PRISCILA BRIZOLLA DE CAMPOS

**Caracterização clínica e histológica do
carcinoma hepatocelular (*CHC*) secundário à
doença hepática gordurosa não alcoólica (*DGHNA*)**

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

Programa de Ciências em Gastroenterologia

Orientadora: Profa. Dra. Claudia Pinto Marques
Souza de Oliveira

São Paulo

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Campos, Priscila Brizolla de

Caracterização clínica e histológica do carcinoma hepatocelular (*CHC*) secundário à doença hepática gordurosa não alcoólica (*DHGN*) / Priscila Brizolla de Campos -- São Paulo, 2017.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Ciências em Gastroenterologia.

Orientador: Claudia Pinto Marques Souza de Oliveira.

Descritores: 1.Carcinoma hepatocelular 2.Doença hepática gordurosa não alcoólica 3.Patologia 4.Imuno-histoquímica 5.Queratina 19 6.Antígeno 67

USP/FM/DBD-382/17

Dedicatória

Dedico esta, e todas as minhas demais conquistas,
aos meus amados pais,
meus melhores e maiores presentes.

Agradecimentos

A minha orientadora Profa. Dra. Claudia Pinto Marques Souza de Oliveira, pelo apoio, compreensão e amizade. Agradeço a sua contribuição, seus ensinamentos, e todo entusiasmo e incentivos prestados a mim;

Ao Prof. Dr. Venâncio Avancini Ferreira Alves, toda a minha gratidão por repartir seus conhecimentos e princípios que grandemente contribuíram para esta minha conquista. Ao seu exemplo grandioso de dedicação a esta Escola, toda a minha admiração;

Aos amigos e colegas do Departamento de Gastroenterologia e do Departamento de Anatomia Patológica, agradeço o apoio, o auxílio e a disponibilidade que me prestaram ao longo desses quatro anos;

Aos meus pais e irmão, que com muito carinho, não mediram esforços para que eu chegasse até esta etapa de minha vida;

Ao meu esposo Luiz Gustavo, obrigada pela paciência, pelo incentivo, pela força e principalmente pelo amor. Valeu a pena toda a distância e todas as renúncias. Esta vitória é nossa!

NORMATIZAÇÃO

Esta tese está de acordo com:

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

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias da FMUSP. Elaborado por Annelise Carneiro da Cunha, Maria Julia A.L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de S. Aragão, Suely C. Cardoso, Valéria Vilhena. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2011.

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

Sumário

Lista de Abreviaturas e Siglas

Lista de Figuras

Lista de Tabelas

Resumo

Abstract

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Considerações gerais sobre o CHC.....	2
1.2 Considerações gerais sobre a DHGNA e EHNA.....	4
1.2.1 Patologia da DHGNA e EHNA.....	7
1.3 Considerações gerais sobre o CHC secundário a DHGNA.....	8
1.3.1 Epidemiologia.....	8
1.3.2 Fisiopatogênese do CHC secundário a DHGNA	10
1.3.3 Patologia do CHC secundário à DHGNA.....	15
1.4 Expressão tecidual de proteínas identificáveis por métodos imuno-histoquímicos refletindo propriedades das células neoplásicas	18
1.4.1 Queratina 19 (K19) como marcador de célula progenitora hepática	19
1.4.2 Ki67 (Ki67) como marcador de ciclo celular.....	20
1.5 Aspectos gerais da classificação molecular do CHC	21
2 OBJETIVOS	23
2.1 Objetivo primário	24
2.2 Objetivos secundários	24
3 METODOLOGIA.....	25
3.1 Ética em pesquisa	26
3.2 Desenho do estudo	26
3.3 Casuística.....	26
3.3.1 Seleção dos casos	29
3.3.2 Obtenção de dados clínicos e laboratoriais	31
3.4 Variáveis anatomopatológicas	32
3.5 Seleção das amostras e confecção dos blocos de Tissue Microarray	37
3.6 Reações de imuno-histoquímica.....	38
3.7 Análise da expressão proteica por imuno-histoquímica	40

4 ANÁLISE ESTATÍSTICA	41
5 RESULTADOS	43
5.1 Aspectos demográficos, clínicos e laboratoriais.....	44
5.2 Dados anatomopatológicos do parênquima não tumoral	53
5.3 Análise anatomopatológica do parênquima tumoral e peritumoral	58
5.4 Avaliação imuno-histoquímica dos marcadores representativos de classe proliferativa	65
5.4.1 Análise dos marcadores de classe proliferativa por paciente	65
5.4.2 Análise dos marcadores de classe proliferativa por nódulo	79
6 DISCUSSÃO	85
7 CONCLUSÃO	95
8 REFERÊNCIAS.....	98

Listas

ABREVIATURAS E SIGLAS

AASLD	<i>American Association for Study of Liver Disease</i> (do inglês)
AFP	Alfafetoproteína
AG	Ácidos graxos
ALT	Alanina aminotransferase
AST	Aspartato aminotransferase
AP	Atividade de protrombina
BCLC	<i>Barcelona Clinic Liver Cancer</i> (staging system)
CAPPesq	Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa
CC	Cirrose criptogênica
CD4+	CD4 (“cluster of differentiation 4”) positivas
CD8+	CD8 (“cluster of differentiation 8”) positivas
CHC	Carcinoma hepatocelular
CTNNB1	<i>Catenin Beta 1</i> (do inglês)
DAP	Departamento de Anatomia Patológica
DHA	Doença hepática alcoólica
DHGNA	Doença hepática gordurosa não alcoólica
DLP	Dislipidemia
DM	Diabetes mellitus
EASL	<i>European Association for Study oh the Liver</i> (do inglês)
ECOG	<i>Eastern Cooperative Oncology Group</i>
EHNA	Esteato-hepatite não alcoólica
EROS	Espécies reativas de oxigênio
EUA	Estados Unidos
FA	Fosfatase alcalina
GGT	Gama glutamil transferase
HAS	Hipertensão arterial sistêmica
HCFMUSP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP

HPC	Célula progenitora hepática (do inglês)
ICESP	Instituto do câncer do estado de São Paulo
IGF	Fator de crescimento semelhante a insulina
IGF-1	Fator de crescimento semelhante a insulina 1
IGF-2	Fator de crescimento semelhante a insulina 2
IGF-2R	Receptor do fator de crescimento semelhante a insulina 2
IL-6	Interleucina 6
IMC	Índice de massa corpórea
INR	Razão normalizada internacional
IR	Receptor de insulina
IRS-1	Receptor do substrato de insulina 1
JNK	“c-jun NH ₂ -terminal protein kinase”
K19	Queratina 19
Ki-67	Antígeno Ki67
LIM-14	Laboratório de Investigação Médica 14
LIN	Limite inferior da normalidade
LSN	Limite superior da normalidade
M6P	Receptor de manose 6-fosfato
MDB	Corpúsculos de Mallory- Denk
MELD	<i>Model for End-Stage Liver Disease</i> (do inglês)
mTOR	Proteína alvo da rapamicina
NAFLD	Doença hepática gordurosa não alcoólica (do inglês)
NAS	<i>Non-alcoholic fatty liver disease Activity Score</i> (do inglês)
NASH	Esteatohepatite não alcoólica (do inglês)
NCEP-ATPIII	<i>National Cholesterol Education Program's Adult Treatment Panel III</i> (do inglês)
NF-kB	Fator nuclear kappa B
Nk	Natural killer
NOTCH	via NOTCH
Nrf-1	Nuclear respiratory factor 1 (do inglês)
PNPLA3	<i>Patatin like phospholipase domain containing 3</i>
PS	<i>Performance status</i>
RE	Retículo endoplasmático
RI	Resistência insulínica

SM	Síndrome metabólica
STAT3	Fator de transcrição oncogênico 3
TG	Triglicerídeos
TGF- β	Fator de transformação de crescimento beta (do inglês)
TNF-alfa	Fator de necrose tumoral alfa (do inglês)
TMA	Micromatrizes teciduais (do inglês)
VHB	Vírus da hepatite B
VHC	Vírus da hepatite C
Wnt	Via Wnt

FIGURAS

Figura 1 -	Esquema ilustrativo da patogênese do Carcinoma hepatocelular (CHC) na Doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA). Adaptado de Starley, Calcagno, Harrison, 2010	12
Figura 2 -	Fluxograma de pacientes incluídos no estudo e distribuição dos nódulos de CHC	30
Figura 3 -	Tratamento aplicado nos casos de Carcinoma hepatocelular (CHC) secundário à Doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA).....	47
Figura 4 -	Pacientes cirróticos e não cirróticos com Carcinoma hepatocelular (CHC) que estavam sob rastreamento	48
Figura 5 -	Classificação e estadiamento <i>Barcelona Clinic Liver Cancer</i> (BCLC) nos 21 pacientes com Carcinoma hepatocelular (CHC). Note que em 9 pacientes por serem não cirróticos, o BCLC não foi aplicado	49
Figura 6 -	Fluxograma demonstrando número de óbitos e suas causas em nossa casuística	50
Figura 7 -	Curva de sobrevida dos pacientes submetidos a transplante de fígado	51
Figura 8 -	Curva de sobrevida dos pacientes submetidos a ressecção.....	52
Figura 9 -	Carcinoma hepatocelular grosseiramente heterogêneo. Note o parênquima hepático adjacente não tumoral amarelado, com septos moderados (F2). Importante também a presença de êmbolo tumoral em grande ramo venoso portal	55
Figura 10 -	Carcinoma hepatocelular medindo 11 cm em seu maior diâmetro, com hemorragia e necrose extensos. Fígado adjacente não tumoral amarelado (esteato-hepatítico à microscopia), com nódulos cirróticos totalmente desenvolvidos	55
Figura 11 -	Esteatose, balonização e eventuais corpúsculos de MDB em fígado não tumoral (HE, x 200)	57
Figura 12 -	Esteatose hepática grau 2 (33 a 66%) no fígado não tumoral (F2)	57

Figura 13 -	Padrões microscópicos dos carcinomas hepatocelulares (CHC).....	58
Figura 14 -	Carcinoma hepatocelular com grau arquitetural grau 3/4, grau nuclear grau 3, com características de esteato-hepatítico.....	61
Figura 15 -	Carcinoma hepatocelular, grau 2, subtipo esteatohepatítico. Note a esteatose macrovesicular, balonização e Corpúsculos de Mallory-Denk intratumorais (HE, x200).....	62
Figura 16 -	Carcinoma hepatocelular com fibrose intratumoral grau 3.....	63
Figura 17 -	Carcinoma hepatocelular com inflamação intratumoral grau 3.....	63
Figura 18 -	Carcinoma hepatocelular com invasão vascular grau 2.....	64
Figura 19 -	Pacientes com expressão de marcadores de K19 e Ki67 positivos e negativos.....	66
Figura 20 -	Reações imunoreativas representativas da K19. A. Expressão de 10% (x100) B. Expressão de 10% (x200) C. Expressão <1% (x200) D. Expressão <1% (x400) E. Expressão de 70%(x100) F. Expressão de 70% (x200). G Expressão de 70% em CHC esteatohepatítico (x100) H. Expressão de 70% em CHC esteatohepatítico (x200)	68
Figura 21 -	Imunoreações representativas do Ki67. A. Expressão de 03% (x200) B. Expressão de 03% (x400) C. Expressão de 58% (x200) D. Expressão de 58% (x400) E. Expressão de 74% (x200) F. Expressão de 74% (x400)	69

TABELAS

Tabela 1 -	Características dos anticorpos utilizados	40
Tabela 2 -	Características demográficas, clínicas e laboratoriais dos pacientes com Carcinoma hepatocelular (CHC) utilizados no estudo	45
Tabela 3 -	Análise histológica do parênquima não tumoral em 21 pacientes com Carcinoma hepatocelular (CHC) incluídos no estudo	54
Tabela 4 -	Variáveis histológicas x grau designado em 35 nódulos de Carcinoma hepatocelular (CHC)	59
Tabela 5 -	Graus arquitetural e nuclear designados e estadiamento histológico de Edmondson e Steiner (1954) nos 35 nódulos de Carcinoma hepatocelular (CHC).....	60
Tabela 6 -	Pacientes com expressão de marcadores de classe proliferativa (K19 e/ou Ki67).....	67
Tabela 7 -	Descritiva da expressão de K19 e Ki67 dos pacientes nas variáveis clínicas	70
Tabela 8 -	Pacientes com DM com expressão de marcadores de proliferação positivos	71
Tabela 9 -	Análise comparativa das características clínicas dos pacientes na expressão menor e maior que 5% de K19.....	73
Tabela 10 -	Análise comparativa das características clínicas dos pacientes na expressão menor e maior que 10% de Ki67	74
Tabela 11 -	Tabela comparativa dos pacientes com expressão de K19 $\leq 5\%$ e acima de 5% x variáveis do fígado não tumoral.....	75
Tabela 12 -	Tabela comparativa dos pacientes com expressão de K19 $\leq 5\%$ e acima de 5% x variáveis do fígado tumoral	76
Tabela 13 -	Tabela comparativa dos pacientes com expressão de Ki67 $\leq 10\%$ e acima de 10% x variáveis fígado não tumoral.....	77
Tabela 14 -	Tabela comparativa dos pacientes com expressão de Ki67 $\leq 10\%$ e acima de 10% x variáveis do fígado tumoral	78
Tabela 15 -	Análise comparativa dos nódulos com expressão de K19 $\leq 5\%$ e acima de 5% x variáveis fígado não tumoral	80

Tabela 16 - Análise comparativa dos nódulos com expressão de K19 ≤5% e acima de 5% x variáveis fígado tumoral	81
Tabela 17 - Análise comparativa dos nódulos com expressão de Ki67 ≤10% e acima de 10% x variáveis do fígado não tumoral.....	83
Tabela 18 - Análise comparativa dos nódulos com expressão de Ki67 ≤10% e acima de 10% x variáveis do fígado tumoral	84

Resumo

Campos PB. *Caracterização clínica e histológica do carcinoma hepatocelular (CHC) secundário à doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA)* [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2017.

O aumento na incidência do carcinoma hepatocelular (CHC) tem sido atribuído ao aumento da obesidade, diabetes e doença hepática gordurosa não alcoólica. (DHGNA), estando ainda por ser melhor esclarecidos vários aspectos histopatológicos e imuno-histoquímicos. O objetivo deste estudo é avaliar aspectos clínicos e patológicos de pacientes com CHC secundário a DHGNA, assim como relacionar a marcadores imuno-histoquímicos de classe proliferativa. Avaliamos 35 espécimes de CHC de 21 pacientes diagnosticados com DHGNA submetidos a ressecção hepática (12 pacientes) ou a transplante hepático (8 pacientes) ou ambos (1 paciente), de 2005 a 2015. Dados demográficos, clínicos e bioquímicos foram relacionados a características histológicas e reatividade imuno-histoquímica para K19, marcando características de células progenitoras e Ki-67, marcando as células em ciclo celular. Um total de 35 nódulos foram detectados em 21 pacientes. A cirrose estava presente em 12 casos (7 F4A x 4F4B x 1F4C de acordo com estadiamento de Laennec) e 9 pacientes não apresentavam cirrose (estadiamento DHGNA: F2: 6pts, F3 = 3pts). A idade variou de 50 a 77 anos e 16 pacientes eram do sexo masculino (76%). Dezesesseis pacientes (76%) apresentavam diabetes mellitus, 17 pacientes (81%) apresentavam hipertensão arterial e 19 pacientes (90%) tinham IMC superior a 25 kg / m². O CHC ocorreu em 8 pacientes CHILD A, 4 CHILD B e em 9 pacientes sem cirrose. O nível de alfa-fetoproteína foi normal em 13 (62%) pacientes. Dentre os critérios histológicos, 25 (70%) nódulos foram diagnosticados como "CHC esteatohepatítico". Embora 63% tenham sido pouco diferenciados (G.3/G.4) de acordo com Edmondson & Steiner (1954), apenas 21% apresentaram níveis elevados de Ki-67 (>10%). No caso da K19, também 21% dos pacientes apresentaram expressão positiva (> 5%), e foi associado a maior inflamação intratumoral (G 2/3). Curiosamente, 75% dos pacientes com alta expressão de Ki-67 (>10%) não eram cirróticos. Em conclusão: 1. Nesta casuística cirúrgica, o CHC relacionado com DHGNA foi encontrado em não cirróticos em 42% dos casos, com nível normal de alfa-fetoproteína em 62%. 2. Os marcadores histológicos de "CHC esteatohepatítico" estiveram altamente prevalentes. 3. A imunoexpressão positiva de K19 e Ki-67 ocorreu em apenas 21% dos pacientes, o que pode sugerir que o CHC na síndrome metabólica pode ser preferencialmente "um subtipo inflamatório e não proliferativo de CHC".

Descritores: carcinoma hepatocelular; doença hepática gordurosa não alcoólica; patologia; imuno-histoquímica, queratina 19; antígeno 67.

Abstract

Campos PB. *Clinical and histopathological characterization of hepatocellular carcinoma (HCC) in non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD)*[Thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2017.

The increase incidence of hepatocellular carcinoma (HCC) has been attributed to the increase in obesity, diabetes and non-alcoholic fatty liver disease. (NAFLD), and several histopathological and immunohistochemical aspects are still to be better clarified. The aim of this study is to assess clinical and pathological aspects of patients with HCC secondary to NAFLD as well as to related to immunohistochemical markers of proliferative class. We evaluated 35 HCC specimens from 21 patients diagnosed with NAFLD undergoing liver resection (12 patients) or liver transplantation (8 patients) or both (1 patient) from 2005 to 2015. Demographic, clinical and biochemical data were related to histological features and immunohistochemical reactivity for K19, marking characteristics of progenitor cells and Ki-67, marking the cells in cell cycle. A total of 35 nodules were detected from 21 patients. Cirrhosis was present in 12 cases (7 F4A x 4F4B x 1F4C according to Laennec Staging) and 9 patients did not have cirrhosis (NAFLD staging: F2: 6pts, F3=3pts). Ages ranged from 50 to 77 years and 16 patients were male (76%). Sixteen patients (76%) had diabetes mellitus, 17 patients (81%) had arterial hypertension and 19 patients (90%) had BMI above 25kg/m². HCC occurred in 8 patients Child A, 4 Child B and in 9 patients without cirrhosis. Alpha-fetoprotein level was normal in 13 (62%) patients. Among the histological criteria, 25 (70%) nodules were diagnosed as "steatohepatic HCC". Although 63% were poorly differentiated (G.3/ G.4) according to Edmondson & Steiner (1954), only 21% presented high levels of Ki-67 (>10%). In the case of K19, 21% of patients presented positive expression (> 5%), and was associated with greater intratumoral inflammation (G 2/3). Interestingly, 75% of the patients with high Ki67 expression (>10%) were non-cirrhotic. In conclusion: 1. In this surgical series, HCC related to NAFLD was found in non-cirrhotic patients in 42% of cases, with a normal level of alpha-fetoprotein in 62%. 2. Histological markers of "steatohepatic HCC" were highly prevalent. 3. Positive immunoexpression of K19 and Ki-67 occurred in only 21% of patients, which might suggest that HCC in metabolic syndrome might be preferentially "an inflammatory, non-proliferative subtype of HCC".

Descriptors: carcinoma, hepatocellular; non-alcoholic fatty liver disease; pathology; immunohistochemistry; keratin 19; antigen 67.

1. Introdução

1. INTRODUÇÃO

1.1 Considerações gerais sobre o carcinoma hepatocelular

O carcinoma hepatocelular (CHC) é o tumor maligno primário mais comum do fígado e uma das neoplasias de maior incidência mundial. É o quinto câncer mais prevalente, ocupando o segundo lugar na mortalidade global entre as diversas neoplasias.^{1,2,3}

No mundo a incidência do CHC é maior em homens, cerca de 3:1 nas regiões de incidência baixa e de 8:1 nas de incidência elevada. É a quinta causa mais comum de câncer em homens e a sétima causa em mulheres, com mais de meio milhão de novos casos diagnosticados em todo o mundo.⁴ Essas diferenças podem estar relacionadas com a maior prevalência de infecção pelo vírus da hepatite B (VHB), alcoolismo e doença hepática crônica. As incidências mais elevadas são encontradas em países asiáticos (Sudeste da China, Coreia e Taiwan) e em países africanos, como Moçambique. Em países ocidentais a incidência do CHC está se expandindo rapidamente. Nos Estados Unidos (EUA), a incidência triplicou nos últimos 25 anos, mais ainda é mais baixa, sendo de 8 a 30 vezes menor do que aquela registrada nos países asiáticos. A infecção crônica pelo VHB é a principal causa de CHC em países em desenvolvimento da Ásia, já a infecção pelo vírus da hepatite C (VHC) é a etiologia dominante dos países desenvolvidos do ocidente e do Japão, enquanto que a contaminação de

alimentos com aflatoxina é visto no Sudeste da Ásia.^{5,6} Atualmente, admite-se que a incidência do CHC esteja crescendo não só devido à epidemia de hepatite C, mas também esteja relacionada ao aumento da obesidade, da diabetes e da doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA), principalmente nos países desenvolvidos.^{7,8,9}

Em um estudo prospectivo realizado no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HCFMUSP), 884 pacientes com cirrose hepática foram acompanhados de agosto de 1998 a agosto de 2008, com seguimento mínimo de 5 anos, com pelo menos um exame de ultrassonografia abdominal e dosagem sérica de alfa-fetoproteína (AFP), e dentre estes pacientes, 8% desenvolveram o CHC com uma média de seguimento de 2,4 meses para o diagnóstico. A principal etiologia foi a infecção pelo VHC, contabilizando 65,3%. A incidência anual no serviço foi de 2,9%. Os pacientes com hepatite C crônica apresentaram maior taxa de incidência global com 16,9%, seguido de perto pelo grupo da hepatite B crônica com 15,3%. A menor taxa foi encontrada no grupo de esteato-hepatite não alcoólica (EHNA) com 4% e o grupo da cirrose alcoólica com 5,7% de CHC ao longo de cinco anos.¹⁰

1.2. Considerações gerais sobre a Doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) e a Esteato-hepatite não alcoólica (EHNA)

A Doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) abrange um espectro de alterações hepáticas que variam desde um simples depósito de gordura no interior do hepatócito, sem inflamação ou fibrose (esteatose simples), até casos de Esteato-hepatite não alcoólica (EHNA), cirrose e CHC.^{11,12,13} A DHGNA ocorre em indivíduos sem história significativa de abuso de álcool, que não apresenta outras doenças hepáticas que expliquem a esteatose, e a grande maioria dos casos é associada com a Síndrome Metabólica (SM).^{14,15}

A EHNA é uma doença hepática de progressão lenta que pode levar à cirrose e insuficiência hepática. Sua importância vem aumentando nos últimos anos devido à alta prevalência no mundo todo.¹⁶

A prevalência estimada da DHGNA na população adulta varia de 9 a 37% com diferenças geográficas, e a prevalência da EHNA é estimada entre 3 a 5%.¹⁷ A DHGNA vem emergindo como a variante mais comum de doença hepática crônica na última década. Acredita-se, que esta se tornará a principal causa de morbidade e mortalidade relacionada ao fígado e também a principal causa de transplante hepático nos próximos anos nos EUA.¹⁸

Vários estudos recentes têm demonstrado uma forte associação entre a DHGNA e cada característica da SM. Atualmente, a maioria dos *guidelines* concordam que a DHGNA é associada com estes fatores de risco,

especialmente a obesidade, o diabetes mellitus (DM) tipo 2 e dislipidemia (DLP).^{19,20}

O índice de massa corpórea (IMC) e a circunferência abdominal, estão positivamente relacionados à presença da DHGNA e predizem a doença avançada, particularmente nos idosos. As comorbidades comuns de obesidade, como o DM2, e a apneia do sono, a síndrome do ovário policístico e outros distúrbios endócrinos (hipogonadismo), impulsionam ainda mais a prevalência e a gravidade da DHGNA.²¹

Por outro lado, a obesidade por si só, é reconhecidamente um importante fator de risco para carcinogênese em muitas neoplasias malignas. Um estudo do Instituto Nacional do Câncer acompanhou 900.000 adultos de 1982 a 1998 e registrou mais de 57.000 mortes relacionadas ao câncer. Em pacientes com IMC $>35 \text{ kg/m}^2$, a taxa de mortalidade foi 52% maior em homens e 62% maior em mulheres, comparados com a taxa de mortalidade em homens e mulheres com peso normal.²²

O DM, principalmente o tipo 2, também tem sido associado como um fator de risco independente para o CHC.²³ Levando se em consideração que estamos frente a uma epidemia de obesidade e DM, e consequentemente de DHGNA, a incidência do CHC vem aumentando progressivamente.²⁴

A DHGNA na grande maioria dos casos é assintomática, embora alguns pacientes possam apresentar sintomas inespecíficos, como fadiga, desconforto no quadrante superior direito ou plenitude gástrica. Na ausência de doença hepática avançada, a hepatomegalia pode ser a única evidência. Uma vez que a cirrose se desenvolve, podem ser identificadas

esplenomegalia, *spiders*, eritema palmar ou ascite. A DHGNA é mais comumente reconhecida por meio de exames laboratoriais hepáticos anormais ou achados ultrassonográficos acidentais e deve ser considerada no diagnóstico diferencial de qualquer paciente com níveis elevados de transaminases. O nível de fosfatase alcalina (FA) e, ou, gama-glutamilttransferase (GGT) pode estar ligeiramente elevado, mas o nível de bilirrubina normalmente permanece normal, a menos que haja doença avançada. Razão normalizada internacional (INR) aumentada, hipoalbuminemia ou trombocitopenia frequentemente indicam cirrose ou hipertensão portal e podem ser os principais achados laboratoriais em pacientes com fibrose avançada.²⁵

No diagnóstico da DHGNA, a ultrassonografia, a tomografia computadorizada, a ressonância magnética e a espectroscopia de ressonância magnética podem ajudar na avaliação da esteatose, embora estes testes não possam distinguir a esteatose da EHNA. Os testes clínicos, bioquímicos (enzimas e função hepática) e ultrassonografia abdominal são importantes para o diagnóstico diferencial da DHGNA de outras condições como hepatite viral, alcoólica, hepatite induzida por drogas, hepatite autoimune e doença de Wilson. No entanto, em muitos casos a biópsia hepática e análises histológicas são necessárias.¹⁵

O diagnóstico da EHNA é anatomopatológico, onde a esteatose, a inflamação lobular e a balonização hepatocelular são todos componentes necessários para o seu diagnóstico. A fibrose não é necessária, embora usualmente esteja presente.²⁶

A elastografia transitória pode auxiliar no diagnóstico da fibrose hepática e estadiamento de pacientes com DHGNA, mas a biópsia hepática é recomendada nas seguintes situações:

1. Pacientes com suspeita de EHNA e diagnóstico diferencial de outras doenças hepáticas crônicas.
2. Doentes com DHGNA e alto risco de EHNA e, ou, fibrose avançada sugerida por marcadores sorológicos e, ou, elastografia hepática.
3. Pacientes com níveis elevados de enzimas hepáticas: alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST) por mais de 3 meses.
4. Pacientes com SM não controlada após 6 meses de alterações comportamentais.¹⁵

1.2.1. Patologia da DHGNA e EHNA

Na maioria dos casos, as características histológicas da DHGNA são indistinguíveis daquelas da Doença hepática alcoólica (DHA) e por isso o patologista deve confiar no clínico para excluir o uso do álcool como etiologia. Para fins de diagnóstico, os patologistas dividem a DHGNA em esteatose hepática não alcoólica (predominantemente esteatose macrovesicular) e EHNA. As características histológicas da EHNA incluem: esteatose macrovesicular, balonização hepatocelular, inflamação lobular e corpúsculos de Mallory-Denk (MDBs, sigla em inglês). Notavelmente, embora algum grau de fibrose esteja frequentemente presente, não é necessário para o diagnóstico. Ao contrário da esteatose hepática, a EHNA

é um padrão específico de lesão hepática que pode ser reconhecido, mesmo se presente com outras doenças do fígado. Nas fases iniciais da doença, as alterações histológicas têm uma distribuição distinta com as alterações mais acentuadas na zona acinar 3. Devido à complexidade da doença inerente e ao amplo espectro de achados, sistemas de pontuação foram concebidos para auxiliar os patologistas na avaliação da gravidade da DHGNA.^{27,28}

Em 2002, o Comitê de Patologia da Rede de Pesquisa Clínica em EHNA, projetou e validou um sistema de pontuação com as características histológicas, que aborda todo o espectro de lesões de DHGNA e propuseram o *Non-alcoholic fatty liver disease* (NAFLD) Activity Score (NAS, sigla em inglês), para ser utilizado em clinical trials. A pontuação é calculada como a soma não ponderada dos escores para esteatose (0-3), inflamação lobular (0-3) e balonização hepatocelular (0-2), e varia de 0 a 8. O objetivo principal do NAS é avaliar as alterações histológicas ao longo do tempo, ao invés de servir como critérios diagnósticos para a EHNA.^{26,29}

1.3. Considerações gerais sobre o CHC secundário a DHGNA

1.3.1. Epidemiologia

Juntamente com o VHB, o VHC, o consumo prolongado de álcool a longo prazo, a aflatoxina e as doenças hepáticas metabólicas, a DHGNA constitui um fator de risco significativo para o CHC. Desde o primeiro caso

de CHC associado a DHGNA em 1990³⁰, o número de casos vem aumentando progressivamente.³¹

Na grande maioria dos casos, o CHC se desenvolve no contexto da cirrose hepática, mas dados recentes sugerem que existe uma proporção de pacientes com DHGNA que apresentam alto risco de CHC na ausência de cirrose.³²⁻³⁵ Em 2009, Chagas e colaboradores³⁶, relataram 7 casos de CHC em pacientes com EHNA confirmada histologicamente. Destes, 1 era não cirrótico (EHNA estadio 1), demonstrando que a fibrose relevante ou cirrose não é mandatória para o surgimento do CHC. Outro estudo brasileiro, realizado por Kikuchi e colaboradores (2014), avaliou a aplicabilidade do sistema de estadiamento do Barcelona Clinical Liver Cancer (BCLC) em uma casuística de 42 casos de CHC secundário a DHGNA ou cirrose criptogênica (CC), 4 pacientes eram não cirróticos.³⁷ E cada vez mais estudos, demonstram o surgimento do CHC na ausência de cirrose.³⁸⁻⁴¹

Um estudo multicêntrico nacional, onde participaram 9 unidades de hepatologia de seis estados do país, avaliou as características clínicas de 110 pacientes com diagnóstico de CHC e DHGNA. Neste estudo, a média de idade foi de 67 ± 11 anos e 65,5% eram do sexo masculino. A obesidade foi observada em 52,7% dos casos; DM, em 73,6%; DLP em 41%; hipertensão arterial (HAS), em 60%; e SM, em 57,2%. O diagnóstico histológico do CHC foi realizado em 47,2% dos pacientes; e dentre estes pacientes, a EHNA com cirrose foi observada em 61,5%; EHNA com fibrose grau 1-3, em 27%; e EHNA sem fibrose, em 3,8%.⁴²

1.3.2. Fisiopatogênese do CHC secundário a DHGNA

As evidências de que o CHC seja parte da história natural da EHNA vem de 3 linhas de pesquisa: (1) estudos retrospectivos que observam que o CHC decorrente da CC está relacionado aos fatores de risco da EHNA, (2) relatos de casos e (3) estudos que avaliam as complicações tardias da EHNA e da cirrose associada à EHNA.⁴³

Embora nenhum estudo explique claramente a evolução de DHGNA para CHC, pesquisadores sugerem que o mecanismo mais provável envolve o acúmulo de ácidos graxos (AG) nos hepatócitos decorrente de fatores predisponentes, como a SM, aumento do estresse oxidativo, estresse do retículo endoplasmático (RE), disfunção mitocondrial e endotoxemia crônica. Todos esses fenômenos contribuem para o desencadeamento da inflamação e fibrose, levando a uma lesão crônica e progressiva.^{7,44}

Estudos demonstram que 70% dos indivíduos com DM tipo 2 e 90% dos obesos têm alguma forma de acúmulo de triglicérides (TG) no fígado, sendo: esteatose simples (60%), EHNA (25-30%) e cirrose (5-10%), evidenciando que a DHGNA e a EHNA são comuns nesses indivíduos. A DHGNA e a EHNA podem ser os elementos de ligação entre a SM (que tem a obesidade como principal fator) e o CHC, ou seja, indivíduos que possuem os principais fatores da SM (resistência insulínica (RI)/ DM2, e obesidade) apresentam grandes chances de acúmulo de TG no fígado, que por sua vez, pode levar a DHGNA, evoluir para EHNA, cirrose e CHC.⁴⁵⁻⁴⁷

A RI associada com obesidade, SM e DM2 leva ao aumento da liberação de AG livres pelos adipócitos, liberando múltiplas citocinas pró

inflamatórias, como Fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interleucina 6 (IL-6), leptina e resistina e a diminuição da adiponectina.⁴⁸

Park e colaboradores (2010) descreveram o desenvolvimento de CHC no contexto da obesidade como uma função da expressão aumentada de TNF- α e IL-6. Estas citocinas, além de causar inflamação hepática, ativam o fator de transcrição oncogênico (STAT3), que aumenta a proliferação e progressão dos hepatócitos com mutações oncogênicas, levando ao desenvolvimento tumoral.⁴⁹

O crescimento celular desregulado, no contexto de hiperinsulinemia foi descrito como uma função do fator de crescimento insulina símile 1 (IGF-1), do receptor de manose 6-fosfato/ receptor do fator de crescimento insulina símile 2 (M6P/ IGF2R), e do primeiro substrato do receptor de insulina (IRS-1). A hiperinsulinemia, aumenta a produção de IGF1, um peptídeo hormonal que estimula o crescimento celular pela proliferação celular e inibição da apoptose no fígado. A insulina também ativa o IRS1, o qual está envolvido nas vias de sinalização das citocinas e que está aumentado no CHC (Figura 1). O MP6/ IGF2R, um gene supressor tumoral, regula o crescimento celular através da inibição da proliferação celular e apoptose, via transformação do fator de crescimento Beta (TGF- β) e fator de crescimento insulina símile 2 (IGF2), respectivamente. Interessantemente, mutações do MP6/ IGF2R, tem sido identificados em CHC, mesmo na ausência de hepatite viral ou cirrose hepática. A adiponectina é um polipeptídeo antiinflamatório, específico do tecido adiposo, que está diminuído nos estados de RI, e tem sido demonstrado que é responsável

pela inibição da angiogênese, via modulação da apoptose em modelo animal.^{48,50} (Figura 1)

Figura 1 - Esquema ilustrativo da patogênese do Carcinoma hepatocelular (CHC) na Doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA). Adaptado de Starley, Calcagno, Harrison, 2010

O desenvolvimento da EHNA também está relacionado ao estresse oxidativo e a liberação de espécies reativas de oxigênio (EROs), os quais provavelmente contribuem para o desenvolvimento do CHC. O estresse oxidativo pode favorecer a tumorigênese através da esteatose, inflamação e proliferação celular, ou pode induzir mutações diretamente associadas ao câncer. Tem sido demonstrado que o *Trans 4 hydroxy 2 nonenal*, um produto da peroxidação lipídica, causa mutações no gene supressor de tumor p53 que está associado com mais da metade dos cânceres humano, incluindo o CHC.⁵¹ O fator de transcrição *nuclear respiratory factor 1* (Nrf1) é essencial

na mediação do estresse oxidativo. Xu e colaboradores (2005) demonstraram em modelo animal que a falta deste fator aumenta a susceptibilidade ao estresse oxidativo. A histologia hepática dos animais com deficiência de Nrf1 apresentou esteatose, apoptose, necrose, inflamação e fibrose, e em alguns casos, observou-se o desenvolvimento de CHC relacionado ao estresse oxidativo.⁵²

Recentemente a proteína *c-Jun amino-terminal kinase 1* (JNK1) tem sido relacionada a obesidade, RI, EHNA e desenvolvimento do CHC. AG livres, TNF- α e EROs liberados no cenário da hiperinsulinemia são todos potentes ativadores da JNK1, que sua vez fosforila o IRS 1. A obesidade esta associada à elevação anormal da atividade da JNK1. A ativação do JNK 1 e subsequente fosforilação do IRS1, são componentes cruciais da sinalização bioquímica responsável pela obesidade induzida pela RI. A atividade do JNK1 já tinha sido previamente associada a uma variedade de cânceres. Mais recentemente, evidências definitivas, tem demonstrado uma relação significativa entre uma ativação sustentada do JNK1 e desenvolvimento do CHC.^{12,48}

A hepatocarcinogênese na EHNA também pode ser mediada por mecanismos celulares. A lesão dos hepatócitos relacionada com a DHGNA leva a uma superestimulação da via de *Hedgehog*, uma via celular complexa para reparo e regeneração de tecidos. Um dos principais mecanismos ativados através da estimulação desta via, inclui a mobilização de populações de células progenitoras hepáticas para substituir os hepatócitos danificados. Embora essenciais para a reparação do fígado, as aberrações

na ativação da população de células progenitoras hepáticas, podem levar à reparação prejudicada e proliferação desregulada de hepatócitos potencializando a carcinogênese.^{50,53}

O papel do sistema imune adaptativo vem se tornando reconhecido através de estudos em modelos animais de CHC secundário a EHNA. Fatores que ativam a inflamação como Fator nuclear kappa B (NF- κ B) e receptor de insulina (IR), contribuem para a carcinogênese em pacientes com DHGNA. Ma e colaboradores (2016) demonstraram em modelo animal, que a desregulação do metabolismo lipídico na DHGNA, leva a uma perda seletiva de linfócitos T CD4⁺ mas não de linfócitos T CD8⁺, levando a uma hepatocarcinogênese aumentada.⁵⁴ Em outro estudo, realizado por Wolf e colaboradores (2014), também em modelo animal, descreveram a ativação metabólica de linfócitos T CD8⁺ e células Natural killer (NK), agindo sinergicamente, com citocinas inflamatórias, levando ao dano hepático e induzindo a carcinogênese.⁵⁵

Outro mecanismo que tem sido associado com a patogenia do CHC secundário a DHGNA é a predisposição genética. Romeo e colaboradores (2008), descreveram um polimorfismo de um único nucleotídeo (SNP) no gene *da Patatin like phospholipase domain containing 3* (PNPLA3), que afeta fortemente o acúmulo de gordura no fígado na ausência de RI.⁵⁶ O alelo de risco PNPLA3 rs 738409 [G], encontrado em ~40% da população europeia, também pode aumentar o risco de progressão para a EHNA em três vezes e, mais importante, aumentar o risco de desenvolvimento de CHC em 12 vezes.⁵⁷

1.3.3. Patologia do CHC secundário a DHGNA

O estudo anátomo-patológico do CHC inicia-se pela macroscopia, caracterizando a natureza nodular ou infiltrativa, seguindo-se pelo estudo histopatológico, avaliando-se primeiramente os padrões: trabecular, pseudoglandular e acinar ou padrão misto. O sistema de graduação histológico utilizado é o de Edmondson e Steiner (1954), uma classificação proposta em 1954, que até hoje inspira a graduação adotada pela Organização Mundial de Saúde (2010) . Este sistema classifica o CHC de acordo com a similaridade que as células neoplásicas apresentam com as células normais correspondentes, ou seja, o grau de diferenciação em: bem diferenciado, moderadamente diferenciado, pobremente diferenciado e indiferenciado.^{58,59}

Segundo a classificação de Edmondson e Stenier (1954), o CHC grau 1 é aquele que apresenta crescimento em trabéculas finas, aumento de densidade celular que é caracterizada por maior relação núcleo/ citoplasma que é encontrado em hepatócitos normais (CHC bem diferenciado). O grau 2 apresenta crescimento em trabéculas médias, as células têm citoplasma amplo e eosinofílico, núcleos redondos com nucléolos distintos e relação núcleo citoplasma próximo ao do hepatócito normal (CHC moderadamente diferenciado). O grau 3 tem crescimento em trabéculas largas, pseudo-ácinos e ocasionais áreas sólidas, relação núcleo citoplasma alta e citoplasma escasso (CHC pouco diferenciado). E finalmente o grau 4, apresenta um padrão de células gigantes com graus variados de pleomorfismo e células gigantes, citoplasma escasso, e dificilmente

consegue se definir a linhagem hepatocelular com base apenas nos achados histológicos.(CHC indiferenciado).⁵⁸

Existem poucos trabalhos avaliando as características anatomopatológicas especificamente do CHC secundário a DHGNA.

Um estudo retrospectivo, realizado por Hernandez-Alejandro e colaboradores (2012), avaliou as características clínicas e anatomopatológicas de 64 pacientes submetidos ao transplante hepático por CHC secundário ao VHC e 17 pacientes transplantados por CHC secundário a EHNA. Na avaliação anatomopatológica dos 2 grupos, houve uma proporção significativamente maior de pacientes com CHC-VHC com invasão vascular (23,4% contra 6,4%, $p = 0,002$), bem como, tumores pior diferenciados (4,7% contra 0%, $p < 0,001$) em comparação com o grupo de CHC-EHNA. Não houve diferença significativa no número médio de tumores ou no tamanho médio acumulado dos tumores entre os dois grupos. A sobrevida livre de doença não foi estatisticamente significativa entre os dois grupos, porém, houve uma tendência clara para uma menor sobrevida livre de doença no grupo CHC-VHC.⁶⁰

Salomão e colaboradores (2011) relataram um subtipo diferente de CHC, o esteato-hepatítico, uma variante do CHC clássico, em pacientes com CHC por VHC, que apresentava características de esteato-hepatite intratumoral. Segundo aqueles autores, a definição deste subtipo requer a identificação de 3 dos 4 critérios: balonização, corpúsculos de Mallory, inflamação e fibroses intratumorais, em mais de 50% de cada nódulo. A esteatose intratumoral geralmente estava presente, mas não era um critério.

Demonstraram que esta variante estava presente em pacientes com hepatite C crônica que apresentavam DHGNA associada.⁶¹ Esse mesmo grupo em 2011, avaliou CHCs tratados cirurgicamente (ressecção ou transplante) por 3,5 anos na instituição, e demonstraram que este ocorria quase exclusivamente em pacientes com doença hepática gordurosa (alcoólica ou não alcoólica) e SM. Do total de pacientes avaliados, 13, 5% apresentavam este subtipo. E dos pacientes que desenvolveram o CHC no contexto da EHNA ou alcoólica, 35,7% possuíam esta variante. E quando este subtipo foi avaliado isoladamente, quase 100% se desenvolveram em pacientes com esteato-hepatite.⁶²

Shibahara e colaboradores (2014) avaliaram retrospectivamente a presença desta variante na população asiática em CHCs tratados cirurgicamente no Hospital Universitário de Tóquio no período de 2005 a 2010. Utilizaram como critérios para o subtipo esteato-hepatítico a presença de: esteatose intratumoral (> 5%), balonização ou corpúsculos de Mallory, fibrose e inflamação intratumorais. Encontraram 120 CHCs (31,4%) em 106 pacientes (36,4%) que preenchiam estes critérios, e estes pacientes apresentavam maior frequência de DM, HAS e DLP quando comparados com os pacientes com CHCs convencionais.⁶³

1.4. Expressão tecidual de proteínas identificáveis por métodos imuno-histoquímicos refletindo propriedades das células neoplásicas

As propriedades fundamentais das células neoplásicas, expostas ao longo de décadas nos textos clássicos de patologia, foram reorganizadas de modo magistral por Hanahan e Weinberg (2011).⁶⁴

Dentre as capacitações biológicas adquiridas pelas células neoplásicas, tais autores destacam a sinalização para a proliferação celular e à “imortalidade replicativa”, a resistência aos estímulos supressores do crescimento celular e à morte celular, a indução à angiogênese e o ganho de propriedades para invasão e metastatização. Hanahan e Weinberg consideram que, como pano de fundo para a carcinogênese esteja a instabilidade genômica, que dá origem à diversidade genética flanqueando as células às transformações próprias da neoplasia, enquanto a inflamação também provoca a ativação de várias dessas propriedades.⁶⁴

A imuno-histoquímica, disciplina da Anatomia Patológica que permite a identificação da expressão de proteínas e sua localização visual nos diversos compartimentos intra e extra-celulares, é uma das ferramentas essenciais para a detecção de proteínas marcadoras das principais propriedades das células neoplásicas, dentre as quais analisaremos aqui a reprodução do perfil de células progenitoras hepáticas e a ativação da célula neoplásica para o ciclo celular.

1.4.1. Queratina 19 (K19) como marcador de célula progenitora hepática

Queratina (K19) 19 é um membro da família das queratinas, proteínas de filamentos intermediários responsáveis pela integridade estrutural das células epiteliais. A queratina 19 é uma queratina de tipo I, proteínas ácidas que estão dispostas em pares de cadeias de queratina heterotípicas.⁶⁵

A K19 é um marcador de células progenitoras biliares/ hepáticas (HPC, sigla em inglês), e é expressa em um subconjunto de CHC com mau prognóstico.⁶⁶

Os hepatócitos e os colangiócitos, como as outras células epiteliais, contêm estes filamentos intermediários de citoesqueleto, as queratinas. Estas também estão presentes em células epiteliais malignas. Diferentes epitélios expressam combinações características de polipeptídeos de queratinas, dependendo do órgão ou do tipo de diferenciação. No fígado normal, os hepatócitos expressam K8 e K18, enquanto os colangiócitos expressam ainda K7 e K19. As HPCs são bipotenciais, e também expressam K7 e K19. Durnez e colaboradores (2006) levantaram a hipótese que se todos os CHCs se desenvolvessem a partir de hepatócitos e se o padrão de queratina fosse invariavelmente preservado durante a transformação neoplásica, esperava-se teoricamente que o CHC expressasse apenas K8 e K18, mas a expressão de K7 e, ou, K19 em CHC sugeria uma característica biliar ou um fenótipo intermediário de hepatócitos/ célula progenitora hepática.⁶⁷

Estudos moleculares recentes têm identificado os hepatócitos adultos como as células de origem dos tumores hepáticos. Estas células têm sido

sugeridas a se transformarem diretamente em células de CHCs através de uma sequência de alterações genéticas, se desdiferenciar em células precursoras de hepatócitos (as quais podem se tornar em células de CHC que expressam marcadores de células progenitoras), ou se transdiferenciar em células biliares-*like* [as quais podem dar origem ao colangiocarcinoma intrahepático (CCIH)]. Alternativamente, células progenitoras também dão origem ao CHC e ao CCIH com marcadores de células progenitoras.⁶⁸

De acordo com a literatura, CHC com K19+ representam cerca de 20% de todos os CHCs.^{69,70} A incidência e a relevância da expressão de K19 em pacientes com CHC secundário a DHGNA não são bem conhecidas.

1.4.2. Antígeno Ki-67 (Ki-67) como marcador de ciclo celular

O marcador mais utilizado associado à proliferação é o Ki-67, que é um antígeno nuclear presente apenas em células que estão em proliferação. Uma análise detalhada do ciclo celular mostrou que o antígeno Ki-67 é expresso em células durante as fases G1, S e G1 e Mitose (M), mas não durante a fase G0 do ciclo celular. Em CHC, a expressão de Ki-67 apresenta estreita relação com a taxa de crescimento tumoral e é um indicador prognóstico independente de taxas de sobrevida global e sobrevida livre de doença do paciente.⁷¹

1.5. Aspectos gerais da classificação molecular do CHC

O progresso na tecnologia de identificação de perfis genômicos tem oferecido evidências que já estimulam os principais autores na tentativa de propostas de classificações moleculares do CHC. Hoshida e colaboradores (2010) realizaram uma metanálise baseada em 24 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.⁷²

Atualmente existe uma tendência a um consenso para a divisão do CHC em 2 grandes grupos: proliferativo e não proliferativo.^{3,73}

Os tumores da classe proliferativa são altamente heterogêneos, com vias de sinalização relacionadas à proliferação mais significativas, como IGF1 e alvo da rapamicina (MTOR) ou apresentam características de células progenitoras (“*stem cell*”), como NOTCH, expressão de queratina 19, SALL4, CD 133, CD 44, EpCAM e outras. Esta classe também contém a maioria dos padrões de expressão gênica associados à recidiva tumoral e menor tempo de sobrevida.^{68,74,75}

Os tumores da subclasse não proliferativa tendem a reter características do fenótipo hepatocitário. Um subconjunto tem ativação da via de sinalização canônica WNT, principalmente através de mutações no gene *Catenin Beta 1* (CTNNB1).⁷³ Os estudos iniciais sugerem que os

tumores desta classe possam ser menos agressivos e melhor diferenciados com baixos níveis de AFP, em comparação com a classe proliferativa.⁶⁸

Apesar dos avanços científicos e da implementação de medidas para a detecção precoce do CHC em pacientes de risco, a sobrevida dos pacientes continua baixa e embora os fatores de risco do CHC secundário a DHGNA já estejam bem estabelecidos, os aspectos histopatológicos e o mecanismo molecular exato que leva ao desenvolvimento do CHC ainda não estão bem definidos. Baseados no papel que os componentes da SM representam na patogênese da DHGNA e evolução para CHC, e considerando que os mecanismos ainda não estão totalmente claros, e que ainda existe esta tendência a um consenso da divisão do CHC em 2 grandes grupos: proliferativo e não proliferativo, o presente estudo tem por objetivo avaliar as características clínicas e histopatológicas e os diferentes marcadores tumorais citados em pacientes com diagnóstico de CHC secundário a DHGNA.

2. Objetivos

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Primário

Avaliar aspectos clínicos, anatomopatológicos e o perfil de expressão proteica de marcadores tumorais que refletem o padrão proliferativo em pacientes com diagnóstico de CHC secundário a DHGNA.

2.2. Objetivos secundários

- 1) Avaliar o perfil de expressão proteica dos marcadores tumorais: Ki-67 e K19 em pacientes com diagnóstico de CHC secundário a DHGNA.
- 2) Correlacionar o perfil de expressão proteica dos marcadores tumorais: Ki-67 e K19 destes pacientes com os dados demográficos, clínicos, bioquímicos e anatomopatológicos.
- 3) Avaliar a sobrevida neste grupo de pacientes.

3. Metodologia

3. METODOLOGIA

3.1. Ética em pesquisa

Este projeto de pesquisa foi aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (Cappesq) do HCFMUSP sob o número: 385.602.

3.2. Desenho do estudo

Este é um estudo retrospectivo que avaliou, através de revisão de prontuários e material anatomopatológico de explante ou amostra tumoral de ressecção de CHC, as correlações entre expressão proteica tecidual por imuno-histoquímica e dados clínico-patológicos em portadores de CHC secundário a DHGNA.

3.3. Casuística

Foram avaliados os pacientes submetidos a transplante hepático ou ressecção hepática por CHC no Departamento de Transplante de Fígado ou Departamento de Cirurgia de Fígado e vias biliares do HC-FMUSP. Os

pacientes estudados eram acompanhados nos ambulatórios de Doença hepática gordurosa não alcoólica (A2MG700) da Disciplina de Gastroenterologia Clínica ou no Ambulatório de Cirurgia de Fígado e vias biliares do HC-FMUSP ou também no Instituto do Câncer do Estado de São Paulo (ICESP). Foram incluídos no estudo, os pacientes submetidos à ressecção ou transplante hepático por CHC, entre o período de janeiro de 2005 a dezembro de 2015. O seguimento dos pacientes encerrou em 31 de dezembro de 2016. Os dados foram coletados retrospectivamente do prontuário médico após inclusão do paciente no estudo. A análise da histologia hepática e imuno-histoquímica foram efetuadas no Departamento da Anatomia Patológica (LIM-14).

Os casos de CHC para o estudo foram selecionados de acordo com os critérios de inclusão e exclusão a seguir.

Critérios de inclusão:

1. Idade acima de 18 anos
2. Diagnóstico de CHC por exame de imagem ou por histologia baseado nos critérios diagnósticos da Associação Europeia para Estudos do Fígado (*European Association for the Study of the Liver – EASL*) e da Associação Americana para Estudo do Fígado (*American Association for the Study of Liver Diseases – AASLD*)^{76,77}
3. História negativa de abuso de álcool (abaixo de 140 g/ semana para homens e < 70g/ semana para mulheres).
4. Pesquisas sorológicas resultando negativas para hepatites virais B e C.

5. Pesquisas negativas para outras causas de doença hepática crônica como Doença de Wilson, Hemocromatose hereditária, cirrose biliar primária, hepatite autoimune, colangite esclerosante primária
6. Diagnóstico de doença hepática gordurosa não alcoólica em acompanhamento no ambulatório de Doença hepática gordurosa não alcoólica (A2MG700) da Disciplina de Gastroenterologia Clínica ou Doença hepática crônica criptogênica que apresentavam critérios para SM conforme critérios do *National Cholesterol Education Program's Adult Treatment Panel III* (NCEP-ATP III)⁷⁸ ou diagnóstico de DM/ HAS/ DLP ou obesidade segundo relatórios prévios de prontuários ou uso de insulina/ hipoglicemiantes ou antihipertensivos ou estatinas, respectivamente.

Critérios de exclusão:

1. Pacientes que, mesmo com diagnóstico de CHC por métodos de imagem, tenham recebido posterior diagnóstico histológico de neoplasia de fígado não CHC.
2. Pacientes com doença hepática crônica criptogênica, mas que não apresentavam nenhum critério para SM ou diagnóstico de DM/ HAS/ DLP/ obesidade, segundo relatórios prévios de prontuários médicos ou uso de insulina/ hipoglicemiantes ou antihipertensivos ou estatinas, respectivamente.
3. Uso de drogas hepatotóxicas.

3.3.1 Seleção dos casos

No período do estudo, foram avaliados 423 pacientes submetidos à ressecção ou transplante hepático por CHC de qualquer etiologia. Foram excluídos deste estudo, 264 pacientes com sorologia positiva para hepatite C, 44 com sorologia positiva para hepatite B, 50 por história positiva de abuso de álcool, 21 pacientes com diagnóstico de hepatopatia crônica por outras causas bem definidas, 16 casos com doença hepática criptogênica mas sem fatores de risco para síndrome metabólica e 7 pacientes que não tinham dados suficientes para participar do estudo. Após a aplicação dos critérios de inclusão e exclusão do estudo, foram elegíveis para análise final do estudo 21 pacientes, que apresentavam diagnóstico de doença hepática gordurosa não alcoólica ou doença hepática criptogênica com fatores de risco para SM. A síndrome metabólica foi definida seguindo as diretrizes, do NCEP-ATP III⁷⁸. O diagnóstico de CHC foi realizado de acordo com as diretrizes internacionais do AASLD e EASL e confirmado por critérios patológicos em espécimes cirúrgicos / explantes (VAFA).^{76,77}

Entre os 21 pacientes, avaliamos 35 nódulos de CHC, sendo incluídos até o máximo de 4 nódulos por paciente, mesmo se o paciente apresentasse mais nódulos para serem avaliados. As características da maior lesão foram consideradas para representar o paciente quando este apresentava mais de 1 nódulo.

Figura 2 - Fluxograma de pacientes incluídos no estudo e distribuição dos nódulos de CHC

3.3.2. Obtenção de dados clínicos-laboratoriais

Os dados clínicos-laboratoriais foram obtidos retrospectivamente por revisão de prontuários, realizada por um único pesquisador. Os dados obtidos referem-se ao momento do diagnóstico do tumor. Os seguintes dados foram obtidos: sexo, idade, raça, história de etilismo, peso, altura, sorologia para hepatite C, sorologia para hepatite B, outras causas para cirrose (hemocromatose, doença de Wilson, hepatite auto-imune). A função hepática foi avaliada de acordo com o escore de Child-Pugh e *Model of End-Stage Liver Disease* (MELD, sigla em inglês). As seguintes características foram avaliadas e utilizados escores específicos para análise: DM (subagrupamos em: 1: Ausência, 2: Presença, sendo considerado como presença, glicemia ≥ 110 mg/dL pelo ATP III ou uso de insulina/hipoglicemiante oral), HAS (subagrupamos em, 1: Ausência e 2: Presença, sendo considerado hipertenso o paciente com PAS ≥ 130 ou PAD ≥ 85 mmHg pelo ATP III ou uso de antihipertensivos), DLP (subagrupamos em, 1: Ausência e 2: Presença, sendo este considerado presente pelo ATP III se HDL em homens < 40 e mulheres < 50 / TG acima de 150 ou uso de estatinas), Obesidade (subagrupamos em, 1: Ausência e 2: Presença, sendo considerado presente se Circunferência abdominal acima de 102 cm homens e > 88 cm em mulheres pelo ATP III ou IMC acima de 25), IMC (subagrupamos: 1: IMC ≤ 25 e 2: IMC > 25 , sendo este considerado como sobrepeso ou obesidade), AST (subagrupamos em : 1: AST $\leq 1,5$ x o Limite Superior da Normalidade (LSN) e 2: AST $> 1,5 \times$ LSN), ALT (subagrupamos em : 1: ALT $\leq 1,5$ x o Limite Superior da Normalidade

(LSN) e 2: ALT > 1,5xLSN), Atividade de protrombina (AP) (subagrupamos em 1: AP > Limite Inferior da Normalidade (LIN) e 2: < LIN), nível sérico de bilirrubinas total e frações (subagrupamos em: 1: Bilirrubina ≤ LSN e 2: > LSN), albumina sérica (subagrupamos em, 1: albumina >3,5 e 2: albumina ≤3,5), contagem de plaquetas (subagrupamos em: 1: >100mil e 2: <100mil, sendo este, fator indireto da presença de hipertensão portal), dosagem sérica de AFP (subagrupamos em, 1: 1 a 10 (LSN) e 2: acima do LSN), Child (subagrupamos em, 1: CHILD A ou NA, cirrose compensada e não cirróticos e 2: Child B ou C: cirrose descompensada), Eastern Cooperative Oncology Group – Performance Status (ECOG-PS), subagrupamos em 1: ECOG 0 e 2: ECOG 1). Avaliamos também tratamento preconizado para CHC até a ressecção ou transplante, e data e causa do óbito e se paciente estava em programa de rastreamento para CHC.

3.4. Variáveis anatomopatológicas

Nesta análise retrospectiva, todas as lâminas dos 21 casos selecionados arquivadas na Divisão de Anatomia Patológica (DAP- HC-FMUSP) foram revistas e as seguintes variáveis anatomopatológicas foram obtidas por 2 observadores simultaneamente (PBC + VAFA). A análise anatomopatológica foi realizada em:

- a. Amostras do parênquima hepático não tumoral

- b. Amostras dos nódulos de CHC, utilizando até 4 nódulos para análise de cada paciente.

3.4.1. Alterações estruturais

O parênquima não tumoral foi avaliado e seu padrão estrutural classificado de 0 a 4, sendo grau 4 os pacientes com cirrose. Subdividimos em: 1: pacientes com alterações estruturais leves (0, 1 + 2) , e 2: pacientes com alterações estruturais acentuadas (3 + 4).

3.4.2. Infiltrado portal

O infiltrado portal foi classificado de 0 a 4 e subdividimos em: 1: infiltrado portal baixo ou ausente (0 + 1+ 2) , e 2: infiltrado portal intenso (3 + 4).

3.4.3. Atividade periportal

Esta foi classificada de 0 a 3, sendo subdividida em: 1: atividade periportal baixa ou ausente (0+ 1), e 2: atividade periportal alta (2+3).

3.4.4. Atividade parenquimatosa

Foi classificado de 0 a 3, sendo subdividida em: 1: atividade parenquimatosa baixa (0+ 1) e 2: atividade parenquimatosa alta (2+3)

3.4.5. Classificação de Laennec

Dentre os que se desenvolveram no contexto da cirrose, subclassificamos a cirrose em 4A (septos finos), 4B (septos médios) ou 4C (septos grossos) pela classificação de Laennec proposta por Wanless e colaboradores (2002).⁷⁹

3.4.6. Balonização

A balonização foi classificada de 0 a 2, e subdividimos em: 1: balonização ausente ou baixa (0+1), e 2: balonização intensa (2).

3.4.7. Esteatose hepática

A esteatose hepática foi classificada de 0 a 3, sendo que 0 eram as amostras com esteatose menor que 5%, grau 1 aquelas com esteatose de 5 a 33%, grau 2 de 33 a 66% e grau 3 acima de 66%. Subdividimos em: 1: esteatose ausente ou baixa (0+1) e 2: esteatose moderada a intensa (2+3).

3.4.8. Corpúsculos de Mallory

Foi classificado de 0 a 2, e subdividimos em 1: corpúsculos de Mallory ausente ou baixo (0+1), e 2: corpúsculos de Mallory em grande quantidade (2).

3.4.9. Padrão macroscópico

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

3.4.10. Padrão arquitetural

O padrão arquitetural dominante foi classificado em trabecular, acinar, pseudoglandular ou misto.

3.4.11. Grau arquitetural

O grau arquitetural foi classificado de 0 a 4, e subdividimos em: 1: grau arquitetural mais baixo (G0/ G1/ G2) e 2: grau arquitetural mais complexo (G3/ G4).

3.4.12. Grau nuclear

Com relação ao grau nuclear, as amostras foram classificadas de 1 a 4, e subdividimos em : 1: grau nuclear mais baixo (G1/G2) e 2: grau nuclear mais complexo (G3/ G4).

3.4.13. Grau histológico

As lesões foram classificadas em graus 1 a 4 de Edmondson-Steiner⁵⁸ segundo o pior padrão histológico observado. A terminologia tumores pouco diferenciados refere-se aos graus 3 e 4 agrupados, e os de graus 1 e 2 agrupados são os tumores bem diferenciados.

3.4.14. Esteatose intratumoral

Foi classificada de 0 a 3, sendo que 0 eram as amostras com esteatose menor que 5%, grau 1 aquelas com esteatose de 5 a 33%, grau 2 de 33 a 66% e grau 3 acima de 66%. Subdividimos em: 1: esteatose intratumoral ausente ou baixa (0+1) e 2: esteatose moderada a intensa (2+3).

3.4.15. Balonização intratumoral

Foi classificada de 0 a 2, e subdividimos em: 1: balonização intratumoral ausente ou baixa (0+1), e 2: balonização intensa (2).

3.4.16. Inflamação intratumoral

Foi classificada de 0 a 3, sendo subagrupada em: 1: inflamação intratumoral baixa ou ausente (0+ 1), e 2: inflamação intratumoral alta (2+3).

3.4.17. Fibrose intratumoral

Foi classificada de 0 a 4, sendo subagrupada em 1: fibrose intratumoral baixa (graus 0+1+2), e 2: fibrose intratumoral alta (graus 3+4).

3.4.18. Infiltração vascular

A infiltração vascular foi classificada de 0 a 2, sendo subagrupada em 1: infiltração vascular ausente ou baixa (0+1) e 2: infiltração vascular intensa (2).

3.4.19. Inflamação peritumoral

Esta foi classificada de 0 a 3, sendo subagrupada em, 1: inflamação peritumoral ausente ou baixa (0+1) e 2: inflamação peritumoral intensa (2+3).

3.4.20. Fibrose Peritumoral

Foi classificada de 0 a 4, sendo subagrupada em, 1: fibrose peritumoral baixa (0+1+2) e 2: fibrose peritumoral intensa (3+4).

3.4.21. Número e tamanho dos nódulos

Determinados conforme relatórios de anatomia patológica. Quanto ao número de nódulos os casos foram categorizados em um, dois, três ou quatro. Foram avaliados no máximo 4 nódulos por paciente.

3.4.22. Metástase à distância ou extra-hepática

Definida como presente se referida em revisão de prontuários e nestes casos, foram computados os respectivos órgãos de disseminação.

3.5. Seleção das Amostras e Confeção dos Blocos de Tissue Microarray

O arranjo em micromatriz tecidual ou *Tissue microarray* (TMA) foi confeccionado utilizando blocos de parafina da periferia do tumor e blocos

de parafina de amostras do carcinoma hepatocelular, analisando se até 4 nódulos por paciente. Analisamos, sempre que possível, 3 áreas mais representativas tanto da região central quanto da periferia de cada nódulo. As amostras foram obtidas do DAP-HCFMUSP.

Cortes histológicos representativos dos casos, corados pela hematoxilina e eosina (HE) foram revisados e as áreas de interesse foram selecionadas nas lâminas. As mesmas áreas foram marcadas nos respectivos blocos de parafina doadores de tecidos. Cilindros de 1,0 mm de diâmetro das áreas marcadas nos blocos de parafina doadores foram transportadas para um bloco de parafina receptor por um sistema mecanizado de precisão (Beecher Instruments), com um intervalo de 0,3 mm entre os cilindros. Cada cilindro amostral foi alocado numa posição do bloco receptor definida num sistema cartesiano de coordenadas, e o conjunto de amostras constituiu uma micromatriz tecidual. Previamente à confecção do bloco de TMA, foi elaborada matriz de orientação das amostras em planilha eletrônica Excel.

3.6 Reações Imuno-histoquímicas

O método imuno-histoquímico utilizado é o de imuno-peroxidase com recuperação antigênica pelo calor úmido. Em resumo, a técnica constitui em: desparafinização e hidratação das lâminas contendo os cortes histológicos dos blocos de TMA. É então realizada recuperação antigênica com tampão

citrato 10 mM pH 6 em panela a vapor por 40 min a cerca de 95 °C. Após lavagens em água corrente e água destilada, (PBS pH7,4), segue-se a etapa de bloqueio da peroxidase endógena com água oxigenada a 6% em metanol, em três imersões de 10 min cada à temperatura ambiente. Após lavagens em água corrente e água destilada e tampão fosfato pH 7,4, realiza-se bloqueio inespecífico de carga com solução comercial *CASBlock* (Invitrogen) por 10 min a 37 °C. Após retirada do excesso, as lâminas são incubadas com o anticorpo primário (específico para o antígeno), em título definido previamente no laboratório, diluído em solução de albumina a 1% e azida sódica a 0.1% em PBS, em câmara úmida: 30 min a 37 °C e, em seguida, 18 horas (over-night) a 4 °C. As lâminas são em seguida lavadas (3X) em tampão PBS. Todas as amplificações de sinal são realizadas com o sistema de polímero curto conjugado a peroxidase Novolink (Novocastra) por 30 min a 37 °C. Após novas lavagens em PBS pH 7,4, realiza-se a revelação com o substrato enzimático 3,3'-diaminobenzidina a 60 mg% em tampão fosfato pH 7,4 por 5 min a 37 °C, e novas lavagens em água corrente e água destilada. As lâminas são então contracoloradas com hematoxilina de Harris por 1 minuto em temperatura ambiente, desidratadas em soluções progressivas de álcool e xilol e montadas com resina sintética *Entellan* (Merck) (Kononen *et al*,1998).⁸⁰

A tabela 1 resume os detalhes da padronização das reações de imuno-histoquímica para os respectivos anticorpos.

Tabela 1 - Características dos anticorpos utilizados

Anticorpo	Fornecedor	Clone	Diluição
K19	Novocastra	b170	1:400
Ki67	DAKO	MIB-1	1:300

Legenda: K19: queratina 19; Ki67: antígeno Ki67

3.7 Análise da Expressão proteica por Imuno-histoquímica

A escolha dos marcadores tumorais foi feita baseada em revisão de literatura de modo a representar as propriedades das células neoplásicas de interesse neste estudo – ativação para o ciclo celular = Ki-67; ativação de células progenitoras = K19.

O antígeno Ki-67, que é de localização nuclear, foi analisado 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 considerado o de maior valor.

Para a K19, as amostras foram avaliadas de acordo com o escore de imunoexpressão: 0: ausente; 1: estimativa de até 5% e 2: acima de 5%. Dividimos em 2 grandes grupos: 1 negativo ou até 5% e 2 acima de 5%.

Tanto para a K19 quanto para o Ki67, foram avaliados a expressão na periferia e no centro do tumor, sendo que o maior valor (área de maior expressão) foi escolhido para representar o nódulo e o maior nódulo foi escolhido para representar o paciente.

4. Análise estatística

4. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram apresentados descritivamente, os dados qualitativos foram apresentados como números com porcentagens em parentêses e os dados quantitativos como média com desvio padrão ou mediana com intervalo interquartil.

Foram digitados os dados no programa Excel e posteriormente exportados para o programa SPSS v. 20.0 para análise estatística. Foram descritas as variáveis por frequências e percentuais e comparadas pelo teste Exato de Fisher. Foi considerado um nível de significância de 5%.

5. Resultados

5. RESULTADOS

Para este estudo retrospectivo, foram avaliadas 21 amostras de tecido hepático de 21 pacientes que foram submetidos à ressecção (12 pacientes) ou transplante hepático (8 pacientes) ou ambos (1 paciente foi submetido a ressecção (1 nódulo) e na recidiva do CHC (2 nódulos) ao transplante) no período de 2005 a 2015. Dentre estes pacientes, 12 eram cirróticos (58%) e 9 eram não cirróticos (42%). Nestes 21 pacientes, foram isolados 35 nódulos de CHC. Dentre as amostras, 18 (51,4%) eram resultado de análise de ressecção hepática e 17 (48,6%) eram resultado de análise de explante por transplante hepático (Figura 2, vide material e métodos).

5.1. Aspectos demográficos, clínicos e laboratoriais

Na avaliação das variáveis demográficas e clínicas, entre os 21 pacientes, a idade variou de 50 a 77 anos e 76% eram do sexo masculino (Tabela 2). No que se refere a presença de comorbidades, 76% apresentavam DM tipo II, 81% eram hipertensos e somente 38% apresentavam DLP. Pacientes com sobrepeso ou obesidade (IMC acima de 25 kg/ m²) foram a grande maioria dos pacientes (90%), restando apenas 2

(10%) com IMC abaixo de 25 kg/ m². O IMC variou de 22 a 35,7 kg/m² (Tabela 2).

Tabela 2 - Características demográficas, clínicas e laboratoriais dos pacientes com Carcinoma hepatocelular (CHC) utilizados no estudo

Características	n=21(%)
<i>Idade (anos)</i>	
Média	64,9
Mínimo- Máximo	50-77
<i>Sexo</i>	
Masculino	16 (76%)
Feminino	5 (24%)
IMC >25	19 (90%)
Diabetes	16 (76%)
Dislipidemia	8 (38%)
Hipertensão	17 (81%)
AST *	47 (39 -55)
ALT *	46 (33 - 73)
FA *	119 (92 -158)
GGT *	163 (73- 262)
Bilirrubina *	0,79 (0,62 -1,5)
Albumina *	4,1 (3,6- 4,3)
Plaquetas *	160 (95- 222)
AP (%) *	81 (67-90)
AFP *	5,7 (2,6-19)
<i>Número de nódulos</i>	
1	12 (57%)
2	6 (28%)
3	1 (5%)
4 ou mais	2 (10%)
<i>Cirrose</i>	
Sim	12 (58%)
Não	9 (42%)
<i>Child Pugh</i>	
A	8 (38%)
B	4 (20%)
C	0
NA	9 (42%)
<i>ECOG</i>	
0	19 (90%)
1	2 (10%)
2	0

Legenda: IMC: índice de massa corpórea; ALT: alanina aminotransferase; AST: aspartato aminotransferase; FA: fosfatase alcalina; GGT: gama glutamil transferase; AFP: alfafetoproteína; AP: atividade de protrombina em %; ECOG: *Eastern Cooperative Oncology Group*

* Mediana com intervalo interquartil

A grande maioria dos CHC ocorreram em pacientes que apresentavam um bom *performance status* (PS), com ECOG de 0 em 19 pacientes (90%), apenas 2 casos (10%) apresentavam ECOG 1 (Tabela 2). Quando se avalia as descompensações prévias da hepatopatia crônica, apenas 23% dos pacientes já tinham apresentado descompensação prévia (ascite ou encefalopatia hepática). Quanto à classificação da hepatopatia pelo *Child Pugh*, 8 pacientes (38%) eram classificados como *Child A* (doença hepática compensada) e 4 *Child B* (20%). Não tinha nenhum paciente *Child C*. Dos 21 pacientes, 9 eram pacientes sem cirrose (42%) com classificação de *Child Pugh* não aplicada (Tabela 2).

O MELD, escore de pontuação para avaliar a gravidade da doença hepática crônica, também foi aplicado e este variou de 6 a 22, onde 10 pacientes apresentavam MELD abaixo de 14, sendo que nos pacientes não cirróticos o score MELD não foi utilizado.

Dos 21 pacientes, 12 foram submetidos a ressecção e 8 ao transplante hepático, e 1 paciente realizou ressecção e na recidiva do CHC, foi submetido ao transplante hepático como tratamento, totalizando 13 ressecções (62%) e 9 transplantes (38%) (Figura 3).

Figura 3 - Tratamento aplicado nos casos de Carcinoma hepatocelular (CHC) secundário à Doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA)

Os níveis de AFP variaram de 1 a 1109 ng/ mL, contudo, dos 21 pacientes, 13 pacientes (62%) apresentavam níveis de AFP normais (valor de referência do laboratório do HC-FMUSP <10 ng/ mL) (Tabela 2).

Do total de 21 pacientes, 9 estavam sobre rastreamento do CHC, com exame de imagem e AFP (42%), sendo que dos 9 pacientes não cirróticos, apenas 3 (33%) estavam em rastreamento e dos 12 pacientes com cirrose, 6 (50%) estavam sobre rastreamento. Quando avaliamos em separado os 13 pacientes que foram submetidos à ressecção, apenas 6 estavam sob rastreamento. E dos 9 pacientes transplantados, 7 estavam sob rastreamento (Figura 4).

Figura 4 - Pacientes cirróticos e não cirróticos com Carcinoma hepatocelular (CHC) que estavam sob rastreamento

Na classificação e estadiamento pelo BCLC do CHC, apenas aplicado para pacientes cirróticos, 9 foram estadiados como BCLC A, um como BCLC B e 2 casos como BCLC C. Nenhum dos casos tinha estadiamento BCLC D. (Figura 5). Quanto a presença de doença extra-hepática, apenas 2 casos apresentavam doença metastática, e os sítios de acometimento eram pulmão e adrenal.

Figura 5 - Classificação e estadiamento *Barcelona Clinic Liver Cancer* (BCLC) nos 21 pacientes com Carcinoma hepatocelular (CHC). Note que em 9 pacientes por serem não cirróticos, o BCLC não foi aplicado

A quimioembolização foi realizada em 8 pacientes, na grande maioria como tratamento ponte para o transplante hepático. Oito pacientes apresentaram progressão radiológica e 8, progressão clínica da doença.

Do total de casos, 14 foram à óbito (66,6%) e 2 casos perdemos seguimento. Dos 14 óbitos, 10 (71,4%) ocorreram em pacientes que foram submetidos à ressecção, e os outros 4 (28,6%), nos pacientes que foram submetidos ao transplante hepático como tratamento. Do total de 21 pacientes temos 5 pacientes vivos, destes, 4 foram submetidos ao transplante hepático e 1 apenas foi submetido a ressecção hepática como tratamento do CHC. As causas dos óbitos foram diversas, dos 14 casos, as causas foram desde não funcionamento primário do enxerto, infecção,

rejeição aguda grave e a própria evolução do CHC, com falência hepática, esta como causa principal (Figura 6).

Figura 6 - Fluxograma demonstrando número de óbitos e suas causas em nossa casuística

O tempo médio de sobrevida do tratamento cirúrgico (transplante) aplicado até o óbito foi de 48,5 meses (intervalo de 95% de confiança de 17,3 a 79,8 meses). Abaixo apresentamos a curva de Kaplan Méier da sobrevida dos pacientes submetidos a transplante de fígado. (Figura 7).

Figura 7 - Curva de sobrevida dos pacientes submetidos a transplante de fígado

O tempo médio de sobrevida do tratamento cirúrgico aplicado (ressecção) até o óbito foi de 31,8 meses (intervalo de 95% de confiança de 14,6 a 49,0 meses). Abaixo apresentamos a curva de Kaplan Méier da sobrevida dos pacientes submetidos a ressecção. (Figura 8)

Figura 8 - Curva de sobrevida dos pacientes submetidos a ressecção

Os pacientes vivos (n=5) têm um tempo médio de seguimento de 58,8 meses, todos no período, sem evidências de recidiva do CHC.

5.2. Achados anatomopatológicos do parênquima não tumoral

Dentre os 21 pacientes, 6 apresentavam no espécime cirúrgico de ressecção ou no explante, hepatopatia crônica com alteração estrutural 2 (28%) (Figura 9), 3 pacientes com alteração estrutural 3 (14%), e os 12 pacientes restantes eram cirróticos (alteração estrutural 4) (Figura 10) (Tabela 3). Dentre estes que se desenvolveram no contexto da cirrose, subclassificamos a cirrose em 4A (septos finos), 4B (septos médios) ou 4C (septos grossos) pela classificação “Laennec” proposta por Wanless e cols (2002).⁷⁹ Dos 12 pacientes, 7 eram Laennec 4A, e 4 eram Laennec 4B e apenas 1 foi classificado como Laennec 4C, portanto 7 são classificados como cirrose inicial e 5 como cirrose avançada conforme Kim e colaboradores (2012).⁸¹

Tabela 3 - Análise histológica do parênquima não tumoral em 21 pacientes com Carcinoma hepatocelular (CHC) incluídos no estudo

Característica histológica	N pacientes(%) n=21
Alterações estruturais	
0	0
1	0
2	6 (28%)
3	3 (14%)
4	12 (58%)
Infiltrado portal	
0	1 (5%)
1	11 (52%)
2	7 (34%)
3	2 (9%)
4	0
Atividade periportal	
0	8 (38%)
1	7 (34%)
2	6 (28%)
3	0
Atividade parenquimatosa	
0	0
1	14 (67%)
2	6 (28%)
3	1(5%)
Esteatose	
0	5(23%)
1	12(58%)
2	4 (19%)
3	0
Balonização	
0	4 (19%)
1	14(67%)
2	3 (14%)
Corpúsculo de Mallory	
0	11(52%)
1	8(38%)
2	2(10%)

Figura 9 - Carcinoma hepatocelular grosseiramente heterogêneo. Note o parênquima hepático adjacente não tumoral amarelado, com septos moderados (F2). Importante também a presença de êmbolo tumoral em grande ramo venoso portal

Figura 10 - Carcinoma hepatocelular medindo 11 cm em seu maior diâmetro, com hemorragia e necrose extensos. Fígado adjacente não tumoral amarelado (esteato-hepatítico à microscopia), com nódulos cirróticos totalmente desenvolvidos

Além do grau arquitetural do tecido hepático distante do tumor, foram avaliadas as variáveis histológicas da DHGNA. Foram avaliados e classificados: a balonização hepatocelular, a esteatose (Figura 11), e a presença de corpúsculos de Mallory no parênquima hepático. A balonização foi classificada de 0 a 2, e dentre todos os pacientes, 14 apresentavam balonização grau 1 (67%), 4 com ausência de balonização (19%) e, 3 pacientes com balonização grau 2 (14%).

A esteatose hepática foi classificada de 0 a 3, cinco pacientes (23%) não apresentam esteatose hepática no parênquima ou apresentavam esteatose mínima, 12 apresentavam esteatose grau 1 (58%) e 4 com esteatose grau 2 (19%) (Figura 12) e nenhuma amostra apresentava esteatose grau 3 (Tabela 3). A presença de corpúsculos de Mallory foi classificada de 0 a 2, dentre os pacientes 11 (52%) foram classificados como 0, oito como grau 1 (38%) e apenas 2 (10%) como grau 2 (Tabela 3).

Foram avaliados também o infiltrado portal, atividade periportal e atividade parenquimatosa. O infiltrado portal foi classificado de 0 a 4, e dentre os 21 pacientes, 1 (5%) apresentava infiltrado portal mínimo ou ausente (0), onze (52%) com infiltrado portal grau 1, sete (34%) com infiltrado portal grau 2 e 2 pacientes (9%) com infiltrado portal 3 e nenhum paciente com infiltrado portal 4 (Tabela 3).

A atividade periportal foi classificada de 0 a 3, e entre os pacientes, 8 (38%) apresentavam atividade 0, sete (34%) com atividade grau 1, seis (28%) com atividade grau 2 e nenhum apresentava atividade periportal grau 3 (Tabela 3).

A atividade parenquimatosa também foi avaliada e classificada de 0 a 3. Dentre os pacientes, nenhum apresentava atividade parenquimatosa 0. Esta atividade foi classificada como 1 na grande maioria dos pacientes, 14 pacientes, totalizando 67%. Do restante, seis (28%) apresentavam atividade parenquimatosa grau 2 e apenas 1 caso apresentava atividade grau 3 (5%) (Tabela 3).

Figura 11 - Esteatose, balonização e eventuais corpúsculos de MDB em fígado não tumoral (HE, x 200)

Figura 12 - Esteatose hepática grau 2 (33 a 66%) no fígado não tumoral (F2)

5.3. Análise anatomopatológica do parênquima tumoral e peritumoral

Quando avaliamos os 35 nódulos de CHC, as dimensões variaram de 0,4 cm a 15 cm e o padrão macroscópico nodular foi o predominante, 31 de 35 casos. Apenas 4 casos tinham padrão macroscópico infiltrativo. O padrão microscópico presente eram: trabecular, acinar ou pseudoglandular. Das 35 amostras, 14 (40%) apresentavam padrão trabecular puro, 14 (40%) padrão misto trabecular e acinar, dois (6%) padrão acinar puro, um (2,8%) padrão misto acinar e pseudoglandular, um (2,8%) padrão puro pseudoglandular e 3 (8,5%) padrão misto trabecular e pseudoglandular (Figura 13)

Figura 13 - Padrões microscópicos dos carcinomas hepatocelulares (CHC)

Na avaliação dos nódulos de CHC classificamos o grau arquitetural, o grau nuclear e, avaliados também esteatose, balonização, inflamação e fibrose intratumoral. Adicionalmente, avaliamos a presença de infiltração vascular, inflamação e fibrose peritumoral (Tabela 4).

Tabela 4 - Variáveis histológicas x grau designado em 35 nódulos de Carcinoma hepatocelular (CHC)

Variável histológica	Grau designado (n= 35 nódulos de CHC)				
	0	1	2	3	4
Grau arquitetural (0-4)	0	7	10	15	3
Grau nuclear (1-4)	x	4	11	18	2
Esteatose intratumoral (0 -3)	7	17	7	4	x
Balonização intratumoral (0- 2)	4	9	22	x	x
Inflamação intratumoral (0- 3)	6	12	9	8	x
Fibrose intratumoral (0- 4)	0	16	8	9	2
Invasão vascular (0- 2)	14	5	16	X	x

Do total de amostras de CHC, 7 (20%) apresentavam grau arquitetural grau 1, 10 (28%) apresentavam grau arquitetural grau 2, 15 (43%) apresentavam grau arquitetural grau 3 e apenas 3 (9%) amostras apresentavam grau arquitetural grau 4 e nenhuma com grau arquitetural grau 0. Com relação ao grau nuclear, as amostras que foram classificadas de 1 a 4, quatro amostras (11%) apresentavam grau nuclear grau 1, 11 (31%) grau 2, 18 (52%) grau 3 e 2 (6%) grau 4 (Figura 14).

Pela classificação histológica de Edmondson e Steiner (1954), 13 (37%) dos nódulos eram CHC bem diferenciados (grau 1 ou 2) e 22 (67%) eram CHC pouco diferenciados (grau 3 ou 4). Quando avaliamos os 35

nódulos independentemente, grau arquitetural mais baixo, foi encontrado em 17 nódulos (48%) (graus 0, 1 e 2) e grau arquitetural mais complexo foi encontrado em 18 nódulos (52%) (graus 3 e 4). Na avaliação do grau nuclear, 15 nódulos (43%) tinham grau nuclear 1 ou 2 e 20 nódulos (57%) apresentavam grau nuclear graus 3 ou 4 (Tabela 5).

Tabela 5 - Graus arquitetural e nuclear designados e grau histológico de Edmondson e Steiner (1954) nos 35 nódulos de Carcinoma hepatocelular (CHC)

Nódulos de CHC n= 35 (%)	
Edmondson & Steiner	
Graus 1+2 (bem diferenciados)	13 (37%)
Graus 3+4 (pouco diferenciados)	22 (63%)
Grau arquitetural	
Graus 0+1+2	17 (48%)
Graus 3+4	18 (52%)
Grau nuclear	
Graus 1+2	15 (43%)
Graus 3+4	20 (57%)

A esteatose intratumoral apresentava-se como grau 0 em 7 amostras (20%), grau 1 em 17 (49%), grau 2 em 7 (20%) e grau 3 em 4 (11%) (Tabela 4). A balonização intratumoral foi classificada de 0 a 2. Quatro amostras (11%) apresentavam balonização grau 0, 9 (26%) balonização grau 1 e 22 (63%) balonização grau 2 (Tabela 4) (Figura 15).

Figura 14 - Carcinoma hepatocelular com grau arquitetural grau 3/4, grau nuclear grau 3, com características de esteato-hepatítico

Figura 15 - Carcinoma hepatocelular, grau 2, subtipo esteatohepatítico. Note a esteatose macrovesicular, balonização e Corpúsculos de Mallory-Denk intratumorais (HE, x200)

Foram avaliados também a fibrose e inflamação intratumorais (Tabela 4). A fibrose intratumoral foi classificada de 0 a 4. Fibrose grau 1 foi encontrada em 16 amostras (46%), grau 2 em 8 (23%), grau 3 em 9 (25%), grau 4 de fibrose em 2 (6%) das amostras estudadas (Figura 16) e nenhuma amostra com fibrose 0.

A inflamação intratumoral, foi classificada de 0 a 3 (Tabela 4). Do total de amostras, 6 (17%) apresentavam inflamação intratumoral grau 0, 12 (35%) apresentavam grau 1, 9 (25%) grau 2 e 8 (23%) grau 3 (Figura 17).

Figura 16 - Carcinoma hepatocelular com fibrose intratumoral grau 3

Figura 17 - Carcinoma hepatocelular com inflamação intratumoral grau 3

Dentre os 35 nódulos, avaliamos quais apresentavam os critérios do subtipo esteato-hepatítico, conforme Salomão e colaboradores, (2011) e o diagnóstico deste subtipo em nosso estudo foi feito quando o tumor preenchia os critérios histológicos, mesmo que estes fossem focais ou extensivos, semelhante ao estudo de Shibahara e colaboradores (2014). Em nossa casuística, 25 nódulos (70%) eram esteato-hepatíticos.

Na avaliação da invasão vascular, a qual foi classificada de 0 a 2, 14 casos (40%) não apresentavam invasão vascular (grau 0), 5 (14%) invasão vascular grau 1 e 16 (46%) invasão grau 2 (Tabela 4) (Figura 18).

Figura 18 - Carcinoma hepatocelular com invasão vascular grau 2

A inflamação peritumoral foi classificada de 0 a 3, nenhum caso apresentava inflamação peritumoral grau 0, 13 (37%) apresentavam inflamação peritumoral grau 1, 14 (40%) grau 2 e 8 (23%) grau 3. Na avaliação da fibrose peritumoral, que foi classificada de 0 a 4, dos 35 casos de CHC, 6 (17%) apresentavam fibrose peritumoral grau 1, 18 (52%) grau 2, 8 (23%) grau 3, apenas 3 (8%) apresentavam fibrose peritumoral grau 4 e nenhuma com fibrose peritumoral grau 0.

5.4. Avaliação imuno-histoquímica dos marcadores representativos de “classe proliferativa”

O estudo imuno-histoquímico dos marcadores K19 e Ki67 visaram a refletir a “classe proliferativa”. Tal análise foi possível em 19 pacientes (31 nódulos) pois 2 pacientes não apresentavam material suficiente para a confecção do TMA.

5.4.1. Análise dos marcadores de classe proliferativa por paciente

A expressão geral dos marcadores K19 e Ki67 nos 19 pacientes apresentou-se da seguinte forma: 7 (36%) pacientes apresentaram expressão de Ki-67 e / ou K19 acima dos respectivos cut-offs. (Tabela 6) Apenas 1 paciente apresentou expressão de ambos. K19 > 5% ou Ki67 > 10% foi observado somente em 6 pacientes, ou seja, marcação importante

nos marcadores de proliferação foi encontrado em 30% dos pacientes. Destes 6 pacientes, 3 (15%) apresentaram apenas expressão de K19 acima de 5% nas células neoplásicas e 3 (15%) apresentaram apenas a expressão do Ki67 acima de 10% nas células neoplásicas (Figura 19). Por outro lado, chama a atenção que 64% dos pacientes não tiveram no CHC expressão importante de nenhum dos marcadores da classe proliferativa aqui analisados, sendo compreendidos como possíveis representantes da classe de CHC “não proliferativo”.

Figura 19 - Pacientes com expressão de marcadores de K19 e Ki67 positivos e negativos

Tabela 6 - Pacientes com expressão de marcadores de classe proliferativa (K19 e/ou Ki67)

	K19 >5%	Ki67>10%
Paciente 1	Não	Sim
Paciente 2	Sim	não
Paciente 3	Sim	Não
Paciente 4	Não	Sim
Paciente 5	Sim	Sim
Paciente 6	Sim	Não
Paciente 7	Não	Sim

Avaliando apenas a expressão de K19 nos 19 pacientes, apenas 4 pacientes com CHC secundário a DHGNA apresentavam expressão > 5% nas células neoplásicas, totalizando 21% dos casos (Figura 20).

Figura 20 - Reações imunorreativas representativas da K19. A. Expressão de 10% (x100) B. Expressão de 10% (x200) C. Expressão <1% (x200) D. Expressão <1% (x400) E. Expressão de 70%(x100) F. Expressão de 70% (x200). G Expressão de 70% em CHC esteatohepatítico (x100) H. Expressão de 70% em CHC esteatohepatítico (x200)

Apenas 4 pacientes apresentaram expressão de Ki67 >10% nas células neoplásicas, totalizando novamente 21% dos casos. (Figura 21).

Figura 21 - Imunoreações representativas do Ki67. A. Expressão de 03% (x200) B. Expressão de 03% (x400) C. Expressão de 58% (x200) D. Expressão de 58% (x400) E. Expressão de 74% (x200) F. Expressão de 74% (x400)

Avaliamos a expressão dos marcadores de proliferação nas principais variáveis clínicas (Tabela 7).

Tabela 7 - Descritiva da expressão de K19 e Ki67 dos pacientes nas variáveis clínicas

Variáveis clínicas	n	Expressão K19 >5%	Expressão Ki67>10%
Diabetes Mellitus	15	3 (20,0)	3 (20,0)
Hipertensão Arterial	15	3 (20,0)	3 (20,0)
Dislipidemia	7	2 (28,6)	1 (14,3)
Obesidade	17	4 (23,5)	4 (23,5)
IMC>25	17	4 (23,5)	4 (23,5)
AST>1,5xLSN	5	1 (20,0)	1 (20,0)
ALT>1,5xLSN	6	1 (16,7)	1 (16,7)
Atividade de Protombina (<LIN)	6	3 (50,0)	2 (33,3)
Bilirrubina>LSN	8	2 (25,0)	2 (25,0)
Albumina≤3,5	5	2 (40,0)	1 (20,0)
Plaquetas ≤100mil	6	1 (16,7)	1 (16,7)
AFP>LSN 10	7	3 (42,9)	2 (28,6)
Child Pugh			
A ou NA	15	1 (6,7)	4 (26,7)
B ou C	4	3 (75,0)	-
ECOG			
0	17	3 (17,6)	3 (17,6)
1	2	1 (50,0)	1 (50,0)

Entre os 19 pacientes que conseguimos avaliação para imunohistoquímica, 15 (79%) eram diabéticos. Entre estes pacientes, apenas 5 apresentavam expressão de K19 e/ou expressão de Ki67. Dois pacientes com expressão de K19 positiva, dois pacientes com expressão de Ki67 positiva e apenas 1 paciente com expressão de ambos positiva, resultando em 20% de pacientes com diabetes mellitus com K19+ e 20% com Ki67 positivo (Tabela 8) .

Tabela 8 - Pacientes com DM com expressão de marcadores de proliferação positivos

Diabetes mellitus	K19>5%	Ki67>10%
Paciente 1	não	Sim
Paciente 2	sim	Não
Paciente 3	sim	sim
Paciente 4	sim	Não
Paciente 5	não	Sim
Total	20%	20%

Nos 15 pacientes (79%) que apresentavam HAS, 5 apresentavam expressão de K19 e/ou expressão de Ki67 (Tabela 7). Dois pacientes com expressão de K19 positiva, dois com expressão positiva para Ki67 e apenas 1 com expressão positiva para ambos. (20% dos pacientes com HAS com K19+ e 20% com Ki67+). Na avaliação da expressão geral em obesos, 7 pacientes apresentavam expressão da K19 e/ou de Ki67. Apenas 1 paciente apresentava a expressão de ambos marcadores acima do cut-off. Três

pacientes apenas com expressão positiva para K19 e os outros 3 com expressão apenas de Ki67, resultando em 23% dos obesos com K19 positiva e 23% com Ki67 positivo (Tabela 7).

Dentre os 19 pacientes, 7 (37%) apresentavam DLP, dentre estes, 3 apresentavam expressão de K19 e, ou, de Ki67. Dois pacientes com expressão de K19 e 1 apenas com expressão de Ki67, resultando em 28% dos pacientes com DLP com K19 positiva e 14% com Ki67 acima de 10% (Tabela 7).

Correlacionamos a expressão de marcadores de proliferação com as variáveis clínicas e houve diferença para a variável **Child Pugh** ($p=0,016$). Setenta e cinco % dos pacientes com expressão de K19 >5% eram *Child B* ou *C* (Tabela 9).

Tabela 9 - Análise comparativa das características clínicas dos pacientes na expressão menor e maior que 5% de K19

	K19 ≤5%	K19>5%	P
Tipo de tratamento			0,262
Ressecção	10 (66,7)	1 (25,0)	
Transplante	5 (33,3)	3 (75,0)	
Diabetes Mellitus	12 (80,0)	3 (75,0)	0,999
Hipertensão Arterial	12 (80,0)	3 (75,0)	0,999
Dislipidemia	5 (33,3)	2 (50,0)	0,603
Obesidade	13 (86,7)	4 (100,0)	0,999
IMC>25	13 (86,7)	4 (100,0)	0,999
AST>1,5xLSN	4 (26,7)	1 (25,0)	0,999
Bilirrubina>LSN	6 (40,0)	2 (50,0)	0,999
Atividade de Protombina (<LIN)	3 (20,0)	3 (75,0)	0,071
AFP>LSN 10	4 (26,7)	3 (75,0)	0,117
Plaquetas≤100000	5 (33,3)	1 (25,0)	0,999
Albumina≤3,5	3 (20,0)	2 (50,0)	0,272
Child Pugh			0,016
A ou NA	14 (93,3)	1 (25,0)	
B ou C	1 (6,7)	3 (75,0)	
ECOG			0,386
0	14 (93,3)	3 (75,0)	
1	1 (6,7)	1 (25,0)	

Dados apresentados pelo n(%) e comparados pelo teste Exato de Fisher.

A mesma análise comparativa foi realizada para a expressão de Ki67 com as variáveis clínicas, mas não houve diferença estatisticamente significativa para nenhuma variável clínica entre pacientes com Ki67 maior ou menor que 10% (Tabela 10).

Tabela 10 - Análise comparativa das características clínicas dos pacientes na expressão menor e maior que 10% de Ki67

	Ki67 ≤10%	Ki67>10%	P
Tipo de tratamento			0,103
Ressecção	7 (46,7)	4 (100,0)	
Transplante	8 (53,3)	-	
Diabetes Mellitus	12 (80,0)	3 (75,0)	0,999
Hipertensão Arterial	12 (80,0)	3 (75,0)	0,999
Dislipidemia	6 (40,0)	1 (25,0)	0,999
Obesidade	13 (86,7)	3 (75,0)	0,530
IMC>25	13 (86,7)	4 (100,0)	0,999
AST>1,5xLSN	4 (26,7)	1 (25,0)	0,999
Bilirrubina>LSN	6 (40,0)	2 (50,0)	0,999
Atividade de Protombina (<LIN)	4 (26,7)	2 (50,0)	0,557
AFP>LSN 10	5 (33,3)	2 (50,0)	0,603
Plaquetas≤100000	5 (33,3)	1 (25,0)	0,999
Albumina≤3,5	4 (26,7)	1 (25,0)	0,999
Child Pugh			0,530
A ou NA	11 (73,3)	4 (100,0)	
B ou C	4 (26,7)	-	
ECOG			0,386
0	14 (93,3)	3 (75,0)	
1	1 (6,7)	1 (25,0)	

Dados apresentados pelo n(%) e comparados pelo teste Exato de Fisher.

Após, correlacionamos a expressão destes marcadores com as variáveis anatomopatológicas do fígado não tumoral (Tabela 11) e tumoral (Tabela 12) e observou-se que houve diferença estatisticamente significativa apenas para a **inflamação intratumoral** ($p=0,009$). Todos os pacientes com expressão de K19 $>5\%$, apresentavam inflamação intratumoral em graus mais acentuados (graus 2+3).

Tabela 11 - Tabela comparativa dos pacientes com expressão de K19 $\leq 5\%$ e acima de 5% x variáveis do fígado não tumoral

	K19 $\leq 5\%$	K19 $>5\%$	P
Alterações estruturais			0,999
0+1+2	3 (20,0)	1 (25,0)	
3+4	12 (80,0)	3 (75,0)	
Infiltrado portal			0,386
0+1+2	14 (93,3)	3 (75,0)	
3+4	1 (6,7)	1 (25,0)	
Atividade periportal			0,557
0+1	11 (73,3)	2 (50,0)	
2+3	4 (26,7)	2 (50,0)	
Atividade de parenquimatosa			0,999
0+1	10 (66,7)	3 (75,0)	
2+3	5 (33,3)	1 (25,0)	
Balonização			0,53
0+1	2 (50,0)	3 (75,0)	
2	2 (50,0)	1 (25,0)	
Esteatose			0,53
0+1	13 (86,7)	3 (75,0)	
2+3	2 (13,3)	1 (25,0)	
Inflamação lobular			0,999
0+1	9 (60,0)	2 (50,0)	
2+3	6 (40,0)	2 (50,0)	
Corpúsculos de Mallory			0,999
0+1	13 (86,7)	4 (100,0)	
2	2 (13,3)	-	

Dados apresentados pelo n(%) e comparados pelo teste Exato de Fisher.

Tabela 12 - Tabela comparativa dos pacientes com expressão de K19 $\leq$ 5% e acima de 5% x variáveis do fígado tumoral

	K19 $\leq$ 5%	K19>5%	P
Grau arquitetural			0,530
0+1+2	4 (26,7)	-	
3+4	11 (73,3)	4 (100,0)	
Grau nuclear			0,530
1+2	5 (33,3)	-	
3+4	10 (66,7)	4 (100,0)	
Esteatose intratumoral			0,53
0+1	11 (73,3)	4 (100,0)	
2+3	4 (26,7)	-	
Balonização intratumoral			0,999
0+1	7 (46,7)	2 (50,0)	
2	8 (53,3)	2 (50,0)	
Inflamação intratumoral			0,009
0+1	12 (80,0)	-	
2+3	3 (20,0)	4 (100,0)	
Fibrose intratumoral			0,071
0+1+2	12 (80,0)	1 (25,0)	
3+4	3 (20,0)	3 (75,0)	
Infiltração vascular			0,557
0+1	4 (26,7)	2 (50,0)	
2	11 (73,3)	2 (50,0)	
Inflamação peritumoral			0,603
0+1	7 (46,7)	1 (25,0)	
2+3	8 (53,3)	3 (75,0)	
Fibrose peritumoral			0,262
0+1+2	10 (66,7)	1 (25,0)	
3+4	5 (33,3)	3 (75,0)	

Dados apresentados pelo n(%) e comparados pelo teste Exato de Fisher.

Na correlação da expressão de Ki-67 de cada paciente com as variáveis anatomopatológicas do fígado não tumoral (Tabela 13) e tumoral (Tabela 14) houve diferença estatisticamente significativa com **alterações estruturais** ($p=0,016$), 75% dos pacientes com nódulo com expressão de Ki67 acima de 10% apresentavam alterações estruturais mais leves (graus 0+1+2), ou seja, os nódulos que ocorreram em pacientes não cirróticos.

Tabela 13 - Tabela comparativa dos pacientes com expressão de Ki67 $\leq$ 10% e acima de 10% x variáveis fígado não tumoral

	Ki67 $\leq$ 10%	Ki67>10%	P
Alterações estruturais			0,016
0+1+2	1 (6,7)	3 (75,0)	
3+4	14 (93,3)	1 (25,0)	
Infiltrado portal			0,999
0+1+2	13 (86,7)	4 (100,0)	
3+4	2 (13,3)	-	
Atividade periportal			0,999
0+1	10 (66,7)	3 (75,0)	
2+3	5 (33,3)	1 (25,0)	
Atividade parenquimatosa			0,557
0+1	11 (73,3)	2 (50,0)	
2+3	4 (26,7)	2 (50,0)	
Balonização			0,097
0+1	14 (93,3)	2 (50,0)	
2	1 (6,7)	2 (50,0)	
Esteatose			0,530
0+1	13 (86,7)	3 (75,0)	
2+3	2 (13,3)	1 (25,0)	
Inflamação lobular			0,999
0+1	9 (60,0)	2 (50,0)	
2+3	6 (40,0)	2 (50,0)	
Corpúsculos de Mallory			0,386
0+1	14 (93,3)	3 (75,0)	
2	1 (6,7)	1 (25,0)	

Dados apresentados pelo n(%) e comparados pelo teste Exato de Fisher.

Tabela 14 - Tabela comparativa dos pacientes com expressão de Ki67 $\leq$ 10% e acima de 10% x variáveis do fígado tumoral

	Ki67 $\leq$ 10%	Ki67>10%	p
Grau arquitetural			0,999
0+1+2	3 (20,0)	1 (25,0)	
3+4	12 (80,0)	3 (75,0)	
Grau nuclear			0,530
1+2	5 (33,3)	-	
3+4	10 (66,7)	4 (100,0)	
Esteatose intratumoral			0,999
0+1	12 (80,0)	3 (75,0)	
2+3	3 (20,0)	1 (25,0)	
Balonização intratumoral			0,303
0+1	6 (40,0)	3 (75,0)	
2	9 (60,0)	1 (25,0)	
Inflamação intratumoral			0,999
0+1	9 (60,0)	3 (75,0)	
2+3	6 (40,0)	1 (25,0)	
Fibrose intratumoral			0,557
0+1+2	11 (73,3)	2 (50,0)	
3+4	4 (26,7)	2 (50,0)	
Infiltração vascular			0,255
0+1	6 (40,0)	-	
2	9 (60,0)	4 (100,0)	
Inflamação peritumoral			0,999
0+1	6 (40,0)	2 (50,0)	
2+3	9 (60,0)	2 (50,0)	
Fibrose peritumoral			0,262
0+1+2	10 (66,7)	1 (25,0)	
3+4	5 (33,3)	3 (75,0)	

5.4.2. Análise dos marcadores de classe proliferativa por nódulo

Após a avaliação da expressão dos marcadores por paciente, avaliamos a expressão nos 31 nódulos de CHC.

A expressão da K19 mostrou se positiva em mais de 5% das células neoplásicas em apenas 5 nódulos (16%).

Na avaliação da expressão do Ki67 nos 31 nódulos, apenas 7 mostraram o Ki67 positivo em mais de 10% das células neoplásicas (22,5%).

Correlacionamos a expressão dos marcadores nos 31 nódulos com as variáveis anatomopatológicas do fígado não tumoral (Tabela 15) e tumoral (Tabela 16) e obtivemos diferença estatisticamente significativa com as variáveis **fibrose intratumoral, inflamação intratumoral e fibrose peritumoral**, entre aqueles com expressão $\leq 5\%$ e $> 5\%$ de **K19 nos nódulos**.

Dos nódulos com expressão de K19 acima de 5%, 100% (5 nódulos) apresentavam inflamação intratumoral em graus mais acentuados (graus 2+3) ($p=0,018$) e 80% (4 nódulos) com fibrose intratumoral com graus 3 ou 4 ($p=0,027$) (Tabela 16) .

A fibrose peritumoral também se correlacionou com a expressão da K19, 4 nódulos (80%) que tinham a expressão $> 5\%$ de K19, tinham fibrose peritumoral de graus 3 ou 4 ($p=0,042$) (Tabela 16).

Tabela 15 - Análise comparativa dos nódulos com expressão de K19 $\leq 5\%$ e acima de 5% x variáveis fígado não tumoral

	K19 $\leq 5\%$	K19 $> 5\%$	P
Alterações estruturais			0,241
0+1+2	4 (15,4)	2 (40,0)	
3+4	22 (84,6)	3 (60,0)	
Infiltrado portal			0,301
0+1+2	25 (96,2)	4 (80,0)	
3+4	1 (3,8)	1 (20,0)	
Atividade periportal			0,625
0+1	16 (61,5)	2 (40,0)	
2+3	10 (38,5)	3 (60,0)	
Atividade parenquimatosa			0,999
0+1	18 (69,2)	3 (60,0)	
2+3	8 (30,8)	2 (40,0)	
Balonização			0,241
0+1	22 (84,6)	3 (60,0)	
2	4 (15,4)	2 (40,0)	
Esteatose			0,241
0+1	22 (84,6)	3 (60,0)	
2+3	4 (15,4)	2 (40,0)	
Inflamação lobular			0,625
0+1	16 (61,5)	2 (40,0)	
2+3	10 (38,5)	3 (60,0)	
Corpúsculos de Mallory			0,999
0+1	22 (84,6)	5 (100,0)	
2	4 (15,4)	-	

Dados apresentados pelo n(%) e comparados pelo teste Exato de Fisher.

Tabela 16 - Análise comparativa dos nódulos com expressão de K19 $\leq 5\%$ e acima de 5% x variáveis fígado tumoral

	K19 $\leq 5\%$	K19 $> 5\%$	P
Grau arquitetural			0,058
0+1+2	13 (50,0)	-	
3+4	13 (50,0)	5 (100,0)	
Grau nuclear			0,128
1+2	12 (46,2)	-	
3+4	14 (53,8)	5 (100,0)	
Esteatose intratumoral			0,147
0+1	16 (61,5)	5 (100,0)	
2+3	10 (38,5)	-	
Balonização intratumoral			0,999
0+1	10 (38,5)	2 (40,0)	
2	16 (61,5)	3 (60,0)	
Inflamação intratumoral			0,018
0+1	16 (61,5)	-	
2+3	10 (38,5)	5 (100,0)	
Fibrose intratumoral			0,027
0+1+2	20 (76,9)	1 (20,0)	
3+4	6 (23,1)	4 (80,0)	
Infiltração vascular			0,654
0+1	12 (46,2)	3 (60,0)	
2	14 (53,8)	2 (40,0)	
Inflamação peritumoral			0,999
0+1	9 (34,6)	1 (20,0)	
2+3	17 (65,4)	4 (80,0)	
Fibrose peritumoral			0,042
0+1+2	19 (73,1)	1 (20,0)	
3+4	7 (26,9)	4 (80,0)	

Dados apresentados pelo n(%) e comparados pelo teste Exato de Fisher.

A expressão do Ki67 nos nódulos, mostrou diferença estatisticamente significativa para as variáveis: **alterações estruturais, balonização, grau nuclear e fibrose intratumoral**, entre aqueles com e sem expressão de Ki67 no nódulo abaixo ou acima de 10%. Mais de setenta % dos nódulos que apresentavam expressão de Ki67 >10% das células neoplásicas, ocorreram em fígados não cirróticos, ao contrário dos nódulos que ocorreram em fígados com grau de fibrose mais acentuado (graus 3 ou 4), onde apenas 28% apresentavam a expressão de Ki67 acima de 10%. (**p=0,001**) (Tabela 17)

Cinquenta e sete por cento dos nódulos com expressão >10% de ki67 tinham balonização em grau acentuado (grau 2). (**p=0,014**) (Tabela 17).

Todos os nódulos com expressão de Ki67 >10% tinham grau nuclear mais acentuados (graus 3 ou 4) (**p=0,026**), e 71,4% apresentavam fibrose intratumoral em graus mais avançados (graus 3 ou 4) (**p=0,022**) (Tabela 18).

Tabela 17 - Análise comparativa dos nódulos com expressão de Ki67 $\leq 10\%$ e acima de 10% x variáveis do fígado não tumoral

	Ki67 $\leq 10\%$	Ki67 $> 10\%$	p
Alterações estruturais			0,001
0+1+2	1 (4,2)	5 (71,4)	
3+4	23 (95,8)	2 (28,6)	
Infiltrado portal			0,999
0+1+2	22 (91,7)	7 (100,0)	
3+4	2 (8,3)	-	
Atividade periportal			0,999
0+1	14 (58,3)	4 (57,1)	
2+3	10 (41,7)	3 (42,9)	
Atividade parenquimatosa			0,172
0+1	18 (75,0)	3 (42,9)	
2+3	6 (25,0)	4 (57,1)	
Balonização			0,014
0+1	22 (91,7)	3 (42,9)	
2	2 (8,3)	4 (57,1)	
Esteatose			0,110
0+1	21 (87,5)	4 (57,1)	
2+3	3 (12,5)	3 (42,9)	
Inflamação lobular			0,413
0+1	15 (62,5)	3 (42,9)	
2+3	9 (37,5)	4 (57,1)	
Corpúsculos de Mallory			0,212
0+1	22 (91,7)	5 (71,4)	
2	2 (8,3)	2 (28,6)	

Tabela 18 - Análise comparativa dos nódulos com expressão de Ki67 $\leq 10\%$ e acima de 10% x variáveis do fígado tumoral

	Ki67 $\leq 10\%$	Ki67 $> 10\%$	p
Grau arquitetural			0,667
0+1+2	11 (45,8)	2 (28,6)	
3+4	13 (54,2)	5 (71,4)	
Grau nuclear			0,026
1+2	12 (50,0)	-	
3+4	12 (50,0)	7 (100,0)	
Esteatose intratumoral			0,652
0+1	17 (70,8)	4 (57,1)	
2+3	7 (29,2)	3 (42,9)	
Balonização intratumoral			0,999
0+1	9 (37,5)	3 (42,9)	
2	15 (62,5)	4 (57,1)	
Inflamação intratumoral			0,685
0+1	13 (54,2)	3 (42,9)	
2+3	11 (45,8)	4 (57,1)	
Fibrose intratumoral			0,022
0+1+2	19 (79,2)	2 (28,6)	
3+4	5 (20,8)	5 (71,4)	
Infiltração vascular			0,083
0+1	14 (58,3)	1 (14,3)	
2	10 (41,7)	6 (85,7)	
Inflamação peritumoral			0,999
0+1	8 (33,3)	2 (28,6)	
2+3	16 (66,7)	5 (71,4)	
Fibrose peritumoral			0,067
0+1+2	18 (75,0)	2 (28,6)	
3+4	6 (25,0)	5 (71,4)	

6. Discussão

6. DISCUSSÃO

No presente estudo, avaliamos as características anatomopatológicas do CHC secundário a DHGNA, associado aos aspectos clínicos, laboratoriais, de sobrevida e tratamento destes pacientes. Este é um dos primeiros estudos que objetivou avaliar criteriosamente as características do CHC secundário a DHGNA, conjuntamente com a avaliação imunohistoquímica de marcadores que representem a “classe de CHC proliferativo”.

Atualmente, a incidência de CHC em DHGNA vem aumentando exponencialmente. Em um estudo de coorte retrospectivo realizado por Wong e colaboradores (2014), foram levantadas, através de dados nacionais da rede de registro de doação de órgãos dos Estados Unidos, as principais etiologias dos receptores de transplante de fígado no país de 2002 a 2012. Neste período, houveram 61.868 indivíduos submetidos ao transplante de fígado, incluindo 10.061 pacientes com CHC. O CHC secundário ao VHC foi a principal causa de transplante e este apresentou um aumento de 2 vezes no período e o CHC secundário a EHNA foi a segunda etiologia, mas com aumento de 4 vezes no mesmo período. Sendo assim, a indicação para transplante de fígado por CHC secundário a DHGNA, é a que mais cresce no país.⁸²

Estudos epidemiológicos anteriores já demonstram a relação do DM e da obesidade com o risco aumentado de câncer primário de fígado ou CHC.

Chen e colaboradores em uma meta-análise publicada em 2012, avaliou a associação entre IMC e risco de câncer primário de fígado, e encontraram que sobrepeso (IMC > 25), obesidade (IMC >30) e excesso de peso, estavam associados com risco aumentado de câncer primário de fígado em 18%, 83% e 48%, respectivamente.⁸³ Com a mesma finalidade, Wang e colaboradores (2012) publicaram uma meta-análise, avaliando a associação do DM e CHC, demonstrando que indivíduos com DM apresentavam um risco 2 x maior de CHC, comparando com os não diabéticos.⁸⁴ Na nossa casuística, consistente com a literatura, 76% eram diabéticos e 90% apresentavam IMC acima de 25, demonstrando que a grande maioria dos nossos pacientes apresentavam risco aumentado de câncer de fígado.

Vários estudos anteriores também avaliaram as características clínicas deste grupo de pacientes. Em um estudo multicêntrico retrospectivo prévio, realizado por Yasui e colaboradores (2011) no Japão, avaliaram as características clínicas de 87 pacientes com CHC em EHNA, e a idade média encontrada foi de 71,2 anos, sendo que 62% eram do sexo masculino e 38% sexo feminino.⁸⁵ Na nossa casuística, a grande maioria eram homens (76%) com idade um pouco mais baixa que o estudo japonês (média de 64,9 anos).

O tempo médio de sobrevida em nossa casuística dos pacientes submetidos a ressecção como tratamento do CHC foi de 31,8 meses e nos pacientes submetidos ao transplante hepático foi 48,5 meses, sendo mais baixo comparado com estudos de CHCs de várias etiologias submetidos a tratamentos curativos (ressecção ou transplante), apesar do bom PS dos

pacientes.^{86,87} Neste caso, temos viés pois a grande maioria dos pacientes submetidos a ressecção não são cirróticos e temos uma pequena casuística nos dois grupos. Por outro lado, dos pacientes vivos (n=5) com tempo médio de seguimento de quase 5 anos, nenhum apresentou recidiva do CHC, o que vai de acordo com trabalhos recentes sobre a menor chance de recidiva do tumor após tratamento curativo neste grupo de pacientes.⁸⁸

A AFP é o principal marcador sorológico utilizado no processo de rastreio e diagnóstico do CHC, e até um valor de 20 ng/ mL, a sensibilidade é de apenas 60%, permitindo assim que passem despercebidos 40% dos casos de CHC.⁸⁹ A ineficiência da AFP como marcador sorológico, tem sido demonstrada em vários estudos até o momento, e condizente com a literatura, em nosso estudo, 62% tinham níveis de AFP dentro do limite da normalidade pelo laboratório do HC-FMUSP, demonstrando a necessidade da descoberta de outro marcador, visto que o diagnóstico do CHC se faz na maioria dos casos por métodos de imagem, até o momento, apenas realizando biópsia do nódulo em casos não conclusivos.⁹⁰

Embora a maioria dos casos de CHC em EHNA seja acompanhada de cirrose hepática de acordo com relatos prévios, recentes casos de CHC ocorrendo em não cirróticos, só vem aumentando. Num estudo realizado por Takuma e colaboradores (2010)⁹¹, foram avaliadas as características clínico-patológicas do CHC em EHNA com uma revisão de literatura, onde foram levantados 94 casos de CHC em EHNA, e 26% dos casos ocorreram em fígados não cirróticos, mostrando que nossos casos de CHC em EHNA em fígado não cirrótico, estão acima da média da literatura (26% revisão de

literatura x 42% da nossa casuística). Este resultado provavelmente porque selecionamos apenas pacientes que poderiam ser manejados cirurgicamente (ressecção ou transplante) então possivelmente superestimamos o número de pacientes com função hepática preservada. Por outro lado, o nosso serviço é centro de referência para pacientes com cirrose que tenham indicação de transplante, então o número de pacientes cirróticos também pode estar superestimado na nossa casuística.

Paradis e colaboradores (2009) analisaram as características histológicas do CHC e do fígado não tumoral, de pacientes com SM como único fator de risco para doença hepática (n=31) e compararam com indivíduos que desenvolveram CHC no curso de outras doenças hepáticas crônicas do fígado (n= 81) e outro grupo com doença criptogênica hepática (n= 16). Todos os pacientes foram submetidos à ressecção hepática como tratamento curativo. No grupo da SM, apenas 35% dos CHCs ocorreram em pacientes F3-F4, os restantes 65% ocorreram em pacientes com F0-2 de fibrose (fibrose foi estadiada por Kleiner e col 2005). Neste mesmo grupo de SM, a esteatose hepática no fígado não tumoral, estava presente em 81% (graus 1/ 2 e 3) dos pacientes, mais acentuada em 42% (graus 2/ 3), diferente do grupo da doença hepática crônica e doença hepática criptogênica onde a esteatose hepática estava presente em 42% e 6%, mais acentuada em 6% e 0%, respectivamente.⁹² Na nossa casuística, na avaliação histológica do fígado não tumoral dos 21 pacientes, 42% (9 pacientes) eram não cirróticos, mas com grau F2 (6 pacientes) ou F3 (3 pacientes) de estadiamento da fibrose. A esteatose, balonização e

corpúsculos de Mallory, no nosso estudo, estavam presentes em 77% (graus 1/ 2/ 3), 81% (1/2) e em 48% (1/ 2) dos pacientes, e mais acentuada, em 19% (graus 2/ 3), 14% (grau 2) e 10% (grau 2), respectivamente. Neste estudo não temos grupo comparativo, mas principalmente a esteatose e a balonização, estavam presentes na grande maioria destes pacientes.

Na nossa casuística, aplicamos o BCLC nos pacientes com cirrose, e dos 12 pacientes, 75% eram BCLC A, e 25% eram BCLC B ou C. Já nos pacientes sem cirrose, o BCLC não foi aplicado, mas estes pacientes apresentavam mais tumores multinodulares, contudo, não temos grupo comparativo para avaliação. Piscaglia e colaboradores (2016) realizaram um estudo observacional prospectivo e multicêntrico, comparando pacientes com CHC secundário a DHGNA (n=145) e CHC secundário a VHC (n=611), matriculados em centros de cuidados secundários italianos, entre 2010 e o final de 2012. Avaliaram as características clínicas e anatomopatológicas dos 2 grupos. CHCs pequenos (ou seja, CHC único ou 2 ou 3 nódulos de até 3cm) e BCLC 0 foram mais freqüentes em CHC relacionados ao VHC. Por outro lado, CHC BCLC C e CHC infiltrativo foi significativamente ($p < 0,0001$) mais comum em pacientes com DHGNA (CHC infiltrativo: 21% versus 4% em DHGNA e VHC, respectivamente). Neste estudo italiano, demonstraram que os pacientes com CHC-DHGNA apresentaram uma menor sobrevida quando comparados com os pacientes com CHC-VHC, principalmente porque a combinação anterior geralmente é detectada em um estadio posterior e com maior carga tumoral e não porque o CHC-DHGNA é mais agressivo, pois quando fatores de confusão foram eliminados, CHC-DHGNA

mostrou uma sobrevivida totalmente comparável à do CHC-VHC.⁹³ Na nossa casuística, do total de 21 pacientes apenas 42% estavam sob rastreamento (contra 48% do estudo italiano) e vemos que nos pacientes sem cirrose, apesar do BCLC não aplicado, estes apresentavam tumores mais multinodulares, corroborando para esta conclusão que estes tumores na etiologia DHGNA são diagnosticados em estádios mais tardios, principalmente pela falta de estratégias de vigilância, em pacientes com DHGNA, SM ou DMT2, principalmente nos pacientes sem cirrose.

Com relação aos graus histológicos de CHCs propostos por Edmondson e Steiner, subagrupamos em 2 grupos: bem diferenciados (ES 1 + 2) ou pouco diferenciados (ES 3 +4), totalizando 37% contra 63%, respectivamente, sugerindo que neste nosso grupo de pacientes de CHC em DHGNA na população brasileira, CHC pouco diferenciados são mais comuns. Em um estudo realizado por Hernandez-Alejandro e colaboradores em 2012, também comparando CHC –DHGNA (n=17) e CHC-VHC (n=64), submetidos ao transplante hepático, uma proporção significativamente maior de pacientes com CHC-VHC teve tumores mal diferenciados (4,7% vs 0%, $p<0,001$) em comparação com o CHC-DHGNA, o que também ocorreu com invasão vascular (23,4% contra 6,4%, $p= 0,002$).⁶⁰ Naquele estudo, entretanto, foram selecionados apenas pacientes elegíveis para transplante, portanto pacientes com estádios mais precoces e também 65% dos pacientes com CHC-DHGNA estavam sob rastreamento contra 42% da nossa casuística. Existem também outros estudos demonstrando CHCs em DHGNA serem mais bem ou moderadamente diferenciados³¹, mas em

nossa casuística, 63% eram pouco diferenciados, talvez por termos feito diagnóstico mais tardio pela falta do rastreamento.

Na avaliação da presença da variante esteato-hepatítico de CHC, dos nossos 35 nódulos, 25 (71%) apresentavam características histológicas de CHC esteato-hepatítico conforme Salomão e colaboradores em 2011, reforçando a associação da presença de fatores metabólicos (DM/ obesidade/ HAS e DLP) neste subtipo de CHC.⁶¹ Avaliamos os critérios para a presença da variante esteatohepatítico se estivessem presentes, focais ou extensivos, como fez Shibahara e colaboradores em 2014⁶³. Devido a pequena casuística não foi possível quantificar se os critérios estavam presentes acima de 50% de cada nódulo. Importante salientar que nos casos de Salomão *et al.* (2011), tanto pacientes com doença hepática gordurosa seja, não alcoólica ou alcoólica foram incluídos. Na nossa casuística, os pacientes apresentavam DHGNA ou fatores de risco para SM, mas nosso resultado foi acima da literatura⁶¹⁻⁶³, e como esta associação é relativamente nova, talvez possa estar subestimada em trabalhos anteriores.

A invasão vascular ocorreu em 21 (60%) nódulos de CHC (graus 1 + 2), proeminentemente em 16 nódulos (grau 2) (46%), demonstrando um prognóstico ruim neste nosso grupo de pacientes.

Iniciamos a avaliação imunohistoquímica dos marcadores de proliferação por paciente, avaliando a expressão de K19 e Ki67, acima de 5% e 10% das células neoplásicas, respectivamente. Na nossa casuística a expressão de K19 >5% ocorreu em 21% dos pacientes. De acordo com literatura publicada, CHC com K19+ contabilizam em média 20% de todos os

CHCs mas existem estudos de séries relatando expressão de marcadores de células progenitoras de até 29 a 50%.^{67,69} Chama a atenção que 20% dos pacientes com DM, HAS e obesidade apresentavam a expressão de K19+, possivelmente estes fatores metabólicos são importantes na perpetuação da inflamação do CHC secundário a DHGNA, mas provavelmente não são responsáveis pela iniciação tumoral em um subgrupo de pacientes que tenham tumores com fenótipo de célula progenitora. A ativação de células progenitoras foi recentemente demonstrada tanto em DHGNA da população adulta quanto na população pediátrica, aumentando a possibilidade de que essas células possam contribuir para a iniciação do CHC nesta etiologia.^{94,95,96}

A expressão da K19 por paciente associou-se com graus mais acentuados de inflamação intratumoral (graus 2 + 3), e a expressão por nódulo, que ocorreu em apenas 16% dos nódulos, associou se com graus mais acentuados de fibrose intratumoral e peritumoral (graus 3+4), sendo estes possivelmente marcadores histológicos de pior prognóstico, uma vez que existem inúmeros trabalhos demonstrando que CHCs K19+ são de pior prognóstico.^{97,98,99}

Quando analisamos o perfil de Ki67 por paciente, apenas 21% apresentaram expressão >10% das células neoplásicas, denotando um perfil de proliferação baixo nestes pacientes. Interessantemente, a expressão de Ki67 associou se com alterações estruturais mais leves, ou seja, foi mais acentuada em CHCs que ocorreram em pacientes não cirróticos, levantando

a suspeita que a hepatocarcinogênese no CHC secundário a DHGNA no paciente não cirrótico possa ser diferente do paciente com cirrose.⁴⁰

A expressão do Ki67 nos nódulos associou-se com balonização mais intensa (grau 2), e com grau nuclear e fibrose intratumoral, mais acentuados. (graus 3+4), e possivelmente estes achados histológicos também são representativos de pior prognóstico, uma vez que também existem vários trabalhos demonstrando que CHCs Ki67+ são de pior prognóstico.^{100,101}

Uma das limitações deste nosso estudo é a pequena casuística (n= 21), não termos grupo comparativo de outra etiologia e não termos feito a avaliação imunohistoquímica dos marcadores no parênquima não tumoral para comparação.

7. Conclusão

7. CONCLUSÃO

Deste nosso estudo podemos concluir:

1. CHC secundário a DHGNA pode surgir em pacientes sem cirrose, com nível normal de alfa-fetoproteína.
2. Em nossa casuística, 63% dos CHCs eram pouco diferenciados, talvez por termos feito diagnóstico mais tardio, uma vez que apenas 42% dos nossos pacientes estavam sob rastreamento.
3. A avaliação da presença do subtipo de CHC esteato-hepatítico, na nossa casuística foi acima da literatura (71%), talvez esta esteja subestimada em estudos anteriores dada a recente descoberta desta variante.
4. K19 e Ki-67 acima dos cut-offs correspondentes ocorreram em apenas 21% dos pacientes, e em 16% e 22% dos nódulos, respectivamente, podendo indicar um subtipo de CHC inflamatório, não proliferativo.
5. Vinte % dos pacientes com DM, HAS e obesidade apresentavam a expressão de K19+, possivelmente estes fatores metabólicos são importantes na perpetuação da inflamação do CHC secundário a DHGNA, mas podem não ser os responsáveis pela iniciação tumoral em um subgrupo de tumores com fenótipo de célula progenitora.

6. A expressão do Ki67 correlacionou-se com alterações estruturais mais leves, ou seja, foi positiva em CHCs que ocorreram em pacientes sem cirrose, levantando a suspeita de que haja diferenças na hepatocarcinogênese do CHC que ocorrem em pacientes sem cirrose neste grupo de pacientes.
7. Variáveis histológicas como balonização mais intensa, grau nuclear mais complexo, fibrose intratumoral mais acentuada e inflamação intratumoral mais elevada, que se correlacionaram com expressão elevada de K19 e /ou Ki67, podem ser utilizados como critérios histológicos de mau prognóstico neste grupo de pacientes.
8. Apesar do bom *Performance Status* dos pacientes, a sobrevida média foi baixa quando comparamos com pacientes com CHC submetidos a tratamentos curativos como a ressecção ou transplante hepático, provavelmente pelo diagnóstico mais tardio e presença de comorbidades.

8. Referências

8 REFERÊNCIAS

1. Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Estimating the world cancer burden: Globocan 2000. *Int J Cancer*. 2001;94(2):153-6.
2. Bosch FX, Ribes J, Díaz M, Cléries R. Primary liver cancer: worldwide incidence and trends. *Gastroenterology*. 2004;127(5 Suppl 1):S5-S16.
3. Llovet JM, Zucman-Rossi J, Pikarsky E, Sangro B, Schwartz M, Sherman M, Gores G. Hepatocellular carcinoma. *Nat Rev Dis Primers*. 2016; 2:16018.
4. Mittal S, El-Serag HB. Epidemiology of hepatocellular carcinoma: consider the population. *J Clin Gastroenterol*. 2013;47 Suppl:S2-6.
5. El-Serag HB, Rudolph KL. Hepatocellular carcinoma: epidemiology and molecular carcinogenesis. *Gastroenterology*. 2007;132(7):2557-76.
6. Lata J. Chronic liver diseases as liver tumor precursors. *Dig Dis*. 2010; 28(4-5):596-9.
7. Caldwell SH, Crespo DM, Kang HS, Al-Osaimi AM. Obesity and hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology*. 2004;127(5 Suppl 1):S97-103.
8. Bugianesi E. Non-alcoholic steatohepatitis and cancer. *Clin Liver Dis*. 2007; 11(1):191-207.
9. Degasperi E, Colombo M. Distinctive features of hepatocellular carcinoma in non-alcoholic fatty liver disease. *Lancet Gastroenterol Hepatol*. 2016;1(2):156-64.

10. Paranaguá-Vezozzo DC, Ono SK, Alvarado-Moura MV, Farias AQ, Cunha-Silva M, França JI, Alves AV, Sherman M, Carrilho FJ. Epidemiology of HCC in Brazil: incidence and risk factors in a ten-year cohort. *Ann Hepatol*. 2014;13(4):386-93.
11. Farrell GC, Larter CZ. Nonalcoholic fatty liver disease: from steatosis to cirrhosis. *Hepatology*. 2006;43(2 Suppl 1):S99-S112.
12. Hashimoto E, Tokushige K. Hepatocellular carcinoma in non-alcoholic steatohepatitis: Growing evidence of an epidemic?. *Hepatol Res*. 2012;42(1):1-14.
13. Benedict M, Zhang X. Non-alcoholic fatty liver disease: An expanded review. *World J Hepatol*. 2017;9(16):715-32.
14. Chalasani N, Younossi Z, Lavine JE, Diehl AM, Brunt EM, Cusi K, Charlton M, Sanyal AJ; American Gastroenterological Association; American Association for the Study of Liver Diseases; American College of Gastroenterology. The diagnosis and management of non-alcoholic fatty liver disease: practice guideline by the American Gastroenterological Association, American Association for the Study of Liver Diseases, and American College of Gastroenterology. *Gastroenterology*. 2012;142(7):1592-609.
15. Cotrim HP, Parise ER, Figueiredo-Mendes C, Galizzi-Filho J, Porta G, Oliveira CP. Nonalcoholic fatty liver disease Brazilian Society of Hepatology Consensus. *Arq Gastroenterol*. 2016;53(2):118-22.
16. Adams LA, Lindor KD. Nonalcoholic fatty liver disease. *Ann Epidemiol*. 2007;17:863-9.

17. Weinmann A, Alt Y, Koch S, Nelles C, Düber C, Lang H, Otto G, Zimmermann T, Marquardt JU, Galle PR, Wörns MA, Schattenberg JM. Treatment and survival of non-alcoholic steatohepatitis associated hepatocellular carcinoma. *BMC Cancer*. 2015;15:210.
18. Mohamad B, Shah V, Onyshchenko M, Elshamy M, Aucejo F, Lopez R, Hanouneh IA, Alhaddad R, Alkhouri N. Characterization of hepatocellular carcinoma (HCC) in non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) patients without cirrhosis. *Hepatol Int*. 2016;10(4):632-9.
19. Streba LA, Vere CC, Rogoveanu I, Streba CT. Nonalcoholic fatty liver disease, metabolic risk factors, and hepatocellular carcinoma: an open question. *World J Gastroenterol*. 2015;21(14):4103-10.
20. Clark JM. The epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease in adults. *J Clin Gastroenterol*. 2006;40 Suppl 1:S5-10.
21. European Association for the Study of the Liver (EASL); European Association for the Study of Diabetes (EASD); European Association for the Study of Obesity (EASO). EASL-EASD-EASO Clinical Practice Guidelines for the management of non-alcoholic fatty liver disease. *J Hepatol*. 2016; 64(6):1388-402.
22. Calle EE, Rodriguez C, Walker-Thurmond K, Thun MJ. Overweight, obesity, and mortality from cancer in a prospectively studied cohort of U.S. adults. *N Engl J Med*. 2003;348(17):1625-38.
23. Koh WP, Wang R, Jin A, Yu MC, Yuan JM. Diabetes mellitus and risk of hepatocellular carcinoma: findings from the Singapore Chinese Health Study. *Br J Cancer*. 2013;108 (5):1182-8.

24. Baffy G, Brunt EM, Caldwell SH. Hepatocellular carcinoma in non-alcoholic fatty liver disease: an emerging menace. *J Hepatol.* 2012; 56(6):1384-91.
25. Spengler EK, Loomba R. Recommendations for Diagnosis, Referral for Liver Biopsy, and Treatment of NAFLD and NASH. *Mayo Clin Proc.* 2015; 90(9):1233-46.
26. Takahashi Y, Fukusato T. Histopathology of nonalcoholic fatty liver disease/nonalcoholic steatohepatitis. *World J Gastroenterol.* 2014;20(42): 15539-48.
27. Brown TG, Kleiner E. Histopathology of nonalcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis. *Metabolism.* 2016;65(8):1080-6.
28. Kleiner DE, Hala R. Histology of NAFLD and NASH in adults and children. *Clin Liver Dis.* 2016;20(2):293-312.
29. Kleiner DE, Brunt EM, Van Natta M, Behling C, Contos MJ, Cummings OW, Ferrell LD, Liu YC, Torbenson MS, Unalp-Arida A, Yeh M, McCullough AJ, Sanyal AJ. Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology.* 2005;41(6):1313-21.
30. Powell EE, Cooksley WG, Hanson R, Searle J, Halliday JW, Powell LW. The natural history of nonalcoholic steatohepatitis: a follow-up study of forty-two patients for up to 21 years. *Hepatology.* 1990;11:74-80.
31. Duan XY, Qiao L, Fan JG. Clinical features of nonalcoholic fatty liver disease-associated hepatocellular carcinoma. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int.* 2012;11:18-27.

32. Khan FZ, Perumpail RB, Wong RJ, Ahmed A. Advances in hepatocellular carcinoma: Nonalcoholic steatohepatitis-related hepatocellular carcinoma. *World J Hepatol.* 2015;7(18):2155-61.
33. Ertle J, Dechêne A, Sowa JP, Penndorf V, Herzer K, Kaiser G, Schlaak JF, Gerken G, Syn WK, Canbay A. Non-alcoholic fatty liver disease progresses to hepatocellular carcinoma in the absence of apparent cirrhosis. *Int J Cancer.* 2011;128(10):2436-43.
34. Simonetti RG, Cammà C, Fiorello F, Politi F, D'Amico G, Pagliaro L. Hepatocellular carcinoma. A worldwide problem and the major risk factors. *Dig Dis Sci.* 1991;36(7):962-72.
35. Kawada N, Imanaka K, Kawaguchi T, Tamai C, Ishihara R, Matsunaga T, Gotoh K, Yamada T, Tomita Y. Hepatocellular carcinoma arising from non-cirrhotic nonalcoholic steatohepatitis. *J Gastroenterol.* 2009;44:1190-4.
36. Chagas AL, Kikuchi LO, Oliveira CP, Vezozzo DC, Mello ES, Oliveira AC, Cella LC, Herman P, Bachella T, Caldwell SH, Alves VA, Carrilho FJ. Does hepatocellular carcinoma in non-alcoholic steatohepatitis exist in cirrhotic and non-cirrhotic patients? *Braz J Med Biol Res.* 2009;42(10):958-62.
37. Kikuchi L, Oliveira CP, Alvares-da-Silva MR, Tani CM, Diniz MA, Stefano JT, Chagas AL, Alencar RSSM, Vezozzo DCP, Santos GR, Campos PB, Alves VA, Ratziu V, Carrilho. Hepatocellular carcinoma management in nonalcoholic fatty liver disease patients applicability of the BCLC staging system. *Am J Clin Oncol.* 2016;39(5):428-32.
38. Alexander J, Torbenson M, Wu TT, Yeh MM. Non-alcoholic fatty liver disease contributes to hepatocarcinogenesis in non-cirrhotic liver: a clinical and pathological study. *J Gastroenterol Hepatol.* 2013;28(5):848-54.

39. Mikuriya Y, Tashiro H, Kobayashi T, Kuroda S, Abe T, Hashimoto M, Ohdan H. Clinicopathological features of hepatocellular carcinoma in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Langenbecks Arch Surg*. 2015; 400(4):471-6.
40. Leung C, Yeoh SW, Patrick D, Ket S, Marion K, Gow P, Angus PW. Characteristics of hepatocellular carcinoma in cirrhotic and non-cirrhotic non-alcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol*. 2015;21(4):1189-96.
41. Mittal S, El-Serag HB, Sada YH, Kanwal F, Duan Z, Temple S, May SB, Kramer JR, Richardson PA, Davila JA. Hepatocellular carcinoma in the absence of cirrhosis in United States Veterans is associated with nonalcoholic fatty liver disease. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2016;14(1):124-31.e1.
42. Cotrim HP, Oliveira CP, Coelho SM, Alvares-da-Silva MR, Nabuco L, Parise ER, Ivantes C, Martinelli ALC, Galizzi-Filho J, Carrilho FJ. Nonalcoholic steatohepatitis and hepatocellular carcinoma: Brazilian survey. *Clinics (Sao Paulo)*. 2016;71(5):281-4.
43. Kikuchi L, Oliveira CP, Carrilho FJ. Nonalcoholic fatty liver disease and hepatocellular carcinoma. *Biomed Res Int*. 2014;2014:106247.
44. Day CP, James OF. Steatohepatitis: a tale of two "hits"? *Gastroenterology*. 1998;114(4):842-5.
45. Ascha MS, Hanouneh IA, Lopez R, Tamimi TA, Feldstein AF, Zein NN. The incidence and risk factors of hepatocellular carcinoma in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology*. 2010;51(6):1972-8.

46. Jimba S, Nakagami T, Takahashi M, Wakamatsu T, Hirota Y, Iwamoto Y, Wasada T. Prevalence of non-alcoholic fatty liver disease and its association with impaired glucose metabolism in Japanese adults. *Diabet Med.* 2005;22(9):1141-5.
47. Hashizume H, Sato K, Takagi H, Hirokawa T, Kojima A, Sohara N, Kakizaki S, Mochida Y, Shimura T, Sunose Y, Ohwada S, Mori M. Primary liver cancers with nonalcoholic steatohepatitis. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2007;19:827-34.
48. Starley BQ, Calcagno CJ, Harrison SA. Nonalcoholic fatty liver disease and hepatocellular carcinoma: a weight connection. *Hepatology.* 2010;51:1820-32.
49. Park EJ, Lee JH, Yu GY, He G, Ali SR, Holzer RG, Osterreicher CH, Takahashi H, Karin M. Dietary and genetic obesity promote liver inflammation and tumorigenesis by enhancing IL-6 and TNF expression. *Cell.* 2010;140(2):197-208.
50. Wong CR, Nguyen MH, Lim JK. Hepatocellular carcinoma in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol.* 2016; 22(37):8294-303.
51. Hu W, Feng Z, Eveleigh J, Iyer G, Pan J, Amin S, Chung FL, Tang MS. The major lipid peroxidation product, trans-4-hydroxy-2-nonenal, preferentially forms DNA adducts at codon 249 of human p53 gene, a unique mutational hotspot in hepatocellular carcinoma. *Carcinogenesis* 2002; 23:1781-9.
52. Xu Z, Chen L, Leung L, Yen TS, Lee C, Chan JY. Liver-specific inactivation of the Nrf1 gene in adult mouse leads to nonalcoholic steatohepatitis and hepatic neoplasia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102: 4120-5.

-
53. Machado MV, Diehl AM. Pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis. *Gastroenterology*. 2016;150:1769-77.
54. Ma C, Kesarwala AH, Eggert T, Medina-Echeverez J, Kleiner DE, Jin P, Stroncek DF, Terabe M, Kapoor V, ElGindi M, Han M, Thornton AM, Zhang H, Egger M, Luo J, Felsher DW, McVicar DW, Weber A, Heikenwalder M, Greten TF. NAFLD causes selective CD4(+) T lymphocyte loss and promotes hepatocarcinogenesis. *Nature* 2016;531:253-7.
55. Wolf MJ, Adili A, Piotrowitz K, Abdullah Z, Boege Y, Stemmer K, Ringelhan M, Simonavicius N, Egger M, Wohlleber D, Lorentzen A, Einer C, Schulz S, Clavel T, Protzer U, Thiele C, Zischka H, Moch H, Tschöp M, Tumanov AV, Haller D, Unger K, Karin M, Kopf M, Knolle P, Weber A, Heikenwalder M. Metabolic activation of intrahepatic CD8+ T cells and NKT cells causes nonalcoholic steatohepatitis and liver cancer via cross-talk with hepatocytes. *Cancer Cell*. 2014;26:549-64.
56. Romeo S, Kozlitina J, Xing C, Pertsemlidis A, Cox D, Pennacchio LA, Boerwinkle E, Cohen JC, Hobbs HH. Genetic variation in PNPLA3 confers susceptibility to nonalcoholic fatty liver disease. *Nat Genet*. 2008;40:1461-5.
57. Dongiovanni P, Romeo S, Valenti L. Hepatocellular carcinoma in nonalcoholic fatty liver: Role of environmental and genetic factors. *World J Gastroenterol*. 2014;20(36):12945-55.
58. Edmondson HA, Steiner PE. Primary carcinoma of the liver: a study of 100 cases among 48,900 necropsies. *Cancer*. 1954;7(3):462-503.
59. Kojiro M. Pathology of hepatocellular carcinoma. Malden: Blackwell Publishing Ltd; 2006.

60. Hernandez-Alejandro R, Croome KP, Drage M, Sela N, Parfitt J, Chandok N, Marotta P, Dale C, Wall W, Quan D. A comparison of survival and pathologic features of non-alcoholic steatohepatitis and hepatitis C virus patients with hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol*. 2012;18:4145-9.
61. Salomao M, Yu WM, Brown RS Jr, Emond JC, Lefkowitz JH. Steatohepatitic hepatocellular carcinoma (SH-HCC): a distinctive histological variant of HCC in hepatitis C virus-related cirrhosis with associated NAFLD/NASH. *J Surg Pathol*. 2010;34(11):1630-6.
62. Salomao M, Remotti H, Vaughan R, Siegel AB, Lefkowitz JH, Moreira RK. The steatohepatitic variant of hepatocellular carcinoma and its association with underlying steatohepatitis. *Hum Pathol*. 2012;43(5):737-46.
63. Shibahara J, Ando S, Sakamoto Y, Kokudo N, Fukayama M. Hepatocellular carcinoma with steatohepatitic features: a clinicopathological study of Japanese patients. *Histopathology*. 2014;64(7):951-62.
64. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011;144(5):646-74.
65. Schweizer J, Bowden PE, Coulombe PA, Langbein L, Lane EB, Magin TM, Maltais L, Omary MB, Parry DAD, Rogers MA, Wright MW. New consensus nomenclature for mammalian keratins. *J Cell Biol*. 2006;174(2):169-74.
66. Govaere O, Komuta M, Berkers J, Spee B, Janssen C, de Luca F, Katoonizadeh A, Wouters J, van Kempen LC, Durnez A, Verslype C, De Kock J, Rogiers V, van Grunsven LA, Topal B, Pirenne J, Vankelecom H, Nevens F, van den Oord J, Pinzani M, Roskams T. Keratin 19: a key role player in the invasion of human hepatocellular carcinomas. *Gut*. 2014;63(4):674-85.

67. Durnez A, Verslype C, Nevens F, Fevery J, Aerts R, Pirenne J, Lesaffre E, Libbrecht L, Desmet V, Roskams T. The clinicopathological and prognostic relevance of cytokeratin 7 and 19 expression in hepatocellular carcinoma. A possible progenitor cell origin. *Histopathology*. 2006;49(2):138-51.
68. Sia D, Villanueva A, Friedman SL, Llovet JM. Liver cancer cell of origin, molecular class, and effects on patient prognosis. *Gastroenterology*. 2017;152(4):745-61.
69. Feng J, Zhu R, Chang C, Yu L, Cao F, Zhu G, Chen F, Xia H, Lv F, Zhang S, Sun L. CK19 and Glypican 3 expression profiling in the prognostic indication for patients with HCC after surgical resection. *PLoS One*. 2016;11(3):e0151501.
70. Kim H, Choi GH, Na DC, Ahn EY, Kim GI, Lee JE, Cho JY, Yoo JE, Choi JS, Park YN. Human hepatocellular carcinomas with "Stemness"-related marker expression: keratin 19 expression and a poor prognosis. *Hepatology*. 2011;54(5):1707-17.
71. Stroescu C, Dragnea A, Ivanov B, Pechianu C, Herlea V, Sgarbura O, Popescu A, Popescu I. Expression of p53, Bcl-2, VEGF, Ki67 and PCNA and prognostic significance in hepatocellular carcinoma. *J Gastrointest Liver Dis*. 2008;17(4):411-7.
72. 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.
73. Zucman-Rossi J, Villanueva A, Nault JC, Llovet JM. Genetic landscape and biomarkers of hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology*. 2015;149(5):1226-39.e4

74. Villanueva A, Hoshida Y, Battiston C, Tovar V, Sia D, Alsinet C, Cornella H, Liberzon A, Kobayashi M, Kumada H, Thung SN, Bruix J, Newell P, April C, Fan JB, Roayaie S, Mazzaferro V, Schwartz ME, Llovet JM. Combining clinical, pathology, and gene expression data to predict recurrence of hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology*. 2011;140(5):1501-12.e2.
75. Nault JC, De Reyniès A, Villanueva A, Calderaro J, Rebouissou S, Couchy G, Decaens T, Franco D, Imbeaud S, Rousseau F, Azoulay D, Saric J, Blanc JF, Balabaud C, Bioulac-Sage P, Laurent A, Laurent-Puig P, Llovet JM, Zucman-Rossi J. A hepatocellular carcinoma 5-gene score associated with survival of patients after liver resection. *Gastroenterology*. 2013;145(1):176-87.
76. European Association For The Study Of The Liver; European Organisation For Research And Treatment Of Cancer. EASL-EORTC clinical practice guidelines: management of hepatocellular carcinoma. *J Hepatol*. 2012;56(4):908-43.
77. Bruix J, Reig M, Sherman M. Evidence-Based Diagnosis, Staging, and Treatment of Patients With Hepatocellular Carcinoma. *Gastroenterology*. 2016;150(4):835-53.
78. Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults. Executive Summary of The Third Report of The National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, And Treatment of High Blood Cholesterol In Adults (Adult Treatment Panel III). *JAMA*. 2001;285(19):2486-97.
79. Wanless IR, Sweeney G, Dhillon AP, Guido M, Piga A, Galanello R, Gamberini MR, Schwartz E, Cohen AR. Lack of progressive hepatic fibrosis during long-term therapy with deferiprone in subjects with transfusion-dependent beta-thalassemia. *Blood* 2002;100:1566-9.

80. Kononen J, Bubendorf L, Kallioniemi A, Bärklund M, Schraml P, Leighton S, Torhorst J, Mihatsch MJ, Sauter G, Kallioniemi OP. Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. *Nat Med*. 1998;4(7):844-7.
81. Kim SU, Oh HJ, Wanless IR, Lee S, Han KH, Park YN. The Laennec staging system for histological sub-classification of cirrhosis is useful for stratification of prognosis in patients with liver cirrhosis. *J Hepatol*. 2012;57(3):556-63.
82. Wong RJ, Cheung R, Ahmed A. Nonalcoholic steatohepatitis is the most rapidly growing indication for liver transplantation in patients with hepatocellular carcinoma in the U.S. *Hepatology*. 2014;59(6):2188-95.
83. Chen Y, Wang X, Wang J, Yan Z, Luo J. Excess body weight and the risk of primary liver cancer: an updated meta-analysis of prospective studies. *Eur J Cancer*. 2012;48(14):2137-45.
84. Wang C, Wang X, Gong G, Ben Q, Qiu W, Chen Y, Li G, Wang L. Increased risk of hepatocellular carcinoma in patients with diabetes mellitus: a systematic review and meta-analysis of cohort studies. *Int J Cancer*. 2012;130(7):1639-48.
85. Yasui K, Hashimoto E, Komorizono Y, Koike K, Arai S, Imai Y, Shima T, Kanbara Y, Saibara T, Mori T, Kawata S, Uto H, Takami S, Sumida Y, Takamura T, Kawanaka M, Okanoue T; Japan NASH Study Group, Ministry of Health, Labour, and Welfare of Japan. Characteristics of patients with nonalcoholic steatohepatitis who develop hepatocellular carcinoma. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2011;9(5):428-33.

86. Almeida-Carvalho SR, Gomes-Ferraz ML, Loureiro-Matos CA, Benedito-Silva AT, Carvalho-Filho RJ, Renato-Perez R, Miziara-Gonzalez A, Salzedas-Netto AA, Szejnfeld D, D'Ippolito G, Pereira-Lanzoni V, Souza-Silva I. Practical considerations of real life of hepatocellular carcinoma in a tertiary center of Brazil. *Ann Hepatol.* 2017;16(2):255-62.
87. Sá GP, Vicentine FP, Salzedas-Netto AA, Matos CA, Romero LR, Tejada DF, Massarollo PC, Lopes-Filho GJ, Gonzalez AM. Liver transplantation for carcinoma hepatocellular in São Paulo: 414 cases by the Milan/Brazil Criteria. *Arq Bras Cir Dig.* 2016;29(4):240-5.
88. Lewin SM, Mehta N, Kelley RK, Roberts JP, Yao FY, Brandman D. Liver transplantation recipients with nonalcoholic steatohepatitis have lower risk hepatocellular carcinoma. *Liver Transpl.* 2017 Aug;23(8):1015-1022.
89. ForȚofoiu M, ForȚofoiu MC, Comănescu V, Dobrinescu AC, Pădureanu V, Vere CC, Streba CT, Ciurea PL. Hepatocellular carcinoma and metabolic diseases - histological perspectives from a series of 14 cases. *Rom J Morphol Embryol.* 2015;56(4):1461-5.
90. Marrero JA, Feng Z, Wang Y, Nguyen MH, Befeler AS, Roberts LR, Reddy KR, Harnois D, Llovet JM, Normolle D, Dalhgren J, Chia D, Lok AS, Wagner PD, Srivastava S, Schwartz M. Alpha-fetoprotein, des-gamma carboxyprothrombin, and lectin-bound alpha-fetoprotein in early hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology.* 2009;137(1):110-8.
91. Takuma Y, Nouse K. Nonalcoholic steatohepatitis-associated hepatocellular carcinoma: our case series and literature review. *World J Gastroenterol.* 2010;16(12):1436-41.

-
92. Paradis V, Zalinski S, Chelbi E, Guedj N, Degos F, Vilgrain V, Bedossa P, Belghiti J. Hepatocellular carcinomas in patients with metabolic syndrome often develop without significant liver fibrosis: a pathological analysis. *Hepatology*. 2009;49(3):851-9.
93. Piscaglia F, Svegliati-Baroni G, Barchetti A, Pecorelli A, Marinelli S, Tiribelli C, Bellentani S; HCC-NAFLD Italian Study Group. Clinical patterns of hepatocellular carcinoma in nonalcoholic fatty liver disease: A multicenter prospective study. *Hepatology*. 2016;63(3):827-38.
94. Lade A, Noon LA, Friedman SL. Contributions of metabolic dysregulation and inflammation to nonalcoholic steatohepatitis, hepatic fibrosis, and cancer. *Curr Opin Oncol*. 2014;26(1):100-7.
95. Guy CD, Suzuki A, Zdanowicz M, Abdelmalek MF, Burchette J, Unalp A, Diehl AM, NASH CRN. Hedgehog pathway activation parallels histologic severity of injury and fibrosis in human nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*. 2012;55:1711-21.
96. Nobili V, Carpino G, Alisi A, Franchitto A, Alpini G, De Vito R, Onori P, Alvaro D, Gaudio E. Hepatic progenitor cells activation, fibrosis and adipokines production in pediatric nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*. 2012;56:2142-53.
97. Yang XR, Xu Y, Shi GM, Fan J, Zhou J, Ji Y, Sun HC, Qiu SJ, Yu B, Gao Q, He YZ, Qin WZ, Chen RX, Yang GH, Wu B, Lu Q, Wu ZQ, Tang ZY. Cytokeratin 10 and cytokeratin 19: predictive markers for poor prognosis in hepatocellular carcinoma patients after curative resection. *Clin Cancer Res*. 2008;14(12):3850-9.
98. Lee JI, Lee JW, Kim JM, Kim JK, Chung HJ, Kim YS. Prognosis of hepatocellular carcinoma expressing cytokeratin 19: comparison with other liver cancers. *World J Gastroenterol*. 2012;18(34):4751-7.

99. Uenishi T, Kubo S, Yamamoto T, Shuto T, Ogawa M, Tanaka H, Tanaka S, Kaneda K, Hirohashi K. Cytokeratin 19 expression in hepatocellular carcinoma predicts early postoperative recurrence. *Cancer Sci.* 2003;94(10):851-7.
100. Bai K, Cao Y, Huang Q, Jiang Y, Lv L. Prognostic value of Ki67 expression for patients with surgically resected hepatocellular carcinoma: perspectives from a high incidence area. *Clin Lab.* 2017;63(2):355-64.
101. Cao Y, Ke R, Wang S, Zhu X, Chen J, Huang C, Jiang Y, Lv L. DNA topoisomerase II α and Ki67 are prognostic factors in patients with hepatocellular carcinoma. *Oncol Lett.* 2017;13(6):4109-16.