. Todavia, suas proteínas podem interagir com as do hospedeiro de diferentes formas, gerando respostas celulares que potencialmente predisõem à transformação maligna dos hepatócitos. Por exemplo, a proteína do “core” é capaz de mediar alterações nas vias de sinalização

celular do hospedeiro, modular respostas imunológicas, apoptose, estresse oxidativo e metabolismo lipídico.¹² A influência no metabolismo lipídico, que predispõe a esteatose, e no estresse oxidativo nas superfícies do retículo endoplasmático e das mitocôndrias parece ser particularmente importante. Em outro exemplo, a proteína não estrutural NS5A, embora preferencialmente localizada no citoplasma associada ao retículo endoplasmático, pode sofrer alterações pós-translacionais e se deslocar para o núcleo do hospedeiro, agindo como ativador da transcrição. A NS5A pode ainda interagir com várias vias de sinalização do ciclo celular, apoptose e do metabolismo lipídico.¹³

1.1.2.4 Álcool

O álcool (etanol) promove a carcinogênese hepática por via direta (genotóxica) e principalmente indireta, pelo estabelecimento da cirrose alcoólica. O efeito do álcool é dose-dependente, aumentando a partir de 60g/dia e atingindo significância estatística a partir de 80g/dia. Este efeito é independente da idade de início e do tempo de consumo.¹⁴ Adicionalmente, o álcool age de forma sinérgica às hepatites virais, aumentando o risco de CHC em cerca de três a quatro vezes na infecção pelo VHB e em cerca de duas vezes na infecção pelo VHC.¹⁵ Um efeito genotóxico especificamente relacionado ao abuso de álcool, associado à deleção 4q34-q35 e a tumores bem diferenciados foi descrito por Bluteau et al em uma população francesa.¹⁶

De modo geral, o álcool administrado isoladamente não tem efeito carcinogênico em modelos animais.¹⁷ Entretanto, recentemente, demonstrou-se o efeito carcinogênico do álcool em um modelo experimental de alcoolismo em ratos. Nesse modelo, a linhagem de animais foi selecionada por sua preferência em ingerir altas quantidades de álcool em vez de água. O modelo também preencheu outros critérios estabelecidos de alcoolismo e de simulação do comportamento humano. Após 18 meses houve aparecimento de lesões hepáticas macroscópicas, classificadas como CHC bem diferenciados em fígados não cirróticos. Estas lesões associaram-se a ativação de quinases MAPK/ERK, aumento da atividade do citocromo P450 2E1 e aumento do estresse oxidativo intra-hepático.¹⁸

Curiosamente, o risco de desenvolvimento de CHC é maior nos indivíduos que se tornam abstêmios (durante os 10 primeiros anos) do que naqueles que continuam a ingestão alcoólica. Esta observação parece estar relacionada à regeneração hepática desencadeada pela abstinência, que aumentaria o risco de CHC. Por outro lado, os indivíduos que se tornaram abstêmios poderiam ter deixado a ingestão etílica por já apresentar sinais de doença descompensada ou, eventualmente, poderiam ter maior chance de viver mais em relação aos que continuaram a ingestão alcoólica, estando portanto mais expostos ao risco de desenvolverem CHC.¹⁴ Devido à alta prevalência de hepatites virais, sobretudo a infecção pelo VHB na Ásia e África, e VHC no Japão, o papel do álcool nas estatísticas globais parece ficar em segundo plano. Entretanto, alguns estudos epidemiológicos atribuem a maior parte dos casos de CHC no ocidente à alta prevalência de consumo de álcool, atingindo 45% dos casos na Itália e 32% nos Estados Unidos.^{14, 15, 19}

1.1.2.5 Aflatoxina

As aflatoxinas são micotoxinas com potencial carcinogênico produzidas principalmente pelo fungo *Aspergillus flavus*, comum em regiões de clima quente e úmido. O fungo contamina cereais e alimentos secos tais como milho e amendoim, especialmente em más condições de estocagem nos países subdesenvolvidos e em desenvolvimento. Estima-se que o risco populacional atribuído à aflatoxina seja de 17 a 23%.²⁰

Ross et al. demonstraram pela primeira vez uma relação direta entre a exposição dietética à aflatoxina e o desenvolvimento de CHC, principalmente em portadores de infecção pelo VHB. Em coorte prospectiva com mais de 18 mil homens chineses verificou-se, por meio de dosagem urinária de metabólitos da aflatoxina, um risco relativo de 3,8 (intervalo de confiança a 95% 1,2–12,2) para o desenvolvimento de CHC, após ajustes para variáveis de confusão.²¹

O principal mecanismo de carcinogênese hepática relacionado à aflatoxina parece ser uma mutação característica no gene p53. A substituição de uma guanina (G) por uma timina (T) no códon 249 (AGG) do éxon 7 leva a uma substituição da arginina (Arg) por uma serina (Ser) resultando na forma mutante do p53 (249^{Ser}), mais freqüente em CHC.^{22,23} Em nosso meio, esta mutação foi detectada em 28% das amostras de CHC, relacionada a tumores maiores e indiferenciados, e não relacionada a infecção pelo VHB, sugerindo a presença de aflatoxina nos alimentos.^{24,25}

1.1.2.6 Outros fatores

O tabagismo é considerado fator de risco para o desenvolvimento de CHC.⁵ Entretanto, a reconhecida associação entre etilismo e tabagismo em um mesmo estilo de vida, mesmo em diferentes populações, limita a avaliação do tabaco como fator independente em estudos epidemiológicos baseados em entrevistas.²⁶ Mais recentemente uma coorte prospectiva em Singapura, onde a prevalência de ingestão alcoólica é baixa, confirmou um risco relativo aumentado associado ao tabagismo que se mostrou dependente de dose e duração.²⁷

Vários estudos epidemiológicos apontam o diabetes melito, a obesidade e a esteato-hepatite não-alcoólica (do inglês, NASH) como fatores de risco para o CHC. A obesidade é um dos principais fatores de risco para o diabetes melito tipo 2, e ambas as doenças estão fortemente relacionadas à NASH. Observa-se uma alta prevalência destas doenças nos casos de cirrose criptogênica.^{28,29} O desenvolvimento de CHC neste contexto parece estar mais relacionado à cirrose, embora vários casos em fígado não cirrótico sejam descritos.^{30,31} O mecanismo de carcinogênese relacionado à NASH está relacionado à inflamação hepática com maior peroxidação lipídica e estresse oxidativo, que levam à fibrose e cirrose. A hiperinsulinemia seria um fator central, que levaria a maior expressão de fatores de crescimento e consequente estímulo à proliferação celular e inibição da apoptose.³²

O uso de anticoncepcionais orais está fortemente associado ao desenvolvimento de adenomas hepáticos em mulheres jovens.³³ Embora

vários casos de adenomas com áreas de transformação em CHC tenham sido descritos³⁴, uma metanálise mostrou que a associação entre anticoncepcionais orais e CHC é menos evidente, e parece estar mais relacionada ao uso prolongado destas substâncias.³⁵

O CHC é mais comum em homens do que em mulheres, numa proporção global de cerca de 3:1. Este predomínio é maior em regiões onde a incidência é mais alta como África e China, entretanto, há variações entre países e faixas etárias.¹ O predomínio masculino é em grande parte explicado pela maior exposição aos fatores de risco como o álcool e o tabagismo.¹¹ Recentemente, Keng et al demonstraram que a maior frequência do CHC no sexo masculino deve-se em parte a uma maior frequência de tumores com polissomia do cromossomo 7, onde está localizado o gene do receptor de fator de crescimento epidérmico (do inglês EGFR), e que nestes tumores havia hiperexpressão de EGFR. No modelo experimental correspondente, inserções no gene EGFR foram mais frequentes em camundongos machos do que em fêmeas.³⁶

1.1.3 Tendências na incidência e mortalidade

De modo geral tem havido uma queda gradual e recente na incidência e mortalidade de CHC em regiões de incidência alta e intermediária, incluindo China e Japão. Esta queda está sobretudo relacionada a uma redução no número de casos relacionadas à infecção pelo VHB, enquanto

tem havido um aumento no número de casos relacionados à infecção pelo VHC.⁹ Entretanto, o número total global de casos é crescente, em grande parte devido à alta prevalência de infecção pelo VHC. Em vários países ocidentais considerados de baixa incidência, incluídos na América do Norte e Europa, a incidência de CHC é crescente.³⁷ Houve um aumento significativo de até 80% na incidência de CHC nos Estados Unidos nas últimas décadas.^{38,39}

O Brasil é considerado um país de incidência baixa a intermediária com menos de 3,4 casos por 100.000 habitantes-ano.³⁷ Todavia estes dados devem ser vistos com cautela uma vez que estatísticas oficiais de incidência de CHC são limitadas e os registros são frequentemente agrupados na categoria “neoplasia maligna de fígado e vias biliares intra-hepáticas” (CID C22) e possivelmente subnotificados.

Projeta-se para o Brasil um aumento da mortalidade relacionada à infecção por VHC (por todas as causas) até 2021.⁴⁰ De fato, a mortalidade absoluta por câncer de fígado e vias biliares intra-hepáticas em homens mais do que dobrou entre 1979 e 2010. Quando ajustada por idade à população brasileira (população de referência Brasil censo 2000), o aumento foi de 34,8%.⁴¹ Entre as mulheres este aumento não foi observado ou foi muito modesto. Como o CHC é mais comum em homens, estes dados sugerem de forma indireta um aumento na mortalidade por CHC no Brasil. Nos Estados Unidos observou-se um aumento de 41% na mortalidade por CHC entre os períodos de 1981-85 e 1991-95, também mais acentuado entre os homens.³⁸

1.1.4 Sobrevida

A sobrevida geral após o diagnóstico é frequentemente inferior a seis meses e de 5 a 9% em cinco anos¹, pois o CHC apresenta-se frequentemente em estágio avançado, quando as possibilidades terapêuticas são limitadas e dependentes da disponibilidade e da experiência em cada serviço.⁴² Mesmo para tumores pequenos no contexto do fígado cirrótico a sobrevida é inferior a 20% em cinco anos.^{43,44}

Um estudo epidemiológico nos Estados Unidos mostrou um aumento histórico na sobrevida de portadores de CHC de 13% para 22% no primeiro ano e de 2% para 5% em cinco anos, respectivamente entre os períodos de 1977-81 e 1992-96. Entretanto, este aparente aumento se deve principalmente a uma detecção mais precoce em função das melhorias nos meios diagnósticos (viés de antecipação diagnóstica). Nesse estudo, menos de 1% dos pacientes foram submetidos a cirurgia radical, e neste grupo o ganho de sobrevida foi significativo, mostrando que, mesmo atualmente, os principais tratamentos potencialmente curativos para o CHC são a ressecção (ou ablação) completa do tumor ou o transplante hepático.⁴⁵

1.1.5 Tratamento

Procedimentos curativos como excisão local ou transplante hepático são viáveis em apenas uma minoria dos pacientes. As principais restrições à

ressecção cirúrgica são a função hepática comprometida e a multicentricidade das lesões ou recorrências, comuns nos pacientes cirróticos. O transplante hepático é uma importante opção terapêutica para CHC ressecáveis, com bons resultados quando há uma lesão menor que 5 cm ou até 3 lesões menores que 3 cm. Entretanto, o descompasso entre o número de candidatos ao transplante hepático e a oferta de órgãos leva a longos períodos em lista de espera e risco de progressão tumoral. As terapias ablativas locais, como a destruição local do tumor por injeção percutânea de álcool ou ablação por radiofrequência, são alternativas que visam principalmente à prevenção do crescimento tumoral antes do transplante.⁴²

A quimioembolização transarterial e a quimioterapia sistêmica são opções para o tratamento de doença avançada, contudo a sobrevida geral é muito baixa. Um grupo relativamente restrito de pacientes (com função hepática preservada, com tumores múltiplos assintomáticos, sem invasão vascular ou extensão extra-hepática) apresenta benefício em termos de sobrevida após tratamento com a quimioembolização transarterial.⁴²

O EGFR e proteínas por ele ativadas, especialmente as quinases, são alvos potenciais na terapêutica. A introdução do bloqueador de múltiplas vias sorafenib no tratamento do CHC exemplifica a estratégia de bloqueio de quinases no tratamento da doença avançada.⁴⁶

1.2 Considerações gerais sobre o EGFR

1.2.1 EGFR: membro da família dos receptores do grupo ErbB / HER

O EGFR (ErbB1/HER1) é o protótipo de uma família de proteínas do grupo ErbB/HER (ErbB1 a ErbB4), que são receptores transmembrana com atividade tirosina-quinase, assim nomeadas pela sua homologia com o oncogene viral *v-erbB* (vírus da eritroblastose aviária). Estes receptores são amplamente expressos em tecidos humanos e animais, notadamente em células de origem epitelial e neuroectodérmica. Têm massa molecular entre 170 e 185 quilodaltons e apresentam grande homologia entre si, especialmente na sequência do domínio tirosina-quinase, em continuidade com uma cauda carboxi-terminal. A exceção é o receptor ErbB3, que não apresenta atividade de tirosina-quinase. Apresentam ainda um sítio extracelular com duas regiões ricas em cisteína, menos conservadas em função das diferentes especificidades com os diferentes ligantes.⁴⁷ Quando ativados pelos respectivos ligantes, estes receptores geram respostas diversas que incluem proliferação, diferenciação e transformação celulares. Seu domínio tirosina-quinase citoplasmático é ativado pela ligação de peptídeos da família do Fator de Crescimento Epidérmico (do inglês EGF) ao domínio extracelular.⁴⁸

O gene do EGFR está contido numa sequência de aproximadamente 700kb localizada no braço curto do cromossomo 7 (7p11.2).^{49 50} É composto por 28 éxons que codificam transcritos de mRNA de 2,4 a 3,0 kb. O domínio

tirosina-quinase é codificado nos éxons 18 a 24; os éxons 2 a 16 codificam o domínio extracelular e o éxon 17 codifica a região transmembrana.⁵¹

Os ligantes de alta afinidade dos receptores ErbB compreendem uma família ampla de pelo menos 10 proteínas com domínios EGF-símile, codificadas em pelo menos 9 genes. Estes ligantes são sintetizados em diversos tecidos, incluindo o fígado, geralmente como precursores ou pró-formas (por exemplo pró-EGF) ancorados à membrana celular que são então clivados em fatores de crescimento ou de diferenciação solúveis por desintegrinas e metaloproteinases ligadas à membrana ou metaloproteinases da matriz extracelular.^{52,53}

Três famílias de ligantes dos receptores ErbB podem ser definidas com base nas propriedades de interação ligante-receptor. A primeira família compreende os ligantes EGF, fator transformador do crescimento alfa (TGF α) e anfirregulina (AR) que se ligam exclusivamente ao EGFR. Uma segunda família, compreendendo herregulinas (HR) e neuregulinas, liga-se exclusivamente aos receptores ErbB3 e ErbB4. Uma terceira família, composta por betacelulina, fator de crescimento EGF-símile ligado a heparina (HB-EGF) e epirregulina, liga-se tanto ao EGFR quanto ao ErbB4. ErbB2 (HER2) não se liga com grande afinidade a nenhum dos homólogos de EGF conhecidos ou herregulinas, apesar de ter um domínio extracelular.⁵⁴

Em resposta à ligação ao fator de crescimento, as proteínas ErbB formam ora homodímeros ora heterodímeros, dependendo do repertório de receptores disponíveis numa dada célula.⁵⁵ A dimerização do receptor leva à ativação do domínio tirosina-quinase por transfosforilação, o que por sua vez

resulta na propagação da sinalização celular. Alguns receptores individuais favorecem certos pares na família ErbB, e certos ligantes podem induzir combinações preferenciais de receptores ErbB. Como cada receptor apresenta sítios intracelulares únicos para recrutamento e ativação de moléculas sinalizadoras, diferentes ligantes podem propagar diferentes sinais e respostas celulares, dependendo dos receptores disponíveis para dimerização.⁵⁶

Várias vias sinalizadoras descritas para o EGFR podem ser direta ou indiretamente ativadas por proteína-quinases ativadas por mitose – MAPK – específicas (por exemplo ERK e JNK). Em CHC, tais vias incluem a ativação do complexo de moléculas adaptadoras Grb2/Shc/SOS e ativação subsequente das vias Ras/Raf/Erk1/2 MAPK, que resultam na ativação dos ativadores transcricionais AP-1, *c-fos* e *c-jun*, com consequente ativação da transcrição de genes envolvidos na progressão do ciclo celular, resistência a apoptose, diferenciação, adesão e migração celular.^{57,58}

A inativação do EGFR ocorre a partir da agregação dos receptores em regiões da membrana plasmática ricas em clatrina, as quais se invaginam para formar vesículas de endocitose. Estas maturam em endossomos precoces e tardios, enquanto gradualmente diminuem seu pH interno e acumulam enzimas hidrolíticas que levam à degradação do receptor. Os demais receptores ErbB são resistentes à endocitose, sendo preferencialmente reciclados à superfície celular.⁵⁹

A rede de sinalização ErbB é crucial no desenvolvimento e organogênese. A inativação do EGFR ou de seus ligantes em estudos experimentais resulta no aparecimento de diferentes fenótipos embrionários ou neonatais com graves anormalidades cardíacas, neurais ou intestinais.^{60,61}

1.2.2 EGFR no fígado normal e patológico

Em ratos, hepatócitos maduros expressam EGFR com oscilações circadianas, sugerindo um papel importante na função hepática normal.^{62,63} Aparentemente, contudo, o EGFR não parece ser importante na organogênese hepática, como sugerido pelo desenvolvimento hepático normal em camundongos EGFR/"null".^{60,64} Achados similares são descritos no desenvolvimento hepático em humanos, nos quais a expressão do EGFR é fracamente detectada em hepatócitos fetais.⁶⁵ A expressão de EGFR em tecido hepático humano adulto normal é geralmente ausente ou fraca.^{66,67,68}

Há pelo menos duas grandes vias de sinalização que parecem estar criticamente envolvidas na regeneração hepática: o eixo de sinalização pelo EGFR e seus ligantes e a via mediada pelo fator de crescimento hepatocitário (HGF) e seu receptor Met.⁶⁹ Tais vias são, portanto, importantes mecanismos de defesa hepática no contexto da lesão aguda do fígado.

Em ratos e camundongos, os ligantes EGF, HB-EGF, TGF α , AR e HR demonstram importante efeito mitogênico em hepatócitos isolados e em cultura, além de terem expressão aumentada em um curto período após a hepatectomia parcial, em modelos de regeneração hepática.^{70,71,72} A contribuição de cada um destes ligantes na regeneração hepática tem sido estabelecida em modelos com ratos "knockout", porém em nenhum destes animais geneticamente modificados foi demonstrado um bloqueio completo da replicação do DNA ou da proliferação celular, sugerindo que nenhum destes genes isoladamente é essencial para a regeneração hepática.⁷³

Possivelmente diferentes interações dos ligantes com os outros membros da família ErbB expressos no fígado estejam envolvidas nas nuances observadas na regeneração hepática⁶⁹, bem como a expressão destes fatores por diferentes tipos celulares no fígado (macrófagos, células estreladas) ou ainda, modulações na clivagem dos mesmos pela metaloproteinases.^{74,75}

Em geral, nos modelos de lesão aguda do fígado, os níveis dos ligantes de ErbB caem aos níveis normais após cessado o estímulo nocivo. Contudo, a injúria hepática persistente resulta na hiperexpressão de ligantes e hiper-estimulação da via EGFR, possivelmente um importante passo no desenvolvimento do CHC.^{68,76,77}

A maioria dos CHC surge em um ambiente de inflamação permanente, com perda contínua de hepatócitos, produção de citocinas e estresse oxidativo em que a proliferação dos hepatócitos residuais parcialmente substitui os hepatócitos destruídos. No contexto da cirrose, os hepatócitos regeneram em nódulos, dentre os quais podem surgir populações monoclonais, com acúmulos de alterações genéticas. Nódulos constituídos por hepatócitos fenotipicamente alterados (displásicos), apresentam frequentemente taxas de proliferação celulares mais altas e taxas de apoptose proporcionalmente reduzidas, e conferem um risco aumentado para o desenvolvimento do CHC. Várias vias de sinalização estão desreguladas no CHC, particularmente as famílias relacionadas ao fator de crescimento semelhante a insulina (IGF), via Wingless (Wnt), HGF, fator transformador de crescimento β (TGF- β) e EGF, sendo frequentes as interações entre as mesmas.^{58,78,79}

Alguns estudos identificaram níveis elevados de expressão de ErbB1 e ErbB3 em CHC, relacionados a tumores pouco diferenciados e a maior taxa de proliferação celular. A hiperexpressão de EGFR também foi relacionada à ocorrência de metástases intra-hepáticas e menor sobrevida em tumores pouco diferenciados, porém não como fator independente em análise multivariada.^{80,81,82} Alguns estudos, entretanto, não indicaram uma expressão significativa ou aumentada de EGFR em CHC por imuno-histoquímica, embora houvesse um aumento de 60% de expressão do respectivo RNAm em relação ao tecido circunjacente.^{83,84,85} Não identificamos estudos que apontassem a expressão de EGFR como fator prognóstico independente em CHC, entretanto a associação com o grau histológico é controversa na literatura.

1.2.3 EGFR como alvo no tratamento do câncer

Vários estudos indicam que o EGFR é um alvo promissor no tratamento do câncer. Muitas neoplasias, particularmente carcinomas, apresentam expressão anormal, aumentada ou constitucional desta proteína.⁸⁶ Em muitos casos, a ativação anômala do EGFR, mediada primariamente por alterações gênicas ou por estimulação autócrina, parece ser um fator importante na carcinogênese, bem como uma alteração essencial para o comportamento mais agressivo da neoplasia.⁸⁷

Os mecanismos ativadores da rede de sinalização ErbB incluem hiperprodução dos ligantes, hiperexpressão ou ativação constitucional dos

receptores. Assim, torna-se importante saber se um tumor em particular tem uma via ErbB hiperativa devido a mutação, hiperexpressão ou amplificação de um dos componentes da via sinalizadora, com possíveis implicações prognósticas e terapêuticas. Neoplasias malignas em humanos frequentemente apresentam hiperexpressão e alterações estruturais do EGFR e a expressão de ligantes geralmente acompanha a hiperexpressão de EGFR em tumores primários. Menor intervalo livre de doença e piores taxas de sobrevida em carcinomas de cabeça e pescoço, colo uterino, ovário, bexiga e esôfago estão fortemente associados à hiperexpressão de EGFR.⁸⁶

A terapêutica anti-EGFR apresenta atividade anti-tumoral em carcinoma colorretal, carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço, carcinoma de células não-pequenas de pulmão e carcinomas renais. Agentes terapêuticos anti-EGFR poderão eventualmente se mostrar alternativas no tratamento do CHC.⁸⁸

Há duas formas de terapêutica anti-EGFR: inibidores do domínio tirosina-quinase, que competem com o ATP (gefitinib, erlotinib) e os anticorpos monoclonais que competem com os ligantes ativadores no domínio extracelular do receptor.⁸⁸ Anticorpos monoclonais ligam-se ao EGFR com uma afinidade muitas vezes maior do que os ligantes naturais, e ao fazê-lo promovem a internalização do receptor e sua degradação sem que ocorra a fosforilação e ativação, resultando em inibição da via de sinalização a jusante. Por sua vez, os inibidores de tirosina-quinase agem de forma reversível, ligando-se no sítio do ATP no domínio tirosina-quinase intracelular. Neste caso, não há internalização e degradação do receptor.⁷⁰

1.3 Papel do EGFR na patogênese do CHC

1.3.1 Evidências da importância do EGFR e sua via no CHC

Em culturas de células de CHC humano ocorrem aumento de expressão de EGFR e maior atividade proliferativa em resposta ao tratamento com ligantes como TGF α e EGF.^{89,90} Por outro lado, estes efeitos proliferativos podem ser revertidos através da inibição da sinalização da via do EGFR pelo tratamento das células de CHC com inibidores da atividade tirosina-quinase ou anticorpos monoclonais anti-EGFR, isoladamente ou combinados, com consequente parada do ciclo celular, redução das taxas de proliferação celular e aumento das taxas de apoptose.^{91;92;93;94}

Estudos experimentais demonstram que a hiperativação da via do EGFR está envolvida não apenas no desenvolvimento como também na manutenção do fenótipo tumoral em CHC. Camundongos transgênicos para TGF α ou EGF apresentam alta tendência ao desenvolvimento de CHC^{95,96}, enquanto a administração de carcinógenos em camundongos “knockout” para TGF α resulta no aparecimento de tumores menores do que nos animais de tipo selvagem.⁹⁷

Modelos animais descrevem efeitos *in vivo* da terapêutica anti-EGFR em CHC. O tratamento com gefitinib parece inibir o desenvolvimento de CHC em ratos⁷⁷, além de inibir o desenvolvimento de metástases intra-hepáticas⁹⁸ e de reduzir a angiogênese induzida pelo CHC.⁹⁹

Estudos clínicos utilizando inibidores de tirosina-quinase (erlotinib, lapatinib) em pacientes com CHC avançado demonstraram benefício clínico manifestado por controle da doença, entretanto não houve correlação entre resposta terapêutica e expressão de EGFR por imuno-histoquímica, tampouco associação entre expressão de EGFR e sobrevida, salientando-se a considerável variação de métodos de detecção e formas de quantificação dentre os estudos disponíveis.^{100;101;102;103}

Cetuximab, um anticorpo quimérico anti-EGFR, não demonstrou atividade anti-tumoral em CHC avançado em ensaio clínico em fase II.¹⁰⁴ De modo geral os resultados clínicos com monoterapia anti-EGFR têm sido ruins, e os estudos clínicos mais recentes têm combinado estes agentes a drogas citotóxicas convencionais ou outras terapias-alvo.¹⁰⁵

1.3.2 Mecanismos de ativação do EGFR em CHC

Embora mutações ativadoras no domínio catalítico tirosina-quinase do EGFR, localizado nos éxons 18-21, descritas em carcinomas de células não-pequenas de pulmão tenham sido correlacionadas à resposta terapêutica a gefitinib¹⁰⁶, estas e outras mutações não foram encontradas em amostras de CHC.^{107,108} Por outro lado, uma mutação no sítio catalítico do receptor ErbB2/HER2 foi detectada em 11% dos CHC.¹⁰⁹

Buckley et al observaram relação entre a hiperexpressão de EGFR observada na variante fibrolamelar de CHC e um aumento do número de

cópias do gene EGFR devido a polissomia balanceada.¹¹⁰ Em CHC convencional, a expressão de EGFR não foi correlacionada a aumento do número de cópias ou amplificação gênica.¹¹¹ A amplificação do gene EGFR geralmente não acompanha a hiperexpressão da proteína em diversos tipos de carcinoma, todavia, alguns trabalhos demonstram ganhos na região do braço curto do cromossomo 7 (7p), locus do gene EGFR, favorecendo polissomias em relação às amplificações.¹¹² De fato, estudos mais recentes apontam para uma subclasse molecular de CHC caracterizada por polissomia do cromossomo 7, hiperexpressão de EGFR e predomínio no sexo masculino.³⁶

Assim, a ativação constitucional do EGFR não mutado devido à hiperexpressão ou à estimulação autócrina pelos fatores de crescimento, bem como uma sinalização intracelular anômala, parecem ser mecanismos essenciais para a proliferação celular geral em CHC. A polissomia do cromossomo 7 parece ser um mecanismo importante em alguns grupos de CHC, notadamente a variante fibrolamelar e indivíduos do sexo masculino.

A via associada ao EGFR também pode ser considerada um ponto de convergência a outros estímulos extracelulares, com interação e ativação através de outros receptores de membrana não-ErbB (transativação). Particularmente, vias relacionadas aos receptores acoplados à proteína G, ao receptor de IGF e ao receptor de prostaglandina podem ativar a via do EGFR de forma indireta.⁷⁰ Este é um dos possíveis mecanismos de resistência à terapêutica anti-EGFR, assim como produção autócrina ou parácrina de ligantes, mutações do receptor, ativação constitucional de vias a jusante e ativação de vias alternativas.¹¹³

1.4 Patologia do CHC

Uma característica marcante na patologia do CHC é sua heterogeneidade, tanto nos aspectos macroscópicos quanto nos microscópicos e moleculares. Esta heterogeneidade reflete não apenas as diferentes populações de células neoplásicas mas também a complexidade metabólica do hepatócito e fatores modificadores em termos de suprimento vascular e interação com o estroma.

1.4.1 Classificação macroscópica

As principais classificações macroscópicas do CHC são as propostas por Eggel¹¹⁴, Okuda-Peters-Simson¹¹⁵ e Nakashima-Kojiro¹¹⁶. Em comum, a utilização destes esquemas necessita da avaliação de todo o fígado à autópsia e têm pouco valor prognóstico ou terapêutico atual por se aplicarem a lesões avançadas.

Pelo uso consagrado e simplicidade, a classificação de Eggel mostra-se adequada para estudos de autópsia. Segundo este esquema o CHC é classificado macroscopicamente em:

- a) Nodular: quando há um ou mais nódulos distintos;
- b) Maciço: quando há uma massa tumoral única, dominante, de limites irregulares, geralmente substituindo um lobo hepático, com ou sem lesões satélites;
- c) Difuso: quando há nódulos múltiplos pequenos, indistintos, cirrotoicomiméticos.

As classificações de Okuda e Nakashima apresentam em comum o reconhecimento de padrões macroscópicos expansivos, infiltrativos e mistos, sendo que na classificação de Nakashima as lesões expansivas são divididas em únicas ou multinodulares.

1.4.2 CHC pequeno e CHC precoce

A definição de CHC pequeno é variável na literatura, embora pontos em comum sejam o tamanho pequeno (em geral até 2 ou 3cm), cápsula fibrosa, baixo grau histológico (bem diferenciados), frequente associação com cirrose, baixa associação com infecção por VHB e baixos níveis de alfa-fetoproteína.^{117,118,119;120,121} O consenso internacional de 1995 define CHC pequeno como aquele menor que 2 cm.¹²² Muitos destes casos são detectados em programas de rastreamento ou como achados incidentais em explantes ou autópsias.^{119,123,124} Em geral são considerados como lesões subclínicas de bom prognóstico, especialmente quando não há invasão da cápsula ou invasão vascular.

De fato, um subgrupo do CHC pequeno é composto pelo CHC precoce (ou CHC pequeno “vagamente nodular” ou “de limites indistintos”), que consiste em um conjunto de lesões de difícil detecção macro e microscópica. Este grupo é caracterizado pelo seu aspecto macroscópico vagamente nodular, histologia extremamente bem diferenciada, que se mistura quase imperceptivelmente ao tecido hepático circunjacente.

Apresenta trabéculas finas, com aumento da densidade celular, ocasional arranjo microacinar, esteatose, arteríolas desemparelhadas e espaços-porta intratumorais.^{5,120,125,126} Para o difícil diagnóstico diferencial com nódulo displásico de alto grau é necessário o encontro de invasão estromal de forma análoga aos carcinomas microinvasores de outros órgãos.

Em contrapartida, os CHC pequenos não precoces (ou distintamente nodulares), a despeito do tamanho, são considerados lesões em que já houve progressão tumoral, frequentemente com pseudocápsula fibrosa, componente moderadamente diferenciado e padrão vascular predominantemente proveniente da artéria hepática, com numerosas arteríolas não pareadas.¹²⁷

A classificação macroscópica de Eggel não é aplicável ao CHC pequeno, comum em material de ressecção cirúrgica ou transplantes. Nestes casos, outros esquemas de classificação foram propostos. A classificação japonesa separa o CHC de padrão nodular em três subtipos: simples, simples com crescimento extranodular e multinodular confluyente.¹²⁵ Kanai et al propuseram outro tipo adicional, mais raro, o padrão nodular pouco delimitado, de bordas infiltrativas.¹¹⁸

1.4.3 Multifocalidade e multicentricidade

A maioria dos CHC tem aspecto nodular e pode ser focal ou multifocal. Tumores multifocais são separados por tecido não tumoral e podem corresponder tanto a tumores independentes (ou seja, CHC

multicêntrico) ou a metástases intra-hepáticas. As lesões focais (ou unifocais) podem ser constituídas tanto por um nódulo único como por um agrupamento de nódulos contíguos ou indistintamente próximos.⁵

Segundo Kojiro¹²⁵, o principal critério morfológico para se determinar, ainda que arbitrariamente, se uma lesão multifocal é multicêntrica é a presença de um componente bem diferenciado ou displásico na periferia do nódulo em questão. Assume-se que esta seja uma característica de uma origem multicêntrica, ou seja, que a lesão se originou *in situ*. Outros critérios são: ocorrência de tumor bem diferenciado em segmento distinto de lesão moderadamente ou pouco diferenciada; duas ou mais lesões bem diferenciadas separadas; lesão com padrão de nódulo-em-nódulo, indicando um componente bem diferenciado progressivo.¹²⁸ Estes critérios são bastante limitados, pois pressupõem a ausência ou rara possibilidade de metástase de CHC bem diferenciado. Por outro lado, assume-se também a ausência ou rara possibilidade de que haja progressão rápida de um CHC bem diferenciado ou de que um CHC menos diferenciado não possa surgir *de novo*.

Estudos de clonalidade mostram que os critérios histológicos são de fato limitados, e que ambos os métodos, juntamente com dados de imagem, devem ser somados para uma avaliação mais precisa de multicentricidade.¹²⁹

1.4.4 Padrões de disseminação

Os padrões macroscópicos refletem de certa forma o padrão de crescimento e disseminação do CHC. Nas fases iniciais os nódulos tendem

a crescer de forma expansiva, frequentemente encapsulada, e nas fases mais tardias o crescimento é infiltrativo e destrutivo no tecido circunjacente.

Estudos em autópsias demonstram que metástases intra-hepáticas são muito comuns, presentes em mais de 95% dos tumores com mais de cinco centímetros e ocorrem em geral por via hematogênica.¹³⁰ A invasão vascular é comum, frequentemente com trombose da veia porta ou de seus ramos (cerca de 70% nos tumores avançados). A invasão de veias hepáticas ocorre em cerca de 20% dos casos.¹²⁰

Alguns tumores podem crescer pelas veias hepáticas atingindo a veia cava e o átrio direito.¹³¹ Podem ocorrer invasão de vias biliares, invasão do diafragma e disseminação peritoneal.¹³²

Metástases extra-hepáticas são mais comuns para os pulmões e linfonodos regionais, porém podem ocorrer para outros órgãos, particularmente ossos e adrenais. A sobrevida nestes casos é de 7,1% em três anos. A causa imediata de óbito está relacionada às metástases em 11% destes pacientes enquanto na maioria dos casos a insuficiência hepática ou o tumor primário são a causa imediata de óbito.¹³³

1.4.5 Grau histológico

Edmondson e Steiner classificaram o CHC em graus crescentes de 1 a 4, de acordo com o aumento da atipia celular, da irregularidade nuclear, hipercromasia e relação núcleo/citoplasma.¹³⁴ Este sistema tem sido

amplamente utilizado e se reflete na graduação adotada pela Organização Mundial de Saúde de acordo com o grau de diferenciação: bem, moderadamente, pouco diferenciado e indiferenciado.^{5,125}

O CHC bem diferenciado corresponde ao grau 1 de Edmondson-Steiner. Apresenta crescimento em trabéculas finas, esteatose frequente e aumento de densidade celular caracterizada por maior relação núcleo/citoplasma. Raramente está presente em nódulos maiores do que três centímetros.

O CHC moderadamente diferenciado corresponde ao grau 2 de Edmondson-Steiner. Apresenta crescimento em trabéculas médias e frequente arranjo acinar ou pseudoglandular. As células apresentam citoplasma amplo e eosinofílico, núcleos redondos com nucléolos distintos e relação núcleo/citoplasma próxima à do hepatócito normal.

O CHC pouco diferenciado corresponde ao grau 3 de Edmondson-Steiner. Apresenta crescimento em trabéculas largas ou sólido (ou compacto), com poucos sinusóides e células de citoplasma escasso (alta relação núcleo/citoplasma). Pode apresentar padrão de células gigantes com graus variados de pleomorfismo e células bizarras.

O CHC indiferenciado corresponde ao grau 4 de Edmondson-Steiner, e neste caso é muitas vezes difícil de se definir a linhagem hepatocelular apenas com base nos achados histológicos. Frequentemente o diagnóstico é feito com base no contexto da cirrose e nas outras áreas de menor grau presentes. As células têm citoplasma escasso, por vezes com aspecto de células pequenas, indiferenciadas, e crescem em padrão sólido ou medular.

Os padrões arquiteturais trabecular, acinar (pseudoglandular) e sólido têm relação próxima, embora não absoluta, com os graus histológicos, respectivamente, bem, moderadamente e pouco diferenciados.¹²⁵

1.4.6 Variantes histológicas

As principais variantes histológicas do CHC são o fibrolamelar, o rico em linfócitos (linfoepitelioma-símile), o esquirroso, o de células claras e o sarcomatóide.^{5,125,135}

O CHC fibrolamelar ocorre mais frequentemente em fígado não cirrótico de pacientes jovens, e tem prognóstico mais favorável do que o CHC clássico em fígado cirrótico. Compreende de 0,5 a 9,0% dos cânceres hepáticos primários conforme o país. É considerado raro nas casuísticas orientais.^{5,125}

O CHC rico em linfócitos também apresenta melhor prognóstico, atribuído a uma intensa reação inflamatória anti-tumoral, predominantemente por linfócitos T CD8+, mas também neutrófilos e linfócitos B.¹²⁵ O CHC linfoepitelioma-símile pode ser considerado uma forma rara de CHC com estroma muito rico em linfócitos e arranjo celular sincicial.¹³⁶

O tipo esquirroso corresponde a cerca de 3% dos CHC. É caracterizado por fibrose sinusoidal peritumoral difusa, com atrofia celular, e, à semelhança do CHC rico em linfócitos, apresenta frequente infiltração por linfócitos CD8+, com necrose de células tumorais. Macroscopicamente

simula colangiocarcinoma, tumores mistos ou mesmo o CHC fibrolamelar, e apresenta-se frequentemente em contato com a cápsula hepática.¹²⁵ Alguns estudos japoneses sugerem prognóstico mais favorável em relação ao CHC convencional, associado a uma maior ativação de células estreladas produtoras de colágeno.^{137;138} Todavia uma grande série coreana recente não identificou diferença no prognóstico após cirurgia.¹³⁹

A variante citológica de células claras é caracterizada por abundante glicogênio citoplasmático em mais de 50% das células tumorais.¹⁴⁰ Em relação ao CHC convencional, a variante de células claras apresenta uma maior proporção de mulheres. Embora as causas deste achado sejam desconhecidas, acredita-se que a alteração de células claras esteja associada a influências hormonais. A associação a melhor prognóstico é controversa.^{125,141,142}

O CHC sarcomatóide (ou com alterações sarcomatosas) é caracterizado por componente fusocelular ou anaplásico, focal ou difuso. Quando todo o tumor tem aspecto sarcomatóide o diagnóstico de CHC é difícil com base apenas em achados morfológicos, e o diagnóstico diferencial com outros sarcomas é necessário. Entretanto, assim como no CHC indiferenciado, na maioria dos casos há um componente de CHC mais bem diferenciado, e, no caso das áreas sarcomatóides, formas transicionais entre os dois componentes.¹²⁵ CHC sarcomatóides são mais frequentes em autópsias (cerca de 5%), e estão também associados a ciclos repetidos de quimioembolização transarterial.¹⁴³ A alteração sarcomatóide é considerada em evento tardio na evolução do CHC e relacionada a mutação e hiperexpressão de p53, assim como a maiores taxa de proliferação celular.¹⁴⁴

1.5 Aspectos gerais da classificação molecular do CHC

A classificação clínico-patológica tradicional do CHC considera variáveis patológicas como número e tamanho de nódulos, tipo e grau histológico, invasão vascular além de dados clínicos como a presença de metástases e o grau de comprometimento da função hepática. Visa fundamentalmente estabelecer parâmetros prognósticos. Entretanto, com a disseminação de programas de rastreamento em cirróticos que leva ao encontro de lesões menores, e o advento de novas drogas, surge a necessidade de refinamento nos métodos de classificação e busca de marcadores moleculares relevantes em CHC.

Estudos de expressão gênica têm proposto o agrupamento dos CHC em diferentes categorias com perfis moleculares distintos.¹⁴⁵ Hoshida et al realizaram metanálise baseada em 24 destes estudos e definiram dois grandes grupos de CHC. O primeiro com CHC de perfil agressivo, em que predominam tumores maiores, moderadamente ou pouco diferenciados, e o segundo com perfil menos agressivo, em que predominam tumores menores, bem diferenciados, com manutenção de fenótipo hepatocitário.¹⁴⁶

O CHC de tipo mais agressivo, caracterizado por expressão de queratina 19 (CK19), mutação de p53 e/ou regulação pelo receptor Met em outros estudos, foi subclassificado em tipos S1, com ativação da via Wnt e TGF- β ; e S2, com ativação de myc e AKT.

O CHC menos agressivo foi classificado como S3, e engloba os subtipos moleculares com polissomia do cromossomo 7 e ativação da via da beta-catenina correspondentes de outros estudos.

Esta classificação fornece uma base comum aos diferentes estudos, epidemiologicamente e clinicamente heterogêneos, proporcionando algumas correlações. Os subtipos agressivos S1 e S2 tendem a ser mais frequentes no contexto da hepatite B; o subtipo S2 tende a apresentar níveis mais elevados de alfa-fetoproteína e o subtipo S3 tende a apresentar preservação da função hepática.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Analisar a expressão de proteínas do sistema de sinalização relacionado ao EGFR e proteínas relacionadas aos seus efeitos em CHC primário, em suas metástases e em tecido hepático não tumoral em autópsias.

2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a expressão de EGFR, EGFR fosforilado na tirosina 1173 (pEGFR Tyr 1173), HER2, ERK1/2, MAPKAPK-2, pMAPK, Ag Ki67 e caspase 3 no CHC primário, em suas metástases e no tecido hepático circunjacente.
- Correlacionar os achados de expressão a dados clínicos e etiológicos (idade, sexo, etilismo, co-infecções) e anatomopatológicos (presença ou ausência de cirrose ou hepatopatia crônica, padrão histológico da cirrose, grau e padrão histológico do tumor, invasão vascular e metástase à distância).

- Correlacionar os achados à expressão de outras proteínas potencialmente representativas de classes moleculares do CHC recentemente propostas em estudos de expressão gênica (citoqueratina 19, mTOR, ciclina D1, Met, vimentina, p53 e beta-catenina).
- Avaliar possível heterogenidade de expressão dos marcadores entre o CHC primário e suas metástases à distância.
- Avaliar fatores no tecido tumoral e não tumoral que possam estar associados à disseminação extra-hepática.
- Avaliar o potencial do material de arquivo de autópsia para análise do número de cópias dos genes EGFR e HER2 em CHC por hibridização *in situ*.

3 MÉTODOS

3.1 Ética em Pesquisa

Este estudo foi aprovado como projeto de pesquisa pelo Comitê de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HCFMUSP) em agosto de 2008.

3.2 Desenho do Estudo

Este é um estudo retrospectivo transversal que avaliou, através de laudos, prontuários e material anatomopatológico de autópsias, as correlações entre expressão proteica tecidual por imuno-histoquímica e dados clínico-patológicos em portadores de CHC.

3.3 Casuística

3.3.1 Autópsias e revisão de lâminas

Foram revistos relatórios de 5836 autópsias realizadas no Serviço de Autópsias da Divisão de Anatomia Patológica do HCFMUSP de pacientes previamente atendidos no HCFMUSP no período de Janeiro de 2003 a Dezembro 2009, buscando-se primeiramente casos de tumor hepático primário, transplante hepático ou cirrose. Os casos de CHC foram selecionados de acordo com os critérios de inclusão e exclusão a seguir:

Critérios de inclusão:

a) Pacientes adultos (idade maior ou igual a 18 anos) com CHC presente à autópsia, como tumores únicos ou múltiplos, seja no fígado original como tumor primário e/ou recidiva; ou em fígado transplantado como recidiva; ou como metástase à distância;

b) Representação histológica suficiente e disponível (pelo menos um fragmento da neoplasia disponível em bloco de parafina).

Critérios de exclusão:

a) Ausência de neoplasia remanescente à autópsia (tumor primário previamente ressecado ou submetido a transplante); tumores hepáticos

secundários (metástases de outras neoplasias que não CHC); colangiocarcinomas, tumores de padrão morfológico misto (hepatocolangiocarcinomas) e outros cânceres primários do fígado;

b) Amostras necróticas (por tratamento prévio ou não), com áreas viáveis insuficientes ou com artefatos de autólise ou de fixação.

3.3.2 Caracterização geral das autópsias (pré-seleção)

No período foram identificados 648 casos de interesse potencial (cirrose ou tumor hepático primário ou transplante). Neste total, foram identificados 537 casos de cirrose, 188 casos de tumores hepáticos primários e 62 transplantes hepáticos. Dentre os casos de cirrose, 115 (21,4%) apresentaram tumor primário e 59 (11%) haviam sido previamente transplantados. Dentre estes 59 explantes, neoplasia primária hepática foi encontrada 19 casos (32,2%). (Figura 1)

Dos 188 casos com tumores hepáticos primários, foram identificados 108 casos de CHC, 65 colangiocarcinomas, um hepatocolangiocarcinoma, um hemangioendotelioma epitelióide e 13 neoplasias malignas de outra natureza. As lâminas dos casos de tumor hepático primário foram revistas quando disponíveis para confirmação dos diagnósticos.

Dos 108 casos de CHC levantados, 3 foram previamente ressecados por hepatectomias parciais e 18 foram excluídos por haverem sido previamente transplantados, não apresentando evidências de neoplasia à

autópsia. Um caso de recidiva de CHC pós-transplante foi incluído e os dados anatomopatológicos do explante foram computados. Sete casos foram excluídos por não haver material adequado ou suficiente disponível. (Figura 2)

A população final do estudo consiste, portanto, em 80 autópsias sequenciais de pacientes com CHC presente no momento do exame.

Figura 1: Distribuição de 648 casos de autópsia pré-selecionados. Os números nas intersecções correspondem aos casos pertencentes a ambas as categorias

Figura 2: Fluxograma de casos de autópsia incluídos no estudo (2003 a 2009)

3.3.3 Obtenção de dados clínico-laboratoriais

Os seguintes dados foram obtidos retrospectivamente por meio de revisão de laudos e resumos de prontuários: sexo, idade à época do óbito, raça, história de etilismo, infecção por VHC, infecção por VHB, outras causas para cirrose (hemocromatose, doença de Wilson, esteatohepatite não alcoólica), infecção pelo HIV, tratamento prévio, clínica de procedência, causa básica e causa imediata de óbito.

Foram considerados como casos de cirrose criptogênica aqueles em que a pesquisa clínica e/ou patológica dos fatores etiológicos foi realizada porém não se chegando a um fator específico. Casos em que estas informações não eram disponíveis foram considerados como de etiologia indeterminada.

A causa básica e a causa imediata de óbito foram determinadas com base na correlação entre os dados da história clínica e as informações constantes no laudo final das autópsias. Os casos em que se considerou que o CHC não contribuiu para o óbito foram computados.

Os pacientes foram posteriormente agrupados em faixas etárias assim definidas: adultos jovens (idade menor que 40 anos), adultos (de 40 a 59 anos) e idosos (idade maior ou igual a 60 anos).

3.4 Variáveis Anatomopatológicas

Todas as lâminas arquivadas dos casos selecionados foram revistas e as seguintes variáveis anatomopatológicas foram obtidas com base nos relatórios de autópsias e nos achados histológicos.

3.4.1 Peso do fígado

Anotado sempre que disponível conforme relatórios de autópsias.

3.4.2 Cirrose

Determinada como presente ou ausente. Casos com tecido hepático com alto grau de fibrose (pré-cirrose) foram agrupados juntamente com os cirróticos.

3.4.3 Número e tamanho dos nódulos

Determinados conforme relatórios de autópsia. Quanto ao número de nódulos os casos foram categorizados em um, dois, três ou múltiplos (quando mais do que três lesões). Para agrupamento dos casos quanto ao tamanho da maior lesão foram utilizados pontos de corte a 2,0 cm e 6,0 cm.

3.4.4 Padrão macroscópico

De acordo com a descrição macroscópica geral de número, tamanho e padrão das lesões, procedeu-se a categorização segundo o padrão macroscópico.

Tumores isolados menores do que 2,0 cm foram classificados como CHC pequenos (ou incidentais). Lesões maiores ou iguais a 2,0 cm foram classificadas no esquema de lesões avançadas segundo Eggel nos padrões nodular/multinodular, maciço ou difuso.

3.4.5 Grau histológico

As lesões foram classificadas em graus 1 a 4 de Edmondson-Steiner segundo o pior padrão histológico observado. A terminologia tumores de alto grau refere-se aos graus 3 e 4 agrupados.

3.4.6 Variantes histológicas

Além do padrão clássico, variantes histológicas se presentes foram classificadas em células claras, fibrolamelar, esquirroso e sarcomatóide.

3.4.7 Padrão arquitetural

Para o padrão clássico de CHC, o padrão arquitetural dominante foi classificado em trabecular, acinar/pseudoacinar, sólido/macrotrabecular ou misto.

3.4.8 Invasão de grandes veias

Definida como invasão macroscópica de veias porta ou hepáticas e seus ramos referidas nas descrições macroscópicas dos laudos e/ou identificada na revisão histológica dos casos.

3.4.9 Metástase à distância ou extra-hepática

Definida como presente se referida no relatório final de autópsia e/ou identificada na representação histológica revista, e nestes casos, foram computados os respectivos órgãos de disseminação.

3.5 Micromatrizes teciduais (TMA)

As áreas de interesse foram marcadas sobre as lâminas à medida que foi realizada a revisão dos preparados histológicos de rotina (hematoxilina-eosina) e, quando disponíveis, colorações específicas e reações de imuno-histoquímica das autópsias selecionadas.

Duas ou três áreas de cada um dos tumores hepáticos, das metástases e do tecido não tumoral foram selecionadas. Para tumores com áreas heterogêneas representadas, o procedimento foi repetido para cada área. Quando mais de uma lesão primária estava representada, o procedimento foi repetido para cada lesão, entretanto na tabulação final foram considerados para análise comparativa os dados da lesão maior. Para metástases muito pequenas (menores que 0,5 cm), apenas uma área foi selecionada. O tecido hepático não tumoral disponível foi selecionado o mais distante possível do tumor, geralmente em um bloco de parafina diferente. Áreas de todas as metástases e invasões de grandes veias disponíveis foram selecionadas para a construção do TMA

Foi utilizado equipamento MTA1 (Manual Tissue Microarrayer, Beecher Instruments, EUA) disponível no LIM-14, Patologia Hepática, FMUSP, para a confecção de blocos de TMA, conforme descrito por Kononen et al.¹⁴⁷ Com agulha de 1,0 mm de diâmetro foram extraídos cilindros teciduais dos blocos doadores previamente marcados, que foram dispostos nos blocos receptores com espaçamento de 0,3 mm e respectivos controles (tecido renal) nas primeiras posições para orientação de posição. Previamente à confecção do bloco de TMA, foi elaborada matriz de orientação das amostras em planilha eletrônica Excel (Microsoft Office 2003, EUA).

Para cada TMA foi confeccionada uma duplicata em espelho (cópia de segurança), limitando-se o número de cilindros apenas nos casos com pouca representação tecidual. Ou seja, para cada área de interesse com

material suficiente foram colhidos dois a três cilindros para cada TMA (original e espelho).

As amostras dos tumores primários e metástases foram agrupadas em dois TMA (T0123 e T0268) e respectivos espelhos (T0124 e T0269). As amostras de tecido não tumoral foram agrupadas no TMA T0285 e respectivo espelho (T0286).

Cada bloco de TMA foi submetido a sessão única de microtomia em lâminas silanizadas, que foram submetidas a banho de parafina e arquivadas em caixa escura a -20 °C para preservar a antigenicidade das amostras.

Lâminas intervaladas foram coradas em hematoxilina-eosina para avaliação da representatividade geral do respectivo nível de cada bloco de TMA, e os cortes próximos aos melhores níveis foram selecionados para as reações imuno-histoquímicas.

3.6 Reações imuno-histoquímicas

Uma lâmina de cada um dos três TMA foi submetida a reação imuno-histoquímica, previamente padronizada para este estudo, com cada um dos anticorpos listados na tabela 1.

Resumidamente, as lâminas foram desparafinadas, hidratadas e submetidas a recuperação antigênica por calor úmido em panela a vapor. A

recuperação padrão consiste em aquecimento por 40 minutos em tampão citrato 10 mM pH 6. Após lavagens em água corrente e água destilada procedeu-se ao bloqueio da peroxidase endógena com solução de peróxido de hidrogênio a 6% em metanol, em três imersões de 10 minutos cada à temperatura ambiente. Foram realizadas novas lavagens em água corrente, água destilada e tampão fosfato pH 7,4. Em seguida foi feito o bloqueio de cargas com solução comercial CASBlock (Invitrogen) por 10 minutos a 37°C. Cada lâmina foi então incubada com um dos anticorpos primários por 30 minutos a 37°C em títulos previamente otimizados (exceto os “kits” comerciais pré-diluídos). Seguiu-se a incubação por 18 horas a 4°C e banhos em tampão fosfato pH 7,4. Todas as amplificações de sinal foram realizadas com o sistema de polímero curto conjugado a peroxidase Novolink (Novocastra) por 30 minutos a 37°C, com exceção daquelas em que foi utilizado “kit” comercial (EGFR Pharm Dx e Herceptest). Seguiram-se novos banhos em tampão fosfato 7,4, incubação com cromógeno 3-3'-diaminobenzidina a 60mg% em tampão fosfato pH 7,4 por 5 minutos a 37°C e novas lavagens em água corrente e água destilada. As lâminas foram contracoradas com hematoxilina de Harris por 1 minuto à temperatura ambiente, desidratadas em soluções progressivas de álcool e xilol e montadas com resina sintética Entellan (Merck).

A tabela 2 resume os detalhes da padronização das reações de imuno-histoquímica para os respectivos anticorpos.

Tabela 1: Características dos anticorpos utilizados

Anticorpo	Fornecedor	Clone	Espécie
1 EGFR PharmDx ("kit" comercial)	DAKO	2-18C9	Camundongo
2 EGFR humano ("wild-type")	DAKO	DAK-H1-WT	Camundongo
3 Ag Ki67	DAKO	MIB-1	Camundongo
4 Ciclina D1	DAKO	SP4	Coelho
5 Caspase 3	DBS	3C SP03	Camundongo
6 ERK1	DBS	Policlonal	Coelho
7 ERK2	DBS	Policlonal	Coelho
8 pMAPK(p44/42)(Thr202/Tyr204)	Cell Signaling	20G11	Coelho
9 MAPKAPK-2	Cell Signaling	Policlonal	Coelho
10 Met	Cell Signaling	Policlonal	Coelho
11 mTOR	Cell Signaling	Policlonal	Coelho
12 Citoqueratina 19 (CK19)	Novocastra	b170	Camundongo
13 Vimentina	DAKO	Vim3B4	Camundongo
14 HER2 (Herceptest)	DAKO	Policlonal	Coelho
15 p53	DAKO	DO7	Camundongo
16 Beta Catenina	BD	14 BetaCatenin	Camundongo
<i>Phospho-ErbB family kit</i>		Cell Signaling ("kit")	
17 EGFR		D38B1	Coelho
18 Phospho EGFR (Tyr 1173)		53A5	

Tabela 2: Detalhes das reações imuno-histoquímicas

	Anticorpo	Recuperação	Título	Controle positivo	Resultado
1	EGFR PharmDx	Proteinase K	Pré Diluído	Fornecido pelo fabricante	Membrana
2	EGFR humano ("wild-type") DAK-H1-WT	Padrão*	1:100	Tonsila	Membrana
3	Ag Ki67	Padrão*	1:400	Tonsila	Núcleo
4	Ciclina D1	Panela a vapor TRIS 10 mM EDTA 1 mM pH 9	1:100	Tonsila Intestino	Núcleo
5	Caspase 3	Padrão*	1:160	Tonsila Estômago	Citoplasma
6	ERK1	Padrão*	1:100	Carcinoma mamário	Citoplasma
7	ERK2	Padrão*	1:400	Carcinoma mamário	Citoplasma
8	pMAPK(p44/42)	Padrão*	1:100	Cólon (Adenocarcioma) Endotélio	Núcleo e citoplasma
9	MAPKAPK-2	Padrão*	1:50	Cólon (Adenocarcioma) Tecido linfoide	Citoplasma
10	Met	Padrão*	1:50	Carcinoma mamário	Citoplasma
11	mTOR	Padrão*	1:50	Tecido linfoide	Citoplasma
12	Citoqueratina 19 (CK19)	Padrão*	1:300	Colangiocarcinoma	Citoplasma e membrana
13	Vimentina	Padrão*	1:3000	Rim	Citoplasma
14	HER2 (Herceptest)	Instruções do fabricante	Pré Diluído	Fornecido pelo fabricante; carcinoma de mama	Membrana
15	p53	Padrão*	1:100	Carcinoma de mama	Núcleo
16	Beta-catenina <i>Phospho-ErbB family kit</i>	Padrão*	1:800	Tonsila	Membrana
17	EGFR (D38B1)	Panela a vapor EDTA 1 mM pH 8	1:200	Carcinoma epidermóide	Membrana
18	Phospho EGF (Tyr 1173)	Panela a vapor EDTA 1 mM pH 8	1:250	<i>SignalSlide</i> (Cell Signaling)	Membrana

*Nota: A recuperação padrão consiste em panela vapor e tampão citrato 10 mM pH 6

3.7 Avaliação das reações imuno-histoquímicas

3.7.1 Avaliação da expressão de EGFR e sistema de escore

A marcação de membrana foi avaliada em intensidade (0 a 3+), distribuição de células marcadas (0 a 100%), completude (completa ou incompleta) e padrão (simétrica ou assimétrica). A marcação assimétrica é caracterizada por um reforço no pólo celular basolateral ou apical/biliar.

Foi atribuída intensidade forte (3+) se a marcação de membrana era facilmente visualizada ao menor aumento do microscópio (objetiva de 4x); moderada (2+) à marcação de membrana visualizada apenas no aumento intermediário (objetiva de 10x) e intensidade fraca (1+) à marcação de membrana visualizada apenas ao maior aumento (objetivas de 20 ou 40x). A expressão citoplasmática foi semiquantificada em 0 a 3+.

Um escore foi atribuído a cada “spot” analisável, variando de zero (nenhuma marcação) até 300 (100% de marcação 3+), conforme descrito por Piker et al.¹⁴⁸ A avaliação da expressão de EGFR foi realizada por dois observadores (ASFS e VAFA). Foi atribuído escore de consenso ao microscópio de dupla observação para os casos em que houve divergência. Este sistema foi utilizado para cada um dos anticorpos anti-EGFR em uma fase preliminar. Para os demais dados do estudo foram utilizados os resultados do anticorpo EGFR Pharm DX.

Em cada caso o escore final de determinada amostra (grupos diagnósticos: CHC primário, invasão de grandes veias, metástases e fígado não tumoral) foi calculado pela média aritmética dos “spots” avaliáveis no mesmo grupo diagnóstico de amostras. Nos casos com mais de uma metástase avaliável, foi atribuído um escore geral à doença metastática que correspondeu à média aritmética dos escores de cada metástase. Seguindo a proposta de Pirker et al.¹⁴⁸ (2012), escores maiores ou iguais a 200 foram considerados como hiperexpressão (ou expressão forte) ao passo que escores menores do que 10 foram considerados como EGFR negativos. Para análise de correlação de expressão entre os tumores primários e as respectivas metástases, as amostras foram pareadas e, quando pertencentes à mesma categoria (hiperexpresso, expressão moderada ou ausente), foram consideradas concordantes.

3.7.2 Demais anticorpos

Os anticorpos Ag Ki67, ciclina D1 e p53, de marcação nuclear, foram analisados em cada “spot” por meio de contagem de células (1000 núcleos ou o máximo de células possível em cada “spot”) e o resultado expresso em porcentagem de células marcadas. Para mais de um “spot” avaliável foi considerada a média das amostras. A marcação de beta-catenina nuclear foi semiquantificada em 0 a 3+.

Para os demais anticorpos adotou-se um sistema de escore análogo à análise de EGFR, considerando-se a porcentagem de células marcadas e a

intensidade de 0 a 3+, mesmo para aqueles de expressão citoplasmática, de forma que para cada anticorpo foi atribuída um escore de expressão de 0 a 300.

3.7.3 Avaliação imuno-histoquímica do tecido hepático não tumoral e elementos não hepatocitários

No tecido não tumoral foram realizadas duas análises complementares:

- a) A reação ductular foi semiquantificada em 0 a 3+ pela marcação com citoqueratina 19.
- b) A densidade de população de células estromais perissinusoidais (células endoteliais, células de Kupffer e miofibroblastos) foi semiquantificada em 0 a 3+ pela marcação com vimentina.

A marcação endotelial de pMAPK foi semiquantificada em 0 a 3+ no tecido não tumoral, CHC e metástases.

3.7.4 Grupo controle para expressão de EGFR

Exclusivamente para a análise comparativa da expressão ou hiperexpressão de EGFR foram analisadas oito amostras de tecido hepático em cortes inteiros provenientes de autópsias de indivíduos sem CHC e sem hepatopatia, com distribuição de idade e sexo semelhante aos casos.

3.7.5 Análise de heterogeneidade

Na análise de heterogeneidade de expressão entre o tumor hepático e metástases extra-hepáticas foram consideradas expressões concordantes aquelas com escore ou porcentagem de marcação celular na mesma categoria. Nesta fase cada metástase disponível foi considerada individualmente em relação ao tumor hepático. Em caso de expressão discordante nas metástases, esta foi classificada em ganho ou perda de expressão conforme a alteração de categoria em relação ao respectivo tumor hepático.

3.8 Reações de hibridização *in situ*

Para a avaliação do número de cópias dos genes EGFR e HER2, foram padronizadas reações de hibridização *in situ* cromogênica (do inglês CISH) e por fluorescência (do inglês FISH).

3.8.1 CISH

A tabela 3 resume os protocolos padronizados para as respectivas sondas utilizadas em CISH. Uma vez que para estas reações padronizadas obteve-se um sinal fraco de hibridização em material de autópsia, foram

tentados protocolos alternativos, especificados no Anexo. Nenhum dos protocolos alternativos permitiu resultado satisfatório no material deste estudo.

Tabela 3: Características das sondas de CISH e padronização das reações

Sonda	EGFR	Cromossomo 7	HER2
Fornecedor	Invitrogen	Invitrogen	Invitrogen
Tipo	Polimérica	Centromérica	Polimérica
Pré-tratamento	Painela de pressão Ácido cítrico 10mM pH 6 3 min 30 s	Painela de pressão Ácido cítrico 10mM pH 6 3 min 30 s	Painela de pressão Ácido cítrico 10mM pH 6 3 min 30 s
Digestão enzimática	10 min	10 min	10 min
Desnaturação	95°C por 5 min	95°C por 5 min	95°C por 5 min
Hibridização	37°C por >10 h	37°C por >10 h	37°C por >10 h
Lavagem estrigente	1,5 M Uréia 0,1x SSC	1,5 M Uréia 0,1x SSC	1,5 M Uréia 0,1x SSC
Controle	Carcinoma epidermóide de pele (biópsia)	Carcinoma epidermóide de pele (biópsia)	Carcinoma de mama (biópsia)
Resultado no controle	Sinal de hibridização adequado	Sinal de hibridização adequado	Sinal de hibridização adequado
Resultado em material de autópsia	Sinal de hibridização fraco	Sinal de hibridização fraco	Sinal de hibridização fraco

3.8.2 FISH

A tabela 4 resume os protocolos padronizados para as respectivas sondas para FISH. Apesar dos resultados satisfatórios com as reações de FISH padronizadas em TMA de CHC de peças cirúrgicas, o mesmo não foi observado no material de autópsia deste estudo.

Tabela 4: Características das sondas de FISH e padronização das reações

Sonda	EGFR/cromossomo 7	HER2/cromossomo 17
Fornecedor	Zytovision (Alemanha)	Zytovision (Alemanha)
Tipo	Dupla	Dupla
Pré-tratamento	Painela de pressão Ácido cítrico 10 mM pH 6 3 min 30 s Descanso 30 min	Painela de pressão Ácido cítrico 10 mM pH 6 3 min Descanso 20 min
Digestão enzimática	Proteinase K 0,025mg/mL 10 s a 45°C	Proteinase K 0,025mg/mL 10 s a 45°C
Desnaturação	95°C por 10 min	95°C por 10 min
Hibridização	37°C por 15h30min	37°C por 20h
Controle	CHC peças cirúrgicas	CHC peças cirúrgicas
Resultado no controle	Sinal de hibridização adequado	Sinal de hibridização adequado
Resultado em material de autópsia	Hibridização ausente	Hibridização irregular

3.9 Análise Estatística

Para a análise estatística foi utilizada a versão 15.0 do *software* SPSS (SPSS Inc, Chicago, EUA).

Todas as variáveis numéricas foram submetidas a teste de distribuição normal (Kolmogorov-Smirnov). Peso, idade e medidas do tumor tiveram distribuição normal.

As comparações das distribuições das variáveis clínico-patológicas e imuno-histoquímicas foram realizadas através dos testes do qui-quadrado ou exato de Fisher quando aplicáveis, ao nível de significância de 0,05.

As comparações de médias dos pesos do fígado foram realizadas através do teste t de Student, ao nível de significância de 0,05. As diferenças de escores foram avaliadas pelo teste de Mann-Whitney.

O coeficiente de correlação de Spearman foi utilizado para as correlações dos escores e demais variáveis categóricas.

Na análise de heterogeneidade entre o tumor e as próprias metástases (ganho ou perda de expressão) foi utilizado o teste de Wilcoxon unicaudal para duas amostras não paramétricas relacionadas.

4 RESULTADOS

4.1 Dados epidemiológicos e anatomopatológicos gerais

As características epidemiológicas e anatomopatológicas estão resumidas nas tabelas 5 e 6 e nas figuras 3 e 4. Foram incluídos 62 casos do sexo masculino e 18 do sexo feminino (relação M:F de 3,4:1), com idade média de $58,1 \pm 10,9$ anos, 50% (40/80) na faixa etária idosa. A idade mínima e a máxima foram de 28 a 82 anos, respectivamente. Casos classificados como brancos foram 60% (48/80), pardos e negros, 9% (7/80) e amarelos 8% (6/80). A informação sobre raça não estava disponível nos demais casos.

A infecção pelo VHC foi o principal fator etiológico para o CHC em 49% (39/80) dos casos, seguido por ingestão significativa de álcool em 30% (24/80) e infecção por VHB em 19% (15/80). Estes fatores estiveram combinados de diferentes formas em 19% dos casos (15/80). Dentre os casos de hepatite crônica viral, o álcool foi um co-fator em 26% (10/39) dos casos de infecção pelo VHC e 27% (4/15) dos casos de infecção pelo VHB. Houve co-infecção pelo VHB em 8% (3/39) dos casos de hepatite C (Tabela 5). Foram incluídos dois casos de CHC em cirrose por hemocromatose.

Tabela 5: Sumário dos dados clínicos e epidemiológicos em 80 autópsias com CHC

Características	n=80 (%)
<i>Sexo</i>	
Masculino	62 (78,5)
Feminino	18 (22,5)
<i>Idade (anos)</i>	
Média ± DP	58,1 ± 10,9
Mínimo – Máximo	28 – 82
<i>Faixas etárias</i>	
Adulto jovem (<40 anos)	04 (05)
Adulto (40 a 59 anos)	36 (45)
Idoso (≥ 60 anos)	40 (50)
<i>Etiologia geral</i>	
VHC	39 (49)
Álcool	24 (30)
VHB	15 (19)
<i>Etiologia específica</i>	
VHC	27 (33,7)
VHC + álcool	09 (11,2)
VHC + VHB	02 (2,5)
VHC + VHB + álcool	01 (1,3)
Álcool	11 (13,8)
VHB	09 (11,2)
VHB + álcool	03 (3,8)
Hemocromatose	02 (2,5)
Criptogênica	10 (12,5)
Dados não disponíveis	06 (7,5)

A etiologia do CHC foi considerada criptogênica em 12% (10/80) dos casos e indeterminada em 8% (6/80). Dentre os casos criptogênicos, houve suspeita clínica ou anatomopatológica de hemocromatose, doença de Wilson e NASH em um caso cada, porém sem diagnóstico definitivo. Dentre os casos de etiologia indeterminada, houve suspeita clínica de NASH em um caso, porém sem diagnóstico definitivo.

História de tratamento prévio foi identificada em 18% (14/80) dos casos: quimioembolização transarterial em 14% (11/80), um caso de quimioembolização associada a alcoolização e um caso de quimioterapia sistêmica. Foi identificado um caso de CHC presente à autópsia realizada 54 dias após transplante em que havia tumor avançado não previamente diagnosticado.

Pacientes cirróticos com CHC clinicamente relevante, não incidental, predominaram nesta série de autópsias. De fato, considerou-se que o CHC não contribuiu para o óbito apenas em 16% (13/80) dos casos, incluindo aqueles incidentais, e neste grupo a cirrose foi a causa básica de óbito. Por outro lado, o CHC, associado à cirrose ou não, foi causa básica de óbito em 75% (60/80) dos casos, e foi causa contribuinte em outros 9% (7/80).

Cirrose foi identificada em 90% (72/80) dos casos, e tumores avançados maiores do que 2,0 cm em 95% (76/80). Padrões macroscópicos avançados, com lesões múltiplas e de alto grau histológico foram frequentes (Tabela 6). Dentre as variantes histológicas foram apenas identificados dois casos de CHC de células claras, não estando os demais subtipos representados na presente série de autópsias.

Tabela 6: Sumário dos dados anatomopatológicos em 80 autópsias com CHC

Características	n=80 (%)
Em fígado cirrótico	72 (90)
CHC pequeno incidental (<2,0 cm)	04 (05)
<i>Padrão macroscópico (Eggel)</i>	
Nodular	31 (39)
Maciço (com ou sem lesões satélites)	26 (32)
Difuso	08 (10)
Não disponível / não classificável	11 (14)
<i>Maior medida do tumor (cm)</i>	
Mediana	4,1
Mínimo – Máximo	0,8 – 18,0
Dados não disponíveis / não mensuráveis	21 (26)
<i>Número de nódulos</i>	
1	24 (30)
2	04 (05)
3	01 (01)
≥4	43 (54)
Não disponível / não mensuráveis	08 (10)
<i>Grau histológico (Edmondson-Steiner)</i>	
1+2	22 (27)
3	47 (59)
4	11 (14)
<i>Padrão histológico predominante ou variante</i>	
Trabecular	36 (45)
Acinar / pseudoglandular	09 (11)
Sólido / macrotrabecular	24 (30)
Misto	09 (11)
Células claras	02 (03)

Insuficiência hepática e suas manifestações foram a causa imediata de óbito em 28% (22/80) dos casos, seguidas por hemorragia digestiva alta e eventos relacionados à hipertensão portal em 25% (20/80), infecções em 24% (19/80), complicações diretas do tumor em 14% (11/80) e outras causas em 10% (8/80).

Invasão de grandes veias foi descrita nos relatórios ou detectada à histologia em 19% (15/80), enquanto metástases extra-hepáticas (embólicas ou invasivas) foram detectadas em 38% dos casos (30/80). Os pulmões foram o principal sítio de disseminação com 26% (21/80) dos casos, seguidos pelos linfonodos com 8% (6/80). Os achados de disseminação e metástases estão na tabela 7. Dentre os 22 casos com representação histológica de metástases extra-hepáticas incluídas nos TMA, obtiveram-se resultados gerais em até 17 casos devido à perda relacionada ao pequeno tamanho de algumas metástases e/ou durante o processamento do TMA.

Amostras de tecido hepático não tumoral de 26 casos foram recuperadas para análise. Destas, 19 eram cirróticas (incluído um caso “pré-cirrótico”) e sete eram de tecido não cirrótico e sem fibrose relevante. Dentre as amostras de tecido não cirrótico, a etiologia do CHC foi considerada criptogênica em duas, indeterminada em duas, relacionada a infecção pelo VHC em uma, à co-infecção VHC e HIV em uma e ao etilismo em uma.

Tabela 7: Frequência e distribuição de invasão de grandes veias e metástases extra-hepáticas

	n (%)
<i>Invasão de grandes veias</i>	15 (19)
- com representação histológica disponível	10 (12)
<i>Metástases extra-hepáticas</i>	30 (38)
- com representação histológica disponível	22 (28)
<i>Locais de metástases (casos por topografia)</i>	
Pulmões	21 (26)
Linfonodos	06 (08)
Adrenais, osso, baço, diafragma, peritônio	02 (02)
Delgado, bexiga, cólon, pâncreas, hipófise, tireóide, pleura	01 (01)

Figura 3: Características histológicas (grau e arquitetura). A- CHC grau 1, padrão trabecular (HE, 400x). B-CHC grau 2, padrão acinar (HE, 400x). C-CHC grau 3, padrão macrotrabecular (HE, 400x). D-CHC grau 4, padrão sólido (HE, 400x)

Figura 4: Variante histológica e disseminação. A- CHC de células claras (HE, 400x). B- Metástase pulmonar embólica (HE, 400x). C- Metástase linfonodal (HE, 400x)

4.2 Correlações clínico-patológicas na série de autópsias

No contexto de uma casuística de autópsias, o peso do fígado torna-se um indicador e pode ser correlacionado às outras variáveis. O peso médio dos fígados foi de $1796 \pm 812\text{g}$, com base em 63 casos em que a informação estava disponível. O peso médio do fígado foi menor entre as mulheres, entre os idosos, nos casos com até três tumores, naqueles com maior tumor $< 6,0\text{ cm}$ e nos casos sem metástases extra-hepáticas (Tabela 8).

Tabela 8: Grupos com diferenças significativas de peso médio do fígado

Variável clínico-patológica (grupos)	Peso do fígado (g)		
	Média $\pm$ DP	n	
Homens	1913 ± 719	47	P = 0,050
Mulheres	1454 ± 986	16	
<60anos	2024 ± 830	31	P = 0,027
≥ 60 anos	1576 ± 742	32	
Até 3 tumores	1508 ± 737	25	P = 0,028
4 ou mais tumores (múltiplos)	1973 ± 820	35	
Maior tumor $< 6\text{ cm}$	1455 ± 687	35	P = 0,001
Maior tumor $\geq 6\text{ cm}$	2129 ± 680	18	
Casos sem metástases extra-hepáticas	1501 ± 626	41	P < 0,001
Casos com metástases extra-hepáticas	2346 ± 846	22	

Informações sobre etilismo e infecção por VHC ou VHB foram obtidas em 74 casos. O etilismo foi identificado em 43% dos homens (24/56) e não foi identificado entre as mulheres (0/18) (P < 0,001). Os homens

apresentaram tumores em média maiores do que as mulheres e tendência a menor prevalência de infecção pelo VHC (Tabela 9). Não se observou diferença estatística nas demais variáveis entre homens e mulheres.

Tabela 9: Dados clínico-patológicos selecionados em homens e mulheres

	Homens	Mulheres	
	n/total (%)	n/total (%)	
Etilismo	24/56 (43)	0/18 (0)	P < 0,001
Infecção pelo VHC	26/56 (46)	13/18 (72)	P = 0,065
	Média ± DP		
Medida do maior tumor	6,0 ± 4,4 cm (n=45)	3,2 ± 2,0 cm (n=14)	P < 0,01

As medidas do maior nódulo tumoral foram obtidas em 58 casos. Fígados com maior nódulo tumoral < 2,0 cm ocorreram em 45% (5/11) dos casos de infecção pelo VHB e em 15% (7/47) dos casos sem infecção pelo VHB (P = 0,039). Tumores com medida ≥ 6,0 cm foram mais frequentes nos fígados não cirróticos – 80% (4/5) – do que nos fígados cirróticos – 30% (17/54) (P = 0,049).

Os tumores de alto grau corresponderam a 68% (21/31), 88% (23/26) e 75% (6/8) dos padrões macroscópicos nodular, maciço e difuso, respectivamente (P = 0,190). Dentre os 72 casos com número de nódulos avaliável, as lesões de alto grau corresponderam a 55% (16/29) dos casos com um a três nódulos e a 86% (37/43) dos casos com múltiplos nódulos (P < 0,01).

Dentre os casos de CHC clássico graus 1 e 2 predominou o padrão histológico trabecular – 62% (13/21), seguido pelo padrão acinar/pseudoglandular – 24% (5/21). Nos tumores grau 3 também houve predomínio do padrão trabecular – 48% (22/46), seguido pelo padrão sólido/macrotrabecular – 28% (13/46). Dentre os casos de CHC grau 4 predominou o padrão sólido/macrotrabecular – 91% (10/11). Dos dois casos de variante de células claras um correspondeu a CHC grau 2 e outro a CHC grau 3.

Como nesta série o etilismo foi identificado apenas entre os indivíduos do sexo masculino, analisou-se esta população separadamente, identificando-se invasão de grandes veias em 38% dos etilistas (9/24) e em 16% (5/32) daqueles sem história de etilismo ($P = 0,061$).

Os grupos de variáveis anatomopatológicas em que se observaram diferenças na distribuição dos casos com metástases extra-hepáticas estão resumidos na tabela 10. Metástases extra-hepáticas ocorreram em 53% (23/43) dos casos com múltiplos nódulos hepáticos e em 10% (3/29) dos casos com 1 a 3 nódulos ($P < 0,001$). Enquanto o padrão macroscópico nodular apresentou 16% (5/31) de metástases extra-hepáticas, estas foram detectadas em 62% (16/26) dos casos de padrão maciço e em 50% (4/8) dos casos de padrão difuso ($P < 0,01$). Nos grupos com maior tumor $\geq 6,0$ cm e $< 6,0$ cm detectaram-se metástases extra-hepáticas em 57% (12/21) e 21% (8/38), respectivamente. ($P < 0,01$). Em relação ao grau histológico, as metástases extra-hepáticas foram detectadas em 27% (6/22) dos casos de grau 1 e 2 agrupados, 34% (16/47) dos casos de grau 3 e 73% (8/11) dos casos de grau 4 ($P = 0,034$).

Tabela 10: Distribuição de casos com metástases extra-hepáticas segundo variáveis anatomopatológicas

	Metástases extra-hepáticas (casos)		P
	Presentes	Ausentes	
<i>Padrão macroscópico</i>			P = 0,002
Nodular	5	26	
Maciço	15	10	
Difuso	4	4	
<i>Número de tumores hepáticos</i>			P < 0,001
1 a 3	3	26	
≥ 4	23	20	
<i>Medida do maior tumor</i>			P = 0,009
< 6,0 cm	8	30	
≥ 6,0 cm	12	9	
<i>Grau de Edmondson-Steiner</i>			P = 0,034
1 + 2	6	16	
3	16	31	
4	8	3	

Ao se explorar as relações entre o número de tumores hepáticos, metástases e estratificação do grau histológico, observa-se que os tumores grau 3 não diferem estatisticamente dos tumores grau 4 quanto ao número de lesões hepáticas. Entretanto, quando comparados ao grupo de graus 1 e 2, apenas os tumores grau 4 estiveram associados a metástases extra-hepáticas (Tabela 11).

Tabela 11: Variáveis anatomopatológicas selecionadas e grau histológico

	Grau 1+2 (n=22)	Grau 3 (n=47)	Grau 4 (n=11)	P
	Casos / amostras válidas (%)			
Maior tumor ≥ 6,0 cm	5/16 (31)	11/34 (32)	5/9 (56)	0,441
≥ 4 tumores hepáticos	6/19 (32)	30/43 (70)	7/10 (70)	0,014
Invasão de grandes veias	3/22 (14)	10/47 (21)	2/11 (18)	0,849
Metástases	6/22 (27)	16/47 (34)	8/11 (73)	0,034

* Valores em negrito com P<0,05

4.3 Segregação de grupos com possíveis comportamentos biológicos ou fatores etiológicos distintos

Alguns subgrupos foram segregados e analisados isoladamente, em alguns casos de forma descritiva devido ao pequeno número de casos.

4.3.1 CHC em mulheres

Observamos nesta série 23% (18/80) de mulheres. Entre os adultos jovens e entre os idosos a proporção de mulheres sobe respectivamente para 75% (3/4) e 33% (13/40) ($P < 0,01$) (Tabela 12). Entre os adultos, apenas 6% (2/36) dos casos eram do sexo feminino. Dentre os casos com sorologia conhecida, a proporção de infecção por VHC entre as mulheres foi de 72% (13/18) e de 46% (26/56) entre os homens ($P = 0,065$). Ao se excluirmos outras etiologias associadas (álcool e VHB) e as causas indeterminadas ou desconhecidas, as proporções de infecção por VHC passam respectivamente a 80% (12/15) e 62% (15/24) ($P = 0,305$).

4.3.2 CHC em fígado não cirrótico

Observamos oito casos de CHC em fígado não cirrótico e sem fibrose significativa – 10% (8/80). A proporção de adultos jovens foi de 25% (2/8) neste grupo contra 3% entre os cirróticos (2/72) ($P = 0,048$). Este grupo

também apresentou maior frequência de casos de CHC criptogênico ou de causa indeterminada – 50% (4/8) – em relação aos cirróticos – 17% (12/72) ($P = 0,047$). Finalmente, quando avaliável, a medida máxima do tumor foi $\geq 6,0$ cm em 80% (4/5) dos casos deste grupo e em 31% (17/54) dos cirróticos ($P = 0,049$). Brevemente, os casos de CHC em fígado não cirrótico foram assim caracterizados:

Dois casos em homens idosos (80 e 82 anos), com apresentação clínica aguda (hemoperitônio e insuficiência hepática) e padrão macroscópico maciço, sem investigação clínica de causa para o CHC. Ambos apresentaram CHC grau 3, sendo que o paciente com hemoperitônio apresentou metástases pulmonares. Ambos apresentaram alterações reativas hepáticas, sem fibrose ou esteatose significativas.

Dois pacientes do sexo masculino com infecção pelo VHC. Um homem de 52 anos com co-infecção pelo HIV, padrão macroscópico maciço e um de 62 anos com padrão macroscópico nodular. Ambos apresentaram CHC grau 2 com metástases pulmonares e parênquima hepático com atividade inflamatória leve. O primeiro com fibrose portal com septos (F2) e o segundo com fibrose portal leve (F1).

Um paciente masculino de 69 anos etilista com fibrose portal leve e alterações hepáticas reativas secundárias a sepse por abscesso após colangiopancreatografia endoscópica. Apresentou CHC nodular de 8,0cm peri-hilar grau 3, sem metástases à autópsia.

Dois pacientes de causa criptogênica: um homem de 65 anos e uma mulher de 28 anos, ambos com CHC grau 3 de padrão maciço, com metástases. Em ambos o parênquima hepático apresentava áreas isquêmicas ou hemorrágicas, sem fibrose ou esteatose significativas.

Finalmente, em uma paciente de 38 anos com CHC multinodular grau 3 os dados da histologia do fígado não tumoral não puderam ser recuperados, entretanto havia história clínica e descrição macroscópica de lesão em fígado não cirrótico.

4.3.3 CHC em adultos jovens

Entre os quatro casos de CHC em indivíduos com menos de 40 anos, dois ocorreram em mulheres sem cirrose: uma de 38 anos com infecção pelo VHC e uma de 28 anos com CHC variante células claras com metástase pulmonar. Os dois outros casos ocorreram no contexto da cirrose pelo VHB: um homem de 30 anos com CHC de padrão difuso e uma mulher de 36 anos com quimioembolização prévia e metástases pulmonares. Os quatro casos apresentavam múltiplos nódulos hepáticos.

4.3.4 CHC pequeno

Foram identificados quatro casos que apresentaram apenas CHC pequeno, no contexto da cirrose, com um ou dois nódulos com tamanho

máximo de 0,8 a 1,5 cm. Dois casos associados a VHB (um deles com etilismo concomitante), um associado a VHC e um de etiologia indeterminada. Dois homens e duas mulheres com idade de 42 a 68 anos, com neoplasias grau 1 ou 2 (três casos) ou grau 3 (um caso). Duas apresentavam padrão histológico trabecular, uma de padrão misto e uma delas apresentava área de células claras.

Tabela 12: Distribuição dos casos segundo sexo e faixa etária

	Adulto jovem (< 40 anos)	Adulto (40 a 59 anos)	Idoso (≥ 60 anos)	Total
Sexo				
Masculino	1	34	27	62
Feminino	3	2	13	18
Total	4	36	40	80

4.4 Resultados da análise imuno-histoquímica

4.4.1 Análise preliminar dos padrões de reatividade de anticorpos anti-EGFR em CHC e tecido circunjacente

A tabela 13 e a figura 5 resumem e ilustram os resultados comparativos entre os anticorpos anti-EGFR. A tabela 14 demonstra a positividade nos diferentes pontos de corte para os três anticorpos nos CHC intra-hepáticos.

Tabela 13: Comparação dos resultados obtidos com os diferentes anticorpos – EGFR em CHC e tecido não tumoral

	Mediana dos escores (mínimo – máximo)				
	EGFRDx	DAK-H1-WT	D38B1		
	n=75	n=76	n=73		
CHC primário	153,3 (0 – 300)	185,8 (0 – 300)	10,0 (0 – 235)	P = 0,051	P < 0,001
Metástases	n=19 80,0 (0 – 300)	n=19 140,0 (0 – 300)	n=18 23,3 (0 – 280)	P = 0,418	P = 0,189
Tecido não tumoral	n=27 225 (83,3 – 300)	n=27 190 (56,7 – 280)	n=27 0,7 (0 – 83,3)	P = 0,022	P < 0,001
	Marcação citoplasmática – n (%)				
	EGFRDx	DAK-H1-WT	D38B1		
CHC primário	n=75	n=76	n=74		
≥ 1+	16 (21)	60 (79)	40 (54)	P < 0,001	P < 0,001
≥ 2+	7 (9)	20 (26)	5 (7)	P < 0,01	P = 0,566
3+	1 (1)	9 (12)	0 (0)	P = 0,018	P = 1
Metástases	n=17	n=16	n=15		
≥1+	1 (6)	10 (62)	6 (40)	P < 0,001	P = 0,030
Tecido não tumoral	n=27	n=27	n=27		
≥1+	5 (19)	27 (100)	22 (81)	P < 0,001	P < 0,001
≥2+	0 (0)	26 (96)	0 (0)	P < 0,001	P = 1
	Marcação assimétrica de membrana – n(%)				
	EGFRDx	DAK-H1-WT	D38B1		
CHC primário	n=75	n=75	n=73		
	5 (7)	11 (15)	4 (5)	P = 0,185	P = 1
Metástases	n=17	n=16	n=15		
	0 (0)	3 (19)	2 (13)	P = 0,103	P = 0,212
Tecido não tumoral	n=27	n=27	n=27	P < 0,001	P < 0,001
	19 (70)	6 (22)	2 (7)		

Tabela 14: Comparação de anticorpos – Escores de expressão de EGFR em CHC intra-hepático

	EGFRDx		DAK-H1-WT		D38B1	
	n	%	n	%	n	%
Total	75	100	75	100	73	100
<i>Ponto de corte</i>						
>0	67	89	74	99	43	59
>10	59	79	70	93	35	48
>20	54	72	68	91	31	42
>30	52	69	67	89	29	40
>40	52	69	66	88	24	33
>50	51	68	64	85	22	30
≥100	49	65	55	73	13	18
≥150	38	51	48	64	7	10
≥200	29	39	34	45	1	1
≥250	9	12	16	21	0	0

O anticorpo EGFRPharmDx foi o que apresentou melhor resultado geral: houve predomínio de marcação de membranas e geralmente ausência de marcação citoplasmática. Além disso, a marcação assimétrica de membrana (pólo biliar e/ou membrana basolateral) ficou mais evidente com este anticorpo, especialmente no tecido não tumoral (Figura 6). Por este motivo, conforme descrito na seção de métodos, os resultados com EGFRPharmDX foram utilizados na análise estatística final do projeto.

O clone DAK-H1-WT apresentou excessiva marcação citoplasmática, prejudicando o contraste com a marcação de membrana, levando a escores médios ligeiramente mais altos no tecido tumoral e levemente mais baixos no tecido não tumoral. Em dois casos houve marcação citoplasmática em “dot” perinuclear, não observada com os outros anticorpos (Figura 7). A correlação geral foi alta com o anticorpo EGFRPharmDx (coeficiente de 0,83 $P < 0,001$) e moderada com o clone D38B1 (coeficiente de 0,61 $P < 0,001$).

O clone D38B1 apresentou evidente perda de positividade em relação ao EGFRPharmDx com importante redução dos escores médios de membrana e ainda com marcação citoplasmática (embora menor que o clone DAK-H1-WT). Mesmo assim, houve correlação geral com o anticorpo EGFRPharmDx (coeficiente de 0,75 $P < 0,001$).

Figura 5: Padrões de marcação dos anticorpos anti-EGFR respectivamente nos tecidos tumoral (T), metastático (M) e cirrose (C). (400x)

Figura 6: Padrão de marcação do EGFR (PharmDx) basolateral (A, 400x) e canalicular (B, 400x) em CHC. Heterogeneidade de padrão de marcação em tecido cirrótico com aparecimento de padrão canalicular próximo à zona 3 centrolobular (C, 200x) e (D, 400x).

Figura 7: Padrão “dot” perinuclear do EGFR (DAK-H1-WT) (setas em A e B, 400x)

4.4.2 Marcadores com baixa expressão ou resultado negativo

A expressão de MAPKAPK2 foi fraca e focal (escore ≤ 10) em 8% (6/71) dos CHC e em 6% (1/17) das metástases avaliáveis. Não foi detectada expressão hepatocitária de MAPKAPK2 nas amostras não tumorais (0/26) ou nas amostras de invasão venosa (0/8). A marcação foi positiva em linfócitos teciduais. (Figura 8)

Não foi detectada expressão tumoral ou hepatocitária de pEGFR (Tyr1173) ou HER2 em qualquer “spot” deste estudo. Os controles positivos foram adequados em todas as reações. (Figuras 9 e 10)

Figura 8: Marcação para MAPKAPK2. A- Controle interno positivo em linfócitos teciduais (400x). B- Marcação fraca e focal (400x)

Figura 9: A- Ausência de marcação para pEGFR(Tyr1173). B- Controle positivo (400x)

Figura 10: Herceptest (HER2): A- Controle positivo 3+ (mama); B- CHC grau 2 negativo; C- CHC grau 3 negativo; CHC grau 4 negativo. (400x)

4.4.3 Padrões de reatividade geral dos anticorpos em CHC, metástases e tecido não tumoral.

A tabela 15 sintetiza os padrões de expressão e os critérios utilizados para os diferentes marcadores em CHC primários, metástases e tecido não tumoral na série geral do estudo. (Figuras 11 a 22)

No conjunto dos dados, o tecido não tumoral dos casos com CHC apresentou com mais frequência diferenças de expressão significativas em relação às amostras tumorais. Houve maior expressão de EGFR e de caspase 3 além de menor expressão de p53 e índices mais baixos de proliferação celular pelo Ag Ki67 em relação às amostras tumorais. Não se detectou expressão de CK19 maior do que 1% em hepatócitos de fígado não tumoral. Positividade de ERK1 e ERK2 com escores ≥ 200 foi detectada apenas em amostras tumorais.

Houve uma expressão significativamente mais frequente de ciclina D1 nas metástases em relação às demais amostras. Observamos ainda uma tendência a expressões crescentes de vimentina e beta-catenina nuclear nas amostras tumorais e nas metástases em relação ao tecido não tumoral.

A expressão tumoral ou hepatocitária de pMAPK foi fraca e focal (escore ≤ 10) em 3% (2/72) dos CHC avaliáveis, e não foi detectada em invasões vasculares (0/8), metástases (0/17) ou tecido não tumoral (0/26). Entretanto, embora pouco frequente, a expressão endotelial moderada a acentuada de pMAPK foi detectada em 12% (2/17) das metástases e em 1,4% (1/72) dos tumores intra-hepáticos ($P = 0,09$) (Figura 23).

A expressão de mTOR, Met, ERK1 e ERK2 foi maior nas metástases do que nos tumores hepáticos embora sem significância estatística. Entretanto, curiosamente, a expressão de mTOR e Met foi algo semelhante ao tecido não tumoral, mais facilmente detectada nas lesões mais diferenciadas (Figuras 17 e 18). Expressão intensa de ERK1 e ERK2 foi detectada principalmente nas metástases (Figuras 19D, 20C e 20D).

Tabela 15: Resultados dos diferentes marcadores na população geral do estudo

		Não tumoral	CHC primário	Metástases	
Critério		n=26	n=75	n=17	P
EGFR					
Expressão	escore ≥ 10	26 (100)	60 (80)	12 (75)§	0,014
Hiperexpressão	escore ≥ 200	17 (65)	29 (39)	6 (38)§	0,054
Citoplasmático	$\geq 1+$	5 (19)	16 (21)	1 (6)§	0,420
Assimetria de membrana	canalicular/basal	19 (73)	5 (7)	0 (0)	<0,001
Ag Ki67					
	$\geq 0,1\%$	2 (8)	45 (63)‡	13 (76)	<0,001
CK19					
	$> 1\%$	0 (0)	12 (16)†	5 (29)	0,011
Vimentina					
	> 0	0 (0)	4 (6)†	3 (18)	0,064
Caspase 3 (perda)					
	≤ 10	2 (8)	26 (36)†	7 (41)	0,009
Ciclina D1					
	$> 0,1\%$	4 (15)	16 (23)•	9 (53)	0,018
mTOR (expressão)					
	escore ≥ 100	8 (31)	14 (21)•	5 (31)§	0,533
Met (expressão)					
	escore ≥ 100	10 (38)	12 (17)‡	5 (29)	0,068
pMAPK (endotelial)					
	2 ou 3+	0 (0)	1 (1)‡	2 (12)	0,090
ERK1					
	escore ≥ 200	0 (0)	10 (14)‡	5 (33)†	0,006
ERK2					
	escore ≥ 200	0 (0)	10 (14)‡	4 (24)	0,029
p53					
	$\geq 10\%$	2 (8)	28 (42)•	8 (50)§	0,002
Beta-catenina (membrana)					
	escore ≥ 100	10 (38)	42 (61)•	11 (65)	0,113
Beta-catenina (núcleo)					
	2 ou 3+	0 (0)	9 (9)•	3 (18)	0,070

§ Um caso perdido no processamento em relação ao total (n-1). † Dois casos perdidos no processamento em relação ao total (n-2). ‡ Três casos perdidos no processamento em relação ao total (n-3). • Quatro ou mais casos perdidos no processamento em relação ao total. **Valores em negrito com P < 0,05**

Figura 11: Expressão de Ag Ki67. A- Tecido não tumoral. B- CHC grau 2. C- CHC grau 3. D- CHC grau 4 (400x)

Figura 12: Expressão de vimentina em componente indiferenciado (400x)

Figura 13: CK19: A- CHC CK19 negativo. B- CHC com positividade fraca; C- CHC com positividade moderada; D- Controle positivo (colangiocarcinoma, positividade intensa (400x)

Figura 14: Expressão focal de CK19 em componente indiferenciado metastático em pulmão (400x)

Figura 15: Caspase 3. A- Cirrose. B- CHC grau 2. C- CHC grau 3. D- CHC grau 3 (400x)

Figura 16: Ciclina D1. A- Cirrose. B- CHC grau 2. C- CHC grau 2. D- CHC grau 3

Figura 17: mTOR. A- Cirrose. B- CHC grau 2. C- CHC metastático. D- CHC grau 3 (400x)

Figura 18: Met. A- Cirrose. B- CHC grau 2. C- CHC grau 3. D- CHC grau 3

Figura 19: ERK1. A- Cirrose. B- CHC grau 2. C- CHC grau 3. D- CHC grau 3 (escore 210)

Figura 20:ERK2. A- Cirrose. B- CHC grau 2. C- CHC grau 3. D- CHC grau 3 (escore 300)

Figura 21: p53. A- Cirrose. B- CHC grau 2. C- CHC grau 2. D- CHC grau 3

Figura 22: Beta-catenina. A- Cirrose. B- CHC grau 2. C- CHC grau 3. D- Nuclear em grau 4

Figura 23: A- Marcação endotelial 3+ de pMAPK em metástase de CHC. B- Controle interno positivo (glomérulos) no TMA (200x).

4.4.4 Imunomarcção de EGFR e variáveis anatomopatológicas

Foram obtidos resultados considerados válidos para a avaliação da imunomarcção de EGFR em 94% (75/80) das lesões hepáticas, 53% (16/30) das metástases, 32% (26/80) dos fígados não tumorais e 60% (9/15) das invasões vasculares.

A expressão e a hiperexpressão de EGFR foram respectivamente detectadas em 80% (60/75) e 39% (29/75) das lesões hepáticas, em 75% (12/16) e 38% (6/16) das metástases e em 67% (6/9) e 33% (3/9) das amostras de invasão de grandes veias. Tanto a expressão quanto a hiperexpressão de EGFR foram mais frequentes no fígado não neoplásico, respectivamente 100% (26/26) e 65% (17/26). Por outro lado, apenas a expressão de EGFR foi mais frequente nos controles não patológicos – 100% (8/8). Nenhuma amostra de controle apresentou hiperexpressão de EGFR (0/8) (Figura 24). A diferença observada nas amostras não tumorais se mantém quando a análise é restrita às amostras pareadas, ou seja, entre o tecido tumoral e não tumoral do mesmo caso, quando disponíveis (Tabela 16).

Figura 24: Expressão e Hiperexpressão de EGFR em fígado normal, patológico, CHC e metástases. (* $P < 0,05$ em relação aos controles).

Tabela 16: Análise da expressão de EGFR por escores em 25 amostras pareadas

	EGFR ≥ 10		EGFR ≥ 200	
	n/total (%)	P	n/total (%)	P
Não tumoral	25/25 (100)	0,050	17/25 (68)	0,004
CHC	20/25 (80)		6/25 (24)	
CHC	12/15 (80)	1,0	6/15 (40)	1,0
Metástase	12/15 (80)		7/15 (47)	
Não tumoral	8/8 (100)	0,2	4/8 (50)	1,0
Metástase	5/8 (62)		5/8 (62)	

A marcação assimétrica de membrana (biliar ou basolateral) foi observada em 73% (19/26) das amostras não tumorais, 7% (5/75) nos tumores hepáticos e não foi observada nas metástases (0/16) ($P < 0,001$). Nos controles, foi observada em 38% (3/8), especialmente na região centrolobular. Não foi observada associação entre a marcação assimétrica de membrana no tecido não tumoral com as demais variáveis clínico-patológicas.

A hiperexpressão de EGFR foi detectada em 67% (14/21) dos tumores de baixo grau (1 e 2) e em 28% (15/54) dos tumores de alto grau ($P < 0,01$). EGFR hiperexpresso foi observado em 56% (15/27) dos casos com menos de quatro nódulos hepáticos e em 26% (10/39) dos casos com quatro ou mais nódulos ($P = 0,014$). Corroborando estes achados, os casos com hiperexpressão tumoral de EGFR tiveram menor peso médio do fígado ($1483g \pm 824$, $n = 22$) em relação aos casos sem hiperexpressão ($2003g \pm 775$, $n = 36$) ($P = 0,019$). A tabela 17 resume as relações entre EGFR e os dados clínico-patológicos principais. Não houve associação entre EGFR e infecção por VHC, VHB, etilismo ou a presença de cirrose.

Em resumo, os maiores níveis de expressão de EGFR foram detectados no fígado não tumoral patológico, superiores aos controles normais, inclusive com expressão diferenciada que parece corresponder à assimetria funcional do hepatócito normal. Dentre os CHC, observou-se maior expressão de EGFR nas lesões mais diferenciadas (Figuras 25 e 26).

Tabela 17: EGFR em CHC e dados clínico-patológicos principais

	EGFR (expressão)		P	EGFR (hiperexpressão)		P
	escore < 10	escore ≥ 10		escore < 200	escore ≥ 200	
Grau						
1+2	1	20	0,046	7	14	0,008
3	13	31		32	12	
4	1	9		7	3	
Tumores hepáticos						
< 4	3	24	0,504	12	15	0,014
≥ 4	8	31		29	10	
Metástase						
Presente	9	19	0,042	18	10	0,863
Ausente	6	41		29	19	
Invasão venosa						
Presente	2	7	1,000	6	3	1,000
Ausente	13	53		40	26	
Cirrose						
Presente	12	55	0,193	39	28	0,141
Ausente	3	5		7	1	
VHC						
VHC+	4	33	0,324	21	16	0,806
VHC-	7	25		20	12	
VHB						
VHB+	1	13	0,440	8	6	1,000
VHB-	10	45		33	22	
Etilismo						
Presente	4	19	1,000	13	10	0,780
Ausente	7	39		28	18

Figura 25: Imunomarcacão de EGFR PharmDx e grau histológico: A- CHC grau 2 – escore 300 (400x); B- CHC metastático grau 3 – escore 150 (400x); C- CHC grau 3 – escore 60 (400x); D- CHC grau 4 – escore 0 (400x).

Figura 26: Expressão de EGFR em controles normais. Expressão leve (1+) a moderada (2+) em região centrolobular (escore 140, mesmo paciente). A (200x) e B (400x)

4.4.5 EGFR, proliferação, apoptose e quinases

Entre os elementos diretamente relacionados à cascata do EGFR e seus potenciais efeitos, obtiveram-se avaliações das quinases ERK1 e ERK2 e do Ag Ki67 (índice de proliferação celular). Caspase 3 foi utilizado como marcador de apoptose.

Como visto anteriormente, as amostras neoplásicas mostraram maior proliferação celular, menos morte celular por apoptose, maior ativação de ambas as quinases e menor expressão de EGFR do que as amostras não neoplásicas. Procedeu-se então à análise das correlações destes fatores entre si tanto nos tumores hepáticos quanto nas metástases extra-hepáticas.

As tabelas 18 e 19 mostram os coeficientes de correlação entre os escores de expressão, o grau histológico e o índice de proliferação pelo Ag Ki67 respectivamente nos tumores hepáticos e nas metástases.

Embora os coeficientes tenham valores moderados, foi observada, dentre os tumores hepáticos, uma associação negativa entre EGFR e grau, confirmando as associações anteriores, porém acompanhada de uma associação negativa entre grau e caspase 3 e uma associação positiva entre EGFR e caspase 3. Estes achados parecem indicar um padrão mais semelhante ao tecido não tumoral nas lesões de grau mais baixo, ou seja, maior expressão de EGFR associada a menor grau e mais apoptose. No conjunto dos tumores hepáticos, o Ag Ki67 foi associado ao grau histológico, porém não associado ao EGFR ou caspase 3. Finalmente, as quinases ERK1 e ERK2 estiveram tanto associadas entre si quanto ao Ag Ki67.

A tabela 20 mostra a distribuição dos casos em relação a estes marcadores e o grau histológico.

No conjunto das metástases foi observada uma forte associação negativa entre EGFR e proliferação celular pelo Ag Ki67. Manteve-se a associação positiva moderada entre ERK2 e Ag Ki67.

Tabela 18: Associações entre EGFR, proliferação, apoptose e quinases em CHC

	Grau	EGFR	Caspase 3	Ag Ki67	ERK1
EGFR	-0,34* (n = 75)				
Caspase 3	-0,42** (n = 73)	0,35* (n = 72)			
Ag Ki67	0,43** (n = 72)	0,00 (n = 71)	-0,18 (n = 71)		
ERK1	0,34* (n = 72)	-0,4 (n = 71)	-0,19 (n = 71)	0,39* (n = 70)	
ERK2	0,19 (n = 72)	0,22 (n = 71)	0,06 (n = 71)	0,63** (n = 70)	0,36* (n = 71)

Spearman rho ** P < 0,001; *P < 0,01.

Tabela 19: Associações entre EGFR, proliferação, apoptose e quinases em metástases

	Grau	EGFR	Caspase 3	Ag Ki67	ERK1
EGFR	0,03 (n = 16)				
Caspase 3	-0,3 (n = 17)	0,42 (n = 16)			
Ag Ki67	0,21 (n = 17)	-0,72** (n = 16)	-0,32 (n = 17)		
ERK1	-0,24 (n = 15)	-0,38 (n = 15)	-0,38 (n = 15)	0,39 (n = 15)	
ERK2	0,47§ (n = 17)	-0,15 (n = 16)	-0,39 (n = 17)	0,54* (n = 17)	0,46‡ (n = 15)

Spearman rho ** P = 0,002; * P = 0,027; § P = 0,058; ‡ P = 0,089.

Tabela 20: Distribuição dos casos de CHC pelo grau segundo expressão de EGFR, Ag Ki67, caspase 3 e quinases

	Grau (1+2)	Grau 3	Grau 4	P
	n (%)	n (%)	n (%)	
<i>EGFR escore</i>				0,006
< 10	1 (5)	13 (29)	1 (10)	
10 a 199	6 (28)	21 (48)	6 (60)	
≥ 200	14 (67)	10 (23)	3 (30)	
<i>Ag Ki67</i>				0,003
< 0,1%	14 (70)	11 (26)	2 (20)	
0,1% a < 2%	3 (15)	15 (36)	1 (10)	
≥ 2%	3 (15)	16 (38)	7 (70)	
<i>Caspase 3</i>				0,006
≤ 10	3 (15)	16 (38)	8 (73)	
> 10	17 (85)	26 (62)	3 (27)	
<i>ERK1</i>				
< 200	20 (100)	33 (80)	9 (82)	0,081
≥ 200	0 (0)	8 (20)	2 (18)	
<i>ERK2</i>				
< 200	19 (95)	36 (86)	7 (70)	0,148
≥ 200	1 (5)	6 (14)	3 (30)	

4.4.6 Associações entre os marcadores de perfil molecular e de vias de sinalização em CHC

As expressões dos diferentes marcadores no CHC foram correlacionadas entre si e ao grau histológico na tentativa de se caracterizar nesta série de autópsias diferentes perfis de CHC, associados ou não à expressão de EGFR e à disseminação extra-hepática.

A tabela 21 resume as associações nesta série de autópsias. Embora os coeficientes de associação sejam em geral moderados ou fracos, observou-se certa separação entre marcadores com associação positiva ao grau e proliferação celular (como p53, CK19 e beta-catenina nuclear) e marcadores com perfil oposto (como Met, EGFR e caspase 3). Vimentina teve importante associação com CK19. Um grupo de marcadores constituído por mTOR, beta-catenina de membrana e ciclina D1 parece ter características intermediárias, menos associada ao grau histológico mas ainda associadas à proliferação celular pelo Ag Ki67. Este grupo parece estar mais próximo àquele com maior expressão de Met e caspase 3. Embora ambas as quinases ERK1 e ERK2 estejam associadas à proliferação celular, e também entre si, ERK1 esteve associada a CK19 e vimentina ao passo que ERK2 teve associações com ciclina D1, Met e beta-catenina de membrana. A distribuição de frequência dos casos em relação ao grau histológico está no anexo B.

Tabela 21: Associações entre expressão de marcadores biológicos em CHC

	Grau	Ag Ki67	CK19	p53	ERK1	BcatN	ERK2	Vim	CKD1	BcatM	mTOR	Met	EGFR
Ag Ki67	0,43**												
CK19	0,37**	0,03											
p53	0,36**	0,29*	0,08										
ERK1	0,34**	0,39**	0,37**	0,17									
BcatN	<u>0,23</u>	0,44**	0,13	<u>0,24</u>	0,18								
ERK2	0,19	0,63**	<u>0,22</u>	-0,10	0,36**	<u>0,24</u>							
Vim	0,14	0,11	0,50**	0,02	0,31**	0,08	0,14						
CKD1	0,03	0,46**	-0,32**	-0,10	0,03	0,26*	0,29*	-0,19					
BcatM	-0,08	0,26*	-0,01	<u>-0,23</u>	0,17	-0,07	0,42**	0,01	0,25*				
mTOR	-0,24*	-0,02	-0,20	-0,21	0,25*	-0,03	0,13	-0,13	0,17	0,44**			
Met	-0,32**	0,16	<u>-0,20</u>	-0,35**	-0,01	<u>0,22</u>	0,39**	-0,18	0,38**	0,18	0,40**		
EGFR	-0,34**	0,00	-0,14	-0,13	-0,04	<u>-0,24</u>	<u>0,22</u>	-0,07	0,13	0,20	0,11	<u>0,23</u>	
Casp3	-0,42**	-0,18	-0,25*	-0,43**	-0,19	-0,06	0,06	-0,27*	0,19	0,16	0,32**	0,41**	0,35**

Spearman rho ** P < 0,01; * P < 0,05; P < 0,1(n.s.).

4.4.7 Comparação da expressão dos marcadores nos tumores hepáticos e nas respectivas metástases extra-hepáticas (Avaliação da heterogeneidade entre os tumores de um mesmo paciente)

A avaliação comparativa pareada entre metástases e tumor primário foi obtida em até 16 casos, conforme o anticorpo. A correlação geral de expressão está resumida na tabela 22. Observou-se uma correlação moderada entre as expressões de ciclina D1, ERK1 e beta-catenina nos tumores hepáticos e respectivas metástases. Uma correlação moderada porém não estatisticamente significativa foi observada para o EGFR, CK19 e caspase 3.

Analisou-se então o grau de concordância das categorias de expressão entre os tumores primários e as respectivas metástases (todas as metástases disponíveis avaliadas em relação ao respectivo tumor hepático) – tabela 23. As metástases extra-hepáticas apresentaram o mesmo grau histológico que o respectivo tumor hepático. A concordância de expressão variou de 55% (11/20) para a Caspase 3 a 85% (17/20) para a vimentina.

A concordância de expressão de EGFR entre as metástases e o tumor hepático foi de 61% (11/18). Dentre as metástases com expressão discordante (n=7), houve redução da expressão em relação ao tumor primário em 71% (5/7).

Tabela 22: Correlação geral de expressão entre CHC hepático e metástases

Marcador	Pares (n)	Spearman rho	P
EGFR	15	0,47	0,076
CK19	16	0,47	0,066
Caspase 3	16	0,49	0,052
Ciclina D1	15	0,58	0,025
Ag Ki67	15	0,05	0,860
mTOR	14	0,27	0,346
Met	14	0,08	0,784
Vimentina	16	-0,10	0,717
ERK1	14	0,55	0,042
ERK2	15	-0,11	0,969
p53	15	0,29	0,296
Beta-catenina	15	0,59	0,021

Tabela 23: Concordância de expressão entre CHC intra-hepático e metástases

Marcador	Expressão na metástase em relação ao primário			
	n/total das metástases (%)			P
	Concordante	Discordante		
		Ganho de expressão	Perda de expressão	
Grau	20/20 (100)			
EGFR	11/18 (61)	2/7 (29)	5/7 (71)	n.s.
CK19	15/20 (75)	3/5 (60)	2/5 (40)	n.s.
Caspase 3	11/20 (55)	4/9 (44)	5/9 (56)	n.s.
Ciclina D1	15/19 (79)	4/4 (100)	0/4 (0)	n.s.
Ag Ki67	11/19 (58)	5/8 (62)	3/8 (38)	n.s.
mTOR	14/18 (78)	4/4 (100)	0/4 (0)	n.s.
Met	12/18 (67)	5/6 (83)	1/6 (17)	n.s.
Vimentina	17/20 (85)	2/3 (67)	1/3 (33)	n.s.
ERK1	13/18 (72)	5/5 (100)	0/5 (0)	0,05
ERK2	14/19 (74)	5/5 (100)	0/5 (0)	0,05
p53	14/18 (78)	4/4 (100)	0/4 (0)	n.s.
Beta-catenina	11/19 (58)	2/8 (25)	6/8 (75)	n.s.

4.4.8 Análise das proteínas relacionadas à sinalização intracelular pelo EGFR e marcadores relacionados à biologia do CHC em portadores de infecção pelo VHC

O grupo de casos de CHC avançado em cirrose exclusivamente por hepatite C (excluindo-se co-infecções e álcool) é constituído por 23 autópsias (relação M:F de 1,1 : 1,0; média de idade $58,0 \pm 10,9$ anos). A tabela 24 resume as características deste grupo em comparação aos cirróticos com CHC sem infecção pelo VHC.

O grupo de cirróticos com CHC relacionado à infecção por VHC apresentou maior proporção de mulheres e de casos sem metástases à autópsia ($P < 0,01$).

Neste grupo de cirrose e CHC por VHC, houve predomínio de mulheres na faixa etária idosa (76,9%) em relação à faixa etária adulta (10%) ($P < 0,01$). No grupo sem infecção pelo VHC, estas proporções são de 6,7% (1/15) e 0% (0/12).

Com relação aos marcadores imuno-histoquímicos, não foi observada diferença significativa entre os casos VHC positivos e negativos com relação ao tecido não tumoral (Tabela 25), com exceção de uma menor expressão de ciclina D1 na cirrose por VHC. Os casos de CHC em cirrose por VHC tiveram maior expressão de p53 em relação aos casos VHC negativos.

Tabela 24: Dados clínico-patológicos em cirróticos com CHC em VHC+ e VHC-

	VHC+ (n=23)	VHC- (n=29)	P
	n (%)	n (%)	
Homens	12 (52)	27 (93)	0,001
Mulheres	11 (48)	2 (07)	
Adultos	10 (44)	12 (41)‡	1
Idosos	13 (56)	15 (52)	
1 a 3 tumores	12 (52)	12 (43)§	0,57
4 ou mais tumores	10 (44)	16 (57)	
Maior tumor <6cm	12 (52)	14 (67)†	1
Maior tumor ≥6cm	07 (30)	7 (33)	
Graus 1 + 2	6 (26)	9 (31)	0,72
Graus 3 + 4	17 (74)	20 (69)	
Sem metástases	20 (87)	15 (52)	0,009
Com metástases	3 (13)	14(48)	
Invasão venosa	02 (9)	3 (10)	1

§ Sem informações em 1 caso. † Sem informações em 8 casos. ‡ Excluídos 2 casos com menos de 40 anos. **P < 0,05**

Tabela 25: Comparação da expressão de marcadores em tecido cirrótico não tumoral versus tecido tumoral (VHC+ e VHC-): casos/total (%)

	Critério	Cirrose		P	CHC		P
		VHC+	VHC-		VHC+	VHC-	
EGFR expressão	escore ≥ 10	8/8 (100)	6/6 (100)	1	21/22 (96)	20/26 (77)	0,11
EGFR hiperexpressão	escore ≥ 200	6/8 (75)	4/6 (67)	1	11/22 (50)	9/26 (35)	0,61
Ag Ki67	$\geq 0,1\%$	1/8 (12)	0/6 (0)	1	14/23 (61)	17/26 (65)	0,11
CK19	$> 1\%$	0/8 (0)	0/6 (0)	1	4/22 (18)	3/26 (12)	0,69
Vimentina	> 0	0/8 (0)	0/6 (0)	1	1/23 (4)	1/26 (4)	1
Caspase 3 (perda)	≤ 10	2/8 (12)	0/6 (0)	0,47	7/23 (30)	6/26 (23)	0,75
Ciclina D1	$> 0,1\%$	1/8 (12)	5/6 (83)	0,026	5/22 (23)	6/26 (23)	1
mTOR (expressão)	escore ≥ 100	1/8 (12)	4/6 (67)	0,09	4/20 (25)	8/26 (31)	0,51
Met (expressão)	escore ≥ 100	3/8 (38)	3/6 (50)	1	2/23 (9)	6/25 (24)	0,23
pMAPK (endotelial)	2/3+	0/8(0)	0/6 (0)	1	0/22 (0)	1/25 (4)	1
ERK1	escore ≥ 200	0/8 (0)	0/6 (0)	1	4/22 (18)	2/25 (8)	0,4
ERK2	escore ≥ 200	0/7 (0)	0/6 (0)	1	2/22 (9)	5/26 (19)	0,43
p53	$\geq 10\%$	1/9 (11)	1/6 (17)	1	15/21 (71)	7/26 (27)	0,003
Beta-catenina (membrana)	escore ≥ 100	4/9 (44)	3/6 (50)	1	13/22 (59)	18/27 (67)	0,77
Beta-catenina (núcleo)	2/3+	0/9 (0)	0/6 (0)	1	1/22 (5)	0/27 (0)	0,45

4.4.9 Avaliação do tecido não tumoral e associações às características do tumor e de disseminação

No tecido não tumoral foi avaliado o grau de reação ductular (Figura 27) e semiquantificada a população de células estromais perissinusoidais que expressam vimentina (Figura 28). A semiquantificação das variáveis nas 26 amostras disponíveis está resumida na tabela 26.

Tabela 26: Distribuição das amostras de tecido não tumoral conforme a população de células perissinusoidais vimentina(+) e proliferação ductular (CK19) – 26 amostras

	Ausentes	1+	2+	3+
	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
Células perissinusoidais vimentina (+)	2 (8)	4 (15)	15 (58)	5 (19)
Reação ductular CK19 (+)	7 (27)	13 (50)	3 (12)	3 (12)

Metástases extra-hepáticas foram mais frequentes nos grupos com menor quantidade de células perissinusoidais vimentina (+) e com reação ductular ausente, porém sem significância estatística. O álcool também se associou a uma menor população de células perissinusoidais vimentina (+), embora não tenha havido relação entre álcool e metástases extra-hepáticas. (Tabelas 27 e 28).

Tabela 27: Associações selecionadas com células perissinusoidais vimentina (+)

	Células perissinusoidais vimentina (+)		
	n / total (%)		P
	0/1+	2+/3+	
Metástases	5/6 (83)	6/20 (30)	0,054
Etilismo	4/5 (80)	2/18 (11)	0,008

Tabela 28: Relação entre reação ductular e metástases extra-hepáticas – 26 amostras

Reação ductular CK19 (+)			
	n (%)		
Metástases	0	1+ a 3+	P
Sim	5 (71)	6 (32)	0,095
Não	2 (29)	13 (68)

Figura 27: Reação ductular em fígado circunjacente. A (0). B(2+). C(3+). D (400x)

Figura 28: Células vimentina(+) perissinusoidais. A (0). B (1+). C (3+) (200x). D (3+) (400x)

5 DISCUSSÃO

De modo geral a casuística do presente estudo é representativa de pacientes cirróticos com CHC avançado, com predomínio de infecção pelo VHC, mas também com importante contribuição do etilismo, por vezes isoladamente.

O estudo da presente série de autópsias mostrou que a hiperexpressão de EGFR foi mais frequente nos CHC e no tecido cronicamente inflamado, muitas vezes cirrótico circunjacente, do que no fígado não lesado, adicionado como controle. Mostrou também que, dentre os CHC, a hiperexpressão de EGFR esteve relacionada a lesões mais diferenciadas. Até onde pudemos estudar, até o momento esta é a primeira investigação sistemática *post mortem* sobre a expressão de EGFR por imuno-histoquímica em CHC, fígado circunjacente e metástases extra-hepáticas.

Estudos anteriores avaliaram a expressão do EGFR no CHC em espécimes de patologia cirúrgica ou biópsias, com variações consideráveis de métodos e resultados. Como vemos na tabela 29, as pesquisas são bastante heterogêneas quanto aos critérios de positividade, aos anticorpos e métodos de detecção utilizados. A nosso ver, tal heterogeneidade é uma causa importante para as discrepâncias observadas na literatura.

Tabela 29: Padrões de expressão de EGFR por imuno-histoquímica em lesões hepáticas e fígado normal em humanos:

Referência	Material	Recuperação Revelação	Anticorpo Clone Título	Escore Extensão/ Intensidade	Normal	Hepatite Cirrose	CHC	Relação com grau
Fukusato 1990 ⁶⁶	Congelado	Não ABC	Camundongo cl. 528 1:100	? / 0 – 3	0% (0/8)	27% (3/11)	81%(9/11)	Não
Nakopoulou 1994 ⁸³	Parafina	Tripsina ABC	Camundongo cl.(?) 1:80	Semi-quantitativo	NA	0% (0/34)	4%(4/71)	NA
Morimitsu 1995 ⁶⁷	Parafina	Saponina ABC	Camundongo cl. 528 ?	0 – 3+ / 0 – 4+	0%(0/3)	71% (17/24)	64%(16/25)	Sim Baixo grau
Yamaguchi 1995 ¹⁴⁹	Congelado	Pepsina	Camundongo cl.(?) pré-diluído	(+) ou (-)	NA	NA	70%(21/30)	NA
Kiss 1997 ⁸⁴	Parafina	Microondas pH 6,0 ABC	Camundongo Poli.SC-03 ?	? / 0 – 4+	NA	NI	NA (n=86)	NA
Kira 1997 ⁸⁰	Parafina	Não StreptABC	Camundongo cl.mAb2 1:200	(+) ou (-)	NA	22% (12/53)	47% (25/53)	Sim Alto grau
Tang 1998 ¹⁵⁰	NI	NI	NI	NI	NI	NI	47% (33/70)	NA
Ito 2001 ⁸¹	Parafina	Panela de pressão pH 6,0 ABC	Carneiro Poli.06-129 1:100	% células./ 0-2+	NA	16% (13/84)	68% (68/100)	Sim Alto grau
El Bassiouni 2006 ⁶⁸	Parafina	Microondas pH 6,0 StreptABC	Camundongo cl.EGFR.25 1:80	? / 0 – 3+	0%(0/10)	32% (25/79)	53% (10/19)	NA
Foster 2007 ¹⁵¹	Parafina	Proteinase K StreptABC	Camundongo ? 10µg/ml	(%) x Intensidade Histoscore	NA	NA	67%(20/30)	NA

(Continuação) **Tabela 29:** Padrões de expressão de EGFR por imuno-histoquímica em lesões hepáticas e fígado normal em humanos:

Referência	Material	Recuperação Revelação	Anticorpo Clone Título	Escore Extensão/ Intensidade	Normal	Hepatite Cirrose	CHC	Relação com grau
Buckley 2006 ¹¹⁰	Parafina	Proteinase K EGFR PharmDx kit	Camundongo cl. 2-18C9	10 – 50%/0 – 3+	0%(0/13)	NA	92%(12/13) (fibrolamellar)	NI
Kannangai 2006 ¹⁵²	Parafina	Instruções do fabricante	Cell Signaling ? 1:100	0 – 4+/0 – 3+	raro/focal	raro/focal	29%(21/73) (convencional) 54%(7/13) (fibrolamellar)	Não
Zhu 2007 ¹⁰⁴	Parafina	Pepsina ABC	Mono Zymed ? 1:100	0 – 3+	NI	NI	82%(18/22)	NI
Thomas 2007 ¹⁰¹	Parafina	NI Polímero/dextran	Camundongo cl.31G7 Zymed 1:50	Baixa: (-) ou fraca Alta: modera ou intensa	NI	NI	67%(27/40)	NI
Buckley 2008 ¹¹¹	Parafina	Proteinase K EGFR PharmDx kit	Camundongo cl. 2-18C9	10 – 50%/0 – 3+	0%(0/36) “não neoplásico / não cirrótico”	0%(0/30)	70%(46/66) – (primário) 40%(4/10) – (metástases)	Não
Schmitz 2008 ¹⁵³	Parafina	TRS pH 6.1 Envision	Mono Zymed ? 1:100	0 – 3+	NI	NI	96%(95/99)	NI
Tsiambas 2009 ¹⁵⁴	Parafina	Proteinase K NI	Camundongo cl.31G7 1:10	10%/0 – 3+	NA	NA	74%(26/35)	Sim Alto grau
Yoneda 2011 ¹⁵⁵	Parafina	Proteinase K EGFR PharmDx kit	Camundongo cl. 2-18C9	10 – 50%/0 – 3+	NA	NA	~77%(~60/78)	NI
Presente estudo	Parafina (autópsia)	Proteinase K EGFR PharmDx kit	Camundongo cl. 2-18C9	0 – 100%/0 – 3+ Escore 0 a 300	0% (0/8)	65% (17/26)	39% (29/75)	Sim Baixo grau

ABC: Complexo avidina-biotina-peroxidase. StreptABC: Streptavidina-biotina-peroxidase. cl: anticorpo monoclonal. Poli: Anticorpo policlonal.

NI: Resultado não informado pelo autor. NA:Resultado não avaliado pelo autor. (?): Dado não informado.

Esta enorme variabilidade de técnicas pode ter sido pelo menos um dos importantes fatores para que a expressão EGFR por imuno-histoquímica não tenha sido demonstrada como um bom fator preditivo de resposta às terapias-alvo anti-EGFR em outras neoplasias como adenocarcinoma de cólon e carcinoma não-pequenas células de pulmão. Por outro lado, trabalhos mais recentes parecem estar convergindo para o uso do EGFRPharmDx como forma de padronização da identificação da expressão de EGFR em neoplasias. Também por isto, surgiram recentemente os estudos de semiquantificação mais detalhada, destacando-se os de Foster et al.¹⁵¹, Pirker et al.¹⁴⁸ e Rüschoff et al.¹⁵⁶, tentando abordar o perfil de expressão de maior extensão da neoplasia, contemplando assim a heterogeneidade intratumoral e sugerindo o ponto de corte de 200 (de um escore com máximo de 300) para a definição de “hiperexpressão”. Com base nesses valores já começam a surgir trabalhos demonstrando o valor preditivo da hiperexpressão imuno-histoquímica de EGFR na resposta terapêutica em algumas neoplasias. Segundo Pirker et al.¹⁴⁸, escores de expressão por imuno-histoquímica maiores ou iguais a 200 foram preditivos de ganho de sobrevida com a adição de cetuximab à quimioterapia de primeira linha em pacientes com carcinoma não-pequenas células de pulmão em estágio avançado.

No presente estudo foi aplicado o escore de 0 a 300 descrito por Foster et al.¹⁵¹ e utilizado o escore de 200 para definir a hiperexpressão de EGFR como proposto por Pirker et al e Rüschoff et al.^{148,156}

Ainda de acordo com a tabela 29, a expressão significativa de EGFR não é geralmente detectada por imuno-histoquímica no tecido hepático humano normal.^{66,67,68,110,111} No entanto, a expressão significativa de EGFR pode ser detectada em até 71% dos casos no contexto da hepatite crônica e cirrose.^{66,67,68,80,81} Assim, as taxas de expressão e hiperexpressão de EGFR nas amostras não neoplásicas nesta série de autópsias são consistentes com os estudos anteriores.

A associação entre a expressão de EGFR e o grau histológico em CHC tem sido controversa. Embora alguns estudos tenham encontrado maior expressão de EGFR nos tumores de alto grau^{80,81,154} outros não conseguiram demonstrar qualquer associação.^{152,155} Os resultados do presente estudo são semelhantes aos descritos por Morimitsu et al⁶⁷ que encontraram uma perda progressiva da expressão do EGFR em CHC menos diferenciados em uma série de 25 pacientes japoneses submetidos a ressecção cirúrgica de tumores com tamanho variando entre 1,5 e 7,0cm.

No estudo de Morimitsu et al⁶⁷ foi utilizado o anticorpo anti-EGFR Ab-1, clone 528, Oncogene Science. Os autores utilizaram uma escala de intensidade de marcação de 0 a 3, e um sistema escalonado de extensão de marcação de 0 a 4, em que o zero corresponde à ausência de qualquer expressão e as classes 1 a 4 correspondem a extensões de marcação sucessivas em cortes de 25%. Os autores identificaram expressão de EGFR em 68% (13/19), 28% (5/18) e 0%(0/5) respectivamente das áreas de CHC bem, moderadamente e pouco diferenciado. Adicionalmente, nos tumores que apresentavam padrão de nódulo-em-nódulo, com dois ou três graus no

mesmo tumor, uma expressão menos intensa de EGFR no componente menos diferenciado foi detectada em 91% (10/11) dos casos.

Em estudo recente, Bassullu et al¹⁵⁷, utilizando o clone EGFR.113 (diluição 1:20; Novocastra) e a metodologia proposta por Pirker et al identificou expressão de EGFR em 40% (20/50) dos casos de CHC em série de explantes. A expressão de EGFR foi detectada em 17%(1/6), 49%(17/35) e 22%(2/9) respectivamente dos tumores grau 1, grau 2 e grau 3 de Edmondson-Steiner. Embora aqueles autores tenham correlacionado significativamente a expressão de EGFR ao grau, não fica claro no estudo se esta correlação foi ao alto ou ao baixo grau, e se foi utilizado como ponto de corte o escore de 200. Mesmo assim, chama a atenção a maior frequência de expressão nos CHC grau 2 em explantes, salientando-se que, em consonância com os chamados “critérios de Milão”, na maioria dos países são contra-indicados transplantes para CHC maiores que 5 cm, diferentes, portanto, de grande parcela dos tumores estudados no presente trabalho em casos de autópsias.

Uma possível limitação na interpretação dos resultados de hiperexpressão de EGFR no presente estudo, quando tomados de forma absoluta, é a impossibilidade, em estudo retrospectivo em material de rotina, de se realizar controle estrito dos fatores pré-analíticos como tempo de fixação e tempo de óbito. Esta limitação vale também para os outros marcadores. Tais limitações, especialmente em material de autópsia, tenderiam a reduzir globalmente a imunoexpressão dos marcadores, potencialmente caracterizando um erro sistemático. Todavia, nesta hipótese,

as análises comparativas e de correlação, que foram mais importantes neste estudo de desenho transversal, continuariam válidas, compensando um possível erro sistemático neste aspecto. Por outro lado, é mais provável que as interferências pré-analíticas, bem como outras imprevisíveis, tenham se distribuído na casuística de forma aleatória. Neste caso, o número relativamente alto de amostras, os controles internos de reação e as medidas de tendência central levariam os resultados para seus valores reais. Mesmo assim, estudos futuros em material cirúrgico ou mesmo estudos com coleta prospectiva em autópsias seriam importantes formas de verificação dos presentes resultados.

A análise dos níveis totais de EGFR em vez do estudo específico das formas ativadas (fosforiladas) do receptor pode constituir outra limitação nos trabalhos que implicam EGFR em CHC. No presente estudo não identificamos expressão de EGFR fosforilado na tirosina 1173, uma forma descrita frequentemente em carcinomas de pulmão.¹⁵⁸ Kannangai et al identificaram o principal sítio de fosforilação do EGFR em CHC como o resíduo de tirosina 845.¹⁵²

Yoneda et al¹⁵⁵ demonstraram uma associação entre aumento da expressão de EGFR por imuno-histoquímica e a expressão de CK19 em CHC, e que a ativação da via de sinalização EGF-EGFR associou-se ao desenvolvimento de CHC com expressão de CK19. Em contrapartida, apenas 2 casos (2,5%) naquele estudo foram de CHC pouco diferenciados e CK19 negativos, provavelmente devido a critérios de seleção (apenas espécimes de hepatectomias curativas foram incluídos). Houve uma

tendência na correlação entre a expressão de CK19 e o grau histológico, mas uma correlação entre o grau histológico e a expressão de EGFR não foi explícita. Em contraste, na presente série de autópsias observaram-se 14% de tumores indiferenciados (grau 4), com uma taxa de 30% de hiperexpressão de EGFR. Além de possíveis diferenças epidemiológicas e de seleção, o confronto dos dados pode sugerir que a referida indução de expressão de CK19 pela via EGF-EGFR seja um passo intermediário na progressão ou desdiferenciação do CHC. Possivelmente haja uma perda da hiperexpressão de EGFR em casos de CHC com expressão de CK19 em estágio mais avançado. Como interpretação alternativa, uma vez que os CHC com expressão de CK19 possam ser desde o início genotipicamente determinados (fenótipo de célula progenitora hepática), talvez a hiperexpressão de EGFR ou a expressão de CK19 em tumores avançados e metastáticos possam ser uma reminiscência de tipos previamente definidos por assinaturas de expressão gênica.

Nesta série de autópsias apenas 4 casos (5%) apresentaram CHC incidental. O CHC avançado e/ou a cirrose foram a principal causa de óbito ou uma importante causa contributiva em todos os outros 76 (95%) casos. Também aqui houve maior frequência relativa de alcoolismo na presente série em relação ao observado na prática clínica.⁸ As explicações mais prováveis para esta diferença são um possível viés sócio-econômico, possivelmente havendo maior número de pacientes de classes econômicas menos favorecidas em casos de autópsia, que inclui o acesso ao sistema de saúde, e uma provável baixa adesão ao tratamento em etilistas. Por razões

semelhantes, casos de NASH e de cirrose criptogênica podem estar respectivamente sub- e sobre-representados no presente estudo. Assim, possivelmente por este viés de seleção nas autópsias, há um excesso de casos avançados em homens e relacionados ao etilismo, não observado em mulheres. Este dado pode isoladamente sugerir explicações para alguns achados do presente estudo como uma maior frequência de invasão de grandes veias em etilistas, um predomínio de infecção pelo VHC em mulheres, com menor frequência de metástases extra-hepáticas e menor expressão de ciclina D1 no fígado não tumoral relacionada a infecção pelo VHC.

A concordância de expressão de EGFR entre os tumores hepáticos e as metástases extra-hepáticas foi de 61% (11/18), com uma correlação moderada. Assim, a heterogeneidade de expressão de EGFR mostrou-se relativamente alta no processo de progressão e metástases do CHC. Erros de amostragem não parecem ter sido significativos em função da quantidade suficiente de tecido presente à autópsia. Adicionalmente, dentre os casos com expressão discordante, a perda de expressão de EGFR nas metástases extra-hepáticas foi o padrão mais comum de discordância. Buckley et al¹¹¹ encontraram expressão moderada a intensa de EGFR em 70% (46/66) dos CHC primários porém em apenas 40% (4/10) dos CHC metastáticos. Watzka et al¹⁵⁹ relataram uma taxa de discordância de 31% na análise de expressão de EGFR entre carcinoma não pequenas células de pulmão primário e metastático em autópsias. Curiosamente, uma perda da expressão do EGFR nas metástases também foi o padrão mais comum (75%). Heterogeneidade considerável na expressão EGFR também foi observada entre o carcinoma

de mama primário e metastático em outro estudo de autópsias.¹⁶⁰ Esse conjunto de achados destaca que estudos em necropsias podem ser especialmente úteis na abordagem a aspectos morfológicos e moleculares do papel da heterogeneidade entre as células na progressão das neoplasias. Destaca também a necessidade de maiores discussões sobre a indicação de biópsia de metástases na melhor definição de estratégia terapêutica na prática clínica, já que os espécimes de metástases parecem melhor representar o perfil de expressão de determinadas moléculas-alvo no momento do tratamento, conforme consenso recém-publicado por Penault-Lorca et al¹⁶¹ em adenocarcinomas mamários.

No presente estudo o tumor hepático primário e as metástases intra-hepáticas foram analisados em conjunto devido à enorme extensão da doença hepática em vários casos e ao desenho retrospectivo da pesquisa, condicionada à disponibilidade da representação e às designações histológicas prévias. Outros estudos de autópsia analisaram separadamente as metástases intra-hepática do tumor primário, bem como os diferentes padrões de invasão venosa (portal ou hepáticas).^{116,162} Por outro lado, para os tumores muito grandes e multinodulares esta separação é de fato muito difícil e talvez impossível. O peso do fígado e o padrão macroscópico de Eggel suprem, ainda que parcialmente, estas limitações, como descrito em outros estudos.^{130,163}

Os padrões de expressão de Ag Ki67, ciclina D1 e caspase 3 indicam maior atividade proliferativa e menores taxas de apoptose nos tumores ou subpopulações tumorais mais agressivos, que tendem a predominar no

grupo das metástases. Entretanto, estas características biológicas não se refletem necessariamente no grau histológico das lesões, uma vez que, tanto em conjunto como de forma pareada, as metástases apresentaram aspectos histopatológicos semelhantes aos tumores intra-hepáticos. Analogamente, Winter et al¹⁶⁴ demonstraram menor expressão de caspase 3 em adenocarcinomas de próstata moderadamente e pouco diferenciados quando comparados com tumores bem diferenciados e tecido normal. Por outro lado, Persad et al¹⁶⁵ mostraram aumento de expressão de caspase 3 em espécimes de ressecção de CHC em relação ao tecido circunjacente em 52% (36/69) dos casos, porém sem relação com parâmetros clínico-patológicos, exceto por maiores níveis de alfa-fetoproteína.

Ampliando o conjunto de proteínas abordadas em busca de possíveis informes relevantes para a compreensão das recentes propostas de classificação de perfis de expressão gênica dos CHC obtivemos diversos achados de potencial interesse. Ressalte-se que, até onde pudemos estudar, o presente estudo é o primeiro trabalho a buscar a correspondente morfológica e imuno-histoquímica da classificação molecular proposta por Hoshida et al¹⁴⁶, à semelhança de estudos prévios em adenomas hepatocelulares e mesmo adenocarcinomas de mama.

A maior positividade para CK19 e vimentina nas metástases, mesmo em tumores com padrão histológico clássico, confirma dados da literatura do comportamento mais agressivo do CHC com expressão de CK19. A expressão de vimentina, embora incomum em CHC, tem sido associada a maior risco de metástases.¹⁶⁶ A expressão de CK19 tem sido associada a

um fenótipo de células progenitoras hepáticas em CHC, frequentemente acompanhada da expressão de marcadores de transição epitélio-mesenquimal que incluem a vimentina.¹⁶⁷

Observamos uma expressão de p53 em 42% (28/67) dos CHC primários e em 50% (8/16) das metástases. Estes achados são compatíveis com outros estudos em nosso meio que identificaram expressão ou mutação de p53 em cerca de 20% nas lesões de baixo grau e em cerca de 60% nas lesões de alto grau.^{24,25} No presente estudo a expressão de p53 acima do corte de 10% foi detectada em 28% (5/18) das lesões mais diferenciadas e em 64% (7/11) dos CHC grau 4. Entretanto, uma associação com a expressão de CK19 não foi observada.

Uma fração dos CHC apresenta aumento constitucional da expressão de ciclina D1, muitas vezes relacionado à amplificação da região cromossômica 11q13 onde se situa o respectivo gene CCND1.¹⁶⁸ A ativação do promotor da ciclina D1 é também um dos alvos preferenciais da via da beta-catenina. Joo et al¹⁶⁹ relacionaram a hiperexpressão de ciclina D1 em CHC a tumores bem diferenciados com baixo índice de proliferação pelo Ag Ki67 e, como no presente estudo, não identificaram associação entre a expressão de ciclina D1 e p53. Os resultados do presente estudo são em parte semelhantes aos descritos por Schmitt-Graeff et al¹⁷⁰ os quais demonstraram expressão de ciclina D1 associada à proliferação celular pelo Ag Ki67, porém não ao grau histológico do CHC. Diferentemente dos achados obtidos por aqueles autores e também por Prange et al¹⁷¹, identificamos no presente estudo correlação fraca entre a expressão de

ciclina D1 e a expressão de beta-catenina nuclear ou de membrana. Em outro estudo, Joo et al¹⁷² identificaram que a expressão anômala de beta-catenina (nuclear ou de membrana) estava associada à proliferação celular pelo Ag Ki67, porém apenas a hiperexpressão de membrana foi correlacionada a parâmetros patológicos de neoplasias mais agressivas como maior tamanho de tumor e invasão portal. Aqueles autores concluíram que mesmo a expressão anômala de membrana foi importante na progressão tumoral e na proliferação celular. No presente estudo de autópsias em que predominam tumores avançados pudemos especular sobre um possível papel mais relevante na relação entre a expressão anômala de beta-catenina e ciclina D1 (via Wnt) em um grupo de CHC com proliferação celular aumentada, porém ainda distinto dos tumores com características de indiferenciação. As correlações significativas nas amostras pareadas entre lesões intra-hepáticas e respectivas metástases para beta-catenina e ciclina D1 podem indicar que este grupo é definido numa etapa intermediária da progressão tumoral.

No presente estudo, as quinases ERK1 e ERK2 foram significativamente mais expressas nas lesões neoplásicas em relação ao tecido não tumoral. Ainda, apresentaram alguns comportamentos semelhantes como uma associação significativa entre si tanto no conjunto das lesões hepáticas como no das metástases, além de uma associação à proliferação celular detectada pela expressão do Ag Ki67. Ambas apresentaram uma tendência ao ganho de expressão nas lesões metastáticas em que houve discordância em relação às lesões intra-

hepáticas. Entretanto, algumas diferenças chamam a atenção. A expressão de ERK1 esteve associada ao grau histológico, à expressão de CK19 e vimentina, além de apresentar uma correlação significativa na comparação pareada entre lesões hepáticas e metastáticas. A expressão de ERK2 por sua vez não esteve associada ao grau histológico, e foi correlacionada à expressão de ciclina D1, beta-catenina de membrana e Met. A expressão de beta-catenina de membrana e de Met correlacionaram-se à expressão de mTOR. Tais achados sugerem que ERK1 seja preferencialmente expressa no CHC com fenótipo de células progenitoras, enquanto ERK2 seja preferencialmente expressa em CHC com ativação da via Wnt e/ou Met. Schmitz et al¹⁵³ demonstraram que a ativação das quinases ERK1/ERK2 em CHC, além de indicarem comportamento agressivo, foram um fator prognóstico independente e associado a etiologia pelo VHC. As especificidades e redundâncias de ERK1 e ERK2 ainda são em grande parte desconhecidas, entretanto, estudos indicam que ERK2 tem um papel mais proeminente na proliferação de hepatócitos normais e transformados enquanto ERK1 parece ter um papel pró-apoptótico.¹⁷³ Pode-se especular, à luz dos presentes resultados, que o CHC com fenótipo de células progenitoras apresente mecanismo de escape da ação pró-apoptótica de ERK1, possivelmente por ser mais associado à mutação de p53. Não observamos associação entre ERK1/ERK2 e EGFR no presente estudo. A hiperexpressão de quinases nesta série de casos avançados parece depender de outros mecanismos e vias.

O resultado negativo para HER2 no presente estudo é semelhante ao descrito por Ito et al⁸¹, que não identificaram expressão de HER2 em 79 amostras de CHC e apenas expressão fraca em outros 21 casos. HER2 parece não ter papel relevante na patogênese do CHC, parecendo-nos, entretanto, ainda válidas novas tentativas de estudos adicionais em espécimes cirúrgicos ou de biópsia por agulha.

Identificamos a expressão de pMAPK apenas em células endoteliais, mais frequentemente nas metástases do que nas lesões hepáticas, porém sem significância estatística. Além disso, a expressão de MAPKAPK2 foi fraca e infrequente nesta casuística. A detecção de epítomos fosforilados tem se mostrado um desafio em imuno-histoquímica. Holzer et al¹⁷⁴ demonstraram que, devido à sua natureza lábil e dinamicamente regulada, a detecção destes sítios é bastante prejudicada pelo tempo de isquemia pré-fixação. Porém esta labilidade varia consideravelmente entre epítomos em um mesmo tumor, e, para um mesmo epítopo, entre diferentes tipos de tumor. Em um modelo experimental, Piguet et al¹⁷⁵ demonstraram que o tratamento com doxorubicina estimulou a fosforilação de MAPKAPK2 em células endoteliais aórticas e células tumorais de CHC, porém este efeito foi revertido com a inibição de mTOR por temsirolimus apenas nas células tumorais, indicando que uma mesma proteína em diferentes tipos celulares pode apresentar diferentes padrões de fosforilação e resposta a agentes externos. No presente estudo a detecção preferencial de pMAPK em células endoteliais de lesões metastáticas deve indicar alguma forma de ativação no processo de disseminação ou, alternativamente, que esta forma fosforilada

foi mais estável e resistente a isquemia do que aquelas eventualmente presentes nas células tumorais ou hepatocitárias.

Ainda analisando outras células no ambiente tumoral, encontramos no presente estudo uma associação significativa entre a depleção de células sinusoidais morfológicamente consistentes com células de Kupffer e etilismo. Houve uma tendência à associação desta depleção com a presença de metástases extra-hepáticas. Estudos anteriores observaram uma redução do número de células de Kupffer no tecido hepático em hepatite crônica, cirrose biliar primária e outras formas de cirrose, o que é considerado um dos possíveis mecanismos de quebra de vigilância imunológica que contribuem para o aparecimento do CHC.¹⁷⁶ Chen et al encontraram uma associação entre menor número de células CD68 positivas intratumorais e o aparecimento de metástases, porém esta relação não foi observada com as células CD68 do tecido peritumoral.¹⁷⁷ O consumo excessivo de álcool tem sido descrito como um importante fator de depleção de função de células de Kupffer e células “Natural Killer” em estudos experimentais, o que contribui para a progressão do CHC e outras neoplasias.^{178,179}

No presente estudo, a perda de expressão de CK19 no tecido circunjacente foi mais frequente nos casos com metástases extra-hepáticas, embora sem significância estatística. Estudos recentes têm explorado o papel da perda de reação ductular como parte do processo de progressão do CHC. Lennerz¹⁸⁰ et al demonstraram que esta perda progressiva entre nódulo regenerativo, nódulo displásico e CHC está provavelmente relacionada a uma alteração do fenótipo de células epiteliais ductulares para

células mesenquimais por mecanismo de sinalização parácrina pró-fibrogênico, via TGF- β .

Acreditamos que a falta de padronização do manuseio com o tecido de autópsia em fase pré-analítica (tempo de fixação, formol não tamponado, autólise parcial) tenha sido um fator essencial para a impossibilidade de detecção de cópias do gene EGFR nos núcleos dos tecidos aqui estudados pelos métodos de hibridização *in situ*, contrastando com bons resultados que obtivemos em vários outros tipos de espécimes que usamos como controles. Medidas construtivas como a padronização de processos de fixação e a redução de intervalo entre o óbito e a coleta de amostras devem melhorar o aproveitamento dos tecidos de autópsia para métodos mais finos como hibridização *in situ* e biologia molecular. Assim, além da busca de validação de vários dos achados morfológicos e moleculares aqui identificados, novos estudos em espécimes cirúrgicos e de biópsia deverão buscar as correlações dos perfis de expressão do EGFR com as alterações numéricas de cópias desse gene e do centrômero do cromossomo 7.

6 CONCLUSÕES

- 6.1 O EGFR mostrou-se expresso em tecido hepático normal, patológico e neoplásico. Entretanto, a hiperexpressão, frequente no CHC e no fígado cirrótico ou inflamatório no contexto do CHC, não foi detectada nos controles de fígado normal.
- 6.2 Nesta casuística de autópsias, com predomínio de lesões avançadas, os CHC melhor diferenciados apresentaram hiperexpressão de EGFR mais frequente que nos tumores de maior grau, multifocais e metastáticos. Tais achados podem apontar para um papel relevante do EGFR nas etapas iniciais e intermediárias da progressão do CHC e/ou para a caracterização de classes diferentes de CHC associados ou não a ativação da via do EGFR
- 6.3 A hiperexpressão de EGFR nos CHC mais diferenciados associou-se a maior expressão de caspase 3, corroborando o papel da integridade dos pontos de controle do ciclo celular e das vias de apoptose como barreira importante na progressão do CHC. A análise imuno-histoquímica das proteínas da via de EGFR associadas a um amplo painel de outros marcadores parece validar pelo menos dois grupos de CHC, contemplados no esquema recentemente proposto de classificação molecular como perfil de células progenitoras e perfil hepatocitário. Nesta série de autópsias o grau histológico parece ter separado estes grupos.

- 6.4 A relativa perda de hiperexpressão de EGFR nas lesões mais avançadas e a maior proliferação celular vista pelo Ag Ki67 estão associadas ao aumento de expressão de quinases ERK1 e ERK2. Aparentemente, esta transição se dá ainda quando a doença está restrita ao fígado, uma vez que de modo geral houve concordância do perfil de expressão dessas quinases entre as lesões intra-hepáticas comparadas às respectivas metástases extra-hepáticas. Estes achados confirmam a importância da hiperexpressão das quinases na progressão tumoral, porém relativizam a importância do EGFR nas fases mais avançadas da doença.
- 6.5 A heterogeneidade ou discordância de expressão dos diferentes marcadores entre o CHC hepático e metástases extra-hepáticas variou de 15 a 45%. Entretanto, apenas para as quinases ERK1 e ERK2, nas situações de expressão discordante, identificou-se uma tendência unidirecional ao aumento de expressão nas metástases em relação o tumor hepático. Mesmo para os marcadores com concordância significativa, algum grau de heterogeneidade foi observado, porém sem tendência específica ao ganho ou perda de expressão.
- 6.6 As alterações de expressão das proteínas aqui estudadas parecem ser igualmente importantes na carcinogênese hepatocelular associada às principais causas aqui analisadas, não tendo sido detectadas diferenças significativas conforme os dados epidemiológicos e etiológicos, exceto por uma menor expressão de ciclina D1 no fígado

não tumoral nos casos de infecção pelo VHC e de uma maior expressão de p53 tumoral nos casos de infecção pelo VHC.

- 6.7 A expressão moderada ou forte de pMAPK no endotélio de lesões metastáticas bem como a menor população de células estromais perissinusoidais e a menor proliferação ductular no tecido não tumoral surgem como potenciais marcadores patológicos de disseminação extra-hepática.
- 6.8 O material de autópsia parafinado em arquivo conforme atualmente realizado no Departamento de Patologia da FMUSP apresenta importantes limitações para testes de hibridização *in situ*. A padronização de processos ou a coleta prospectiva são alternativas para contornar estas questões.

7 ANEXOS

7.1 Anexo A - Protocolos de padronização de hibridização *in situ*

Protocolos de padronização e resultados:

Sondas previamente padronizadas e resultados em material de autópsia:

7.1.1 Hibridização *in situ* cromogênica (CISH)

1- Sonda centromérica cromossomo 7 (Invitrogen):

- a. Pré-tratamento Panela de pressão - Solução de ácido cítrico 10mM pH 6,0 - 3'30";
- b. Enzima: 10';
- c. Denaturação e hibridização: 95°C - 5' e 37°C > 10h;
- d. Lavagem estrigente 1.5M Uréia/0,1X SSC

Resultado de CISH para cromossomo 7 em bloco de fígado de autópsia (campo representativo, 1000x) – as setas indicam fracos sinais de hibridização.

2- Sonda polimérica gene EGFR (Invitrogen):

- a- Pré-tratamento Panela de pressão - Solução de ácido cítrico 10mM pH 6,0 - 3'30";
- b- Enzima: 10';
- c- Denaturação e hibridização: 95°C - 5' e 37°C > 10h;
- d- Lavagem estrigente 1.5M Uréia/0,1X SSC

Sinais fracos de hibridização (setas) em material de autópsia – A- Tecido hepático normal; B- Carcinoma hepatocelular. (CISH, EGFR, 1000x – imersão)

3- Sonda polimérica gene HER2 (Invitrogen):

- a- Pré-tratamento Panela de pressão - Solução de ácido cítrico 10mM pH 6,0 - 3'30";
- b- Enzima: 1';
- c- Denaturação e hibridização: 95°C - 5' e 37°C > 10h;
- d- Lavagem estrigente 1.5 M Uréia/0,1X SSC

A- Controle positivo de amplificação de HER2 (*clusters*) em carcinoma de mama; B- Sinais muito fracos de hibridização (setas) em carcinoma hepatocelular de autópsia (CISH, HER2, 1000x- imersão)

Tentativas de protocolo para padronização em tecido de autópsia:

Teste hibridização nos TMAs autópsia (HER2 padronizada)

- a) T0124 (18) HER 2 15,0 ul
- b) T0124 (19) CEN 7 15,0 ul
- c) T0268 (23) HER 2 15,0 ul
- d) T0268 (24) CEN 7 15,0 ul
- e) spot ctl Her 2 HER 2 2,5 ul

Pré-tratamento: solução de ácido cítrico 10mM pH6,0 em panela de pressão por, 3min30

Digestão enzimática: Enzyme Pretreatment Reagent com 10 min nas lâminas

Digestão enzimática: Enzyme Pretreatment Reagent com 1 min na lâmina 7

(kit Spotlight 84-0146 lote 60882817 venc 08/2007)

Hibridizador: desnaturação: 95°C – 10 min e hibridização: 37°C – 14h54

Resultado: sinal fraquíssimo para os TMAs (obj 100X). **Controle Her 2 funcionou.**

Teste hibridização nos TMAs autópsia (EGFR padronizado)

- a) T0124 (20) EGFR 15,0ul
- b) T0268 (25) EGFR 15,0ul
- c) OC10- 0262 B1 EGFR 5,0ul

Pré-tratamento: solução de ácido cítrico 10mM pH6,0 em panela de pressão por 3min30

Digestão enzimática: Enzyme Pretreatment Reagent com 10 min nas lâminas

Hibridizador: desnaturação: 98°C – 5 min e hibridização: 37°C – 15h50

Resultado: sinal fraquíssimo para os TMAs (obj 100X).

Teste geral em material de autópsia para repadronização

1) OC10- 0262 B1 EGFR 4,5 ul

2) HC04/333G EGFR 4,5 ul

3) HC04/333G EGFR 4,5 ul

Pré-tratamento: solução de ácido cítrico 10mM pH6,0 em panela de pressão por 7 min

Digestão enzimática: Enzyme Pretreatment Reagent com 10 min nas lâminas

Hibridizador: desnaturação: 98°C – 5 min e hibridização: 37°C – 89h52

Resultado: sinal fraquíssimo (obj 100X).

Teste de protocolo utilizado em TMA de CHC (Tsiambas et al, 2009).

a) HC04/333G EGFR 3,5 ul

b) HC04/333G CEN 7 3,5 ul

c) OC10- 0262 B1 EGFR 3,5 ul

d) OC10- 0262 B1 CEN 7 3,5 ul

Pré-tratamento: solução do kit Ph 7 em coplin em panela de pressão por 10 min

Digestão enzimática: Enzyme Pretreatment Reagent (kit) com 5 min nas lâminas

Hibridizador: desnaturação: 94°C – 5 min e hibridização: 37°C – 92h57

Resultado: marcação inespecífica verificada pela análise com objetiva de 100X

Teste com aumento do tempo de recuperação por calor em material de autópsia

a) HC04/333G EGFR 3,5 ul

b) HC04/333G CEN 7 3,5 ul

Pré-tratamento: solução do kit pH7 em coplin em panela de pressão por 20 min+ 20 min de descanso

Digestão enzimática: Enzyme Pretreatment Reagent (kit) com 10 min nas lâminas 37°C

Hibridizador: desnaturação: 98°C – 5 min e hibridização: 37°C – 69h58

Resultado: marcação fraca e inespecífica verificada pela análise com objetiva de 100X

Teste com aumento do tempo de recuperação por calor em material de autópsia

a) HC04/333G EGFR 3,5 ul

b) HC04/333G CEN 7 3,5 ul

Pré-tratamento: solução do kit pH7 em coplin em panela de pressão por 25 min+ 20 min de descanso

Digestão enzimática: Enzyme Pretreatment Reagent (kit) com 10 min nas lâminas 37°C

Hibridizador: desnaturação: 98°C – 5 min e hibridização: 37°C – 92h17

Resultado: marcação fraca e inespecífica verificada pela análise com objetiva de 100X

Teste no TMA do estudo

a) TMA 0124 (nº17) EGFR 20,0 ul

b) TMA 0268 (nº22) EGFR 20,0 ul

c) HC04/333GEGFR 3,5 ul

Pré-tratamento: solução do kit pH7 em coplin em panela de pressão por 25 min+ 20 min de descanso

Digestão enzimática: Enzyme Pretreatment Reagent (kit) com 10 min nas lâminas 37°C

Hibridizador: desnaturação: 98°C – 5 min e hibridização: 37°C – 39h34

Resultado: marcação inespecífica verificada pela análise com objetiva de 100X

Resultado da tentativa de análise das amostras tumorais:

Sonda EGFR (Invitrogen)

Número de spots lidos: 232

Hibridização fraca em 39 (16,8%) – **83,6% sem hibridização**

Número médio de núcleos contados em cada spot lido: 31,9±11,0

Número médio de cópias por spot: 1,04 ± 0,26 (valor muito abaixo do esperado, provavelmente resultado não válido)

7.1.2 Hibridização *in situ* por fluorescência (FISH)

HER2

1) TMA 0119 TESTE EM PEÇAS CIRÚRGICAS DE CHC (nº44) 4,0 ul

2) HC04/333G (TESTE EM MATERIAL DE AUTÓPSIA) 3,0 ul

Pré-tratamento: ácido cítrico 10mM pH 6,0 em panela de pressão por 3 min+ 20 min de descanso

Digestão enzimática: enzima Proteinase K 0,025mg/mL 10 seg a 45°C

Hibridizador: desnaturação: 95°C - 10min e hibridização: 37°C - 20h03

Resultado: A reação funcionou para as duas lâminas

FISH HER2 - A e B – Hibridização positiva, número normal de cópias em tecido hepático de autópsia (mesmo material utilizado para o CISH) – 1000x

EGFR

1) TMA 0119 TESTE EM PEÇAS CIRÚRGICAS DE CHC (nº14) 3,5 ul

2) TMA 0124 (nº21) 15,0 ul

3) TMA 0268 (nº21) 15,0ul

Pré-tratamento: ácido cítrico 10mM pH 6,0 em panela de pressão por 3' 30min + 30 min de descanso

Digestão enzimática: enzima Proteinase K 0,025mg/mL 10 seg a 45°C

Hibridizador: desnaturação: 95°C - 10min e hibridização: 37°C - 15h29

Resultado: Funcionou para o TMA 119, mas não para as lâminas do estudo (autópsia)

FISH EGFR/CR7 –A a D: Sinais positivos de hibridização em TMA de carcinomas hepatocelulares (peças cirúrgicas). E – Morfologia nuclear preservada porém sem hibridização em TMA de autópsia. F – Morfologia nuclear não preservada e sem hibridização em TMA de autópsia. (1000x)

7.2 Anexo B

Distribuição dos diferentes marcadores de acordo com o grau histológico

		Casos/total avaliado (%)			P
	Critério	Grau 1+2	Grau 3	Grau 4	
EGFR hiperexpresso	escore ≥ 200	14/21 (67)	12/44 (27)	3/10 (30)	0,008
Ag Ki67	$\geq 0,1\%$	6/20 (30)	31/42 (74)	8/10 (80)	0,002
CK19	$> 1\%$	0/20 (0)	7/42 (17)	5/11 (45)	0,005
Vimentina	> 0	0/20 (0)	3/42 (7)	1/11 (9)	0,465
Caspase 3 (perda)	≤ 10	3/20 (15)	16/42 (38)	8/11 (73)	0,006
Ciclina D1	$> 0,1\%$	4/20 (20)	9/41 (21)	3/10 (30)	0,847
mTOR (expressão)	escore ≥ 100	7/19 (37)	17/38 (45)	1/10 (10)	0,134
Met (expressão)	escore ≥ 100	8/19 (42)	6/43 (14)	0/10 (0)	0,012
ERK1	escore ≥ 200	0/20 (0)	8/41 (20)	2/11 (18)	0,081
ERK2	escore ≥ 200	1/20 (5)	6/42 (14)	3/10 (30)	0,148
p53	$\geq 10\%$	5/18 (28)	16/38 (42)	7/11 (64)	0,164
Beta-catenina (membrana)	escore ≥ 100	13/20 (65)	25/39 (64)	4/10 (40)	0,343
Beta-catenina (núcleo)	2 ou 3+	0/20 (0)	1/39 (3)	1/10 (10)	0,352

8 REFERÊNCIAS

-
- 1 Boyler P, Levin B. editores. World cancer report. Lyon: IARC; 2008. Cap. 5.4 p. 350-7. Liver Cancer
 - 2 El-Serag HB, Rudolph KL. Hepatocellular carcinoma: epidemiology and molecular carcinogenesis. *Gastroenterology*. 2007;132(7):2557-76.
 - 3 Kanwal F, Hoang T, Kramer JR, Asch SM, Goetz MB, Zeringue A, et al. Increasing prevalence of HCC and cirrhosis in patients with chronic hepatitis C virus infection. *Gastroenterology*. 2011;140(4):1182-8.e1.
 - 4 Gonçalves CS, Pereira FE, Gayotto LC. Hepatocellular carcinoma in Brazil: report of a national survey (Florianópolis, SC, 1995). *Rev Inst Med Trop*. 1997;39(3):165-70.
 - 5 Theise ND, Curado MP, Franceschi S, Hytioglou P, Kudo M, Park YN et al. Hepatocellular carcinoma. In: Bosman FT, Carneiro F, Hruban RH, Theise ND, editores. *WHO Classification of Tumours of the Digestive System*. 4th ed. Lyon: IARC; 2010. p. 205-16.
 - 6 Chan HL, Sung JJ. Hepatocellular carcinoma and hepatitis B virus. *Semin Liver Dis*. 2006;26(2):153-61.
 - 7 Hytioglou P, Snover DC, Alves V, Balabaud C, Bhathal PS, Bioulac-Sage P, et al. Beyond "cirrhosis": a proposal from the International Liver Pathology Study Group. *Am J Clin Pathol*. 2012;137(1):5-9.

- 8 Carrilho FJ, Kikuchi L, Branco F, Goncalves CS, Mattos AA, Group BHS. Clinical and epidemiological aspects of hepatocellular carcinoma in Brazil. *Clinics (Sao Paulo)*. 2010;65(12):1285-90.
- 9 El-Serag HB. Epidemiology of viral hepatitis and hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology*. 2012;142(6):1264-73.e1.
- 10 Thorgeirsson SS, Grisham JW. Molecular pathogenesis of human hepatocellular carcinoma. *Nat Genet*. 2002;31(4):339-46.
- 11 Fattovich G, Stroffolini T, Zagni I, Donato F. Hepatocellular carcinoma in cirrhosis: incidence and risk factors. *Gastroenterology*. 2004;127(5 Suppl 1):S35-50.
- 12 Liang TJ, Heller T. Pathogenesis of hepatitis C-associated hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology*. 2004;127(5 Suppl 1):S62-71.
- 13 Yamashita T, Honda M, Kaneko S. Molecular mechanisms of hepatocarcinogenesis in chronic hepatitis C virus infection. *J Gastroenterol Hepatol*. 2011;26(6):960-4.
- 14 Donato F, Tagger A, Gelatti U, Parrinello G, Boffetta P, Albertini A, et al. Alcohol and hepatocellular carcinoma: the effect of lifetime intake and hepatitis virus infections in men and women. *Am J Epidemiol*. 2002;155(4):323-31.
- 15 Morgan TR, Mandayam S, Jamal MM. Alcohol and hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology*. 2004;127(5 Suppl 1):S87-96.
- 16 Bluteau O, Beaudoin JC, Pasturaud P, Belghiti J, Franco D, Bioulac-Sage P, et al. Specific association between alcohol intake, high grade of differentiation and 4q34-q35 deletions in hepatocellular carcinomas identified by high resolution allelotyping. *Oncogene*. 2002;21(8):1225-32.

-
- 17 Stickel F, Schuppan D, Hahn EG, Seitz HK. Cocarcinogenic effects of alcohol in hepatocarcinogenesis. *Gut*. 2002;51(1):132-9.
 - 18 Yip-Schneider MT, Doyle CJ, McKillop IH, Wentz SC, Brandon-Warner E, Matos JM, et al. Alcohol induces liver neoplasia in a novel alcohol-preferring rat model. *Alcohol Clin Exp Res*. 2011;35(12):2216-25.
 - 19 Hassan MM, Hwang LY, Hatten CJ, Swaim M, Li D, Abbruzzese JL, et al. Risk factors for hepatocellular carcinoma: synergism of alcohol with viral hepatitis and diabetes mellitus. *Hepatology*. 2002;36(5):1206-13.
 - 20 Liu Y, Chang CC, Marsh GM, Wu F. Population attributable risk of aflatoxin-related liver cancer: systematic review and meta-analysis. *Eur J Cancer*. 2012;48(14):2125-36.
 - 21 Ross RK, Yuan JM, Yu MC, Wogan GN, Qian GS, Tu JT, et al. Urinary aflatoxin biomarkers and risk of hepatocellular carcinoma. *Lancet*. 1992;339(8799):943-6.
 - 22 Hussain SP, Schwank J, Staib F, Wang XW, Harris CC. TP53 mutations and hepatocellular carcinoma: insights into the etiology and pathogenesis of liver cancer. *Oncogene*. 2007;26(15):2166-76.
 - 23 International Agency for Research on Cancer. IARC TP53 Database. [internet] 2012 nov [citado 2012 dez 12]. Disponível em: <http://p53.iarc.fr/TP53SomaticMutations.aspx>
 - 24 Nogueira JA. *Mutação pontual do códon 249 do TP53 no carcinoma hepatocelular* [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina: Universidade de São Paulo; 2007
 - 25 Nogueira JA, Ono-Nita SK, Nita ME, de Souza MM, do Carmo EP, Mello ES, et al. 249 TP53 mutation has high prevalence and is correlated with larger and poorly differentiated HCC in Brazilian patients. *BMC Cancer*. 2009;9:204.

- 26 Yu MC, Yuan JM. Environmental factors and risk for hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology*. 2004;127(5 Suppl 1):S72-8.
- 27 Koh WP, Robien K, Wang R, Govindarajan S, Yuan JM, Yu MC. Smoking as an independent risk factor for hepatocellular carcinoma: the Singapore Chinese Health Study. *Br J Cancer*. 2011;105(9):1430-5.
- 28 Bugianesi E, Leone N, Vanni E, Marchesini G, Brunello F, Carucci P, et al. Expanding the natural history of nonalcoholic steatohepatitis: from cryptogenic cirrhosis to hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology*. 2002;123(1):134-40.
- 29 Caldwell SH, Crespo DM, Kang HS, Al-Osaimi AM. Obesity and hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology*. 2004;127(5 Suppl 1):S97-103.
- 30 Chagas AL, Kikuchi LO, Oliveira CP, Vezozzo DC, Mello ES, Oliveira AC, et al. Does hepatocellular carcinoma in non-alcoholic steatohepatitis exist in cirrhotic and non-cirrhotic patients? *Braz J Med Biol Res*. 2009;42(10):958-62.
- 31 White DL, Kanwal F, El-Serag HB. Association between nonalcoholic fatty liver disease and risk for hepatocellular cancer, based on systematic review. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2012;10(12):1342-59 e2.
- 32 Starley BQ, Calcagno CJ, Harrison SA. Nonalcoholic fatty liver disease and hepatocellular carcinoma: a weighty connection. *Hepatology*. 2010;51(5):1820-32.
- 33 Sherlock S. Hepatic adenomas and oral contraceptives. *Gut*. 1975;16(9):753-6.

-
- 34 Blonski W, Kotlyar DS, Forde KA. Non-viral causes of hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol*. 2010;16(29):3603-15.
 - 35 Maheshwari S, Sarraj A, Kramer J, El-Serag HB. Oral contraception and the risk of hepatocellular carcinoma. *J Hepatol*. 2007;47(4):506-13.
 - 36 Keng VW, Sia D, Sarver AL, Tschida BR, Fan D, Alsinet C, et al. Sex bias occurrence of hepatocellular carcinoma in Poly7 molecular subclass is associated with EGFR. *Hepatology*. 2013;57(1):120-30.
 - 37 Gomaa AI, Khan SA, Toledano MB, Waked I, Taylor-Robinson SD. Hepatocellular carcinoma: epidemiology, risk factors and pathogenesis. *World J Gastroenterol*. 2008;14(27):4300-8.
 - 38 El-Serag HB, Mason AC. Rising incidence of hepatocellular carcinoma in the United States. *N Engl J Med*. 1999;340(10):745-50.
 - 39 Centers for Disease Control and Prevention. Hepatocellular carcinoma - United States, 2001-2006. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 2010;59(17):517-20.
 - 40 Kershenobich D, Razavi HA, Sánchez-Avila JF, Bessone F, Coelho HS, Dagher L, et al. Trends and projections of hepatitis C virus epidemiology in Latin America. *Liver Int*. 2011;31 Suppl 2:18-29.
 - 41 MS/SVS/DASIS/CGIAE/Sistema de Informação sobre Mortalidade – SIM - MP/Fundação Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE - MS/INCA/Conprev/Divisão de Informação [internet] 2012 [citado 2012 dez. 16]. Disponível em <http://mortalidade.inca.gov.br/Mortalidade/>

-
- 42 Llovet JM, Burroughs A, Bruix J. Hepatocellular carcinoma. *Lancet*. 2003;362(9399):1907-17.
- 43 Kikuchi LO. *Análise da sobrevida de pacientes com carcinoma hepatocelular pequeno* [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina: Universidade de São Paulo; 2007
- 44 Kikuchi LO, Paranaguá-Vezozzo DC, Chagas AL, Mello ES, Alves VA, Farias AQ, et al. Nodules less than 20 mm and vascular invasion are predictors of survival in small hepatocellular carcinoma. *J Clin Gastroenterol*. 2009;43(2):191-5.
- 45 El-Serag HB, Mason AC, Key C. Trends in survival of patients with hepatocellular carcinoma between 1977 and 1996 in the United States. *Hepatology*. 2001;33(1):62-5.
- 46 Llovet JM, Ricci S, Mazzaferro V, Hilgard P, Gane E, Blanc JF, et al. Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med*. 2008;359(4):378-90.
- 47 Schechter AL, Stern DF, Vaidyanathan L, Decker SJ, Drebin JA, Greene MI, et al. The neu oncogene: an erb-B-related gene encoding a 185,000-Mr tumour antigen. *Nature*. 1984;312(5994):513-6.
- 48 Riese DJ, 2nd, Stern DF. Specificity within the EGF family/ErbB receptor family signaling network. *Bioessays*. 1998;20(1):41-8.
- 49 Reiter JL, Threadgill DW, Eley GD, Strunk KE, Danielsen AJ, Sinclair CS, et al. Comparative genomic sequence analysis and isolation of human and mouse alternative EGFR transcripts encoding truncated receptor isoforms. *Genomics*. 2001;71(1):1-20.

-
- 50 Wang Y, Minoshima S, Shimizu N. Precise mapping of the EGF receptor gene on the human chromosome 7p12 using an improved fish technique. *Jpn J Hum Genet.* 1993;38(4):399-406.
 - 51 Moriki T, Maruyama H, Maruyama IN. Activation of preformed EGF receptor dimers by ligand-induced rotation of the transmembrane domain. *J Mol Biol.* 2001;311(5):1011-26.
 - 52 Peschon JJ, Slack JL, Reddy P, Stocking KL, Sunnarborg SW, Lee DC, et al. An essential role for ectodomain shedding in mammalian development. *Science.* 1998;282(5392):1281-4.
 - 53 Blobel CP. ADAMs: key components in EGFR signalling and development. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2005;6(1):32-43.
 - 54 Yarden Y, Sliwkowski MX. Untangling the ErbB signalling network. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2001;2(2):127-37.
 - 55 Brennan PJ, Kumagai T, Berezov A, Murali R, Greene MI. HER2/neu: mechanisms of dimerization/oligomerization. *Oncogene.* 2000;19(53):6093-101.
 - 56 Olayioye MA, Graus-Porta D, Beerli RR, Rohrer J, Gay B, Hynes NE. ErbB-1 and ErbB-2 acquire distinct signaling properties dependent upon their dimerization partner. *Mol Cell Biol.* 1998;18(9):5042-51.
 - 57 Chang L, Karin M. Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature.* 2001;410(6824):37-40.
 - 58 Roberts LR, Gores GJ. Hepatocellular carcinoma: molecular pathways and new therapeutic targets. *Semin Liver Dis.* 2005;25(2):212-25.

-
- 59 Baulida J, Kraus MH, Alimandi M, Di Fiore PP, Carpenter G. All ErbB receptors other than the epidermal growth factor receptor are endocytosis impaired. *J Biol Chem*. 1996;271(9):5251-7.
- 60 Miettinen PJ, Berger JE, Meneses J, Phung Y, Pedersen RA, Werb Z, et al. Epithelial immaturity and multiorgan failure in mice lacking epidermal growth factor receptor. *Nature*. 1995;376(6538):337-41.
- 61 Troyer KL, Luetkeke NC, Saxon ML, Qiu TH, Xian CJ, Lee DC. Growth retardation, duodenal lesions, and aberrant ileum architecture in triple null mice lacking EGF, amphiregulin, and TGF- α . *Gastroenterology*. 2001;121(1):68-78.
- 62 Carver RS, Stevenson MC, Scheving LA, Russell WE. Diverse expression of ErbB receptor proteins during rat liver development and regeneration. *Gastroenterology*. 2002;123(6):2017-27.
- 63 Dunn WA, Hubbard AL. Receptor-mediated endocytosis of epidermal growth factor by hepatocytes in the perfused rat liver: ligand and receptor dynamics. *J Cell Biol*. 1984;98(6):2148-59.
- 64 Threadgill DW, Dlugosz AA, Hansen LA, Tennenbaum T, Lichti U, Yee D, et al. Targeted disruption of mouse EGF receptor: effect of genetic background on mutant phenotype. *Science*. 1995;269(5221):230-4.
- 65 Terada T, Ohta T, Nakanuma Y. Expression of transforming growth factor- α and its receptor during human liver development and maturation. *Virchows Arch*. 1994;424(6):669-75.
- 66 Fukusato T, Mori S, Kawamoto T, Taniguchi S, Machinami R. Immunohistochemical and ultrastructural localization of epidermal growth factor receptor in human liver and hepatocellular carcinoma tissues. *Acta Pathol Jpn*. 1990;40(1):22-9.

-
- 67 Morimitsu Y, Hsia CC, Kojiro M, Tabor E. Nodules of less-differentiated tumor within or adjacent to hepatocellular carcinoma: relative expression of transforming growth factor- α and its receptor in the different areas of tumor. *Hum Pathol*. 1995;26(10):1126-32.
- 68 El-Bassiouni A, Nosseir M, Zoheiry M, El-Ahwany E, Ghali A, El-Bassiouni N. Immunohistochemical expression of CD95 (Fas), c-myc and epidermal growth factor receptor in hepatitis C virus infection, cirrhotic liver disease and hepatocellular carcinoma. *APMIS*. 2006;114(6):420-7.
- 69 Michalopoulos GK, Khan Z. Liver regeneration, growth factors, and amphiregulin. *Gastroenterology*. 2005;128(2):503-6.
- 70 Berasain C, Garcia-Trevijano ER, Castillo J, Erroba E, Lee DC, Prieto J, et al. Amphiregulin: an early trigger of liver regeneration in mice. *Gastroenterology*. 2005;128(2):424-32.
- 71 Komurasaki T, Toyoda H, Uchida D, Nemoto N. Mechanism of growth promoting activity of epiregulin in primary cultures of rat hepatocytes. *Growth Factors*. 2002;20(2):61-9.
- 72 Michalopoulos GK, DeFrances MC. Liver regeneration. *Science*. 1997;276(5309):60-6.
- 73 Fausto N, Campbell JS, Riehle KJ. Liver regeneration. *Hepatology*. 2006;43(2 Suppl 1):S45-53.
- 74 Brown CL, Meise KS, Plowman GD, Coffey RJ, Dempsey PJ. Cell surface ectodomain cleavage of human amphiregulin precursor is sensitive to a metalloprotease inhibitor. Release of a predominant N-glycosylated 43-kDa soluble form. *J Biol Chem*. 1998;273(27):17258-68.

-
- 75 Nanba D, Higashiyama S. Dual intracellular signaling by proteolytic cleavage of membrane-anchored heparin-binding EGF-like growth factor. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2004;15(1):13-9.
- 76 Chung YH, Kim JA, Song BC, Lee GC, Koh MS, Lee YS, et al. Expression of transforming growth factor-alpha mRNA in livers of patients with chronic viral hepatitis and hepatocellular carcinoma. *Cancer.* 2000;89(5):977-82.
- 77 Schiffer E, Housset C, Cacheux W, Wendum D, Desbois-Mouthon C, Rey C, et al. Gefitinib, an EGFR inhibitor, prevents hepatocellular carcinoma development in the rat liver with cirrhosis. *Hepatology.* 2005;41(2):307-14.
- 78 Breuhahn K, Longerich T, Schirmacher P. Dysregulation of growth factor signaling in human hepatocellular carcinoma. *Oncogene.* 2006;25(27):3787-800.
- 79 Giannelli G, Antonaci S. Novel concepts in hepatocellular carcinoma: from molecular research to clinical practice. *J Clin Gastroenterol.* 2006;40(9):842-6.
- 80 Kira S, Nakanishi T, Suemori S, Kitamoto M, Watanabe Y, Kajiyama G. Expression of transforming growth factor alpha and epidermal growth factor receptor in human hepatocellular carcinoma. *Liver.* 1997;17(4):177-82.
- 81 Ito Y, Takeda T, Sakon M, Tsujimoto M, Higashiyama S, Noda K, et al. Expression and clinical significance of erb-B receptor family in hepatocellular carcinoma. *Br J Cancer.* 2001;84(1):1377-83.

-
- 82 Daveau M, Scotte M, Francois A, Coulouarn C, Ros G, Tallet Y, et al. Hepatocyte growth factor, transforming growth factor alpha, and their receptors as combined markers of prognosis in hepatocellular carcinoma. *Mol Carcinog*. 2003;36(3):130-41.
- 83 Nakopoulou L, Stefanaki K, Filaktopoulos D, Giannopoulou I. C-erb-B-2 oncoprotein and epidermal growth factor receptor in human hepatocellular carcinoma: an immunohistochemical study. *Histol Histopathol*. 1994;9(4):677-82.
- 84 Kiss A, Wang NJ, Xie JP, Thorgeirsson SS. Analysis of transforming growth factor (TGF)-alpha/epidermal growth factor receptor, hepatocyte growth Factor/c-met, TGF-beta receptor type II, and p53 expression in human hepatocellular carcinomas. *Clin Cancer Res*. 1997;3(7):1059-66.
- 85 Moon WS, Park HS, Yu KH, Park MY, Kim KR, Jang KY, et al. Expression of betacellulin and epidermal growth factor receptor in hepatocellular carcinoma: implications for angiogenesis. *Hum Pathol*. 2006;37(10):1324-32.
- 86 Nicholson RI, Gee JM, Harper ME. EGFR and cancer prognosis. *Eur J Cancer*. 2001;37 Suppl 4:S9-15.
- 87 Salomon DS, Brandt R, Ciardiello F, Normanno N. Epidermal growth factor-related peptides and their receptors in human malignancies. *Crit Rev Oncol Hematol*. 1995;19(3):183-232.
- 88 Baselga J, Arteaga CL. Critical update and emerging trends in epidermal growth factor receptor targeting in cancer. *J Clin Oncol*. 2005;23(11):2445-59.

-
- 89 Hisaka T, Yano H, Haramaki M, Utsunomiya I, Kojiro M. Expressions of epidermal growth factor family and its receptor in hepatocellular carcinoma cell lines: relationship to cell proliferation. *Int J Oncol.* 1999;14(3):453-60.
- 90 Liu Y, Poon RT, Shao W, Sun X, Chen H, Kok TW, et al. Blockage of epidermal growth factor receptor by quinazoline tyrosine kinase inhibitors suppresses growth of human hepatocellular carcinoma. *Cancer Lett.* 2007;248(1):32-40.
- 91 Hopfner M, Sutter AP, Huether A, Schuppan D, Zeitz M, Scherubl H. Targeting the epidermal growth factor receptor by gefitinib for treatment of hepatocellular carcinoma. *J Hepatol.* 2004;41(6):1008-16.
- 92 Huether A, Hopfner M, Baradari V, Schuppan D, Scherubl H. EGFR blockade by cetuximab alone or as combination therapy for growth control of hepatocellular cancer. *Biochem Pharmacol.* 2005;70(11):1568-78.
- 93 Huether A, Hopfner M, Sutter AP, Schuppan D, Scherubl H. Erlotinib induces cell cycle arrest and apoptosis in hepatocellular cancer cells and enhances chemosensitivity towards cytostatics. *J Hepatol.* 2005;43(4):661-9.
- 94 Matsuo M, Sakurai H, Ueno Y, Ohtani O, Saiki I. Activation of MEK/ERK and PI3K/Akt pathways by fibronectin requires integrin alphav-mediated ADAM activity in hepatocellular carcinoma: a novel functional target for gefitinib. *Cancer Sci.* 2006;97(2):155-62.
- 95 Borlak J, Meier T, Halter R, Spanel R, Spanel-Borowski K. Epidermal growth factor-induced hepatocellular carcinoma: gene expression profiles in precursor lesions, early stage and solitary tumours. *Oncogene.* 2005;24(11):1809-19.

-
- 96 Webber EM, Wu JC, Wang L, Merlino G, Fausto N. Overexpression of transforming growth factor-alpha causes liver enlargement and increased hepatocyte proliferation in transgenic mice. *Am J Pathol.* 1994;145(2):398-408.
 - 97 Russell WE, Kaufmann WK, Sitaric S, Luetke NC, Lee DC. Liver regeneration and hepatocarcinogenesis in transforming growth factor-alpha-targeted mice. *Mol Carcinog.* 1996;15(3):183-9.
 - 98 Matsuo M, Sakurai H, Saiki I. ZD1839, a selective epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor, shows antimetastatic activity using a hepatocellular carcinoma model. *Mol Cancer Ther.* 2003;2(6):557-61.
 - 99 Ueda S, Hatsuse K, Tsuda H, Ogata S, Kawarabayashi N, Takigawa T, et al. Potential crosstalk between insulin-like growth factor receptor type 1 and epidermal growth factor receptor in progression and metastasis of pancreatic cancer. *Mod Pathol.* 2006;19(6):788-96.
 - 100 Philip PA, Mahoney MR, Allmer C, Thomas J, Pitot HC, Kim G, et al. Phase II study of Erlotinib (OSI-774) in patients with advanced hepatocellular cancer. *J Clin Oncol.* 2005;23(27):6657-63.
 - 101 Thomas MB, Chadha R, Glover K, Wang X, Morris J, Brown T, et al. Phase 2 study of erlotinib in patients with unresectable hepatocellular carcinoma. *Cancer.* 2007;110(5):1059-67.
 - 102 Bekaii-Saab T, Markowitz J, Prescott N, Sadee W, Heerema N, Wei L, et al. A multi-institutional phase II study of the efficacy and tolerability of lapatinib in patients with advanced hepatocellular carcinomas. *Clin Cancer Res.* 2009;15(18):5895-901.

-
- 103 Ramanathan RK, Belani CP, Singh DA, Tanaka M, Lenz HJ, Yen Y, et al. A phase II study of lapatinib in patients with advanced biliary tree and hepatocellular cancer. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2009;64(4):777-83.
- 104 Zhu AX, Stuart K, Blaszkowsky LS, Muzikansky A, Reitberg DP, Clark JW, et al. Phase 2 study of cetuximab in patients with advanced hepatocellular carcinoma. *Cancer*. 2007;110(3):581-9.
- 105 Cervello M, McCubrey JA, Cusimano A, Lampiasi N, Azzolina A, Montalto G. Targeted therapy for hepatocellular carcinoma: novel agents on the horizon. *Oncotarget*. 2012;3(3):236-60.
- 106 Lynch TJ, Bell DW, Sordella R, Gurubhagavatula S, Okimoto RA, Brannigan BW, et al. Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *N Engl J Med*. 2004;350(21):2129-39.
- 107 Su MC, Lien HC, Jeng YM. Absence of epidermal growth factor receptor exon 18-21 mutation in hepatocellular carcinoma. *Cancer Lett*. 2005;224(1):117-21.
- 108 Lee SC, Lim SG, Soo R, Hsieh WS, Guo JY, Putti T, et al. Lack of somatic mutations in EGFR tyrosine kinase domain in hepatocellular and nasopharyngeal carcinoma. *Pharmacogenet Genomics*. 2006;16(1):73-4.
- 109 Bekaii-Saab T, Williams N, Plass C, Calero MV, Eng C. A novel mutation in the tyrosine kinase domain of ERBB2 in hepatocellular carcinoma. *BMC Cancer*. 2006;6:278.

-
- 110 Buckley AF, Burgart LJ, Kakar S. Epidermal growth factor receptor expression and gene copy number in fibrolamellar hepatocellular carcinoma. *Hum Pathol*. 2006;37(4):410-4.
- 111 Buckley AF, Burgart LJ, Sahai V, Kakar S. Epidermal growth factor receptor expression and gene copy number in conventional hepatocellular carcinoma. *Am J Clin Pathol*. 2008;129(2):245-51.
- 112 Wilkens L, Bredt M, Flemming P, Becker T, Klempnauer J, Kreipe HH. Differentiation of liver cell adenomas from well-differentiated hepatocellular carcinomas by comparative genomic hybridization. *J Pathol*. 2001;193(4):476-82.
- 113 Morgillo F, Lee HY. Resistance to epidermal growth factor receptor-targeted therapy. *Drug Resist Updat*. 2005;8(5):298-310.
- 114 Eggel H. Über das primäre Carcinom der Leber. *Beitr z path Anat z allg Path* 1910;30:506-604 apud Ishak GI, Goodman ZD, Stocker JT. *Tumors of the liver and intrahepatic bile ducts*. Washington: Armed Forces Institute of Pathology; 1999. Hepatocellular carcinoma p. 203. (Rosai J, Sobin LH. editores. Atlas of Tumor Pathology, third series, fascicle 31).
- 115 Okuda K, Peters RL, Simson IW. Gross anatomic features of hepatocellular carcinoma from three disparate geographic areas. Proposal of new classification. *Cancer*. 1984;54(10):2165-73.
- 116 Nakashima T, Okuda K, Kojiro M, Jimi A, Yamaguchi R, Sakamoto K, et al. Pathology of hepatocellular carcinoma in Japan. 232 Consecutive cases autopsied in ten years. *Cancer*. 1983;51(5):863-77.

-
- 117 Watanabe A, Yamamoto H, Ito T, Nagashima H. Diagnosis, treatment and prognosis of small hepatocellular carcinoma. *Hepatogastroenterology*. 1986;33(2):52-5.
- 118 Kanai T, Hirohashi S, Upton MP, Noguchi M, Kishi K, Makuuchi M, et al. Pathology of small hepatocellular carcinoma. A proposal for a new gross classification. *Cancer*. 1987;60(4):810-9.
- 119 Cameron RG, Greig PD, Farber E, Wilson S, Sherman M, Levy GA, et al. Small encapsulated hepatocellular carcinoma of the liver. Provisional analysis of pathogenetic mechanisms. *Cancer*. 1993;72(9):2550-9.
- 120 Nakashima O, Sugihara S, Kage M, Kojiro M. Pathomorphologic characteristics of small hepatocellular carcinoma: a special reference to small hepatocellular carcinoma with indistinct margins. *Hepatology*. 1995;22(1):101-5.
- 121 Sasaki Y, Imaoka S, Ishiguro S, Nakano H, Kasugai H, Fujita M, et al. Clinical features of small hepatocellular carcinomas as assessed by histologic grades. *Surgery*. 1996;119(3):252-60.
- 122 Terminology of nodular hepatocellular lesions. International Working Party. *Hepatology*. 1995;22(3):983-93.
- 123 Mello ES. *Macronódulos em fígados cirróticos: estudo morfológico com ênfase nos aspectos macroscópicos, proliferação e apoptose*. [tese] São Paulo: Faculdade de Medicina: Universidade de São Paulo; 2001.
- 124 Iida VH, Da Silva TJ, Da Silva AS, Da Silva LF, Alves VA. Cirrose hepática: aspectos morfológicos relacionados às suas possíveis complicações. Um estudo centrado em necropsias. *J Bras Patol Med Lab*. 2005;41:29-36.

-
- 125 Kojiro M. *Pathology of hepatocellular carcinoma*. Malden: Blackwell Publishing Ltd; 2006.
- 126 Kondo F, Wada K, Nagato Y, Nakajima T, Kondo Y, Hirooka N, et al. Biopsy diagnosis of well-differentiated hepatocellular carcinoma based on new morphologic criteria. *Hepatology*. 1989;9(5):751-5.
- 127 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.
- 128 Matsumoto Y, Fujii H, Matsuda M, Kono H. Multicentric occurrence of hepatocellular carcinoma: diagnosis and clinical significance. *J Hepatobiliary Pancreat Surg*. 2001;8(5):435-40.
- 129 Li Q, Wang J, Juzi JT, Sun Y, Zheng H, Cui Y, et al. Clonality analysis for multicentric origin and intrahepatic metastasis in recurrent and primary hepatocellular carcinoma. *J Gastrointest Surg*. 2008;12(9):1540-7.
- 130 Yuki K, Hirohashi S, Sakamoto M, Kanai T, Shimosato Y. Growth and spread of hepatocellular carcinoma. A review of 240 consecutive autopsy cases. *Cancer*. 1990;66(10):2174-9.
- 131 Kojiro M, Nakahara H, Sugihara S, Murakami T, Nakashima T, Kawasaki H. Hepatocellular carcinoma with intra-atrial tumor growth. A clinicopathologic study of 18 autopsy cases. *Arch Pathol Lab Med*. 1984;108(12):989-92.
- 132 Matsukuma S, Sato K. Peritoneal seeding of hepatocellular carcinoma: clinicopathological characteristics of 17 autopsy cases. *Pathol Int*. 2011;61(6):356-62.

-
- 133 Uka K, Aikata H, Takaki S, Shirakawa H, Jeong SC, Yamashina K, et al. Clinical features and prognosis of patients with extrahepatic metastases from hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol*. 2007;13(3):414-20.
- 134 Edmondson HA, Steiner PE. Primary carcinoma of the liver: a study of 100 cases among 48,900 necropsies. *Cancer*. 1954;7(3):462-503.
- 135 Ishak GL, Goodman ZD, Stocker JT. *Tumors of the liver and intrahepatic bile ducts*. Washington: Armed Forces Institute of Pathology; 1999. Hepatocellular carcinoma p. 199-230. (Rosai J, Sobin LH. editores. Atlas of Tumor Pathology, third series, fascicle 31).
- 136 Nemolato S, Fanni D, Naccarato AG, Ravarino A, Bevilacqua G, Faa G. Lymphoepitelioma-like hepatocellular carcinoma: a case report and a review of the literature. *World J Gastroenterol*. 2008;14(29):4694-6.
- 137 Kurogi M, Nakashima O, Miyaaki H, Fujimoto M, Kojiro M. Clinicopathological study of scirrhous hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol Hepatol*. 2006;21(9):1470-7.
- 138 Sugiki T, Yamamoto M, Taka K, Nakano M. Specific characteristics of scirrhous hepatocellular carcinoma. *Hepatogastroenterology*. 2009;56(93):1086-9.
- 139 Lee JH, Choi MS, Gwak GY, Koh KC, Paik SW, Yoo BC, et al. Clinicopathologic characteristics and long-term prognosis of scirrhous hepatocellular carcinoma. *Dig Dis Sci*. 2012;57(6):1698-707.
- 140 Yang SH, Watanabe J, Nakashima O, Kojiro M. Clinicopathologic study on clear cell hepatocellular carcinoma. *Pathol Int*. 1996;46(7):503-9.

-
- 141 Emile JF, Lemoine A, Azoulay D, Debuire B, Bismuth H, Reynès M. Histological, genomic and clinical heterogeneity of clear cell hepatocellular carcinoma. *Histopathology*. 2001;38(3):225-31.
- 142 Liu Z, Ma W, Li H, Li Q. Clinicopathological and prognostic features of primary clear cell carcinoma of the liver. *Hepatol Res*. 2008;38(3):291-9.
- 143 Kojiro M, Sugihara S, Kakizoe S, Nakashima O, Kiyomatsu K. Hepatocellular carcinoma with sarcomatous change: a special reference to the relationship with anticancer therapy. *Cancer Chemother Pharmacol*. 1989;23 Suppl:S4-8.
- 144 Yamaguchi R, Nakashima O, Yano H, Kutami R, Kusaba A, Kojiro M. Hepatocellular carcinoma with sarcomatous change. *Oncol Rep*. 1997;4(3):525-9.
- 145 Chiang DY, Villanueva A, Hoshida Y, Peix J, Newell P, Minguez B, et al. Focal gains of VEGFA and molecular classification of hepatocellular carcinoma. *Cancer Res*. 2008;68(16):6779-88.
- 146 Hoshida Y, Toffanin S, Lachenmayer A, Villanueva A, Minguez B, Llovet JM. Molecular classification and novel targets in hepatocellular carcinoma: recent advancements. *Semin Liver Dis*. 2010;30(1):35-51.
- 147 Kononen J, Bubendorf L, Kallioniemi A, Barlund M, Schraml P, Leighton S, et al. Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. *Nat Med*. 1998;4(7):844-7.
- 148 Pirker R, Pereira JR, von Pawel J, Krzakowski M, Ramlau R, Park K, et al. EGFR expression as a predictor of survival for first-line chemotherapy plus cetuximab in patients with advanced non-small-cell lung cancer: analysis of data from the phase 3 FLEX study. *Lancet Oncol*. 2012;13(1):33-42.

-
- 149 Yamaguchi K, Carr BI, Nalesnik MA. Concomitant and isolated expression of TGF- α and EGF-R in human hepatoma cells supports the hypothesis of autocrine, paracrine, and endocrine growth of human hepatoma. *J Surg Oncol*. 1995;58(4):240-5.
- 150 Tang Z, Qin L, Wang X, Zhou G, Liao Y, Weng Y, et al. Alterations of oncogenes, tumor suppressor genes and growth factors in hepatocellular carcinoma: with relation to tumor size and invasiveness. *Chin Med J (Engl)*. 1998;111(4):313-8.
- 151 Foster J, Black J, LeVeae C, Khoury T, Kuvshinoff B, Javle M, et al. COX-2 expression in hepatocellular carcinoma is an initiation event; while EGF receptor expression with downstream pathway activation is a prognostic predictor of survival. *Ann Surg Oncol*. 2007;14(2):752-8.
- 152 Kannangai R, Sahin F, Torbenson MS. EGFR is phosphorylated at Ty845 in hepatocellular carcinoma. *Mod Pathol*. 2006;19(11):1456-61.
- 153 Schmitz KJ, Wohlschlaeger J, Lang H, Sotiropoulos GC, Malago M, Steveling K, et al. Activation of the ERK and AKT signalling pathway predicts poor prognosis in hepatocellular carcinoma and ERK activation in cancer tissue is associated with hepatitis C virus infection. *J Hepatol*. 2008;48(1):83-90.
- 154 Tsiambas E, Manaios L, Papanikolopoulos C, Rigopoulos DN, Tsounis D, Karameris A, et al. Chromogenic in situ hybridization analysis of Epidermal Growth Factor Receptor gene/chromosome 7 numerical aberrations in hepatocellular carcinoma based on tissue microarrays. *Pathol Oncol Res*. 2009;15(3):511-20.
- 155 Yoneda N, Sato Y, Kitao A, Ikeda H, Sawada-Kitamura S, Miyakoshi M, et al. Epidermal growth factor induces cytokeratin 19 expression accompanied by increased growth abilities in human hepatocellular carcinoma. *Lab Invest*. 2011;91(2):262-72.

-
- 156 Rüschoff J, Kerr KM, Grote HJ, Middel P, von Heydebreck A, Alves VA, et al. Reproducibility of immunohistochemical scoring for epidermal growth factor receptor expression in non-small cell lung cancer. *Arch Pathol Lab Med*. 2012.Dec 27. [Epub ahead of print]
- 157 Bassullu N, Turkmen I, Dayangac M, Yagiz Korkmaz P, Yasar R, Akyildiz M, et al. The predictive and prognostic significance of c-erb-B2, EGFR, PTEN, mTOR, PI3K, p27, and ERCC1 expression in hepatocellular carcinoma. *Hepat Mon*. 2012;12(10 HCC):e7492.
- 158 Hijiya N, Miyawaki M, Kawahara K, Akamine S, Tsuji K, Kadota J, et al. Phosphorylation status of epidermal growth factor receptor is closely associated with responsiveness to gefitinib in pulmonary adenocarcinoma. *Hum Pathol*. 2008;39(3):316-23.
- 159 Watzka SB, Rauscher-Potsch I, Nierlich P, Setinek U, Kostler WJ, Potschger U, et al. Concordance between epidermal growth factor receptor status in primary non-small-cell lung cancer and metastases: a post-mortem study. *Eur J Cardiothorac Surg*. 2010;38(1):34-7.
- 160 Wu JM, Fackler MJ, Halushka MK, Molavi DW, Taylor ME, Teo WW, et al. Heterogeneity of breast cancer metastases: comparison of therapeutic target expression and promoter methylation between primary tumors and their multifocal metastases. *Clin Cancer Res*. 2008;14(7):1938-46.
- 161 Penault-Llorca F, Coudry RA, Hanna WM, Osamura RY, Rüschoff J, Viale G. Experts' opinion: Recommendations for retesting breast cancer metastases for HER2 and hormone receptor status. *Breast*. 2013. Jan 24. [Epub ahead of print]

-
- 162 Sugino T, Yamaguchi T, Hoshi N, Kusakabe T, Ogura G, Goodison S, et al. Sinusoidal tumor angiogenesis is a key component in hepatocellular carcinoma metastasis. *Clin Exp Metastasis*. 2008;25(7):835-41.
- 163 Kaczynski J, Hansson G, Wallerstedt S. Metastases in cases with hepatocellular carcinoma in relation to clinicopathologic features of the tumor. An autopsy study from a low endemic area. *Acta Oncol*. 1995;34(1):43-8.
- 164 Winter RN, Kramer A, Borkowski A, Kyprianou N. Loss of caspase-1 and caspase-3 protein expression in human prostate cancer. *Cancer Res*. 2001;61(3):1227-32.
- 165 Persad R, Liu C, Wu TT, Houlihan PS, Hamilton SR, Diehl AM, et al. Overexpression of caspase-3 in hepatocellular carcinomas. *Mod Pathol*. 2004;17(7):861-7.
- 166 Hu L, Lau SH, Tzang CH, Wen JM, Wang W, Xie D, et al. Association of Vimentin overexpression and hepatocellular carcinoma metastasis. *Oncogene*. 2004;23(1):298-302.
- 167 Kim H, Choi GH, Na DC, Ahn EY, Kim GI, Lee JE, et al. Human hepatocellular carcinomas with "Stemness"-related marker expression: keratin 19 expression and a poor prognosis. *Hepatology*. 2011;54(5):1707-17.
- 168 Zhang YJ, Jiang W, Chen CJ, Lee CS, Kahn SM, Santella RM, et al. Amplification and overexpression of cyclin D1 in human hepatocellular carcinoma. *Biochem Biophys Res Commun*. 1993;196(2):1010-6.

-
- 169 Joo M, Kang YK, Kim MR, Lee HK, Jang JJ. Cyclin D1 overexpression in hepatocellular carcinoma. *Liver*. 2001;21(2):89-95.
- 170 Schmitt-Graeff A, Ertelt-Heitzmann V, Allgaier HP, Olschewski M, Nitschke R, Haxelmans S, et al. Coordinated expression of cyclin D1 and LEF-1/TCF transcription factor is restricted to a subset of hepatocellular carcinoma. *Liver Int*. 2005;25(4):839-47.
- 171 Prange W, Breuhahn K, Fischer F, Zilkens C, Pietsch T, Petmecky K, et al. Beta-catenin accumulation in the progression of human hepatocarcinogenesis correlates with loss of E-cadherin and accumulation of p53, but not with expression of conventional WNT-1 target genes. *J Pathol*. 2003;201(2):250-9.
- 172 Joo M, Lee HK, Kang YK. Expression of beta-catenin in hepatocellular carcinoma in relation to tumor cell proliferation and cyclin D1 expression. *J Korean Med Sci*. 2003;18(2):211-7.
- 173 Guegan JP, Fremin C, Baffet G. The MAPK MEK1/2-ERK1/2 Pathway and Its Implication in Hepatocyte Cell Cycle Control. *Int J Hepatol*. 2012;2012:328372.
- 174 Holzer TR, Fulford AD, Arkins AM, Grondin JM, Mundy CW, Nasir A, et al. Ischemic time impacts biological integrity of phospho-proteins in PI3K/Akt, Erk/MAPK, and p38 MAPK signaling networks. *Anticancer Res*. 2011;31(6):2073-81.
- 175 Piguet AC, Semela D, Keogh A, Wilkens L, Stroka D, Stoupis C, et al. Inhibition of mTOR in combination with doxorubicin in an experimental model of hepatocellular carcinoma. *J Hepatol*. 2008;49(1):78-87.

-
- 176 Manifold IH, Triger DR, Underwood JC. Kupffer-cell depletion in chronic liver disease: implications for hepatic carcinogenesis. *Lancet*. 1983;2(8347):431-3.
- 177 Chen G, Luo DZ, Liu L, Feng ZB, Guo F, Li P. Hepatic local micro-environmental immune status in hepatocellular carcinoma and cirrhotic tissues. *West Indian Med J*. 2006;55(6):403-8.
- 178 Kato S, Kurose I, Higuchi H, Ebinuma H, Saito H, Miura S, et al. Effect of chronic ethanol feeding on Kupffer cell-mediated antitumor cell activity. *Alcohol Clin Exp Res*. 1996;20(1 Suppl):66A-8A.
- 179 Purohit V, Rapaka R, Kwon OS, Song BJ. Roles of alcohol and tobacco exposure in the development of hepatocellular carcinoma. *Life Sci*. 2013;92(1):3-9.
- 180 Lennerz JK, Chapman WC, Brunt EM. Keratin 19 epithelial patterns in cirrhotic stroma parallel hepatocarcinogenesis. *Am J Pathol*. 2011;179(2):1015-29.