

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

MARIA LUIZA PELOSO MAIA

EXPRESSÃO NUCLEAR DE IGF-1R (INSULIN-LIKE GROWTH FACTOR-1 RECEPTOR) E
SUA ASSOCIAÇÃO COM PARÂMETROS CLÍNICO-PATOLÓGICOS E DESFECHOS
CLÍNICOS EM PORTADORES DE CARCINOMA HEPATOCELULAR.

Belo Horizonte

2022

MARIA LUIZA PELOSO MAIA

EXPRESSÃO NUCLEAR DE IGF-1R (INSULIN-LIKE GROWTH FACTOR-1 RECEPTOR) E
SUA ASSOCIAÇÃO COM PARÂMETROS CLÍNICO-PATOLÓGICOS E DESFECHOS
CLÍNICOS EM PORTADORES DE CARCINOMA HEPATOCELULAR.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação
em Patologia da Faculdade de Medicina da
Universidade Federal de Minas Gerais como requisito
parcial para obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Paula Vieira Teixeira Vidigal

Co-orientador: Dr. Paulo Henrique Costa Diniz

Belo Horizonte

2022

M217e Maia, Maria Luiza Peloso.
Expressão Nuclear de IGF-1R (Insulin-like Growth Factor-1 Receptor) e sua associação com parâmetros clínicos-patológicos e desfechos clínicos em portadores de Carcinoma Hepatocelular [recursos eletrônicos]. / Maria Luiza Peloso Maia. - - Belo Horizonte: 2022.
88f.: il.
Formato: PDF.
Requisitos do Sistema: Adobe Digital Editions.

Orientador (a): Paula Vieira Teixeira Vidigal.
Coorientador (a): Paulo Henrique Costa Diniz.
Área de concentração: Patologia.
Dissertação (mestrado): Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina.

1. Receptor IGF Tipo 1. 2. Carcinoma Hepatocelular. 3. Cirrose Hepática. 4. Dissertação Acadêmica. I. Vidigal, Paula Vieira Teixeira. II. Diniz, Paulo Henrique Costa. III. Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina. IV. Título.

NLM: QU 107

Bibliotecário responsável: Fabian Rodrigo dos Santos CRB-6/2697



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
 INSTITUIÇÃO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
 CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA DA UFMG

ATA DA DEFESA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO N° 453 DE MARIA LUIZA PELOSO MAIA

Realizou-se, no dia 26 de agosto de 2022, às 9 horas, on-line, a defesa de Dissertação, intitulada **“EXPRESSION NUCLEAR DE IGF-1R (INSULIN-LIKE GROWTH FACTOR-1 RECEPTOR) E SUA ASSOCIAÇÃO COM PARÂMETROS CLÍNICO-PATOLÓGICOS E DESFECHOS CLÍNICOS EM PORTADORES DE CARCINOMA HEPATOCELULA”**, apresentada por **Maria Luiza Peloso Maia**, número de registro 2020673945, graduada no curso de Medicina, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em PATOLOGIA, à seguinte Comissão Examinadora: **Profª. Dra. Mônica Maria Demas Alvares Cabral, Faculdade de Medicina/UFMG; Prof. Dr. Geraldo Felício da Cunha Júnior, Hospital Fundação Benjamin Guimarães; Prof. Dr. Paulo Henrique Costa Diniz, Faculdade Medicina/UFMG – COORIENTADOR e Profa. Dra. Paula Vieira Teixeira Vidigal, Faculdade de Medicina/UFMG – ORIENTADORA.**

A Comissão considerou a Dissertação:

() Aprovada

Finalizados os trabalhos, lavrei a presente ata que, lida e aprovada, vai assinada por mim e pelos membros da Comissão.

Profª. Dra. Mônica Maria Demas Alvares Cabral - Faculdade de Medicina/UFMG

Prof. Dr. Geraldo Felício da Cunha Júnior - Hospital Fundação Benjamin Guimarães

Prof. Dr. Paulo Henrique Costa Diniz - Faculdade Medicina/UFMG – COORIENTADOR

Profa. Dra. Paula Vieira Teixeira Vidigal - Faculdade de Medicina/UFMG – ORIENTADOR

Belo Horizonte, 26 de agosto de 2022.

*** De acordo com as Normas Gerais de Pós-Graduação da UFMG o grau de Mestre só será concedido ao aluno que entregar ao Colegiado do Curso, no prazo máximo de 60 dias, a versão final da Dissertação, em conformidade com as indicações da Comissão Examinadora. Após a entrega da versão final com a documentação exigida para emissão de Diploma, a secretaria emitirá Certificado de Conclusão do Mestrado.**



Documento assinado eletronicamente por **Paulo Henrique Costa Diniz, Membro**, em 11/10/2022, às 17:56, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Geraldo Felício da Cunha Júnior, Usuário Externo**, em 16/10/2022, às 19:51, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Paula Vieira Teixeira Vidigal, Coordenador(a)**, em 17/10/2022, às 08:17, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).

Documento assinado eletronicamente por **Monica Maria Demas Alvares Cabral, Membro de comissão**, em 17/10/2022, às 14:54, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1827089** e o código CRC **F11F7B99**.

Referência: Processo nº 23072.250860/2022-68

SEI nº 1827089

AGRADECIMENTOS

Durante a minha vida, acredito que Deus vem me agraciando com a presença de pessoas muito especiais, que são imprescindíveis para a caminhada em busca de cada sonho.

Agradeço à minha orientadora Paula Vidigal e ao meu co-orientador Paulo Diniz, por me inspirarem como docentes e pesquisadores e por me guiarem na elaboração e conclusão deste trabalho.

Ao Roniel, agradeço pela disponibilidade e pela coleta dos dados clínicos dos pacientes.

À Serena Silva e a Fernanda Cesare, agradeço pela ajuda com as reações imuno-histoquímicas.

A todos os professores e funcionários do Departamento de Anatomia Patológica e da Unidade de Anatomia Patológica e Necrópsia do HC-UFMG, agradeço pela convivência e aprendizado.

Aos preceptores, colegas de residência e de trabalho, agradeço pela parceria e pelos ensinamentos.

À Camila Brito, agradeço pelo companheirismo e por tornar os momentos vivenciados durante a Pós-graduação e Residência Médica mais doces e mais leves.

À Tatiane, Viviane e Giovana, agradeço pelo apoio e pela amizade que apesar da distância ainda continuam os mesmos.

Ao Glauco, agradeço pelo companheirismo, por dividir comigo as angústias, tornando o caminho mais leve e mais alegre, por sempre acreditar em mim, por me apoiar na busca pelos meus sonhos e nas minhas decisões.

À toda minha família, em especial aos meus pais e irmãos, agradeço por todos os ensinamentos, por todo amor incondicional e apoio, por serem meu maior exemplo e minha base forte diante das adversidades.

A todos os professores que foram mais que educadores, foram inspiração.

RESUMO

Introdução: o carcinoma hepatocelular (CHC), tumor primário mais comum do fígado, representa a sexta neoplasia maligna mais diagnosticada e a terceira maior causa de morte por câncer no mundo. Apesar dos avanços terapêuticos, o prognóstico ainda permanece sombrio, o que reflete a necessidade de se entender melhor os complexos mecanismos envolvidos na carcinogênese dessa neoplasia. O IGF-1R (Insulin-like Growth Factor-1 Receptor) é um receptor transmembrana com domínios de tirosina-quinase, que atua, em conjunto com seus ligantes, no crescimento fisiológico, bem como em processos patológicos. Na hepatocarcinogênese, a ativação do IGF-1R pode deflagrar cascatas de sinalização intracelular, que levam a eventos necessários para a iniciação, promoção e desenvolvimento do câncer. Evidências atuais apontam outra característica do IGF-1R, que o destaca em relação a outros receptores: sua capacidade de se translocar para o núcleo, o que poderia permitir a modulação de eventos de crescimento em um nível de controle genômico, contribuindo assim para transformação neoplásica. O esclarecimento acerca do papel do IGF-1R no CHC poderá contribuir para melhor entendimento dessa doença tão complexa. **Objetivo:** esse estudo visa avaliar a expressão nuclear de IGF-1R em amostras de carcinoma hepatocelular submetidos a transplante hepático ou ressecção hepática parcial, e investigar sua associação com parâmetros clinicopatológicos e com desfechos clínicos. **Metodologia:** foi realizada avaliação imunohistoquímica da expressão nuclear de IGF-1R em amostras provenientes de explantes hepáticos ou ressecções cirúrgicas parciais, entre os anos de 2000 à 2020, para o tratamento de CHC no Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais (HC- UFMG). Os prontuários médicos dos pacientes foram revisados para coletar dados clínicos e as lâminas das amostras foram revisadas para coletar dados anatomopatológicos. **Resultados:** dos pacientes incluídos no estudo (n=111), as principais etiologias da hepatopatia crônica de base foram o vírus da hepatite C (44,1%), vírus da hepatite B (16,2%), etanólica (16,2%) e criptogênica (17,1%). Foi demonstrada expressão de IGF-1R no núcleo de células tumorais no CHC e no parênquima cirrótico adjacente. Na análise univariada, foi observada uma maior expressão nuclear de IGF-1R no CHC do que na cirrose ($p < 0,001$) e em tumores moderadamente/pouco diferenciados ($p < 0,001$). Também foi demonstrada uma maior expressão nuclear, na cirrose, em casos de hepatite B ($p = 0,002$). No modelo multivariado, foi observada maior expressão nuclear de IGF-1R no tumor do que na cirrose ($p < 0,001$) e maior expressão nuclear em tumores classificados como moderadamente/pouco diferenciados ($p < 0,001$). Entretanto, não foi observada associação estatisticamente significativa entre a imunoexpressão e os casos de cirrose causados pelo HBV ($p=0,999$). Não foi observada associação entre os desfechos clínicos e as demais variáveis com a expressão nuclear de IGF-1R no tumor ou na área de cirrose ($p > 0,05$). **Discussão:** os dados mostram maior expressão nuclear de IGF-1R no HCC do que no parênquima cirrótico adjacente, sugerindo que a sua translocação possa ser um dos eventos iniciais na hepatocarcinogênese. Apesar da ausência de associação com desfechos clínicos a longo prazo, a expressão do receptor se associa independentemente com o grau de diferenciação, que é um parâmetro histopatológico de mau prognóstico. Entretanto, mais estudos são necessários, inclusive para avaliação da associação com diferentes etiologias, tendo em vista a heterogeneidade da doença.

Palavras-chave: *IGF-1R, carcinoma hepatocelular, translocação nuclear; cirrose hepática.*

ABSTRACT

Introduction: hepatocellular carcinoma (HCC), the most common primary tumor of the liver, ranks as the sixth most commonly diagnosed malignancy and the third leading cause of cancer deaths in the world. Despite the therapeutic advances, the prognosis remains poor, which reflects the need to better understand the complex mechanisms involved in the carcinogenesis of this neoplasm. IGF-1R (Insulin-like Growth Factor-1 Receptor) is a transmembrane receptor with tyrosine kinase domains, which acts, together with its ligands, in physiological growth as well as in pathological processes. In hepatocarcinogenesis, IGF-1R activation can trigger intracellular signaling cascades, which lead to events necessary for the initiation, promotion and development of cancer. Current evidence points to another characteristic of IGF-1R, which stands it out among other receptors: its ability to translocate to the nucleus, which could allow the modulation of growth events at a level of genomic control, contributing to neoplastic transformation. Clarifying the role of IGF-1R in HCC may contribute to a better understanding of this complex disease. **Objective:** this study aims to evaluate the nuclear expression of IGF-1R in samples of hepatocellular carcinoma submitted to liver transplantation or partial liver resection, and to investigate its association with clinicopathological parameters and clinical outcomes. **Methodology:** an immunohistochemical evaluation of the nuclear expression of IGF-1R was performed in samples from liver explants or partial surgical resections, between the years 2000 to 2020, for the treatment of HCC at the Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais (HC-UFGM). Medical records were reviewed to collect clinical data and specimen slides were reviewed to collect pathological data. **Results:** of the patients included in the study (n=111), the main etiologies of the chronic liver disease were hepatitis C virus (44.1%), hepatitis B virus (16.2%), ethanolic (16.2%) and cryptogenic (17.1%). IGF-1R expression was demonstrated in the nucleus of tumor cells and in the adjacent cirrhotic parenchyma. In univariate analysis, a higher nuclear expression of IGF-1R was observed in HCC than in cirrhosis ($p < 0.001$). and in moderately/poorly differentiated tumors ($p < 0.001$), a higher nuclear expression was also demonstrated, in cirrhosis, in cases of hepatitis B ($p = 0.002$). In the multivariate model, higher nuclear expression of IGF-1R was observed in the tumor than in cirrhosis ($p < 0.001$) and higher nuclear expression in tumors classified as moderately/poorly differentiated ($p < 0.001$). However, no statistically significant association was observed between the presence of immunoexpression and cases of cirrhosis caused by HBV ($p = 0.999$). No association was observed between clinical outcomes and other variables with the nuclear expression of IGF-1R in the tumor or in the area of cirrhosis ($p > 0.05$). Discussion: data show greater nuclear expression of IGF-1R in HCC than in adjacent cirrhotic parenchyma, suggesting that its translocation may be one of the initial events in hepatocarcinogenesis. Despite the lack of association with long-term clinical outcomes, receptor expression is independently associated with the degree of differentiation, which is a histopathological parameter of poor prognosis. However, further studies are needed to further assess the association with different etiologies, given the heterogeneity of the disease.

Keywords: IGF-1R, hepatocellular carcinoma, nuclear translocation; liver cirrhosis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Incidência de carcinomas hepáticos no ano de 2020.

Figura 2 - Indicadores de incidência e mortalidade de câncer hepático no ano de 2020.

Figura 3 - Carcinoma hepatocelular bem diferenciado, com características que se assemelham ao parênquima hepático normal.

Figura 4 - Carcinoma hepatocelular moderadamente diferenciado, exibindo atipias mais pronunciadas e ocasionais células multinucleadas.

Figura 5 - Carcinoma hepatocelular pouco diferenciado, apresentando pleomorfismo nuclear acentuado e citoplasma basofílico e escasso.

Figura 6 – Algoritmo de tratamento do CHC segundo o *Barcelona Clinic Liver Cancer*.

Figura 7 - Marcação nuclear de IGF-1R presente no CHC e ausente no parênquima cirrótico adjacente.

Figura 8 - Marcação nuclear de IGF-1R presente no CHC.

Figura 9 - Marcação nuclear de IGF-1R presente no parênquima cirrótico.

Figura 10 - Marcação nuclear de IGF-1R ausente no CHC e ausente no parênquima cirrótico adjacente.

Figura 11 - Comparação das curvas de Kaplan-Meier entre pacientes com e sem expressão nuclear de IGF-1R na região do CHC.

Figura 12 - Comparação das curvas de Kaplan-Meier entre pacientes com e sem expressão nuclear de IGF-1R na região da cirrose.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Anticorpo utilizado na técnica de imuno-histoquímica.

Tabela 2 – Distribuição dos dados clínicos e demográficos dos pacientes submetidos ao transplante hepático e ressecção hepática parcial no HC-UFMG no período entre 2000 e 2020.

Tabela 3 – Dados anatomopatológicos de 111 casos de CHC provenientes de pacientes submetidos ao transplante hepático e ressecção hepática parcial no HC-UFMG no período entre 2000 e 2020.

Tabela 4 – Análise das características clínicas e anatomopatológicas entre os grupos com e sem a presença de expressão nuclear de IGF-1R no CHC.

Tabela 5 – Análise das características clínicas e anatomopatológicas entre os grupos com e sem a presença de expressão nuclear de IGF-1R no parênquima cirrótico.

Tabela 6 – Desfechos clínicos de acordo com a expressão nuclear de IGF-1R no CHC.

Tabela 7 – Desfechos clínicos de acordo com a expressão de IGF-1R no parênquima cirrótico.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AFP - Alfa-fetoproteína

AJCC - American Joint Comitee on Cancer

AKT1 - Aktmurine thymoma viral oncogene homolog

1ALBI - Albumina-bilirrubina

ARF - Ablação por radiofrequência

BCLC - Barcelona Clinic Liver Cancer

BSC – Melhor cuidado de suporte

BT- Bilirrubina total

CHC - Carcinoma hepatocelular

COEP – Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG

DAB - 3,3- diaminobenzidina

ECOG-PS - Status de desempenho do Eastern Cooperative Oncology Group

EGFR - Receptor do fator de crescimento epidérmico

FA - Fosfatase alcalina

GGT - Gama glutamil transferase

GH - Hormônio do crescimento

HBV - Vírus da hepatite B

HBx - Proteína X transativadora

HC-UFMG - Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais

HCV - Vírus da hepatite C

HE - Hematoxilina-eosina

HRP - Horseradish peroxidase

IGF - Fator de crescimento semelhante à insulina

IGF-1R - Receptor do fator de crescimento semelhante à insulina 1

IR - Receptor de insulina

IRS - Insulin-receptor substrate

IVKA II – Prothrombin induced by vitamin K absence II

LDH – Lactato desidrogenase

LEF1 - Fator 1 de Ligação ao Facilitador Linfoide

LT - Transplante de fígado

M6P/IGF-2R - Receptor manose -6 - fosfato/ fator de crescimento semelhante à insulina 2

MELD - Model for end-stage liver disease

MTOR - Mechanistic target of rapamycin (serine/threonine kinase)

NAFLD - Doença hepática gordurosa não alcoólica

OMS - Organização Mundial da Saúde

PI3K - Fosfatidilinositol 3-quinase

QEAH – Quimioembolização arterial hepática

RNI – International Normalized Ratio

RPS6KB1 – Ribosomal protein S6 kinase 70 KD polypeptide 1

SLE - Sobrevida livre de evento

TACE – Quimioembolização transarterial

TERT - Telomerase reverse transcriptase

TGO - Transaminase oxalacética

TGP - Transaminase pirúvica

UFMG – Universidade Federal de Minas Gerais

SUMÁRIO

1–INTRODUÇÃO	14
1.1– Carcinoma Hepatocelular.....	14
1.2– Aspectos epidemiológicos.....	14
1.3– Características morfológicas e fatores prognósticos relacionados ao CHC.....	16
1.4– Tratamento	20
1.5- Hepatocarcinogênese	21
1.6– O sistema do fator de crescimento semelhante à insulina.....	23
1.7– O IGF-1R	25
1.8– O receptor IGF-1R e o carcinoma hepatocelular	25
1.9– A translocação nuclear do IGF-1R.....	26
2 –JUSTIFICATIVAS	29
3 – OBJETIVOS	30
3.1- Objetivo geral	30
3.2- Objetivos específicos	30
4 – MATERIAIS E MÉTODOS	31
4.1- Considerações éticas	31
4.2– Delineamento e estratégias de estudo	31
4.3- Critérios de exclusão.....	31
4.4– Dados demográficos, clínico-laboratoriais e anatomopatológicos analisados	31
4.5– Técnica de imuno-histoquímica	32
4.6– Análise imuno-histoquímica	33
4.7- Análises estatísticas	33
5 – RESULTADOS.....	35
5.1– Dados demográficos, clínicos e laboratoriais	35
5.2– Dados anatomopatológicos	37
5.3– Análise da expressão nuclear imuno-histoquímica de IGF-1R e dados clínico-laboratoriais e anatomopatológicos.....	37
5.4– Análises de sobrevida.....	43
6 – DISCUSSÃO	46
7 – CONCLUSÃO	54
8– PERSPECTIVAS	55
9 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	56
10– ANEXOS	65
Anexo 1- Carta de aprovação do COEP UFMG.....	65
Anexo 2- Artigo referente ao projeto de pesquisa e seus resultados.....	69

1–INTRODUÇÃO

1.1– Carcinoma Hepatocelular

Carcinoma hepatocelular (CHC), neoplasia maligna primária do fígado, é composto por células epiteliais cuja diferenciação se origina no hepatócito. As infecções pelos vírus da hepatite B (HBV) e C (HCV), causadoras de doença hepática crônica, são as etiologias principais, responsáveis por cerca de 85% dos casos, seguidas pelos danos hepáticos causados pelo álcool e por quadros de doença hepática gordurosa não alcoólica (NAFLD). Entretanto, independentemente da etiologia da hepatopatia crônica, a cirrose é o principal fator de risco para esta neoplasia, cenário no qual o estímulo carcinogênico se dá devido ao estresse oxidativo desencadeado pelos processos de agressão e tentativas de reparo celular (PARADIS; FUKAYAMA; SCHIRMACHE, 2019).

1.2– Aspectos epidemiológicos

O CHC é a neoplasia maligna primária mais comum no fígado. Com o avançar da idade, há aumento de sua incidência e mortalidade. É também, mais comum em pacientes do sexo masculino, em uma proporção de 3:1 (SIEGEL et al., 2022).

No ano de 2020, segundo estimativas da Organização Mundial da Saúde (OMS), o câncer primário do fígado, do qual o CHC é responsável por 75-85% dos casos, é o sexto mais comum, sendo responsável por 4,7% dos novos casos de câncer no mundo. Além disso, configura-se como a terceira principal causa de morte relacionada ao câncer em todo o mundo, correspondendo a 8,3% das mortes por câncer, superando o câncer gástrico (PARADIS; FUKAYAMA; SCHIRMACHE, 2019).

A incidência do CHC tem uma grande variação geográfica, sendo que três quartos dos novos casos ocorrem em países de baixa e média renda, com as maiores taxas de incidência observadas na África, China e sudeste da Ásia. Essa variação geográfica está associada às diferentes etiologias da doença hepática crônica, que leva ao CHC, mais comuns cada população (PARADIS; FUKAYAMA; SCHIRMACHE, 2019) (Figuras 1 e 2).

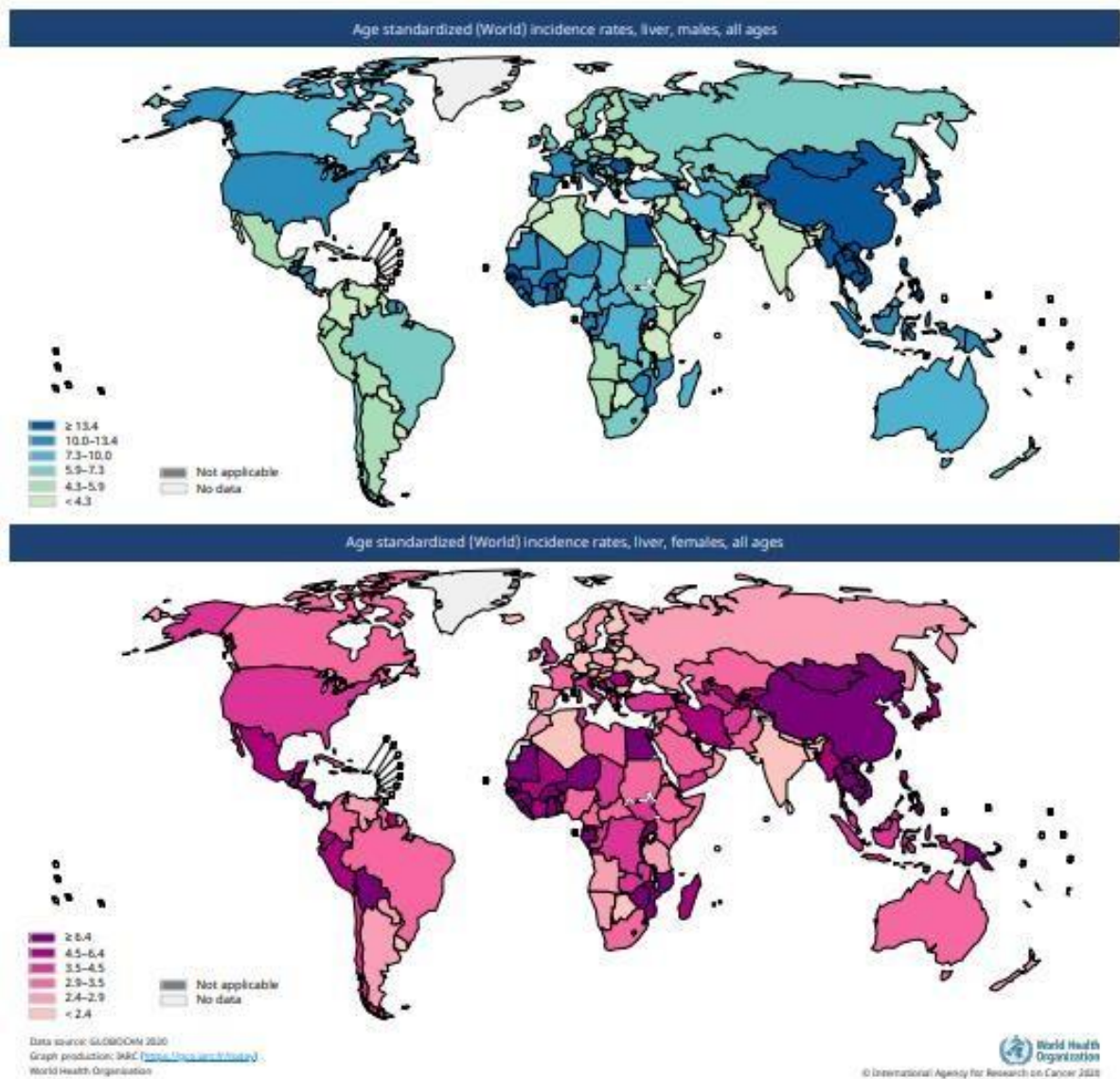


Figura 1 - Incidência de carcinomas hepáticos no ano de 2020. Acima: sexo masculino, abaixo: sexo feminino. Fonte: <https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/cancers/11- Liver-fact-sheet.pdf>. Acesso em 25/07/2022.

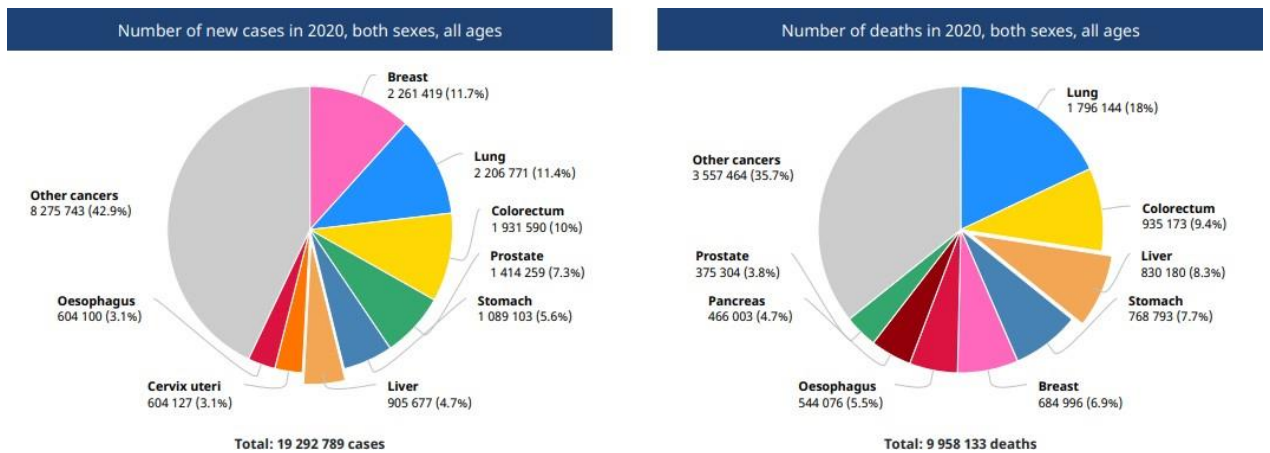


Figura 2 - Indicadores de incidência (à esquerda) e mortalidade (à direita) de câncer hepático no ano de 2020. A doença apresenta a sexta maior incidência entre todas as neoplasias e é a quarta maior causa de óbito. Fonte: <https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/cancers/11-Liver-fact-sheet.pdf>. Acesso em 25/07/2022.

No Brasil, segundo dados do Instituto Nacional do Câncer, o carcinoma hepatocelular foi responsável por um total de 10.902 óbitos no ano de 2019, sendo 6.317 homens e 4.584 mulheres, indicando um aumento gradativo se comparado aos anos anteriores, 10.551 mortes em 2018 e 10.201 em 2017 (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER, acesso em:2022).

1.3– Características morfológicas e fatores prognósticos relacionados ao CHC.

Os aspectos morfológicos característicos do CHC são de tumores bem vascularizados, que por vezes formam arranjos trabeculares constituídos por três ou mais camadas de células, atípicas citológicas, atividade mitótica, invasão vascular, rarefação de células de Kupffer e perda da trama reticulínica sustentacular (SHAFIZADEH; KAKAR, 2011).

A Organização Mundial da Saúde classifica as variações morfológicas do CHC, em comparação com o parênquima hepático maduro normal, em três grupos. Para essa classificação são avaliadas as características morfológicas nucleares e citoplasmáticas, seguindo os seguintes critérios:

Grau 1 – Bem diferenciado: o citoplasma varia de abundante a moderado, podendo ser eosinofílico ou basofílico. As atípicas nucleares são mínimas e leves (Figura 3).

Grau 2 – Moderadamente diferenciados: o citoplasma tem características semelhantes ao bem diferenciado, porém a atipia nuclear é moderada podendo ser identificadas ocasionais células tumorais multinucleadas (Figura 4).

Grau 3 – Pouco diferenciados: o citoplasma varia de moderado a escasso, geralmente é basofílico. Observa-se marcado pleomorfismo nuclear, podendo ser identificadas células gigantes multinucleadas e anaplásicas (Figura 5).

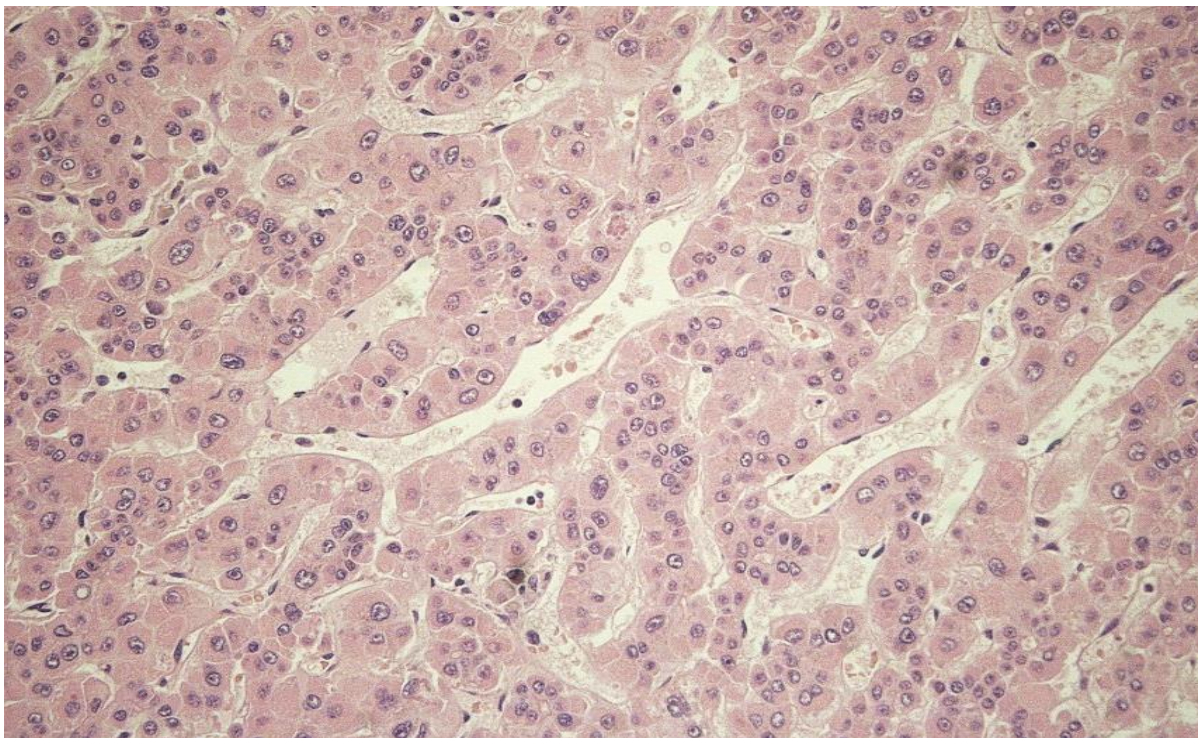


Figura 3 - Carcinoma hepatocelular bem diferenciado, com características que se assemelham ao parênquima hepático normal (aumento: 200x).

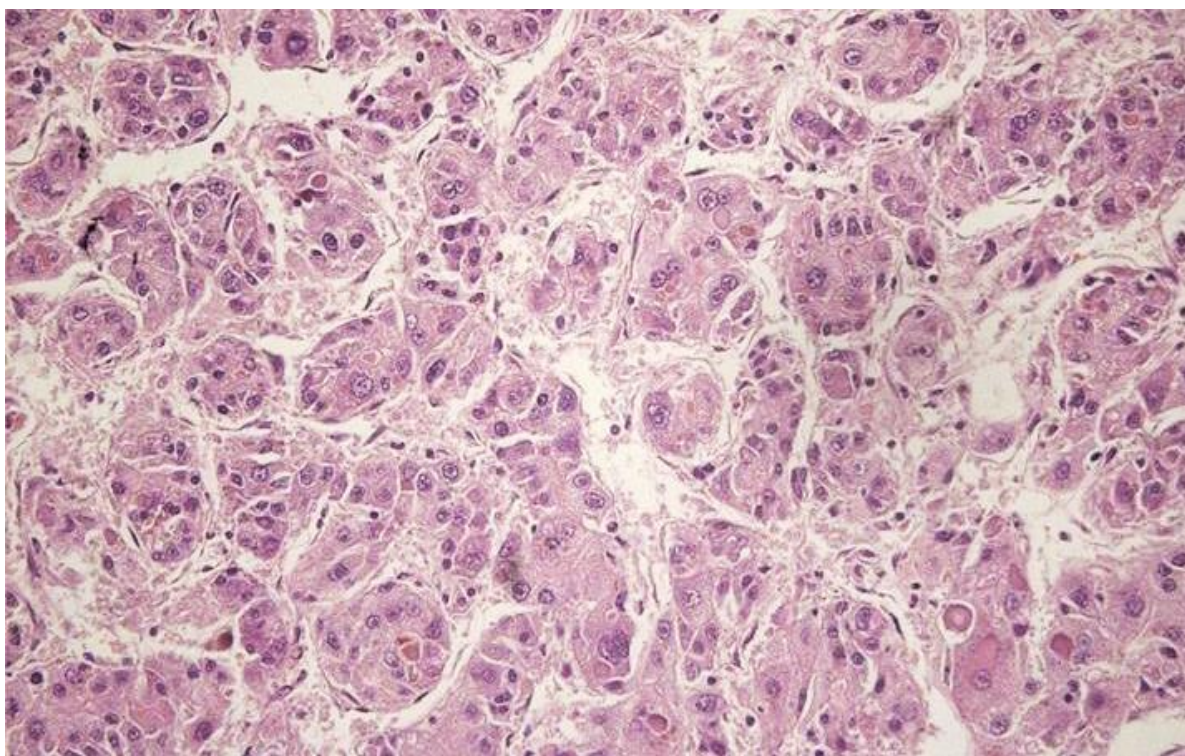


Figura 4 - Carcinoma hepatocelular moderadamente diferenciado, exibindo atipias mais pronunciadas e ocasionais células multinucleadas (aumento: 200x).

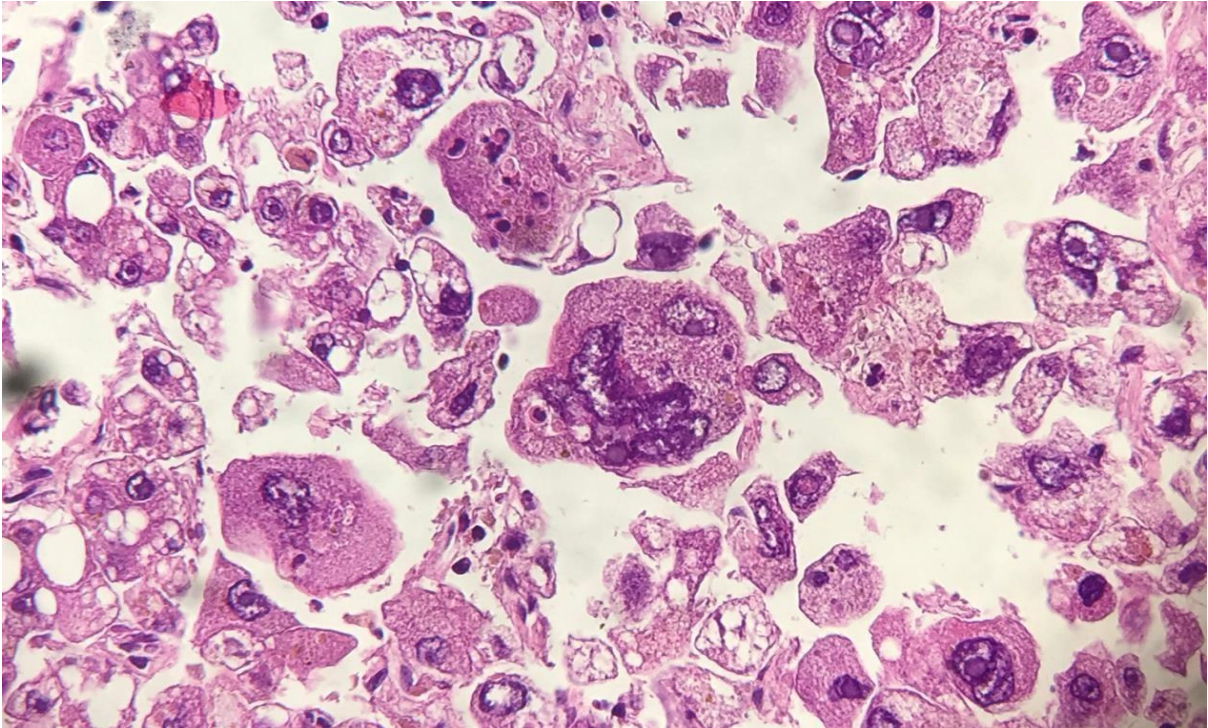


Figura 5 - Carcinoma hepatocelular pouco diferenciado, apresentando pleomorfismo nuclear acentuado e citoplasma basofílico e escasso (aumento: 400x).

Carcinomas considerados como indiferenciados primários do fígado, por definição, não têm evidências convincentes de diferenciação hepatocelular ou biliar, e não são um grau de CHC (PARADIS; FUKAYAMA; SCHIRMACHE, 2019).

Uma outra forma de classificação pelo grau de diferenciação, que também é usada atualmente é o sistema de Edmondson e Steiner modificado, onde os tumores são divididos em quatro grupos (EDMONDSON; STEINER, 1954). Entretanto, há recomendações recentes que favorecem a utilização de um sistema de classificação de apenas três grupos (BURT et al., 2018).

Um sistema de classificação do CHC rigorosamente definido, fácil de usar, reprodutível e amplamente adotado ainda precisa ser desenvolvido, entretanto mesmo com as abordagens heterogêneas, o grau histológico do tumor mostrou-se como um preditor da sobrevida do paciente e da sobrevida livre de doença após ressecção cirúrgica com intenção curativa em fígados cirróticos, em fígados não cirróticos, bem como após o transplante hepático (PARADIS; FUKAYAMA; SCHIRMACHE, 2019; ZHOU et al., 2007; LANG et al., 2007; JONAS et al., 2001).

Outro aspecto importante para o prognóstico do CHC é a presença de invasão vascular. Em estudo de *Rodríguez-Perálvarez et al*, observou-se, em pacientes portadores de CHC tratados com transplante hepático, uma sobrevida livre de doença três anos menor naqueles que apresentaram invasão vascular identificada. De forma semelhante, pacientes com CHC e invasão vascular tratados com ressecção hepática parcial apresentaram uma redução de três a cinco anos na sobrevida livre de doença quando comparados a pacientes sem invasão detectável. Este dado reforça a importância da invasão vascular como critério prognóstico (RODRÍGUEZ-PERÁLVAREZ et al., 2012).

Além do grau de diferenciação e invasão vascular, existem outros fatores que interferem no prognóstico de pacientes portadores de CHC. Esses podem ser divididos em quatro grupos: fatores ligados ao tumor (como tamanho e número de nódulos); fatores ligados ao parênquima hepático adjacente ao tumor (presença ou ausência de cirrose associada); fatores clínicos do paciente (níveis séricos de alfa-fetoproteína, marcadores de função hepática, presença de outras comorbidades), e fatores ligados ao tratamento (TANDON et al., 2009).

O American Joint Comitee on Cancer (AJCC) reconhece alguns aspectos como fatores prognósticos. Dentre eles, encontram-se as características que são utilizadas para o estadiamento patológico do CHC, sendo as principais: o tamanho da lesão (com pontos de corte de 2,0cm e 5,0cm), o número de nódulos (único ou múltiplos), a presença de invasão vascular e de envolvimento de estruturas adjacentes. Além disso, algumas características clínicas também são importantes, como a presença de cirrose no parênquima hepático adjacente, os níveis séricos de alfa-fetoproteína e o escore MELD (*model for end-stage liver disease*) (AMIN et al, 2017).

O escore MELD foi inicialmente criado com o propósito de avaliação de sobrevida de pacientes submetidos a shunt portossistêmico intra-hepático transjugular. Atualmente, o escore foi validado para se estimar a gravidade relativa e sobrevida de pacientes com doença hepática terminal aguardando transplante hepático, atuando com um preditor de mortalidade pré-operatória no intervalo de 3 meses (avaliando-se em conjunto, idealmente, com outros parâmetros clínicos). É calculado a partir de um valor logarítmico envolvendo os níveis séricos de creatinina e de bilirrubina total, além do International Normalized Ratio (RNI). Considera-

se que valores cada vez mais elevados sejam indicativos de menor sobrevida, sendo considerado de péssimo prognóstico aqueles pacientes com escore em torno de 40 (KAMATH et al., 2001; MORAES et al., 2017).

1.4– Tratamento

O sistema de classificação Barcelona Clinic Liver Cancer (BCLC) para CHC, já extensamente validado, é atualmente o mais comumente utilizado para o tratamento dos pacientes portadores de CHC. Os pacientes são subdivididos em cinco grupos (0, A, B, C e D) que, de acordo com variáveis prognósticas pré-estabelecidas, vão guiar o manejo e tratamento (REIG et al., 2022). A versão mais recente dessa classificação encontra-se esquematizada na Figura 6.

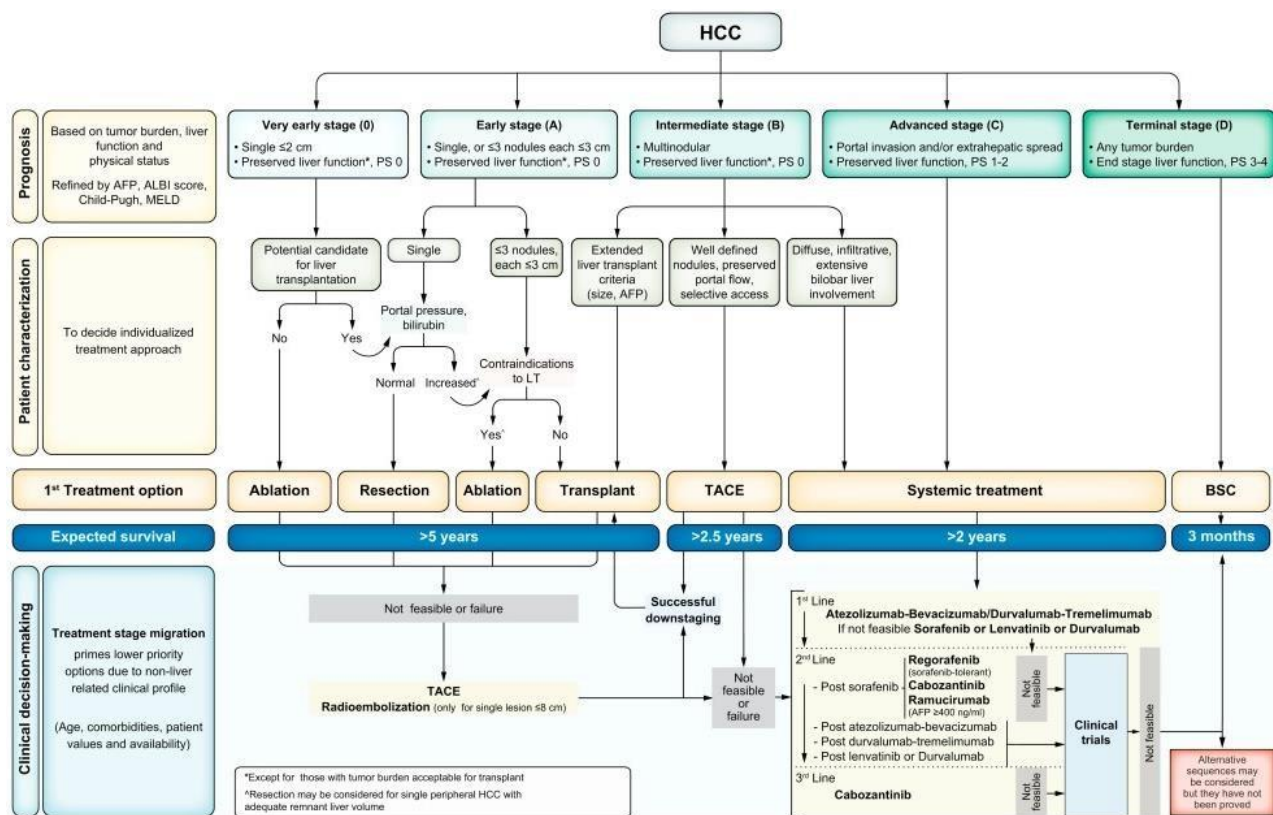


Figura 6 – Algoritmo de tratamento do CHC segundo o *Barcelona Clinic Liver Cancer* (BCLC). AFP, alfa-fetoproteína; ALBI, albumina-bilirrubina; BSC, melhor cuidado de suporte; ECOG-PS, status de desempenho do Eastern Cooperative Oncology Group; LT, transplante de fígado; TACE, quimioembolização transarterial. Fonte: REIG et al. (2022).

Dentre as principais opções terapêuticas atualmente disponíveis para o CHC destacam-se a ressecção cirúrgica e o transplante hepático, indicados em estágios mais iniciais da doença. Entretanto, a sobrevida global em cinco anos é muito baixa, refletindo a possibilidade de recorrência pós-operatória e/ou desenvolvimento de doença metastática (EL-SERAG et al.,

2004; EL-SERAG et al., 2007).

Em relação ao transplante hepático, apesar de oferecer não só a possibilidade de cura da neoplasia como também da hepatopatia crônica de base, ainda persiste o desafio de selecionar adequadamente o potencial candidato a essa modalidade de tratamento, o que reflete diretamente a ausência de biomarcadores que predizem o comportamento biológico desta neoplasia. Além disso, ainda deve ser levada em consideração a escassez de órgãos para transplante, com longas filas de espera por doadores, bem como os problemas logísticos envolvendo o transporte dos enxertos (SILVA et al., 2011; LLOVET et al., 1999).

Já terapias locais como a quimioembolização arterial hepática (QEAH) e ablação por radiofrequência (ARF) são opções consideradas nos casos de doença não metastática em pacientes inelegíveis para cirurgia ou mesmo para controle de sintomas locais em pacientes já com doença sistêmica. Entretanto ainda apresenta altos índices de progressão ou recidiva (REIG et al., 2022).

Embora o tratamento, nas fases iniciais, seja preferencialmente cirúrgico, nos casos avançados, não passíveis de terapias locais, as possibilidades têm sido ampliadas. Com o uso da imunoterapia, foi observado aumento cada vez maior na sobrevida global.

(LLOVET et al., 2008; LIU et al., 2006; BRUIX et al., 2017)

1.5- Hepatocarcinogênese

O CHC é macroscopicamente observado como lesões nodulares, que podem ser isoladas ou múltiplas e desenvolve-se comumente de forma gradativa. Esse processo geralmente envolve o estabelecimento sequencial de lesões, iniciando com a cirrose, seguida pelo surgimento de nódulos displásicos de baixo grau, com progressão para alto grau e CHC bem diferenciado, que se torna cada vez menos diferenciado, podendo culminar em neoplasia avançada metastática. Esse processo é acompanhado por um acúmulo crescente de alterações moleculares que constituem a hepatocarcinogênese (PARADIS; FUKAYAMA; SCHIRMACHE, 2019).

Embora ainda pouco explorados, nos processos iniciais da hepatocarcinogênese destaca-se o papel do telômero e da telomerase (SATYANARAYANA et al., 2004). O telômero é uma sequência de repetições no DNA que se encurta durante cada divisão celular, devido à redução da atividade do complexo telomerase, levando à apoptose ao final do ciclo celular. A

reativação do complexo telomerase, característica das neoplasias malignas, contribui para que o hepatócito adquira novamente a capacidade de proliferação e consiga escapar dos mecanismos de senescência, o que leva ao desenvolvimento do tumor (FARAZI et al., 2003).

A telomerase está reativada em mais de 90% dos casos de CHC, o que ocorre por alterações no promotor TERT (do inglês, *Telomerase reverse transcriptase*), importante enzima que compõe o complexo (TOTOKI et al., 2011). Isso pode ser em decorrência de mutações somáticas (50-60%), amplificações (5-6%), ou mesmo, no caso do vírus da hepatite B, pela sua capacidade de gerar mutações por inserções no genoma do hepatócito (SUNG et al., 2012).

Embora esse seja um evento sabidamente precoce na hepatocarcinogênese, nos estádios mais avançados, o CHC passa a adquirir uma maior diversidade genômica devido à combinação de mutações somáticas em regiões codificadoras ou mesmo deleções homozigóticas (ZUCMAN-ROSSI et al., 2015). Estudos demonstram uma média de 30-40 mutações por tumor, sendo apenas seis a oito consideradas *drivers*, ou seja, mutações que estão diretamente envolvidas na oncogênese e que, conferem vantagens na proliferação das células tumorais (GUICHARD et al., 2012).

A hepatocarcinogênese é um processo complexo, desenvolvido a partir de múltiplas etapas e com mecanismos diversos que podem variar de acordo com a etiologia. Esses mecanismos podem ser divididos em inespecíficos e específicos. Os mecanismos inespecíficos estão associados às alterações causadas pela doença hepática crônica, como a repetição constante de morte hepatocelular e regeneração em um meio inflamatório, levando a aquisição de mutações e ativação de proto-oncogenes. Acresce-se a isto os efeitos decorrentes da fibrose e rearranjo vascular. (PARADIS; FUKAYAMA; SCHIRMACHE, 2019; ROSKAMS et al., 2010; SHIN et al., 2013).

Os mecanismos oncogênicos específicos são aqueles intimamente relacionados a uma determinada etiologia. Alguns mecanismos específicos já foram demonstrados para a hepatite B. O VHB, ao integrar seu DNA no material genético da célula hospedeira, induz instabilidade cromossômica e mutações específicas que culminam na ativação de oncogenes (SHIN et al., 2013). A produção de proteínas virais, principalmente a proteína X transativadora (HBx), pode agir como ativador de vias de sinalização celular, como as vias do JAK/STAT, RAS/RAF, MAPK e Wnt- β -catenina, além de estimular fatores de transcrição, como o c-myc e o c-jun,

que levarão a uma maior expressão de genes reguladores do ciclo celular (GUERRERO et al., 2005; CHIRILLO et al., 1996). Outros mecanismos específicos também já foram demonstrados na ação das aflatoxinas (efeitos genotóxicos diretos que levam a mutação de TP53) e têm sido propostos para hepatite C (efeitos oncogênicos das proteínas virais *core*, NS3 e NS5A) (BRESSAC et al., 1991; HSU et al., 1991; LAN et al., 2002)

Além desses diferentes mecanismos de patogênese, sabe-se que o CHC apresenta uma grande heterogeneidade genômica, que pode variar não apenas de acordo com a etiologia da hepatopatia crônica subjacente, mas também com o contexto genético dos pacientes, entre nódulos tumorais no mesmo paciente ou mesmo dentro do mesmo nódulo. (BRUIX et al., 2014; LU et al., 2016)

Apesar da diversidade molecular e etiopatogênica do CHC, observa-se que a ativação de algumas vias de sinalização intracelular está frequentemente envolvida na sua carcinogênese, como por exemplo, as vias MAPK (RAS/RAF/MEK/ERK) e fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K/AKT/mTOR), ativadas em até 51% e de 15-41% dos casos, respectivamente. Por meio de uma cascata de sinalização, a ativação dessas proteínas desencadeia eventos celulares como os relacionados com a proliferação, angiogênese tumoral, inibição da apoptose, além de mediar mecanismos de resistência à drogas e até mesmo envolvimento com um comportamento mais agressivo do tumor. Tanto a via MAPK quanto a PI3K/AKT/mTOR podem ser deflagradas pela ativação de receptores de fatores de crescimento. Entre eles, destaca-se o IGF-1R (do inglês insulin-like growth factor-1 receptor). (VILLANUEVA et al., 2008; SCHMITZ et al., 2008; POLLAK et al., 2012)

1.6– O sistema do fator de crescimento semelhante à insulina

O sistema do fator de crescimento semelhante à insulina (IGF) inclui três principais ligantes (insulina, IGF-1 e IGF-2), três receptores (o receptor de insulina [IR], o receptor de IGF-1 [IGF-1R] e o receptor manose-6-fosfato/IGF-2 [M6P/IGF-2R]), seis proteínas de ligação ao IGF (IGFBPs) e as proteínas intracelulares sinalizadoras associadas ao IGF-1R, onde estão incluídos os membros da família do IRS (*insulin-receptor substrate*), AKT1 (*v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1*), MTOR [*mechanistic target of rapamycin (serine/threonine kinase)*] e a RPS6KB1 (*ribosomal protein S6 kinase 70 KDa polypeptide 1*). Esse sistema

desempenha um papel importante no crescimento, na proliferação e na sobrevivência celular e afeta quase todos os órgãos e sistemas do corpo humano. (LEROITH et al., 2021; ANNUNZIATA et al., 2010)

Os ligantes IGF-1 e IGF-2 foram denominados fatores de crescimento semelhantes à insulina por causa de sua homologia estrutural com a insulina (de cerca de 50%) e ações metabólicas semelhantes, porém exibem uma atividade promotora de crescimento muito maior. (ADAMEK et al., 2018)

O ligante IGF-1 é produzido, em sua maior parte, no fígado sob o estímulo do hormônio do crescimento (GH) e possui ações estimuladoras da divisão celular e inibidoras da morte celular programada (ação antiapoptótica). Essas ações têm sido associadas ao desenvolvimento de vários tumores sólidos, atuando em funções como infiltração neoplásica, crescimento tumoral e capacidade de metastatização. Além disso, possui um papel central na progressão e transformação do ciclo celular e, juntamente com o seu receptor (IGF-1R), estão altamente expressos nas células da maioria das neoplasias malignas. (LEROITH et al., 2003)

Estudos experimentais mostram que o crescimento de neoplasias que expressam IGF-1R pode ser inicialmente estimulado pelo IGF-1 sintetizado em tecidos que podem estar muito distantes, indicando um efeito endócrino. No entanto, a neoplasia pode adquirir a capacidade de produção desse ligante, caracterizando uma ação autócrina e parácrina. Esta capacidade de autoestimulação pode estar associada a um comportamento mais agressivo da neoplasia. (JENKINS et al., 2004; POLLAK et al., 2012; IBRAHIM et al., 2004)

Em contraste com o IGF-1, o IGF-2 não é produzido sob a influência do GH. No entanto, assim como o IGF-1, o IGF-2 é expresso pela maioria dos tecidos em adultos, com a sua maior parte circulante sendo produzida no fígado, além de apresentar ação endócrina, parácrina e autócrina. O IGF-2 também possui efeito antiapoptótico e proliferativo, sendo frequentemente hiperexpresso nas células neoplásicas. Pacientes com certos tipos de tumores ocasionalmente liberam “*big IGF-2*”, uma forma precursora com uma extensão maior de aminoácidos, que é prontamente biodisponível e efetivamente ativa o IGF-1R. (LEROITH et al., 2021)

Os IGFs exercem suas ações através da ligação com dois tipos diferentes de receptores denominados IGF-R tipo 1 e 2 (IGF-1R e IGF-2R). A grande maioria das ações conhecidas do

IGF-1 e 2 são mediadas via interação com o receptor IGF-1R. O IGF-1R apresenta estrutura semelhante ao IR tratando-se um receptor de membrana com atividade tirosina-quinase. O IGF-2R não apresenta homologia com os IGF-1R ou IR. Trata-se de proteína monomérica com um grande domínio extracelular, sem atividade tirosina-quinase, que contém sítios de ligação para IGF-2 e para manose-6-fosfato. A principal função do IGF-2R é ser um regulador negativo da biodisponibilidade da IGF-2 (NAKAE et al., 2001).

1.7– O IGF-1R

O IGF-1R é um receptor transmembrana com domínios de tirosina-quinase, com uma homologia de cerca de 70% em relação ao receptor de insulina. O processo de formação do receptor começa no retículo endoplasmático. Em seguida, é transportado através do complexo de Golgi e atinge a membrana plasmática. O gene IGF-1R humano consiste em 21 éxons que codificam uma subunidade α extracelular, que contém um domínio que recebe o ligante, e uma subunidade β transmembrana, que contém atividade de tirosina-quinase. As subunidades α e β são sintetizadas como um pré-propeptídeo de cadeia simples e clivadas após a tradução, unidas por uma ponte dissulfeto para formar um semi-receptor de IGF-1 ($\alpha\beta$). Dois semi-receptores dimerizam para formar um IGF-1R funcional ($\alpha_2\beta_2$) (LEROITH et al., 2021; CHITNIS et al., 2008).

Após a união com o ligante, o domínio da tirosina-quinase intracelular autofosforila tirosinas específicas que atuam como locais de ancoragem para proteínas de sinalização, como a família de proteínas do substrato do receptor de insulina (IRS). Essas proteínas então recrutam outros substratos que levam à ativação de diferentes cascatas de sinalização, incluindo a via PI3K/AKT/mTOR e a via MAPK, que estimulam a proliferação e sobrevivência celular. (ANNUNZIATA et al., 2011; LEROITH et al., 2021)

1.8– O receptor IGF-1R e o carcinoma hepatocelular

Estudos in vitro, demonstraram que a ativação do IGF-1R pode atuar com potente mitógeno, contribuindo para a carcinogênese hepática (TSAI et al., 1988; SCHARF et al., 1998). *Desbois et al* demonstraram uma superexpressão de IGF-1R em cinco diferentes linhagens celulares de modelos de CHC humano (HepG2, Hep3B, HuH7, HuH6 e PLC/PRF5) quando comparada com hepatócitos normais. Além disso, também foi observado que a ativação de vias de sinalização intracelular pela ligação do IGF-1R com seus ligantes promove a proliferação,

sobrevivência e migração de linhagens de células do CHC (DESBOIS-MOUTHON et al., 2009). Estudos também mostraram que a inibição de IGF-1R por NVP-AEW541, ou AVE 1642 (anticorpos anti-IGF-1R), resultou na degradação celular, inibição de crescimento e parada do ciclo celular em linhagens celulares de HCC, o que poderia indicar um alvo potencial para o tratamento desta neoplasia. (DESBOIS-MOUTHON et al., 2009; HÖPFNER et al., 2006)

Estudos em modelos animais mostraram que as células do CHC exibiam consistentemente expressão aumentada de IGF-1R, tornando-as suscetíveis aos efeitos mitogênicos do IGF (SCHARF et al., 2000). *Aleem et al* demonstraram, em um estudo sobre CHC induzido por N-nitrosomorfolina em ratos, níveis mais elevados de IGF-1R no fígado, o que poderia levar ao aumento da proliferação celular nas fases iniciais da hepatocarcinogênese (ALEEM et al., 2011). Por outro lado, *Yan et al* observaram um aumento da expressão de RNAm de IGF-1R e de IGF-1R em diferentes estágios de transformação maligna, indicando níveis cada vez maiores à medida que ocorre a progressão do fígado normal, para um estado pré-canceroso e por fim para o CHC estabelecido. Esse achado pode indicar o papel do IGF-1R como um possível marcador precoce da transformação maligna hepatocitária (YAN et al., 2013).

Esses achados mostram que o IGF-1R participa da carcinogênese hepática estimulando a proliferação dos hepatócitos nas fases iniciais, através de um mecanismo parácrino (fase pré-cancerosa) e posteriormente, na proliferação das células malignas, induzida pelo mecanismo autócrino. Além disso, a desregulação da função do IGF-1R pode ocorrer não apenas pela sua hiperexpressão, mas também por outros mecanismos, como anormalidades na estrutura deste receptor, que levam a um ganho de função, ou mesmo no aumento da sua ativação secundária ao aumento da produção local de IGFs. (ADAMEK et al., 2018; POLLAK et al., 2012).

1.9– A translocação nuclear do IGF-1R

Adicionalmente a esses mecanismos clássicos em que o receptor influencia as funções celulares que podem estar associadas à gênese e desenvolvimento do câncer, evidências apontam outra importante característica do IGF-1R que o destaca em relação a muitos outros receptores: sua capacidade de se translocar para o núcleo (SARFSTEIN et al., 2013).

Em 1987, Podlecki et al demonstraram que IR era capaz de sofrer internalização e se translocar para o núcleo (PODLECKI et al., 1987). Mais tarde, em 1996, através de análises de

imunofluorescência, Chen et al observaram que o IGF-1R também estaria presente no núcleo celular e que o estilbena dobrou os níveis nucleares deste receptor (CHEN et al., 1996). Em 2003, Sun et al relataram que os substratos dos IRs-1, IRs-2 e IRs-3 translocam para o núcleo de vários tipos de células após a indução por um IGF-1R ativado ou certos oncogenes (SUN et al., 2003).

A partir desse fenômeno, o receptor pode controlar de forma mais direta a transcrição de genes envolvidos na progressão do ciclo celular, incluindo a auto-regulação do gene IGF-1R. Por meio desse mecanismo de ação tão importante e que necessita de maior esclarecimento, o receptor poderia modular eventos de crescimento e desenvolvimento em um nível de controle genômico, contribuindo assim para transformação neoplásica (SARFSTEIN et al., 2013).

Warsito *et al* demonstraram que IGF-1R nuclear se associa com o Fator 1 de Ligação ao Facilitador Linfóide (LEF1) no núcleo das células, o que poderia levar a um aumento nos níveis de ciclina D1, sugerindo que o IGF-1R nuclear poderia ser responsável pela progressão aberrante do ciclo celular, corroborando com a carcinogênese (WARBITO et al., 2012).

Alguns estudos sugerem também uma potencial resistência ao tratamento em neoplasias que expressam o IGF-1R no núcleo. Guerard *et al* relataram a expressão nuclear do IGF-1R em linhagens de células de carcinomas pulmonares humanos e observaram, nos casos em que ela estava presente, uma maior resistência ao receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR), que é um tipo de terapia-alvo utilizada no tratamento desta neoplasia (GUERARD et al., 2018). Bodzin *et al* observaram também uma maior resistência ao inibidor de EGFR em linhagens de células de carcinoma hepatocelular que expressavam o IGF-1R no núcleo (BODZIN et al., 2012).

Tem sido estudada também a possibilidade da expressão nuclear de IGF-1R atuar como determinante do prognóstico. Aleksic et al relataram a presença de IGF-1R nuclear em células de carcinoma renal primário, amostras de diferentes tumores fixados em formalina, lesões pré-invasivas da mama e tecidos não malignos com elevada taxa de proliferação. Neste estudo, o IGF-1R nuclear foi associado a mau prognóstico no câncer renal (ALEKSIC et al., 2010). Codony-Servat et al identificaram uma maior expressão nuclear de IGF-1R em pacientes com carcinoma colorretal metastático, já tratados com quimioterapia, em comparação com portadores de tumores primários ainda não tratados. Além disso, dentro do grupo de pacientes

com carcinoma colorretal metastático, aqueles com expressão nuclear do receptor apresentaram sobrevida global mais baixa (CODONY-SERVAT et al., 2017).

Apesar dessas evidências em outras neoplasias, ainda são necessários estudos investigando o valor prognóstico da expressão nuclear de IGF-1R no CHC. Além disso, até o momento, uma série de biomarcadores tem sido apontada com o objetivo de estimar o valor prognóstico no CHC, como Golgi proteína-7, PIVKA II (do inglês prothrombin induced by vitamin K absence II) e osteopontina. No entanto, ainda não são evidências definitivas e suas aplicações clínicas ainda precisam ser exploradas (RICH et al., 2014)

.

2 –JUSTIFICATIVAS

O CHC como é uma das poucas neoplasias que ainda apresenta incidência e mortalidade crescentes, e grande proximidade entre as curvas. Além disso, apesar dos diversos estudos já publicados, os aspectos da sua carcinogênese ainda precisam ser melhor elucidados e mais explorados. Tudo isso reflete a heterogeneidade da doença, o que dificulta a identificação de parâmetros clínicos e morfológicos com valor prognóstico e implicações terapêuticas (PARADIS; FUKAYAMA; SCHIRMACHE, 2019).

Nesse cenário de uma doença tão complexa, de carcinogênese ainda pouco esclarecida, e diante do potencial do IGF-1R na hepatocarcinogênese, um estudo que visa identificar a associação do IGF-1R com aspectos clínicos e patológicos em portadores de CHC, seria importante. Potencialmente, levaria a reconhecer um possível biomarcador com valor prognóstico, melhor em relação aos atualmente empregados, além de abrir novos campos para futuros estudos de opções terapêuticas com ação específica, podendo contribuir com os melhores desfechos do CHC, atualmente ainda tão desfavoráveis

3 – OBJETIVOS

3.1 - Objetivo geral

Avaliar e caracterizar a expressão nuclear de IGF-1R em amostras provenientes de pacientes com diagnóstico de carcinoma hepatocelular submetidos a transplante hepático ou ressecção hepática parcial, e investigar sua associação com parâmetros clinicopatológicos.

3.2 - Objetivos específicos

3.2.1- Caracterizar os parâmetros clínicos e epidemiológicos dos pacientes submetidos a transplante hepático ou ressecção hepática parcial.

3.2.2 - Caracterizar morfológicamente os carcinomas hepatocelulares identificados em pacientes submetidos a transplante hepático ou ressecção hepática parcial.

3.2.3- Caracterizar a expressão nuclear imuno-histoquímica de IGF-1R em amostras de carcinoma hepatocelular diagnosticado ao exame histopatológico convencional (Hematoxilina & Eosina).

3.2.4- Avaliar a expressão imuno-histoquímica de IGF-1R no fígado cirrótico adjacente e correlacionar com a sua etiologia.

3.2.5- Comparar a expressão imuno-histoquímica nuclear do IGF-1R no tumor e no parênquima cirrótico adjacente.

3.2.6 -Avaliar a associação entre expressão nuclear imuno-histoquímica tumoral e cirrótica do IGF-1R com parâmetros clínicos e epidemiológicos dos pacientes.

3.2.7- Avaliar a associação entre expressão nuclear imuno-histoquímica tumoral e cirrótica do IGF-1R com parâmetros morfológicos do CHC.

3.2.8- Avaliar a associação entre desfechos clínicos (recidiva ou óbito e sobrevida livre desses eventos) dos pacientes com CHC e a expressão nuclear imuno-histoquímica do IGF-1R.

4 – MATERIAIS E MÉTODOS

4.1- Considerações éticas

O projeto seguiu todas as normas de pesquisas envolvendo seres humanos contidas na Resolução 466 / 2012 do Conselho Nacional de Saúde, para salvaguardar os direitos e o bem-estar das pessoas estudadas. Este projeto foi encaminhado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG (COEP) sob o número CAAE – 44573615.7.0000.5149. (Anexo 1).

4.2– Delineamento e estratégias de estudo

Trata-se de estudo observacional, retrospectivo e comparativo, que analisa a expressão nuclear do IGF-1R em pacientes portadores de CHC e de cirrose, submetidos a transplante hepático ou ressecção hepática parcial, no Instituto Alfa de Gastroenterologia do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais (HC-UFMG).

Foram estudadas amostras de fígado (tumoral e não-tumoral próximo ao tumor) de 111 pacientes, maiores de 18 anos, que receberam o diagnóstico de CHC associado a hepatopatia crônica de diversas etiologias. As amostras selecionadas foram colhidas e arquivadas no Serviço de Anatomia Patológica do HC-UFMG, no período de 2000 a 2020.

Todas as lâminas arquivadas coradas em hematoxilina-eosina (HE) foram revistas para escolha do bloco com maior representatividade tumoral e do parênquima cirrótico. A partir desses blocos selecionados, foram confeccionados novos cortes histológicos para a realização dos estudos imuno-histoquímicos.

4.3- Critérios de exclusão

Foram excluídas todas amostras insuficientes para realização de novos cortes histológicos, bem como aquelas que não continham representação do tumor e do parênquima cirrótico peritumoral.e casos com variante fibrolamelar do CHC.

4.4– Dados demográficos, clínico-laboratoriais e anatomopatológicos analisados

Foi feita a análise dos prontuários arquivados no Instituto Alfa de Gastroenterologia do HC-UFMG para obtenção dos seguintes dados demográficos e clinico-laboratoriais: sexo, idade no momento da cirurgia, etiologia da doença hepática crônica de base, valores de transaminase oxalacética (TGO), transaminase pirúvica (TGP), bilirrubina total (BT), alfa-fetoproteína (AFP), fosfatase alcalina (FA), gama glutamil transferase (GGT), albumina, lactato desidrogenase (LDH), RNI, escore MELD, tempo livre de óbito e tempo livre de recidiva.

Para a análise de sobrevida, evento foi definido como recidiva do tumor ou óbito por qualquer causa, o que ocorresse primeiro, dentro do período de seguimento, que foi até dezembro 2020. Sobrevida livre de evento (SLE) foi definida como o intervalo entre o transplante hepático ou ressecção hepática parcial e a ocorrência do evento ou término do período de seguimento.

Foram revistas as lâminas coradas em HE originais e seus respectivos laudos também no intuito de avaliar os dados anatomopatológicos, sendo eles: números de nódulos tumorais, tamanho do maior nódulo tumoral, grau de diferenciação tumoral (segundo a classificação da OMS) e presença de invasão angiolinfática.

4.5 – Técnica de imuno-histoquímica

Para análise imuno-histoquímica, os blocos de parafina com amostras de carcinoma hepatocelular foram submetidos à microsecção com espessura de 3 µm e colocados em lâminas silanizadas. Os cortes histológicos foram então desparafinizados e reidratados utilizando Xilol, álcool absoluto e álcoois hidratados (95%, 75%) e água destilada.

Imuno-histoquímica foi realizada para identificar a expressão nuclear do IGF-1R. Antes da incubação com o anticorpo primário, as amostras foram tratadas com peróxido de hidrogênio 3%, por 15 minutos, para bloquear peroxidase endógena. Foi feita recuperação antigênica pelo aquecimento das lâminas a 96°C no vapor por 30 minutos em citrato de sódio 0,01M (pH 6,0).

Para minimizar a marcação inespecífica as amostras foram incubadas com *Protein Block* (Dako) por 30 minutos. O anticorpo primário que foi utilizado, assim como as condições de tratamento da amostra e as diluições estão descritos na Tabela 1. Foi utilizado o sistema *EnVision™ Dual Link* (Dako) para visualização. Esse sistema utiliza um anticorpo secundário acoplado a um

polímero sintético conjugado com a peroxidase (HRP, *horseradish peroxidase*). Nas amostras positivas, após adição do 3,3- diaminobenzidina (DAB - substrato da HRP), forma-se um precipitado de cor marrom. Todas as amostras foram contra-coradas com hematoxilina de Harris (Sigma) por dois minutos e tratadas com o reagente *Bluing* (Thermo Scientific) por um minuto, o qual altera para azul a cor dos núcleos corados pela hematoxilina.

Tabela 1 – Anticorpo utilizado na técnica de imuno-histoquímica.

Anticorpo.primário	Especificações	Diluição	Tempo de incubação
IGF-1R	Abcam (ab39675)	1:100	60 minutos

4.6– Análise imuno-histoquímica

Para discriminar as marcações da proteína nos tumores e no parênquima cirrótico adjacente, análise microscópica foi realizada por dois patologistas em duas etapas: graduação da intensidade da marcação e quantificação do número de núcleos marcados. Em cada um dos pacientes, a graduação e quantificação foi realizada em 500 células do tumor e 500 células no parênquima cirrótico.

A intensidade da marcação, vista por microscopia óptica, foi categorizada em ausente, fraca, moderada e forte, sendo que a ausência de marcação foi representada pelo número 0, marcação fraca foi representada pelo sinal 1+, moderada pelo sinal de 2+ e a marcação forte pelo sinal 3+.

Foram consideradas positivas todas as amostras com marcação nuclear de intensidade maior ou igual 1+ e em mais de 10% das células, conforme Rememele e Stegner indicam para interpretação de outros marcadores imuno-histoquímicos que também exibem expressão nuclear (REMMELE, STEGNER, 1987).

4.7- Análises estatísticas

A análise estatística foi feita através do programa SPSS Statistics ® (IBM Corp, 2015, IBM SPSS Statistics for Windows, Version 23.0. Armonk, NY: IBM Corp.). As variáveis nominais foram expressas como números e porcentagens, as variáveis contínuas foram apresentadas como mediana e intervalo interquartil, uma vez que não apresentavam distribuição normal

avaliada pelo teste de Shapiro-Wilk. As variáveis quantitativas foram submetidas ao teste de Mann-Whitney. Foi realizado o teste de Qui quadrado ou o teste exato de Fisher, quando necessário, para comparação de proporções entre as variáveis categóricas. As curvas de sobrevida livre de evento dos pacientes incluídos foram expressas em gráficos por meio do método de Kaplan-Meier e o teste Log-rank foi usado para comparação entre as curvas. A regressão de Cox foi usada para avaliar fatores independentemente associado à sobrevida livre de evento.

Para avaliar parâmetros clínico e histopatológicos independentemente associadas à expressão nuclear do IGF-1R no tumor e no parênquima cirrótico adjacente, as variáveis que apresentaram valor de $p < 0,20$ na análise univariada, foram selecionadas para a análise multivariada utilizando o modelo de regressão logística. Somente valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos

5 – RESULTADOS

Um total de 111 pacientes foram selecionados para o estudo e tiveram suas biópsias e prontuários revistos e suas amostras submetidas ao estudo imuno-histoquímico.

5.1– Dados demográficos, clínicos e laboratoriais

Do total de amostras, 80 (72,1%) são provenientes de pacientes do sexo masculino e 31 (27,9%) de pacientes do sexo feminino; o paciente mais jovem tinha 22 anos e o mais velho 70 anos, enquanto a mediana da idade dos pacientes na época da cirurgia foi de 58 anos. Todos os casos de CHC do presente estudo foram obtidos de fígado cirróticos, cujas etiologias eram: 49 (44,1%) casos de hepatite C, 18 (16,2%) casos de etiologia etanólica, 18(16,2%) de hepatite B, três (2,7%) de etiologia auto-imune, dois (1,8%) de hemocromatose, dois (1,8%) por NAFLD e 19 (17,1%) de etiologia criptogênica. Dos 111 pacientes, 35 foram submetidos à ressecção hepática parcial e 76 ao transplante hepático.

Em relação a dados laboratoriais das amostras, temos os seguintes: TGO com mediana igual a 57,0 U/L (variação de 40,0-95,5) ; TGP com mediana igual a 52,0 U/L(variação de 31,0-76,0); bilirrubina total com mediana igual a 1,75 mg/dL (variação de 0,97-2,78); FA com mediana igual a 125,0 U/L(variação de 89,0-204,0); GGT com mediana igual a 109,0 U/L(variação de 65,5-185,75); LDH com mediana igual a 418,0 U/L(variação de 323,5-568,75); albumina com mediana igual a 3,2 g/dL(variação de 2,7-3,97); RNI com mediana igual a 1,4(variação de 1,17-1,65); AFP com mediana igual a 9,05 ng/ml (variação de 3,89-49,85). A análise dos valores do escore MELD evidenciou mediana de 20 pontos (variação de 15-23).

Esses dados estão expressos na Tabela 2.

Tabela 2 – Distribuição dos dados demográficos e clínico-laboratoriais dos pacientes submetidos ao transplante hepático e ressecção hepática parcial no HC-UFMG no período entre 2000 e 2020.

Dados demográficos/ clínico-laboratoriais	
Sexo	
Masculino	80 (72,1%)
Feminino	31 (27,9%)
Idade (anos)	58 (51 – 63)
Procedimento cirúrgico realizado	
Transplante hepático	76 (68,4%)
Ressecção parcial	35 (31,5%)
Etiologia	
Hepatite C	49 (44,1%)
Criptogênica	19 (17,1%)
Etanólica	18 (16,2%)
Hepatite B	18 (16,2%)
Auto-imune	3 (2,7%)
Hemocromatose	2 (1,8%)
NAFLD	2 (1,8%)
Dados laboratoriais:	
TGO (U/L)	57,0 (40,0-95,5)
TGP (U/L)	52,0 (31,0-76,0)
BT (mg/dL)	1,75 (0,97-2,78)
FA (U/L)	125,0 (89,0-204,0)
GGT (U/L)	109,0 (65,5-185,75)
LDH (U/L)	418,0 (323,5-568,75)
Albumina (g/dL)	3,2 (2,7-3,97)
RNI	1,4 (1,17-1,65)
AFP (ng/ml)*	9,05 (3,89-49,85)
MELD**	20 (15-23)

Os dados são expressos como números absolutos (porcentagem) ou mediana (intervalo interquartil).

*Nível sérico identificado em 86 casos. **Escore obtido em 77 casos. NAFLD doença hepática gordurosa não alcoólica; TGO- trasaminase oxalacética; TGP-transaminase pirúvica; BT-bilirrubina total; FA-fosfatase alcalina; GGT- gama glutamil transferase; LDH- Lactato desidrogenase; RNI- International Normalized Ratio; AFP- alfa-fetoproteína; MELD- *Model for end-stage liver disease*.

5.2– Dados anatomopatológicos

Das 111 amostras, temos os seguintes parâmetros anatomopatológicos: tamanho do maior nódulo tumoral apresentou uma variação de 0,5 a 32,0 cm, sendo 3,0 cm a mediana. Invasão vascular foi detectada em sete (6,4%) casos pela análise das lâminas coradas em HE, não tendo sido identificada em 104 (93,6%). O grau de diferenciação tumoral foi avaliado em todos os 111 casos e as amostras foram divididas em dois grupos: 54(48,6%) foram classificados como tumores bem diferenciados e 57 (51,4%) como tumores moderadamente/pouco diferenciados. Em relação ao número de nódulos tumorais, os 111 casos foram divididos em sete grupos: um (53,2%), dois (23,9%), três (5,5%), quatro (8,3%), cinco (1,8%), sete (%) e dez ou mais nódulos (0,9%). Não haviam casos com seis, oito ou nove nódulos. Esses dados estão expressos na Tabela 3.

Tabela 3 – Dados anatomopatológicos de 111 casos de CHC provenientes pacientes submetidos ao transplante hepático e ressecção hepática parcial no HC-UFMG no período entre 2000 e 2020.

Número de nódulos	
1	59 (53,1%)
2	26 (23,4%)
3	6 (5,4%)
4	9 (8,1%)
5	2 (1,8%)
7	2 (1,8%)
10 ou mais	7 (6,3%)
Tamanho do maior nódulo(cm)	3,0 (2,0-4,0)
Invasão vascular	
Presente	5 (4,5%)
Ausente	106 (95,5%)
Grau de diferenciação*	
Bem diferenciado	54 (48,6%)
Moderadamente/pouco diferenciado	57(51,4%)

Os dados são expressos como números absolutos (porcentagem) ou mediana (intervalo interquartil)

5.3– Análise da expressão nuclear imuno-histoquímica de IGF-1R e dados clínico-laboratoriais e anatomopatológicos

Das 111 amostras examinadas, 38 amostras (34,2%) apresentaram marcação imuno-histoquímica nuclear positiva para o anticorpo IGF-1R na área de CHC e 13 amostras (11,7 %)

na área de cirrose. Dessas 13 amostras positivas na cirrose, 11 também eram positivas no tumor. 98 casos foram negativos nas áreas de cirrose e 73 nas áreas de CHC. (Figuras 7, 8, 9 e 10)



Figura 7 - Marcação nuclear de IGF-1R presente no CHC (região inferior esquerda) e ausente no parênquima cirrótico adjacente (região superior direita). Aumento de 50x.

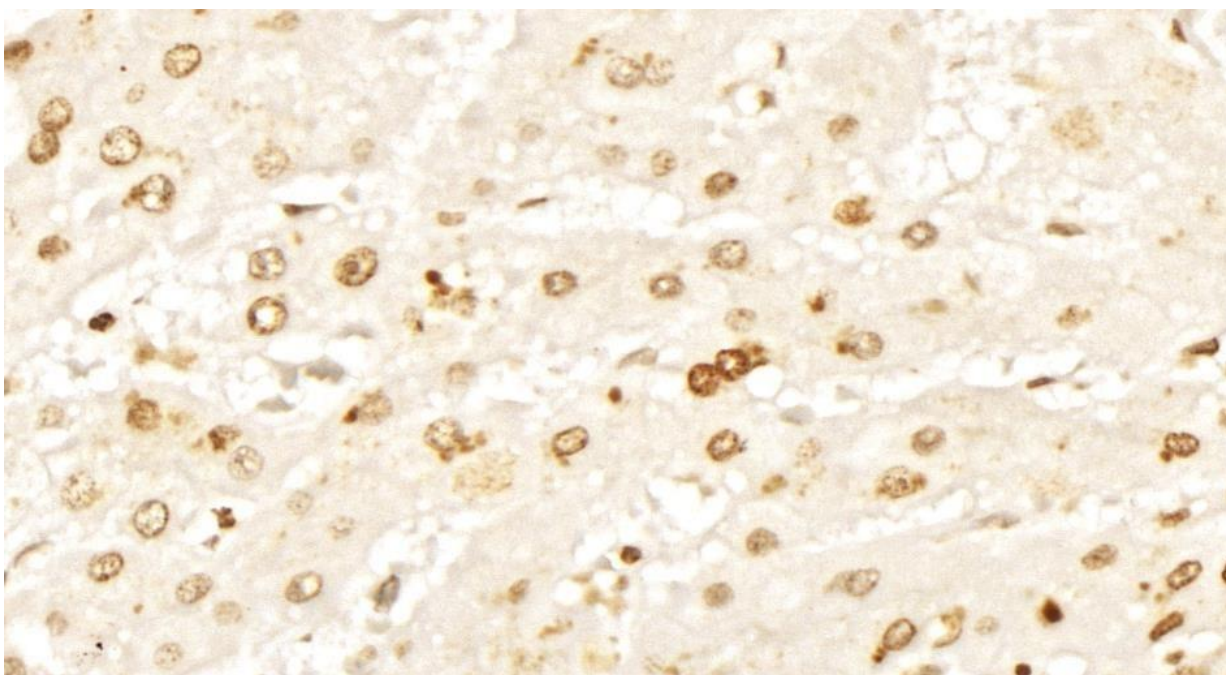


Figura 8 - Marcação nuclear de IGF-1R presente no CHC (aumento: 400x).

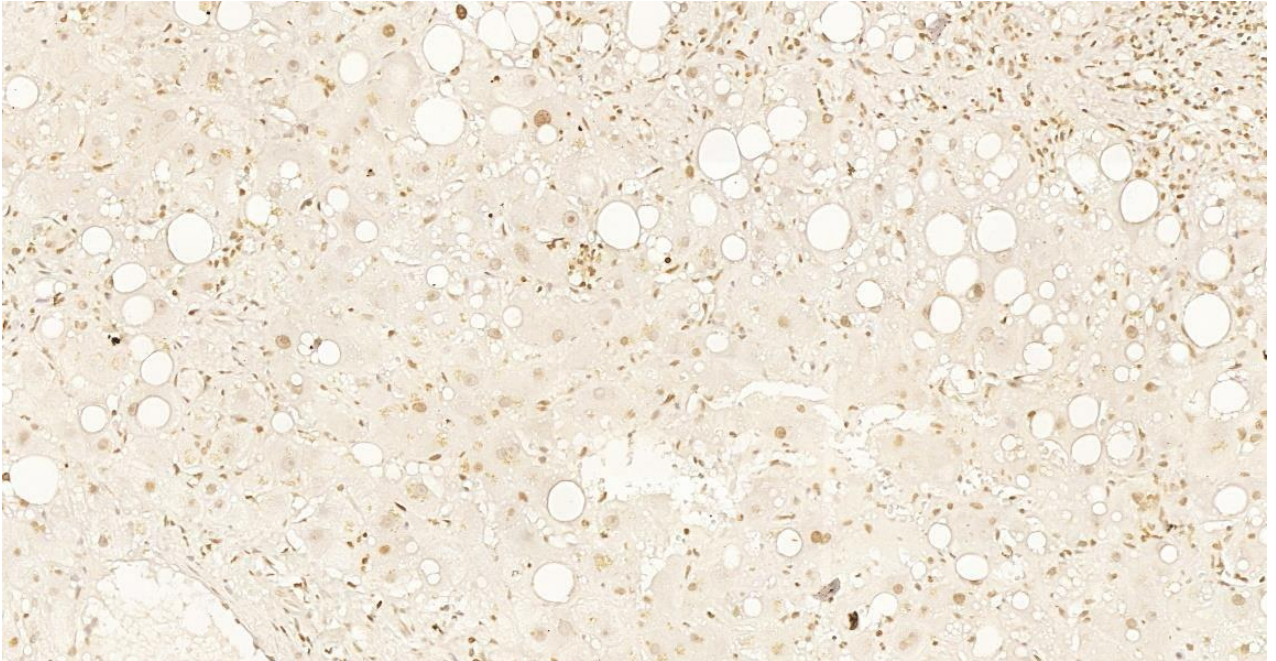


Figura 9 - Marcação nuclear de IGF-1R presente no parênquima cirrótico (aumento: 200x).

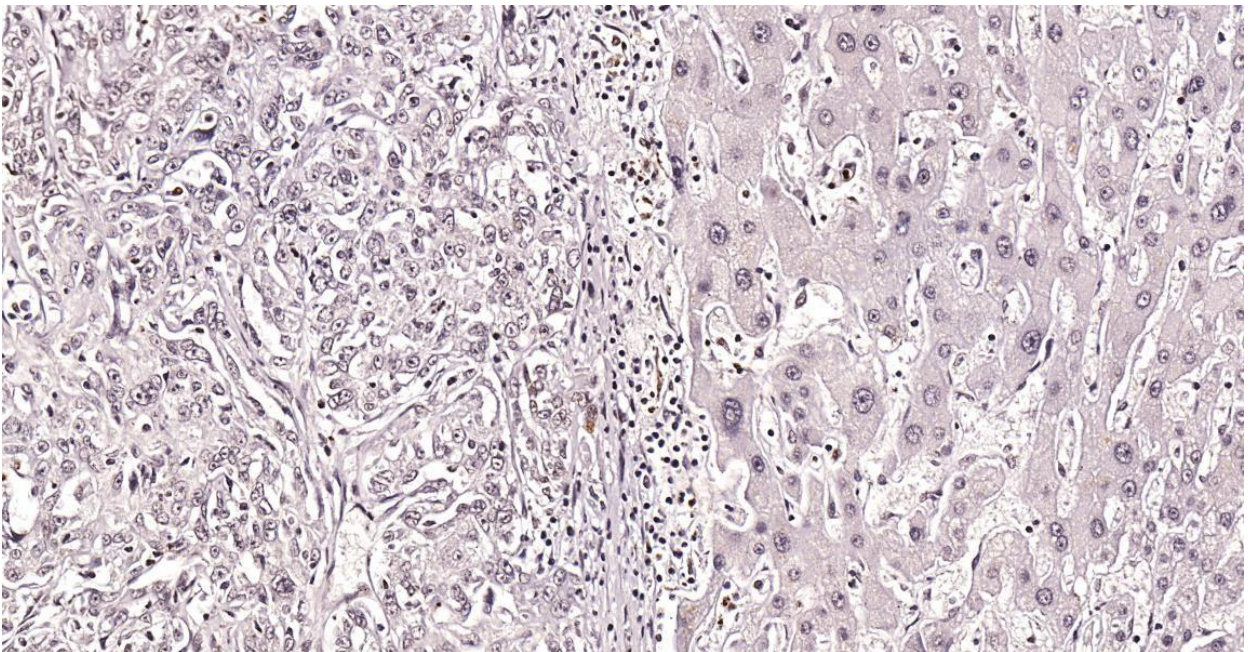


Figura 10 - Marcação nuclear de IGF-1R ausente no CHC (à esquerda) e ausente no parênquima cirrótico adjacente (à direita). Aumento de 100x.

Dos 38 casos positivos no tumor, sete (18,4%) tinham cirrose de etiologia criptogênica, sete (18,4%) de origem etanólica, seis (15,8%) por hepatite B, 16 (42,1%) por hepatite C, dois (5,3%) por NAFLD e nenhum caso de etiologia auto-imune e de hemocromatose. Desses casos, sete (18,4%) eram bem diferenciados e 31 (81,6%) eram moderadamente/pouco diferenciados.

Dos 13 casos positivos na cirrose, dois (15,4%) tinham etiologia criptogênica, um (7,7%) de

origem etanólica, seis (46,2%) por hepatite B, dois (15,4%) por hepatite C, dois (15,4%) por NAFLD e nenhum caso de etiologia auto-imune e de hemocromatose.

No modelo univariado, ao ser analisada a associação dos dados clínicos e anátomopatológicos com os achados imuno-histoquímicos, foi observada maior expressão nuclear de IGF-1R no tumor do que na cirrose ($p < 0,001$), maior expressão nuclear em casos de cirrose causada pelo HBV ($p < 0,002$), e maior expressão nuclear em tumores classificados como moderadamente/pouco diferenciados ($p < 0,001$).

No modelo multivariado, foi observada maior expressão nuclear de IGF-1R no tumor do que na cirrose ($p < 0,001$) e maior expressão nuclear em tumores classificados como moderadamente/pouco diferenciados ($p < 0,001$). Entretanto, não foi observada associação estatisticamente significativa entre a presença da imunexpressão e os casos de cirrose causados pelo HBV (0,999).

Não foi observada significância estatística na comparação da expressão nuclear no tumor em relação ao sexo ($p = 0,174$), idade no momento da cirurgia ($p = 0,512$), números de nódulos tumorais ($p = 0,978$), tamanho do maior nódulo ($p = 0,855$) presença de invasão vascular (0,604).

Não foi observada significância estatística na comparação da expressão nuclear no parênquima cirrótico em relação ao sexo ($p = 0,519$), idade no momento da cirurgia ($p = 0,119$), números de nódulos tumorais ($p = 0,978$), tamanho do maior nódulo ($p = 0,285$) presença de invasão vascular (0,643).

A mediana do valor sérico de AFP foi de 9,05 ng/ml (com intervalo interquartil de 3,89-49,85), não tendo sido observada significância estatística em relação a expressão nuclear de IGF-1R tumoral ou no parênquima cirrótico ($p = 0,790$ e $p = 0,736$, respectivamente). Nesse parâmetro, dos 111 pacientes, o dado estava disponível em 86.

A mediana do escore de MELD foi de 20 (e intervalo interquartil de 15-23), não tendo sido observada significância estatística em relação a expressão nuclear de IGF-1R nas amostras tumorais e cirróticas ($p = 0,893$ e $p = 0,491$, respectivamente). Nesse parâmetro, dos 111 pacientes, o dado estava disponível em 77.

As Tabelas 4 e 5 resumem as análises descritas acima.

Tabela 5 – Análise comparativa das características clínicas e anatomopatológicas de acordo com expressão nuclear de IGF-1R no CHC.

Variável	Expressão do nuclear de IGF-1R		Valor de <i>p</i>
	Ausente	Presente	
Diferenciação tumoral^a			< 0,001 *
Bem diferenciado	47 (42,3%)	7 (6,3%)	
Moderadamente/ pouco diferenciado	26 (23,4%)	31(27,9%)	
Invasão Vascular^b			0,659
Presente	5 (4,5%)	0(0%)	
Ausente	68(61,2%)	38 (34,2%)	
Número de nódulos^b			0,978
1	38 (34,2%)	21 (18,9%)	
2	18 (16,2%)	8 (7,2%)	
3	5 (4,5%)	1 (0,9%)	
4	6 (5,4%)	3 (2,7%)	
5	1 (0,9%)	1 (0,9%)	
7	1 (0,9%)	1 (0,9%)	
10 ou mais	4 (3,8%)	3 (2,7%)	
Etiologia^b			0,708
Hepatite C	33 (29,7%)	16 (14,4%)	
Criptogênica	12 (10,8%)	7 (6,3%)	
Etanólica	11 9,9	7 (6,3%)	
Hepatite B	12 (10,8%)	6(5,4%)	
Auto-imune	3(2,7%)	0 (0%)	
NAFLD	0 (0%)	3 (2,7%)	
Hemocromatose	2 (1,8%)	0 (0%)	
Tamanho do maior nódulo (cm)^c	3,0(1,2-4,0)	3,0 (1,16- 4,2)	0,855
Valor de MELD^{*c}	20 (14,75-24,0)	20 (7-32)	0,893
AFP (ng/ml)**^c	11,40 (3,97-42,55)	8,90 (3,55-56,55)	0,790

Os dados são expressos como números absolutos (porcentagem) ou mediana (intervalo interquartil). *Presença de associação significativa entre a expressão de IGF-1R e casos moderadamente/pouco diferenciados na análise univariada ** Escore obtido em 77 casos ***Nível sérico identificado em 86 casos. NAFLD doença hepática gordurosa não alcoólica; AFP- alfa-fetoproteína; MELD- *Model for end-stage liver disease*. Teste utilizado: ^aQui-quadrado. ^bExato de Fisher. ^cMann-Whitney.

Tabela 5 – Análise comparativa das características clínicas e anatomopatológicas de acordo com expressão nuclear de IGF-1R no parênquima cirrótico.

Variável	Expressão do nuclear de IGF-1R		Valor de <i>p</i>
	Ausente	Presente	
Diferenciação tumoral^a			0,300
Bem diferenciado	49 (44,14%)	5(4,5%)	
Moderadamente/ pouco diferenciado	49 (44,14%)	8 (7,2%)	
Invasão Vascular^b			1,000
Presente	5 (4,5%)	0 (0%)	
Ausente	93 (83,7%)	13 (11,7 %)	
Número de nódulos^b			0,603
1	52 (46,8%)	7 (6,3%)	
2	23 (20,7%)	3 (2,7%)	
3	6 (5,4%)	0 (0%)	
4	8 (7,2%)	1 (0,9%)	
5	1 (0,9%)	1 (0,9%)	
7	2 (1,8%)	0 (0%)	
10 ou mais	5 (4,5%)	2 (1,8%)	
Etiologia^b			0,003 *
Hepatite C	47 (42,3%)	2 (1,8%)	
Criptogênica	17 (15,3%)	2 (1,8%)	
Etanólica	17 (15,3%)	1 (0,9%)	
Hepatite B	12 (10,8%)	6 (5,4%)	
Auto-imune	3 (2,7%)	0 (0%)	
NAFLD	0 (0%)	2 (1,8%)	
Hemocromatose	2 (1,8%)	0 (0%)	
Tamanho do maior nódulo (cm)^c	3,0(2,0-4,0)	2,75 (2,0-4,2)	0,285
Valor de MELD^{*c}	20 (14,75-24,00)	16 (16-20)	0,491
AFP (ng/ml)^{**c}	9,05 (3,97-42,55)	25,50 (3,55-56,55)	0,736

Os dados são expressos como números absolutos (porcentagem) ou mediana (intervalo interquartil). *Presença de associação significativa entre a expressão de IGF-1R e etiologia hepatite B na análise univariada ** Escore obtido em 77 casos ***Nível sérico identificado em 86 casos. NAFLD doença hepática gordurosa não alcoólica; AFP- alfa-fetoproteína; MELD- *Model for end-stage liver disease*. Teste utilizado: ^aQui-quadrado. ^bExato de Fisher. ^cMann-Whitney

5.4– Análises de sobrevida

A recidiva do CHC foi identificada em 11 (10,7%) dos 102 pacientes que mantiveram o seguimento, embora também possa ter ocorrido em pacientes que foram a óbito, sem reconhecimento. A recorrência clinicamente comprovada seguida de óbito foi observada em oito pacientes. A taxa de eventos foi de 30,4% (31 recidivas ou óbitos por qualquer causa dos 102 pacientes analisados). Nove pacientes perderam o seguimento.

Não foi identificada diferença significativa entre a ocorrência dos eventos e o tempo livre de evento e a presença ou ausência de expressão nuclear de IGF-1R no CHC e no parênquima cirrótico.

As tabelas 6 e 7 resumem as análises descritas acima

Tabela 6 – Desfechos clínicos de acordo com a expressão nuclear de IGF-1R no CHC.

Variável	Expressão do nuclear de IGF-1R		Valor de <i>p</i>
	Ausente	Presente	
Recidiva	7/102 (6,8%)	4/102 (3,9%)	0,744
Óbitos	18/102(17,6%)	7/102 (6,8%)	0,684
Sobrevida livre de evento (meses)	49,0(12,0-109,5)	35,0(12,0-80,0)	0,249

Os dados são expressos como números absolutos (porcentagem) ou mediana (intervalo interquartil).

Tabela 7 – Desfechos clínicos de acordo com a expressão de IGF-1R no parênquima cirrótico.

Variável	Expressão do nuclear de IGF-1R		Valor de <i>p</i>
	Ausente	Presente	
Recidiva	8/102(7,8%)	3/102 (2,9%)	0,05
Óbitos	22/102 (21,5%)	3/102 (2,9%)	0,831
Sobrevida livre de evento (meses)	49,5(12,0-96,25)	26,5(15,0-72,0)	0,252

Os dados são expressos como números absolutos (porcentagem) ou mediana (intervalo interquartil).

Na análise de sobrevida, a mediana de sobrevida livre de evento foi de 65 meses. A taxa global de sobrevida livre de evento em 12 e 24 meses foi de 84,0% e 80,6%, respectivamente. Ao analisar a presença de imunopresença nuclear de IGF-1R no tumor e na cirrose, as curvas de Kaplan-Meier (Figuras 11 e 12) mostraram sobreposição ($p=0,667$ e $p=0,589$, respectivamente).

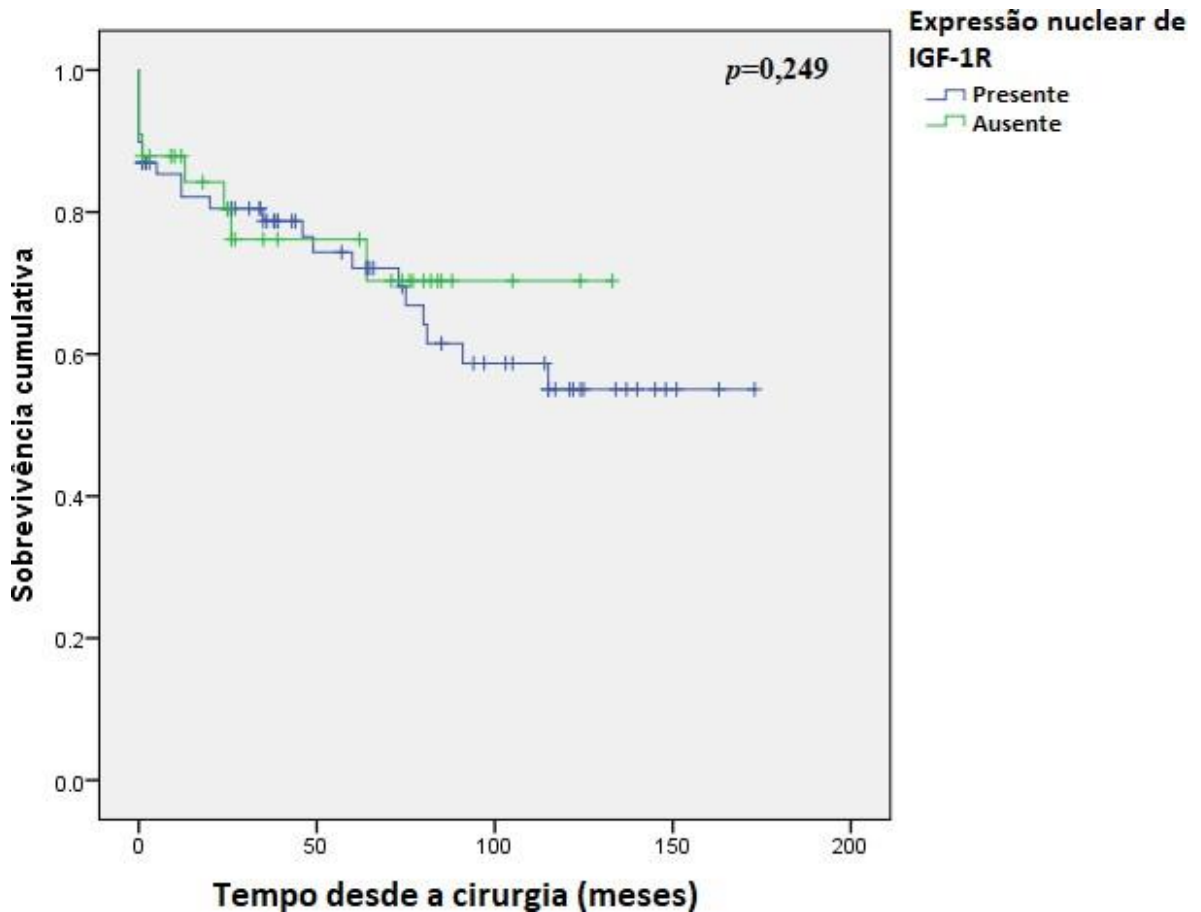


Figura 11 - Comparação das curvas de Kaplan-Meier entre pacientes com expressão nuclear de IGF-1R na região do CHC.

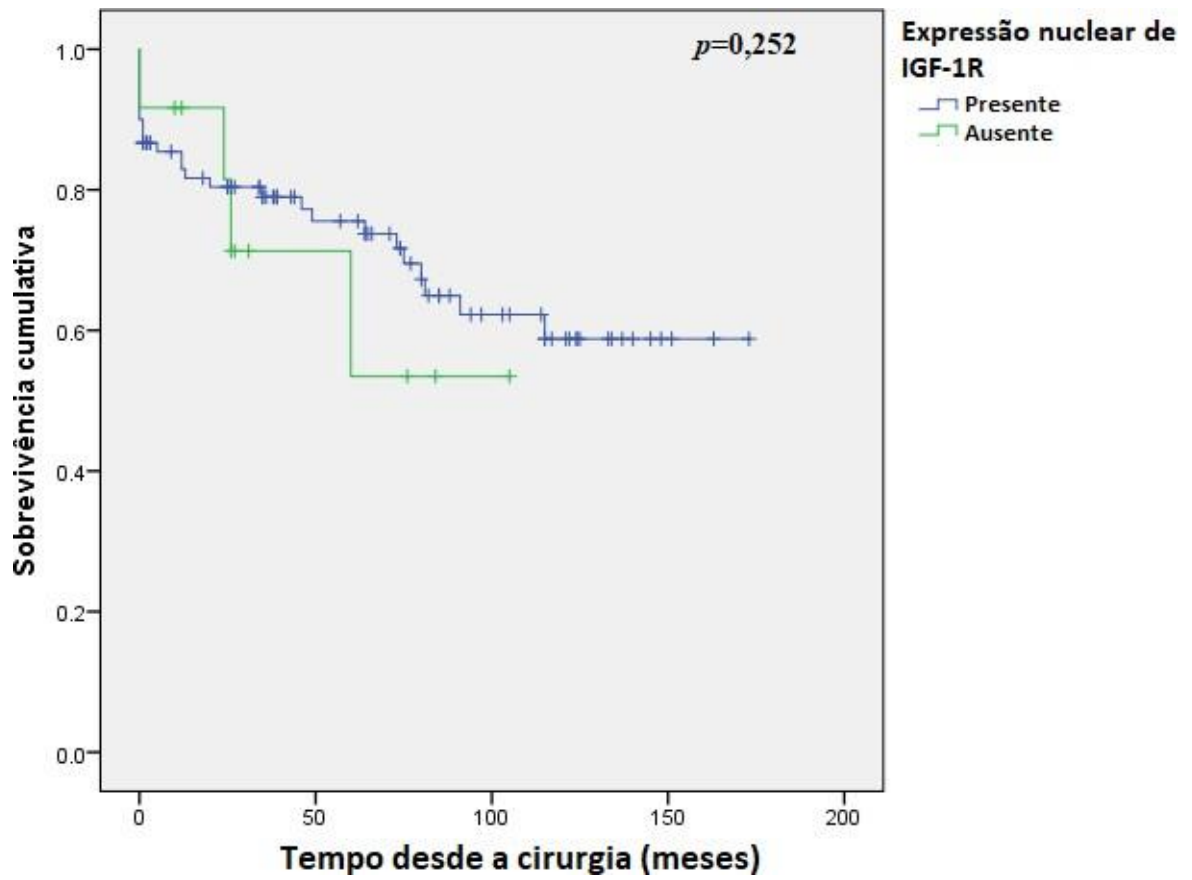


Figura 12 - Comparação das curvas de Kaplan-Meier entre pacientes com expressão nuclear de IGF-1R na região da cirrose.

6 – DISCUSSÃO

O carcinoma hepatocelular apresenta vários aspectos desafiadores, como por exemplo seus aspectos epidemiológicos e as grandes lacunas de conhecimento acerca de sua carcinogênese (PARADIS; FUKAYAMA; SCHIRMACHE, 2019), dessa forma, diversos estudos têm buscado melhor caracterizar os seus aspectos morfológicos, clínicos, etiológicos e sua carcinogênese, mas ainda são necessários mais avanços no entendimento desta doença tão complexa.

Reconhecido por seu papel na carcinogênese de diversas neoplasias, e também pelo envolvimento em importantes eventos celulares, bem como seu potencial envolvimento em mecanismos de resistência e, portanto, valor prognóstico, o IGF-1R tem se configurado como alvo potencial, que merece ser estudado no CHC. Muitos estudos demonstraram um papel importante da ativação do IGF-1R na hepatocarcinogênese, sendo observado o aumento dos seus níveis hepáticos no estágio pré-maligno e nas fases iniciais da hepatocarcinogênese em modelos animais, o que poderia indicar sua contribuição na proliferação e sobrevivência das células do CHC (SCHARF et al., 2000; ALEEM et al., 2011; YAN et al., 2013). Além disso, em estudo recente, Zhang *et al* observaram maior expressão de RNAm de IGF-1R em amostras CHC de pacientes com um pior prognóstico (ZHANG et al., 2019). Entretanto, no presente momento, ainda não foram publicados outros estudos que avaliem a expressão nuclear de IGF-1R no carcinoma hepatocelular e são escassos os estudos que correlacionam a expressão do receptor à parâmetros clínicos e histopatológicos.

Nesse contexto, nosso trabalho foi o primeiro a demonstrar a expressão nuclear desse receptor nos hepatócitos presentes em áreas de cirrose e de CHC, utilizando amostras obtidas em explantes hepáticos e hepatectomias parciais. Também é o primeiro a correlacionar essa expressão com dados anatomopatológicos (como grau de diferenciação tumoral, invasão angiolímfática, tamanho e número de focos neoplásicos), e clínicos, como a etiologia da cirrose, parâmetros indicativos da gravidade da hepatopatia subjacente, (escore MELD), além de dados laboratoriais.

O presente estudo propôs avaliar esse receptor com enfoque em uma característica que o destaca em relação a outros, que é sua capacidade de translocação nuclear. Característica esta, com potencial de ampliar os conhecimentos acerca dos mecanismos da hepatocarcinogênese e ainda

com potencial de se tornar um biomarcador prognóstico para o CHC. Nossa amostra corresponde a um n de 111 pacientes submetidos ao transplante hepático ou ressecção hepática parcial em um hospital escola na região Sudeste do Brasil entre os anos 2000 e 2020.

Ao avaliar as características demográficas da amostra do presente estudo, observamos um predomínio do CHC em pacientes do sexo masculino, com um percentual de 72,1%. Esse achado se aproxima à proporção entre os gêneros descrita para esse tumor mundialmente, que é de três homens para uma mulher (SIEGEL,2022). A mediana de idade dos pacientes deste estudo, de 58 anos, também corrobora os dados da literatura, tendo em vista o aumento da incidência da neoplasia em pacientes acima de 60 anos (LLOVET et al., 2021; RICH et al., 2020).

Em relação as etiologias da doença de base, nota-se, nesse estudo, predomínio da hepatite por HCV, totalizando 44,1% dos casos. Carrilho *at al*, ao coletarem dados sobre pacientes portadores de CHC em 29 centros de saúde em quatro regiões do Brasil (sudeste, sul, nordeste e norte), identificaram também um predomínio de casos cuja etiologia era por HCV, totalizando 39% da sua amostra. Na literatura mundial, a hepatopatia causada pelo HCV configura como umas das principais etiologias de CHC, juntamente com a hepatite B e com a causa etanólica. (CARRILHO et al., 2010; LLOVET et al., 2021; PARADIS; FUKAYAMA; SCHIRMACHE, 2019).

Embora a hepatite B também se configure como uma das principais causas de CHC no mundo, no presente estudo, representava menos da metade do número de casos cuja etiologia era a hepatite C. Esse menor número de casos pode ser explicado pela campanha de vacinação contra HBV realizada pelo sistema público de saúde brasileiro, assim como pela melhoria do acesso ao tratamento antirretroviral (SOUTO et al., 2015).

Sobre os aspectos anatomopatológicos, foram avaliados o grau de diferenciação tumoral, quantidade de nódulos, tamanho do maior nódulo e a presença ou ausência de invasão vascular. Esses dados são importantes parâmetros a serem avaliados para estabelecimento do estadiamento patológico (AMIN et al.,2017). Neste estudo, 51,4% dos casos foram considerados como de baixo grau, segundo os critérios da OMS (PARADIS; FUKAYAMA; SCHIRMACHE, 2019), 93,6% não apresentavam invasão vascular identificada, 53,2% apresentavam nódulo único e a mediana de tamanho do maior nódulo foi de 3,0 cm. No Brasil,

a indicação de transplante hepático para tratamento do CHC baseia-se nos critérios de Milão, onde pacientes portadores de nódulos únicos de tamanho menor ou igual a 5,0 cm ou até três nódulos de até 3,0 cm são candidatos ideais para sua realização (GALLE et al., 2018). Entretanto, para a realização do nosso estudo foram utilizadas amostras de pacientes submetidos ao transplante, como também à ressecção hepática parcial, o que permitiu avaliar casos com maior número de nódulos (chegando até 11 lesões) e com nódulos maiores (chegando até 32,0 cm). Além disso, outra questão importante é que os critérios de Milão são baseados em dados radiológicos, que nem sempre conseguem identificar nódulos muito pequenos, que posteriormente são visualizados no exame anatomopatológico (PARK et al., 2017).

O escore MELD, atualmente utilizado como um preditor de mortalidade pré-operatória em pacientes com doença hepática avançada, apresentou mediana de 20 pontos. Esse valor pode refletir a pontuação especial, já que os pacientes portadores de CHC já recebem pelo menos 20 pontos ao serem inscritos na fila de transplante, como forma de serem legalmente priorizados para receberem órgão, já que uma longa espera pode significar progressão da doença (BRASIL, 2009).

A dosagem sérica de AFP é considerada como um dos marcadores para rastreamento e prognóstico do CHC, por isso sua avaliação é de grande importância no presente estudo (ATAIDE et al., 2011; ZHANG et al., 2020). Entretanto não foi observada correlação com os a expressão nuclear de IGF-1R no CHC com os níveis de AFP. Isso pode ser explicado pois a mediana dos níveis séricos de AFP foi baixa nesse estudo, com o valor de 9,05 ng/mL; com apenas 14 pacientes apresentando níveis acima de 100 ng/mL (16,3%). No entanto, vale ressaltar que, durante a revisão dos prontuários, somente 86 pacientes, dos 111 estudados, apresentavam registro dos níveis séricos de AFP. Além disso, alguns estudos realizados no Brasil, exibem uma maioria de pacientes com valores abaixo de 100 ng/mL, como no estudo Carrilho *et al* que identificaram valores de AFP menores que 100 ng/mL na maioria dos pacientes estudados (56,9%), e no estudo de Ataide *et al* que identificaram valores menores ou iguais a 200 ng/mL em 93,3% dos casos (ATAIDE et al., 2011; CARRILHO et al., 2010).

Outra questão que deve ser levada em conta, é que a causa da hepatopatia crônica mais frequentes no nosso estudo foi a hepatite C. Os casos de CHC cuja etiologia da doença hepática de base é o HCV, geralmente estão associados a um subtipo molecular não proliferativo. Tumores dessa classe exibem, além de um comportamento menos agressivo, menores índices

de AFP, o que poderia explicar os valores mais baixos observados em nosso estudo (ZUCMAN-ROSSI et al., 2015).

No presente estudo, foi observada expressão nuclear de IGF-1R em 38 amostras (34,2%) considerando as células tumorais e em 13 amostras (11,7 %) no parênquima cirrótico adjacente ao tumor. Interessante mencionar que, dessas 13 amostras em que o IGF-1R era expresso na cirrose, 11 também eram positivas no tumor. Esses dados indicam uma maior expressão nuclear de IGF-1R na neoplasia do que nas áreas de cirrose, e sugere que essa hiperexpressão pode ser um evento inicial da sequência: cirrose - nódulos displásicos - CHC. Embora, até o presente momento, não tenham outros estudos que avaliem a imunoposição nuclear de IGF-1R no CHC, nossos achados apresentam semelhança com os de Zhang *et al*, onde foi avaliada a expressão imuno-histoquímica membranar do receptor em amostras de pacientes com CHC na região do tumor e no parênquima hepático adjacente. Nesse estudo foi identificada uma marcação positiva em 72,06% das amostras de CHC e em 22,06% no parênquima adjacente, indicando uma maior expressão membranar significativa no CHC (ZHANG et al., 2019).

Yan *et al* observaram também, ao analisarem modelos animais, um aumento da expressão de RNAm de IGF-1R e de IGF-1R em diferentes estágios de transformação maligna do CHC, identificando níveis cada vez maiores à medida que ocorre o avanço do fígado normal para um estado pré-canceroso e por fim para o CHC (YAN et al., 2013).

Juntos, esses achados poderiam sugerir que o IGF-1R e seus ligantes teriam um papel chave nas etapas da hepatocarcinogênese, estimulando uma proliferação dos hepatócitos na fase pré-cancerosa e nas fases iniciais, por meio de um mecanismo parácrino e posteriormente, na proliferação das células malignas, induzida pelo mecanismo autócrino, na sequência de eventos indicada no estudo de Voci *et al* (VOCI et al., 1999). Além desses efeitos, a translocação nuclear poderia contribuir ainda mais na proliferação celular, assim como foi demonstrado pelo estudo de Warsito *et al*, em que foi observado que o IGF-1R nuclear tinha a capacidade de se associar com o LEF1 no núcleo das células, o que poderia levar a um aumento nos níveis de ciclina D1, sugerindo que o IGF-1R nuclear poderia ser responsável pela progressão aberrante do ciclo celular, corroborando com a carcinogênese (WARSITO et al., 2012).

Outro importante papel da expressão nuclear de IGF-1R, que tem sido cada vez mais

caracterizado, é como determinante prognóstico. No estudo de Aleksic *et al*, a expressão nuclear de IGF-1R foi associada a piores desfechos clínicos no câncer renal (ALEKSIC *et al.*, 2010). Codony-Servat *et al* identificaram, em pacientes com carcinoma colorretal metastático, que aqueles que exibiam expressão nuclear do receptor na neoplasia apresentaram sobrevida global mais baixa (CODONY-SERVAT *et al.*, 2017). No estudo de Zhang *et al*, foi identificado um pior prognóstico, nos pacientes que expressavam níveis mais altos de RNAm de IGF-1R nas células do hepatocarcinoma (ZHANG *et al.*, 2019).

Um importante fator prognóstico já bem estabelecido no CHC é a presença de invasão vascular, sendo utilizada inclusive para avaliação do estadiamento do CHC, segundo o protocolo do *American Joint Comitee on Cancer* (AMIN *et al.*, 2017). No estudo realizado por Kang *et al*, não foi identificada correlação entre a expressão membranar de IGF-1R no CHC e a presença ou ausência de invasão angiolímfática, assim como no estudo realizado por Lin *et al* (KANG *et al.*, 2014; LIN *et al.*, 2017). Nosso estudo também não observou associação entre presença de invasão vascular e a expressão nuclear de IGF-1R. Entretanto, vale ressaltar que dos 111 casos avaliados, foi detectada invasão vascular em apenas cinco casos.

Sabe-se que o grau de diferenciação tumoral possui correlação com o comportamento mais agressivo da neoplasia e conseqüentemente com um pior prognóstico. Em estudo realizado por Tamura *et al.*, foi identificado que o grau histológico de diferenciação do CHC, pode representar um fator prognóstico independente, uma vez que pacientes portadores de tumores de tamanhos variados, porém de baixo grau, apresentaram maiores taxas de sobrevida em três anos quando comparados a pacientes portadores de lesões de alto grau (TAMURA *et al.*, 2001). *Klntmalm* demonstrou que piores graus de diferenciação mostraram uma relação com tumores maiores, mais avançados e com maior taxa de recorrência, indicando uma associação importante com pior prognóstico adicionalmente a outros achados clínicos e anatomopatológicos (KLINTMALM, 1998).

No presente estudo, foi observada uma maior expressão nuclear de IGF-1R em tumores pouco e moderadamente diferenciados quando comparados aos tumores bem diferenciados. De forma semelhante, no estudo publicado por Kang *et al.*, foi observada também uma alta expressão imuno-histoquímica membranar de IGF-1R em CHCs com piores graus de diferenciação (KANG *et al.*, 2014). Dessa forma, a presença da expressão de IGF-1R por si só, ou por associação com outros critérios histopatológicos, podem indicar pior prognóstico. Assim,

podendo ser utilizada para tal finalidade, em associação com outros marcadores já estabelecidos, como por exemplo tamanho do tumor e invasão vascular.

Embora, nesse estudo, tenha sido identificada uma maior expressão nuclear de IGF-1R em amostras de CHC com um maior grau histológico e que o grau histológico tenha uma correlação com piores desfechos, a expressão do IGF-1R não esteve associada a piores desfechos clínicos. Foram observadas sobrevida global e sobrevida livre de evento semelhantes entre os grupos que expressaram ou não o receptor no núcleo das células tumorais e do parênquima cirrótico.

Vale destacar que o estágio dos pacientes da nossa amostra é mais inicial, uma vez que, em geral, apenas os pacientes em estágios mais iniciais são submetidos ao tratamento cirúrgico, não sendo indicado para aqueles com doença metastática, por exemplo. Ou seja, é possível que a translocação nuclear do IGF-1R possa ter esse impacto prognóstico quando avaliada em tumores com estágios mais avançados. Uma das limitações do nosso estudo que deve ser considerada também é que nem todos os pacientes mantiveram o seguimento até 2020, podendo ter ocorrido recidiva ou óbito sem o nosso conhecimento. Além disso, existem outras questões que interferem nos resultados que também devem ser levadas em conta, como as variações geográficas e a ocorrência de eventos epigenéticos que não são contemplados pela metodologia deste estudo. Certamente, isso deve ser mais investigado por outros estudos.

No estudo de *Zhang et al*, foi observada menor sobrevida em pacientes que expressavam maiores níveis de RNAm de IGF-1R no CHC (ZHANG et al., 2019). Entretanto uma das limitações desse estudo é que os níveis de RNAm não necessariamente refletem a expressão e ativação da proteína IGF-1R e muito menos sua localização nuclear. Entretanto esses achados indicam que o IGF-1R pode desempenhar um papel como indicador de prognóstico do CHC, principalmente no tocante ao grau de diferenciação tumoral, mas que ainda necessita de mais investigação e acompanhamento.

Assim como os estudos que avaliaram a expressão membranar de IGF-1R e de RNAm de IGF-1R no CHC, não obtivemos correlação estatística ao realizar a análise da expressão nuclear de IGF-1R no parênquima tumoral e cirrótico com os seguintes parâmetros: tamanho do maior nódulo tumoral e número de nódulos (ZHANG et al., 2019; KANG et al., 2014; LIN et al., 2017). Embora, no presente estudo tenham sido utilizadas amostras de resseção parcial, é importante destacar que a maioria dos casos (68,4%) são de pacientes submetidos ao

transplante hepático, com número e tamanho dos nódulos mais restritos, devido aos critérios de Milão utilizados para indicação de tal procedimento. Então seriam interessantes estudos que avaliassem essa expressão nuclear e casos com maior dimensão e número de nódulos tumorais

Em outro estudo do nosso grupo de pesquisa, foi identificada uma maior expressão das proteínas da via MAPK em CHCs cuja etiologia da hepatopatia crônica era viral. Sabe-se que a ativação dessa via pode ocorrer através da ligação do IGF-1R com seus ligantes (DINIZ et al., 2020). Então, a hiperexpressão IGF-1R, por si só, pode explicar alterações na hepatocarcinogênese como essa já demonstrada na etiologia viral. Muito já se sabe sobre a forte associação entre HBV, a cirrose e o CHC, entretanto estudos recentes têm demonstrado que a proteína X transativadora, expressa pelo HBV, pode ter um papel fundamental na hepatocarcinogênese, além de uma correlação com a maior probabilidade de metástases em pacientes portadores de CHC associado com HBV (LARA-PEZZI et al., 2001; LIU et al., 2012; WEI et al., 2008). Kim et al demonstraram ainda, que a proteína X transativadora pode promover um aumento da expressão de IGF-1R (Kim et al., 1996). Esses dados podem indicar um papel fundamental do IGF-1R na hepatocarcinogênese de etiologia viral. No presente estudo, foi identificada associação da expressão nuclear de IGF-1R na cirrose causada por HBV na análise univariada, não tendo sido observada na análise multivariada. Entretanto, esses achados, podem levantar hipóteses para a realização de estudos futuros que avaliem essa expressão em um maior número de pacientes portadores de CHC e cirrose tendo como etiologia o HBV.

No presente estudo, não foi identificada expressão nuclear significativa de IGF-1R no CHC e na cirrose causados pelas demais etiologias tanto na análise univariada e quanto na multivariada. Entretanto, os estudos que observaram a expressão de IGF-1R membranar em amostras de pacientes portadores de CHC, não avaliaram a frequência da sua expressão nas diferentes causas da hepatopatia de base, com exceção de um estudo que comparou sua expressão com a positividade para o antígeno de superfície da hepatite B (HBsAg), não obtendo correlação significativa (KANG et al., 2014; LIN et al., 2017; ZHANG et al., 2019). Além disso, alguns estudos têm mostrado a participação importante do IGF-2 na hepatocarcinogênese e na hepatopatia crônica causadas pelo HCV. Esses achados poderiam sugerir que talvez o papel do IGF-1R, na hepatocarcinogênese associada a hepatite C, ganhe maior destaque quando localizado na membrana, mediando as ações do IGF-2. Entretanto, mais estudos precisam ser realizados para avaliar melhor o papel do IGF-1R na hepatocarcinogênese e hepatopatia crônica causadas tanto pelo HCV como por outras etiologias. Por fim, cabe ressaltar ainda que, no

presente estudo, uma parte predominante das amostras foi de etiologia criptogênica. Portanto, o poder para avaliar a associação com as causas específicas pode não ter sido suficiente. São necessários mais estudos, com maior representatividade das diferentes etiologias.

Dentre as limitações do nosso estudo destacam-se as relacionadas ao tamanho da amostra e ao possível viés de informação, característicos de estudos retrospectivos. A coleta de dados ocorreu em prontuários físicos, utilizados antes da implementação dos prontuários eletrônicos, que possuem fragilidades no preenchimento de determinadas informações sobre exames laboratoriais, como os valores de AFP e demais exames utilizados no cálculo do score MELD, não sendo possível obter esses dados para todos os pacientes incluídos no estudo. Além disso, os pacientes submetidos à ressecção parcial, por não possuírem um acompanhamento clínico com a mesma frequência e rigor daqueles submetidos ao transplante hepático, acabavam frequentemente perdendo o seguimento (não retornando às consultas agendadas ou mesmo mudando acompanhamento para outras instituições), o que prejudicou a análise de sobrevida e avaliação dos desfechos

Em suma, os achados apresentados e discutidos demonstram que a translocação nuclear do IGF-1R parece estar envolvida na hepatocarcinogênese, principalmente em eventos mais precoces e quando associada a etiologia viral. Além disso, pode ter também um papel prognóstico, uma vez que esteve associada a características já reconhecidamente associadas à piores desfechos clínicos. Esses dados podem contribuir para novos esclarecimentos acerca da hepatocarcinogênese e lançar bases para desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas tão necessárias para o manejo dessa neoplasia tão agressiva, tendo como alvo esse receptor, seus ligantes e mecanismos que favoreçam a sua translocação.

7 – CONCLUSÃO

- Há imunoexpressão nuclear de IGF-1R no CHC e no parênquima cirrótico adjacente, com maior positividade significativamente estatística no tumor;
- Dentre os dados clínicos e laboratoriais, nenhuma variável apresentou associação independente com a imunoexpressão nuclear de IGF-1R no parênquima cirrótico e no tumor;
- Dentre os dados anatomopatológicos, a única variável independentemente associada com a imunoexpressão nuclear de IGF-1R no CHC foi o grau de diferenciação, com maior positividade nos tumores moderadamente/pouco diferenciado;
- Não foi observada associação significativa entre a imunoexpressão nuclear de IGF-1R no CHC e no parênquima cirrótico, com um desfecho clinicamente relevante.

8- PERSPECTIVAS

Os achados deste estudo quanto à associação entre a expressão nuclear de IGF-1R no CHC e no parênquima cirrótico com dados clínicos e anatomopatológicos apontam para a necessidade de mais pesquisas acerca desse receptor, com o objetivo de esclarecer em qual momento da hepatocarcinogênese ocorre a sua translocação, se esse evento contribui com a transformação maligna ou com piores prognósticos de uma neoplasia já estabelecida e investigar sua correlação com etiologias específicas de hepatopatias crônicas, principalmente as virais. Além disso, ainda são necessários mais estudos que investiguem como se dá a translocação desse receptor, suas etapas e substâncias envolvidas em tal processo.

Por fim, acreditamos que a investigação do papel da translocação nuclear do IGF-1R no carcinoma hepatocelular poderia ser melhor investigada com o intuito de utilizar a ocorrência desse evento como um critério prognóstico e avaliar o potencial efeito benéfico de inibidores das estruturas celulares que contribuem com esse processo no CHC

9 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMEK, Agnieszka *et al.* Insulin-Like Growth Factor (IGF) System in Liver Diseases. **International Journal Of Molecular Sciences**, [S.L.], v. 19, n. 5, p. 1308, 27 abr. 2018. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms19051308>.

ALEEM, Eiman *et al.* Upregulation of the Insulin Receptor and Type I Insulin-Like Growth Factor Receptor Are Early Events in Hepatocarcinogenesis. **Toxicologic Pathology**, [S.L.], v. 39, n. 3, p. 524-543, 16 mar. 2011. SAGE Publications. <http://dx.doi.org/10.1177/0192623310396905>.

ALEKSIC, Tamara *et al.* Type 1 Insulin-like Growth Factor Receptor Translocates to the Nucleus of Human Tumor Cells. **Cancer Research**, [S.L.], v. 70, n. 16, p. 6412-6419, 14 ago. 2010. American Association for Cancer Research (AACR). <http://dx.doi.org/10.1158/0008-5472.can-10-0052>.

AMIN, M.B *et al.* AJCC Cancer Staging Manual. 8th ed. New York: **Springer**; 2017.
ANNUNZIATA, Marta *et al.* The IGF system. **Acta Diabetologica**, [S.L.], v. 48, n. 1, p. 1-9, 2 nov. 2010. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00592-010-0227-z>.

ATAIDE, Elaine Cristina *et al.* Correlação do nível de alfa-feto proteína, índice de sobrevida e recidiva tumoral em pacientes submetidos a transplante hepático. **Abcd. Arquivos Brasileiros de Cirurgia Digestiva (São Paulo)**, [S.L.], v. 24, n. 1, p. 43-47, mar. 2011. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0102-67202011000100009>.

BODZIN, Adam S. *et al.* Gefitinib resistance in HCC mahlavu cells: upregulation of cd133 expression, activation of igf-1r signaling pathway, and enhancement of igf-1r nuclear translocation. **Journal Of Cellular Physiology**, [S.L.], v. 227, n. 7, p. 2947-2952, 20 mar. 2012. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/jcp.23041>

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria no 1.160, de 29 de maio de 2006. Modifica os critérios de distribuição de fígado de doadores cadáveres para transplante, implantando o critério de gravidade de estado clínico do paciente. Diário Oficial da União, Brasília (DF); 2006 Mai 31. PORTARIA Nº 2.600, DE 21 DE OUTUBRO DE 2009 Aprova o Regulamento Técnico do Sistema Nacional de Transplantes.

BRESSAC, Brigitte *et al.* Selective G to T mutations of p53 gene in hepatocellular carcinoma from southern Africa. **Nature**, [S.L.], v. 350, n. 6317, p. 429-431, abr. 1991. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/350429a0>.

BRUIX, Jordi *et al.* Hepatocellular carcinoma: clinical frontiers and perspectives. **Gut**, [S.L.], v. 63, n. 5, p. 844-855, 14 fev. 2014. BMJ. <http://dx.doi.org/10.1136/gutjnl-2013-306627>.

BRUIX, Jordi *et al.* Regorafenib for patients with hepatocellular carcinoma who progressed on sorafenib treatment (RESORCE): a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. **The Lancet**, [S.L.], v. 389, n. 10064, p. 56-66, jan. 2017. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736\(16\)32453-9](http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736(16)32453-9).

BURT, Alastair D *et al.* Data set for the reporting of intrahepatic cholangiocarcinoma, perihilar cholangiocarcinoma and hepatocellular carcinoma: recommendations from the international collaboration on cancer reporting (iccr). **Histopathology**, [S.L.], v. 73, n. 3, p. 369-385, 30 maio 2018. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/his.13520>.

CHEN, Chiao-Wen *et al.* Inhibition of stilbene estrogen-induced cell proliferation of renal epithelial cells through the modulation of insulin-like growth factor-I receptor expression. **Cancer Letters**, [S.L.], v. 105, n. 1, p. 51-59, jul. 1996. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0304-3835\(96\)04263-2](http://dx.doi.org/10.1016/0304-3835(96)04263-2).

CHIRILLO, P *et al.* Hepatitis B virus pX activates NF-kappa B-dependent transcription through a Raf-independent pathway. **Journal Of Virology**, [S.L.], v. 70, n. 1, p. 641-646, jan. 1996. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/jvi.70.1.641-646.1996>.

CHITNIS, Meenali M. *et al.* The Type 1 Insulin-Like Growth Factor Receptor Pathway. **Clinical Cancer Research**, [S.L.], v. 14, n. 20, p. 6364-6370, 15 out. 2008. American Association for Cancer Research (AACR). <http://dx.doi.org/10.1158/1078-0432.ccr-07-4879>.

CODONY-SERVAT, Jordi *et al.* Nuclear IGF-1R predicts chemotherapy and targeted therapy resistance in metastatic colorectal cancer. **British Journal Of Cancer**, [S.L.], v. 117, n. 12, p. 1777-1786, 9 nov. 2017. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/bjc.2017.279>.

DESBOIS-MOUTHON, Christèle *et al.* Insulin-Like Growth Factor-1 Receptor Inhibition Induces a Resistance Mechanism via the Epidermal Growth Factor Receptor/HER3/AKT Signaling Pathway: rational basis for cotargeting insulin-like growth factor-1 receptor and epidermal growth factor receptor in hepatocellular carcinoma. **Clinical Cancer Research**, [S.L.], v. 15, n. 17, p. 5445-5456, 31 ago. 2009. American Association for Cancer Research (AACR). <http://dx.doi.org/10.1158/1078-0432.ccr-08-2980>.

DINIZ, Paulo H. C. *et al.* Expression of MAPK and PI3K/AKT/mTOR Proteins according to the Chronic Liver Disease Etiology in Hepatocellular Carcinoma. **Journal Of**

Oncology, [S.L.], v. 2020, p. 1-9, 29 out. 2020. Hindawi Limited. <http://dx.doi.org/10.1155/2020/4609360>.

EDMONDSON, Hugh A.; STEINER, Paul E. Primary carcinoma of the liver. A study of 100 cases among 48,900 necropsies. **Cancer**, [S.L.], v. 7, n. 3, p. 462-503, maio 1954. Wiley. [http://dx.doi.org/10.1002/1097-0142\(195405\)7:33.0.co;2-e](http://dx.doi.org/10.1002/1097-0142(195405)7:33.0.co;2-e).

EL-SERAG, Hashem B. *et al.* Hepatocellular Carcinoma: epidemiology and molecular carcinogenesis. **Gastroenterology**, [S.L.], v. 132, n. 7, p. 2557-2576, jun. 2007. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1053/j.gastro.2007.04.061>.

EL-SERAG, Hashem B. *et al.* Hepatocellular carcinoma: recent trends in the united states. **Gastroenterology**, [S.L.], v. 127, n. 5, p. 27-34, nov. 2004. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1053/j.gastro.2004.09.013>

FARAZI, Paraskevi A *et al.* Differential impact of telomere dysfunction on initiation and progression of hepatocellular carcinoma. **Cancer research**, v. 63, n.16, p. 5021-5027.2003. PMID: 12941829

GALLE, Peter R. *et al.* EASL Clinical Practice Guidelines: management of hepatocellular carcinoma. **Journal Of Hepatology**, [S.L.], v. 69, n. 1, p. 182-236, jul. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhep.2018.03.019>.

GUERARD, Marie *et al.* Nuclear translocation of IGF1R by intracellular amphiregulin contributes to the resistance of lung tumour cells to EGFR-TKI. **Cancer Letters**, [S.L.], v. 420, p. 146-155, abr. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.canlet.2018.01.080>

GUERRERO, Ruben Bonilla *et al.* The role of hepatitis B virus integrations in the pathogenesis of human hepatocellular carcinoma. **Journal Of Hepatology**, [S.L.], v. 42, n. 5, p. 760-777, maio 2005. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhep.2005.02.005>.

GUICHARD, Cécile *et al.* Integrated analysis of somatic mutations and focal copy-number changes identifies key genes and pathways in hepatocellular carcinoma. **Nature Genetics**, [S.L.], v. 44, n. 6, p. 694-698, 6 maio 2012. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/ng.2256>

HÖPFNER, Michael *et al.* Blockade of IGF-1 receptor tyrosine kinase has antineoplastic effects in hepatocellular carcinoma cells. **Biochemical Pharmacology**, [S.L.], v. 71, n. 10, p. 1435-1448, maio 2006. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bcp.2006.02.006>.

HSU, I. C. *et al.* Mutational hot spot in the p53 gene in human hepatocellular carcinomas. **Nature**, [S.L.], v. 350, n. 6317, p. 427-428, abr. 1991. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/350427a0>.

IBRAHIM, Yasir H *et al.* Insulin-like growth factor-I and cancer risk. **Growth Hormone & Igf Research**, [S.L.], v. 14, n. 4, p. 261-269, ago. 2004. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ghir.2004.01.005>

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. Atlas On-line de Mortalidade. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/MortalidadeWeb/pages/Modelo01/consultar.xhtml;jsessionid=3E067C6C0DBB54D16FCFDA4A2AC687>. Acesso em.25/07/2022

JENKINS, Pj *et al.* Evidence for a link between IGF-I and cancer. **European Journal Of Endocrinology**, [S.L.], p. 17-22, 1 ago. 2004. Bioscientifica. <http://dx.doi.org/10.1530/eje.0.151s017>.

JONAS, S *et al.* Vascular invasion and histopathologic grading determine outcome after liver transplantation for hepatocellular carcinoma in cirrhosis. **Hepatology**, [S.L.], v. 33, n. 5, p. 1080-1086, maio 2001. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1053/jhep.2001.23561>

KAMATH, P *et al.* A model to predict survival in patients with end-stage liver disease. **Hepatology**, [S.L.], v. 33, n. 2, p. 464-470, fev. 2001. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1053/jhep.2001.22172>.

KANG, Gu Hyum *et al.* Prognostic Significance of p53, mTOR, c-Met, IGF-1R, and HSP70 Overexpression after the Resection of Hepatocellular Carcinoma. **Gut And Liver**, [S.L.], v. 8, n. 1, p. 79-87, 15 jan. 2014. The Editorial Office of Gut and Liver. <http://dx.doi.org/10.5009/gnl.2014.8.1.79>.

KIM, S. O. *et al.* Increased expression of the insulin-like growth factor I (IGF-I) receptor gene in hepatocellular carcinoma cell lines: implications of IGF-I receptor gene activation by hepatitis B virus X gene product. **Cancer research**, v. 56, n.16, p. 3831-3836, 1996.

KLINTMALM, Goran B. Liver Transplantation for Hepatocellular Carcinoma. **Annals Of Surgery**, [S.L.], v. 228, n. 4, p. 479-490, out. 1998. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). <http://dx.doi.org/10.1097/00000658-199810000-00005>.

LAN, Keng-Hsin *et al.* HCV NS5A interacts with p53 and inhibits p53-mediated apoptosis. **Oncogene**, [S.L.], v. 21, n. 31, p. 4801-4811, 9 jul. 2002. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/sj.onc.1205589>.

LANG, Hauke *et al.* Survival and Recurrence Rates after Resection for Hepatocellular Carcinoma in Noncirrhotic Livers. **Journal Of The American College Of Surgeons**, [S.L.], v. 205, n. 1, p. 27-36, jul. 2007. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). <http://dx.doi.org/10.1016/j.jamcollsurg.2007.03.002>

LARA-PEZZI, Enrique *et al.* Effect of the hepatitis B virus HBx protein on integrin-mediated adhesion to and migration on extracellular matrix. **Journal Of Hepatology**,

[S.L.], v. 34, n. 3, p. 409-415, mar. 2001. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0168-8278\(00\)00090-8](http://dx.doi.org/10.1016/s0168-8278(00)00090-8).

LEROITH, Derek *et al.* Insulin-like growth factors: ligands, binding proteins, and receptors. **Molecular Metabolism**, [S.L.], v. 52, p. 101245, out. 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.molmet.2021.101245>

LEROITH, Derek *et al.* The insulin-like growth factor system and cancer. **Cancer Letters**, [S.L.], v. 195, n. 2, p. 127-137, jun. 2003. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0304-3835\(03\)00159-9](http://dx.doi.org/10.1016/s0304-3835(03)00159-9).

LIN, Song-Bai *et al.* Expression of GRK2 and IGF1R in hepatocellular carcinoma: clinicopathological and prognostic significance. **Journal Of Clinical Pathology**, [S.L.], v. 70, n. 9, p. 754-759, 15 fev. 2017. BMJ. <http://dx.doi.org/10.1136/jclinpath-2016-203998>.

LIU, Haiou *et al.* Hepatitis B virus X protein promotes hepatoma cell invasion and metastasis by stabilizing Snail protein. **Cancer Science**, [S.L.], v. 103, n. 12, p. 2072-2081, 18 out. 2012. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/cas.12017>.

LIU, Li *et al.* Sorafenib Blocks the RAF/MEK/ERK Pathway, Inhibits Tumor Angiogenesis, and Induces Tumor Cell Apoptosis in Hepatocellular Carcinoma Model PLC/PRF/5. **Cancer Research**, [S.L.], v. 66, n. 24, p. 11851-11858, 15 dez. 2006. American Association for Cancer Research (AACR). <http://dx.doi.org/10.1158/0008-5472.can-06-1377>.

LLOVET, Josep M. *et al.* Hepatocellular carcinoma. **Nature Reviews Disease Primers**, [S.L.], v. 7, n. 1, p. 1-1, 21 jan. 2021. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41572-020-00240-3>.

LLOVET, Josep M. *et al.* Intention-to-treat analysis of surgical treatment for early hepatocellular carcinoma: resection versus transplantation. **Hepatology**, [S.L.], v. 30, n. 6, p. 1434-1440, dez. 1999. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/hep.510300629>.

LLOVET, Josep M. *et al.* Sorafenib in Advanced Hepatocellular Carcinoma. **New England Journal Of Medicine**, [S.L.], v. 359, n. 4, p. 378-390, 24 jul. 2008. Massachusetts Medical Society. <http://dx.doi.org/10.1056/nejmoa0708857>.

LU, Li-Chun *et al.* Tumor Heterogeneity in Hepatocellular Carcinoma: facing the challenges. **Liver Cancer**, [S.L.], v. 5, n. 2, p. 128-138, 2016. S. Karger AG. <http://dx.doi.org/10.1159/000367754>.

MORAES, Ana Claudia Oliveira de *et al.* THE IMPACT OF THE MELD SCORE ON LIVER TRANSPLANT ALLOCATION AND RESULTS: an integrative review. **Abcd.**

Arquivos Brasileiros de Cirurgia Digestiva (São Paulo), [S.L.], v. 30, n. 1, p. 65-68, mar. 2017. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/0102-6720201700010018>.

NAKAE, Jun *et al.* Distinct and Overlapping Functions of Insulin and IGF-I Receptors. **Endocrine Reviews**, [S.L.], v. 22, n. 6, p. 818-835, 1 dez. 2001. The Endocrine Society. <http://dx.doi.org/10.1210/edrv.22.6.0452>.

PARADIS, Valerie. FUKAYAMA, Masashi. SCHIRMACHE, Peter. WHO Classification of Tumors: Digestive System Tumours. Tumours of the liver and intrahepatic bile ducts, 5th ed, Lyon, France: **International Agency for Research on Cancer**; 2019.

PARK, Hyun Jeong *et al.* How to Differentiate Borderline Hepatic Nodules in Hepatocarcinogenesis: emphasis on imaging diagnosis. **Liver Cancer**, [S.L.], v. 6, n. 3, p. 189-203, 2017. S. Karger AG. <http://dx.doi.org/10.1159/000455949>.

PODLECKI, D.A. *et al.* Nuclear translocation of the insulin receptor. A possible mediator of insulin's long term effects. **Journal Of Biological Chemistry**, [S.L.], v. 262, n. 7, p. 3362-3368, mar. 1987. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0021-9258\(18\)61511-x](http://dx.doi.org/10.1016/s0021-9258(18)61511-x).

POLLAK, Michael *et al.* The insulin and insulin-like growth factor receptor family in neoplasia: an update. **Nature Reviews Cancer**, [S.L.], v. 12, n. 3, p. 159-169, 16 fev. 2012. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nrc3215>.

REIG, Maria *et al.* BCLC strategy for prognosis prediction and treatment recommendation: the 2022 update. **Journal Of Hepatology**, [S.L.], v. 76, n. 3, p. 681-693, mar. 2022. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhep.2021.11.018>

REMMELE, W; STEGNER H.E. Recommendation for uniform definition of an immunoreactive score (IRS) for immunohistochemical estrogen receptor detection (ER-ICA) in breast cancer tissue. *Pathologe*. 1987 May;8(3):138-40. German. PMID: 3303008

RICH, Nicole E. *et al.* Hepatocellular Carcinoma Incidence Is Decreasing Among Younger Adults in the United States. **Clinical Gastroenterology And Hepatology**, [S.L.], v. 18, n. 1, p. 242-248, jan. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cgh.2019.04.043>.

RICH, Nicole *et al.* Hepatocellular carcinoma tumour markers: current role and expectations. **Best Practice & Research Clinical Gastroenterology**, [S.L.], v. 28, n. 5, p. 843-853, out. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bpg.2014.07.018>.

RODRÍGUEZ-PERÁLVAREZ, Manuel *et al.* A Systematic Review of Microvascular Invasion in Hepatocellular Carcinoma: diagnostic and prognostic variability. **Annals Of**

Surgical Oncology, [S.L.], v. 20, n. 1, p. 325-339, 13 nov. 2012. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1245/s10434-012-2513-1>

ROSKAMS, Tania *et al.* Pathology of Early Hepatocellular Carcinoma: conventional and molecular diagnosis. **Seminars In Liver Disease**, [S.L.], v. 30, n. 01, p. 017-025, fev. 2010. Georg Thieme Verlag KG. <http://dx.doi.org/10.1055/s-0030-1247129>.

SARFSTEIN, Rive *et al.* Minireview: nuclear insulin and insulin-like growth factor-1 receptors. **Endocrinology**, [S.L.], v. 154, n. 5, p. 1672-1679, 18 mar. 2013. The Endocrine Society. <http://dx.doi.org/10.1210/en.2012-2165>.

SATYANARAYANA, Ande *et al.* Telomeres and telomerase: a dual role in hepatocarcinogenesis. **Hepatology**, [S.L.], v. 40, n. 2, p. 276-283, 2004. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/hep.20308>.

SCHARF, J. *et al.* Characterization of the insulin-like growth factor axis in a human hepatoma cell line (PLC). **Carcinogenesis**, [S.L.], v. 19, n. 12, p. 2121-2128, 1 dez. 1998. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/carcin/19.12.2121>.

SCHARF, Jens-Gerd *et al.* Analysis of the IGF Axis in Preneoplastic Hepatic Foci and Hepatocellular Neoplasms Developing after Low-Number Pancreatic Islet Transplantation into the Livers of Streptozotocin Diabetic Rats. **Laboratory Investigation**, [S.L.], v. 80, n. 9, p. 1399-1411, set. 2000. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/labinvest.3780147>.

SCHMITZ, Klaus Juergen *et al.* Activation of the ERK and AKT signalling pathway predicts poor prognosis in hepatocellular carcinoma and ERK activation in cancer tissue is associated with hepatitis C virus infection. **Journal Of Hepatology**, [S.L.], v. 48, n. 1, p. 83-90, jan. 2008. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhep.2007.08.018>.

SHIN, Jung Woo *et al.* Molecular targeted therapy for hepatocellular carcinoma: current and future. **World Journal Of Gastroenterology**, [S.L.], v. 19, n. 37, p. 6144, 2013. Baishideng Publishing Group Inc. <http://dx.doi.org/10.3748/wjg.v19.i37.6144>.

SIEGEL, Rebecca L.; MILLER, Kimberly D.; FUCHS, Hannah E.; JEMAL, Ahmedin. Cancer statistics, 2022. **Ca: A Cancer Journal for Clinicians**, [S.L.], v. 72, n. 1, p. 7-33, jan. 2022. Wiley. <http://dx.doi.org/10.3322/caac.21708>.

SILVA, Mauricio F. *et al.* Criteria for liver transplantation for HCC: what should the limits be?. **Journal Of Hepatology**, [S.L.], v. 55, n. 5, p. 1137-1147, nov. 2011. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhep.2011.05.012>.

SOUTO, Francisco José Dutra *et al.* Distribution of hepatitis B infection in Brazil: the epidemiological situation at the beginning of the 21 st century. **Revista da Sociedade**

Brasileira de Medicina Tropical, [S.L.], v. 49, n. 1, p. 11-23, 22 dez. 2015. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/0037-8682-0176-2015>.

SUN, Hongzhi *et al.* Insulin-Like Growth Factor I Receptor Signaling and Nuclear Translocation of Insulin Receptor Substrates 1 and 2. **Molecular Endocrinology**, [S.L.], v. 17, n. 3, p. 472-486, 1 mar. 2003. The Endocrine Society. <http://dx.doi.org/10.1210/me.2002-0276>.

SUNG, Wing-Kin *et al.* Genome-wide survey of recurrent HBV integration in hepatocellular carcinoma. **Nature Genetics**, [S.L.], v. 44, n. 7, p. 765-769, 27 maio 2012. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/ng.2295>.

Tamura, S. *et al.* Impact of histological grade of hepatocellular carcinoma on the outcome of liver transplantation. **Archives of surgery**, Chicago, v. 136, n. 1, p. 25–31, Jan. 2001.

TANDON, Puneeta *et al.* Prognostic indicators in hepatocellular carcinoma: a systematic review of 72 studies. **Liver International**, [S.L.], v. 29, n. 4, p. 502-510, 10 mar. 2009. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1478-3231.2008.01957.x>.

TOTOKI, Yasushi *et al.* High-resolution characterization of a hepatocellular carcinoma genome. **Nature Genetics**, [S.L.], v. 43, n. 5, p. 464-469, 17 abr. 2011. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/ng.804>.

TSAI, Ting-Fen *et al.* Evidence of autocrine regulation in human hepatoma cell lines. **Biochemical And Biophysical Research Communications**, [S.L.], v. 153, n. 1, p. 39-45, maio 1988. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0006-291x\(88\)81186-0](http://dx.doi.org/10.1016/s0006-291x(88)81186-0).

VILLANUEVA, Augusto; CHIANG, Derek Y.; NEWELL, Pippa; PEIX, Judit; THUNG, Swan; ALSINET, Clara; TOVAR, Victoria; ROAYAIE, Sasan; MINGUEZ, Beatriz; SOLE, Manel. Pivotal Role of mTOR Signaling in Hepatocellular Carcinoma. **Gastroenterology**, [S.L.], v. 135, n. 6, p. 1972-1983, dez. 2008. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1053/j.gastro.2008.08.008>

VOCI, *et al.* IGF-I production by adult rat hepatocytes is stimulated by transforming growth factor-alpha and transforming growth factor-beta1. **European Journal Of Endocrinology**, [S.L.], p. 577-582, 1 jun. 1999. Bioscientifica. <http://dx.doi.org/10.1530/eje.0.1400577>.

WARBITO, Dudi *et al.* Nuclear IGF1R is a transcriptional co-activator of LEF1/TCF. **Embo Reports**, [S.L.], v. 13, n. 3, p. 244-250, 20 jan. 2012. EMBO. <http://dx.doi.org/10.1038/embor.2011.251>.

WEI, Yuanyan *et al.* Identification of β -1,4-galactosyltransferase I as a target gene of HBx-induced cell cycle progression of hepatoma cell. **Journal Of Hepatology**, [S.L.], v.

49, n. 6, p. 1029-1037, dez. 2008. Elsevier BV.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.jhep.2008.09.003>.

YAN, Xiao-Di *et al.* Overexpression of insulin-like growth factor-I receptor as a pertinent biomarker for hepatocytes malignant transformation. **World Journal Of Gastroenterology**, [S.L.], v. 19, n. 36, p. 6084, 2013. Baishideng Publishing Group Inc..
<http://dx.doi.org/10.3748/wjg.v19.i36.6084>.

ZHANG, Jiaxin *et al.* The threshold of alpha-fetoprotein (AFP) for the diagnosis of hepatocellular carcinoma: a systematic review and meta-analysis. **Plos One**, [S.L.], v. 15, n. 2, 13 fev. 2020. Public Library of Science (PLoS).
<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0228857>

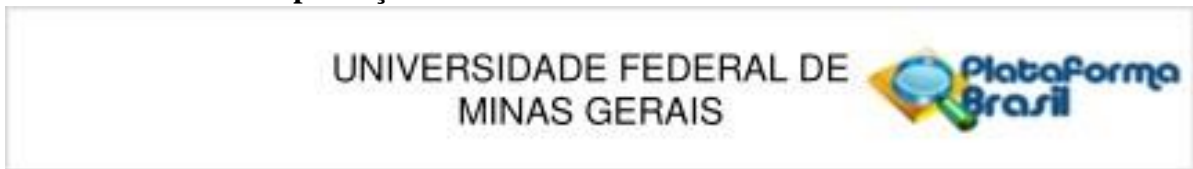
ZHANG, Zhiquan *et al.* Increased expression of insulin-like growth factor-1 receptor predicts poor prognosis in patients with hepatocellular carcinoma. **Medicine**, [S.L.], v. 98, n. 44, nov. 2019. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health).
<http://dx.doi.org/10.1097/md.00000000000017680>.

ZHOU, Li *et al.* Outcomes and prognostic factors of cirrhotic patients with hepatocellular carcinoma after radical major hepatectomy. **World Journal Of Surgery**, [S.L.], v. 31, n. 9, p. 1782-1787, 4 jul. 2007. Springer Science and Business Media LLC.
<http://dx.doi.org/10.1007/s00268-007-9029-z>

ZUCMAN-ROSSI, Jessica *et al.* Genetic Landscape and Biomarkers of Hepatocellular Carcinoma. **Gastroenterology**, [S.L.], v. 149, n. 5, p. 1226-1239, out. 2015. Elsevier BV.
<http://dx.doi.org/10.1053/j.gastro.2015.05.061>

10- ANEXOS

Anexo 1- Carta de aprovação do COEP UFMG.



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: ASSOCIAÇÃO DO IGF1R (INSULIN-LIKE GROWTH FACTOR-1 RECEPTOR) E DE PROTEÍNAS DAS VIAS MAPK E PI3K/AKT/MTOR AOS DIFERENTES TIPOS ETIOLÓGICOS DE CARCINOMA HEPATOCELULAR

Pesquisador: Paula Vieira Teixeira Vidigal

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 44573615.7.0000.5149

Instituição Proponente: Faculdade de Medicina da UFMG

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 4.458.522

Apresentação do Projeto:

Trata-se de pedido de Emenda ao projeto "ASSOCIAÇÃO DO IGF1R (INSULIN-LIKE GROWTH FACTOR-1 RECEPTOR) E DE PROTEÍNAS DAS VIAS MAPK E PI3K/AKT/MTOR AOS DIFERENTES TIPOS ETIOLÓGICOS DE CARCINOMA HEPATOCELULAR". De acordo com os pesquisadores, A proposta inicial do projeto previa o estudo de expressão imunohistoquímica do receptor do IGF1R (insulin-like growth factor-1 receptor) e de proteínas das vias MAPK e PI3K/AKT/mTOR nos diferentes tipos etiológicos de carcinoma hepatocelular e sua correlação com dados clínicos e laboratoriais dos pacientes. Todas as etapas referentes ao estudos das vias MAPK e PI3K/AKT/mTOR já foram executadas e estão em vias de publicação, restando executar os objetivos referentes à expressão imunohistoquímica do receptor do IGF1R, sua localização no contexto celular e significado clínico desta localização. A solicitação refere-se apenas a extensão do prazo de execução, não alterando nenhum objetivo original e nenhuma metodologia proposta anteriormente.

Objetivo da Pesquisa:

Solicitação de extensão do prazo para realização do projeto. Justificada pelo pesquisador responsável devido às dificuldades técnicas enfrentadas na execução de parte dos objetivos propostos, que impediram sua execução em tempo hábil.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos e Benefícios apresentados no projeto original, e que segundo o pesquisador responsável

Endereço: Av. Presidente Antônio Carlos, 6627 2ª Ad S1 2005

Bairro: Unidade Administrativa II **CEP:** 31.270-901

UF: MG **Município:** BELO HORIZONTE

Telefone: (31)3409-4592

E-mail: coep@prpq.ufmg.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
MINAS GERAIS



Continuação do Parecer: 4.458.522

não será alterado com a Emenda.

Riscos biológicos, físicos e químicos: não haverá riscos físicos aos sujeitos da pesquisa porque o projeto objetiva, exclusivamente, a manipulação

das amostras biológicas (biópsias) arquivadas nos laboratórios supracitados.

Riscos sociais: riscos sociais de quebra da confidencialidade ou perda de privacidade serão mínimos porque o projeto prevê apenas o uso de

informações demográficas (idade, sexo, procedência) presentes na requisição do exame da biópsia. Essas informações demográficas serão

codificadas no computador da pesquisadora responsável.

Benefícios:

Possíveis benefícios: produção de conhecimento sobre hepatocarcinogênese.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A solicitação da Emenda, refere-se a um pedido de extensão de prazo para realização do projeto.

A proposta inicial do projeto previa o estudo de expressão imunohistoquímica do receptor do IGF1R (insulin-like growth factor-1 receptor) e de proteínas das vias MAPK e PI3K/AKT/mTOR nos diferentes tipos etiológicos de carcinoma hepatocelular e sua correlação com dados clínicos e laboratoriais dos pacientes. Todas as etapas referentes ao estudos das vias MAPK e PI3K/AKT/mTOR já foram executadas e estão em vias de publicação, restando executar os objetivos referentes à expressão imunohistoquímica do receptor do IGF1R, sua localização no contexto celular e significado clínico desta localização.

Segundo o pesquisador responsável, não haverá nenhuma alteração nos objetivos e nem na metodologia. Assim, não foram apresentadas modificações nos riscos e benefícios ao participante.

Os autores ainda explicam que, tendo em vista que todas as etapas das partes remanescentes do projeto serão executadas nos domínios do Hospital das Clínicas e Faculdade de Medicina da UFMG, foram retirados da solicitação os documentos referentes às instituições outrora participantes.

No cronograma apresentado nas informações básicas do projeto, a data inicial do projeto seria entre 15/09/2020 a 16/11/2020 (submissão e aprovação pelo CEP/UFMG) e término em 15/09/2021.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os termos anexados nesta solicitação de Emenda são:

-Informações Básicas do Projeto (incluindo o cronograma de execução para a emenda);

Endereço: Av. Presidente Antônio Carlos, 6627 2ª Ad SI 2005

Bairro: Unidade Administrativa II **CEP:** 31.270-901

UF: MG **Município:** BELO HORIZONTE

Telefone: (31)3409-4592

E-mail: coep@prpq.ufmg.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
MINAS GERAIS



Continuação do Parecer: 4.458.522

-Carta de Justificativa da Emenda.

Recomendações:

Sem recomendações.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Somos, SMJ, favoráveis à aprovação do pedido de Emenda ao projeto "ASSOCIAÇÃO DO IGF1R (INSULIN-LIKE GROWTH FACTOR-1 RECEPTOR) E DE PROTEÍNAS DAS VIAS MAPK E PI3K/AKT/MTOR AOS DIFERENTES TIPOS ETIOLÓGICOS DE CARCINOMA HEPATOCELULAR

Pesquisador Responsável: Paula Vieira Teixeira Vidigal, de acordo com o cronograma de atividades apresentado.

Considerações Finais a critério do CEP:

Tendo em vista a legislação vigente (Resolução CNS 466/12), o CEP-UFMG recomenda aos Pesquisadores: comunicar toda e qualquer alteração do projeto e do termo de consentimento via emenda na Plataforma Brasil, informar imediatamente qualquer evento adverso ocorrido durante o desenvolvimento da pesquisa (via documental encaminhada em papel), apresentar na forma de notificação relatórios parciais do andamento do mesmo a cada 06 (seis) meses e ao término da pesquisa encaminhar a este Comitê um sumário dos resultados do projeto (relatório final),

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_1630781_E1.pdf	12/10/2020 15:55:54		Aceito
Outros	Carta_de_justificativa_extensao_de_prazo.docx	12/10/2020 15:54:18	Paula Vieira Teixeira Vidigal	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido modif 230615.docx	23/06/2015 13:04:10		Aceito
Outros	Parecer APM Projeto CHC0001.pdf	30/04/2015 14:46:26		Aceito
Outros	Parecer UFPML Projeto CHC0001.pdf	30/04/2015 14:46:13		Aceito
Outros	Parecer consubstanciado projeto hepatocarcinoma0001.pdf	30/04/2015 14:45:24		Aceito
Outros	Declaracao DEPE projeto Hepatocarcinoma0001.pdf	30/04/2015 06:59:29		Aceito

Endereço: Av. Presidente Antônio Carlos, 6627 2ª Ad SI 2005

Bairro: Unidade Administrativa II **CEP:** 31.270-901

UF: MG **Município:** BELO HORIZONTE

Telefone: (31)3409-4592

E-mail: coop@ppq.ufmg.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
MINAS GERAIS



Continuação do Parecer: 4.458.522

Folha de Rosto	Folha de Rosto Projeto Hepatocarcinoma0001.pdf	30/04/2015 06:58:42		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.pdf	26/03/2015 14:38:00		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Protocolo de Pesquisa Projeto Carcinoma hepatocelular COEP UFMG.pdf	26/03/2015 14:35:59		Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

BELO HORIZONTE, 11 de Dezembro de 2020

Assinado por:
Crissla Carem Paiva Fontainha
(Coordenador(a))

Endereço: Av. Presidente Antônio Carlos, 6627 2ª Ad SI 2005

Bairro: Unidade Administrativa II **CEP:** 31.270-901

UF: MG **Município:** BELO HORIZONTE

Telefone: (31)3409-4592

E-mail: coop@prpq.ufmg.br

Anexo 2- Artigo referente ao projeto de pesquisa e seus resultados

NUCLEAR IMMUNOHISTOCHEMICAL EXPRESSION OF IGF-1R (INSULIN-LIKE GROWTH FACTOR-1 RECEPTOR) AND ITS ASSOCIATION WITH CLINICOPATHOLOGICAL PARAMETERS IN HEPATOCELLULAR CARCINOMA

Authors: Maria L.P. Maia¹, Roniel M. Albuquerque² Paula V. T. Vidigal¹, Paulo H. C. Diniz³.

Affiliations and addresses:

¹Departamento de Anatomia Patológica e Medicina Legal, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brasil.

² Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brasil

³ Hospital das Clínicas, Serviço de Oncologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brasil.

.

Corresponding author: Maria Luiza Peloso Maia

Email: mlpelosomaia@gmail.com

Phone: +55 35 988542213

ABSTRACT

Introduction: hepatocellular carcinoma (HCC), the most common primary tumor of the liver, rank as the sixth most commonly diagnosed malignancy and the third leading cause of cancer mortality in the world. Despite the therapeutic advances, the prognosis remains poor, which reflects the need to better understand the complex mechanisms involved in the carcinogenesis of this neoplasm. IGF-1R (Insulin-like Growth Factor-1 Receptor) is a transmembrane receptor with tyrosine kinase domains, which acts, together with its ligands, in physiological growth as well as in pathological processes. In hepatocarcinogenesis, IGF-1R activation can trigger intracellular signaling cascades, which lead to events necessary for the initiation, promotion and development of cancer. Current evidence points to another characteristic of IGF-1R, which stands it out among other receptors: its ability to translocate to the nucleus, which could allow the modulation of growth events at a level of genomic control, contributing to neoplastic transformation. Clarifying the role of IGF-1R in HCC may contribute to a better understanding of this complex disease.

Objective: this study aims to evaluate the nuclear expression of IGF-1R in samples of hepatocellular carcinoma submitted to liver transplantation or partial liver resection, and to investigate its association with clinicopathological parameters and clinical outcomes.

Methodology: an immunohistochemical evaluation of the nuclear expression of IGF-1R was performed in samples from liver explants or partial surgical resections, between the years 2000 to 2020, for the treatment of HCC at the Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais (HC-UFMG). Medical records were reviewed to collect clinical data and specimen slides were reviewed to collect pathological data.

Results: of the patients included in the study (n=111), the main etiologies of the chronic liver disease were hepatitis C virus (44.1%), hepatitis B virus (16.2%), ethanolic (16.2%) and cryptogenic (17.1%). IGF-1R expression was demonstrated in the nucleus of tumor cells in HCC and in the adjacent cirrhotic parenchyma. In univariate analysis, a higher nuclear expression of IGF-1R was observed in HCC than in cirrhosis ($p < 0.001$). and in moderately/poorly differentiated tumors ($p < 0.001$), a higher nuclear expression was also demonstrated, in cirrhosis, in cases of hepatitis B ($p = 0.002$). In the multivariate model, higher nuclear expression of IGF-1R was observed in the tumor than in cirrhosis ($p < 0.001$) and higher nuclear expression in tumors classified as moderately/poorly differentiated ($p < 0.001$). However, no statistically significant association was observed between the presence of immunoexpression and cases of cirrhosis caused by HBV ($p = 0.999$). No association was observed between clinical outcomes and other variables with the nuclear expression of IGF-1R in the tumor or in the area of cirrhosis ($p > 0.05$).

Discussion: data show greater nuclear expression of IGF-1R in HCC than in adjacent cirrhotic parenchyma, suggesting that its translocation may be one of the initial events in hepatocarcinogenesis. Despite the lack of association with long-term clinical outcomes, receptor expression is independently associated with the degree of differentiation, which is a histopathological parameter of poor prognosis. However, further studies are needed, including to assess the association with different etiologies, given the heterogeneity of the disease.

Keywords: IGF-1R, hepatocellular carcinoma, nuclear translocation; liver cirrhosis.

INTRODUCTION

Hepatocellular carcinoma (HCC), the most common primary malignant neoplasia of the liver, ranks as the sixth mostly common malignancy and the third leading cause of cancer mortality worldwide. Chronic viral infections by hepatitis B (HBV) and C (HCV) viruses are the main etiologies, responsible for about 85% of cases, followed by alcohol-induced liver damage. Regardless of the etiology of chronic liver disease, cirrhosis is the main risk factor for this neoplasm^{1,2}.

Among the main therapeutic options available, surgical resection and liver transplantation is the main step treatment modality in the earlier stages of the disease.^{3,4} In advanced cases, not amenable to local therapies, systemic treatment is indicated, despite of the limited regimens available. Some studies have shown an increase in overall survival with the use of multikinase inhibitors, and, more recently, immunotherapy in combination^{5,6,7,8}.

Despite advances in therapeutic techniques, the overall prognosis of patients with HCC remains dismal, which reflects the need to better understand the complex mechanisms involved in its carcinogenesis, including the important role of genetic alterations and protein expressions^{9,10}.

Some intracellular signaling cascades seem to have an increasingly well-established role in hepatocarcinogenesis, such as the MAPK (Mitogen Activated Protein Kinase) pathway and the PI3K/AKT/mTOR pathway. Through a signaling cascade, the activation of these proteins triggers cellular events such as those related to proliferation, tumor angiogenesis, inhibition of apoptosis, in addition to mediating drug resistance mechanisms and even involvement with more aggressive tumor behavior. Both the MAPK and PI3K/AKT/mTOR pathways can be triggered by the activation of growth factor receptors. Among them, IGF-1R (insulin-like growth factor-1 receptor) stands out^{11, 12, 13, 14}.

IGF-1R is a transmembrane receptor with tyrosine kinase domains, with 70% homology to the insulin receptor. Its ligands, IGF1 and 2 (insulin-like growth factor 1 and 2), are produced under growth hormone stimulation, this signaling mediates a variety of pathological processes, particularly in carcinogenesis of different tumors, such as HCC^{15,16,17}.

Current evidence points to another important characteristic of IGF-1R which sets it apart from many other receptors: its ability to translocate to the nucleus, a phenomenon from which

the receptor can more directly control the transcription of genes involved in the progression of the disease cell cycle, including self-regulation of the IGF-1R gene. Through this very important mechanism, which needs further clarification, the receptor could modulate growth and development events to the point of genomic control, contributing to the neoplasia's transformation¹⁸.

The possibility of IGF-1R overexpression as well as its nuclear expression acting as prognostic determinants has also been studied. Aleksic et al pointed out the presence of IGF-1R in the cell nucleus as a poor prognostic factor in clear cell renal carcinoma¹⁹. In a meta-analysis, Zhao et al reported that IGF-1R overexpression was associated with unfavorable clinical outcomes in patients with non-small cell lung cancer²⁰. Bieghs et al indicated that the increased expression of IGF-1R was correlated with a poor prognosis in patients with multiple myeloma²¹. Together, these findings suggest the role of this receptor as a surrogate for poor outcomes and its impact on treatment decisions, but the evidence specifically in HCC is scarce, as are studies evaluating the nuclear translocation of IGF-1R in this neoplasm.

In the scenario of such a complex disease, whose carcinogenesis is still poorly understood, and given necessity of exploring the potential of IGF-1R in hepatocarcinogenesis, this study aims to identify the association of IGF-1R nuclear expression with clinical and pathological aspects in HCC patients. It would be important to assessing with the prognostic value of this receptor, which could impact in and the HCC outcomes.

MATERIALS AND METHODS

Cohort

A total of 111 patients who underwent liver explants or partial surgical resections as treatment of HCC at the Hospital das Clínicas da Univeridade Federal de Minas Gerais (HC-UFMG), a referral Brazilian center, were identified. The surgical procedure was performed from 2000 to 2020. The pathological archived were reviewed to choose the most representative blocks of the neoplasm.

This study was approved by the Ethics Committee of the Universidade Federal de Minas Gerais (CAAE – 44573615.7.0000.5149).

Immunohistochemical analysis

For immunohistochemical analysis, paraffin blocks with samples of hepatocellular carcinoma were submitted to microsection with 3- μ m thickness and placed on silanized slides.

The histological sections were then deparaffinized and rehydrated using Xylol, absolute alcohol and hydrated alcohols (95%, 75%) and distilled water.

Immunohistochemistry was performed to identify the nuclear expression of IGF-1R. Prior to incubation with the primary antibody, samples were treated with 3% hydrogen peroxide for 15 minutes to block endogenous peroxidase. Antigenic recovery was performed by heating the slides at 96°C in steam for 30 minutes in 0.01M sodium citrate (pH 6.0).

To minimize nonspecific labeling, samples were incubated with Protein Block (Dako) for 30 min. Later, the tissue section was incubated with primary anti-IGF-1R antibody (Abcam-ab39675) for 60 minutes. The EnVision™ Dual Link System (Dako) was used for visualization. This system uses a secondary antibody coupled to a synthetic polymer conjugated to peroxidase (HRP, horseradish peroxidase). In positive samples, after addition of 3,3-diaminobenzidine (DAB - HRP substrate), a brown precipitate is formed. All samples were counterstained with Harris' hematoxylin (Sigma) for two minutes and treated with the Bluing reagent (Thermo Scientific) for one minute, which changes the color of the hematoxylin-stained nuclei to blue. All samples with nuclear staining of intensity greater than or equal to 1+ (considered weak intensity) in more than 10% of the cells were considered positive.

Demographic, clinical and pathological data

All patients whose samples were analyzed and selected had their medical records reviewed. It was collected information regarding clinicopathological parameters, such as gender, age at diagnosis, number of tumor nodules, size of the largest tumor nodule, tumor grade, etiology of the chronic liver disease, recurrence-free time expressed in months, presence of angiolymphatic invasion, alpha-fetoprotein (AFP) serum level and MELD score (model for end-stage liver disease). This score assesses the degree of involvement of liver disease, considering laboratory parameters (serum creatinine, total serum bilirubin and International Normalized Ratio – INR) and establishes a numerical value that represents a percentage of risk of mortality in 3 months.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using the SPSS Statistics program (IBM Corp, 2015, IBM SPSS Statistics for Windows, Version 23.0. Armonk, NY: IBM Corp.). The values of quantitative variables were described in the tables as medians and interquartile ranges. The quantitative variable was submitted to the Mann-Whitney test. The Chi-square test or Fisher's

test was performed, when necessary, to identify the association between categorical variables.

Multivariate Poisson regression model with covariance structure was performed to identify the characteristics independently associated with the IGF-1R nuclear expression.

For survival analysis, event was defined as tumor recurrence or death from any cause, whichever occurred first, within the follow-up period, which was until December 2020. Event-free survival (EFS) was defined as the interval between liver transplantation or partial liver resection and the occurrence of the event or the end of the follow-up period, what occurred first. Only p values < 0.05 were considered statistically significant.

RESULTS

Of the 111 patients, the samples of 38 (34.2%) showed positive nuclear immunohistochemical staining for the IGF-1R antibody in the HCC area and 13 samples (11.7%) in the cirrhosis area. Of these 13 cirrhosis positive samples, 11 were also positive in tumor. 98 cases were negative in areas of cirrhosis and 73 in areas of HCC. (Figures 1, 2, 3 and 4)



Figure 01 - Nuclear labeling of IGF-1R present in the HCC (lower left region) and absent in the adjacent cirrhotic liver (upper right region). (50x magnification).

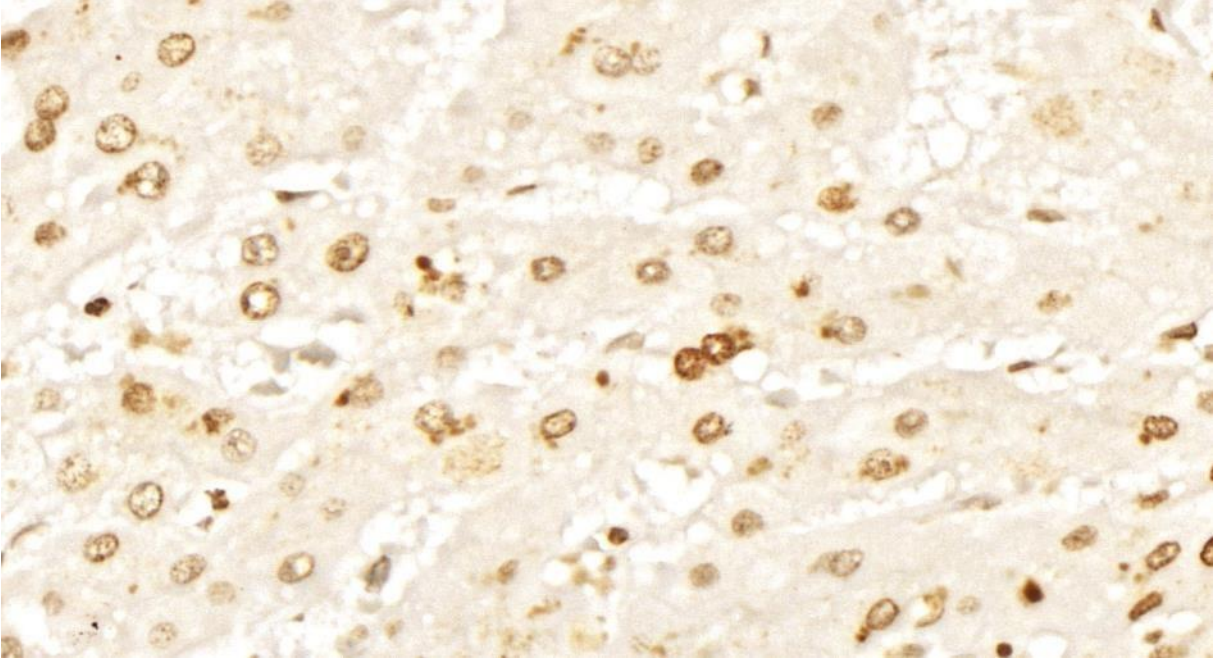


Figure 02 - Nuclear labeling of IGF-1R present in the HCC (magnification: 400x).

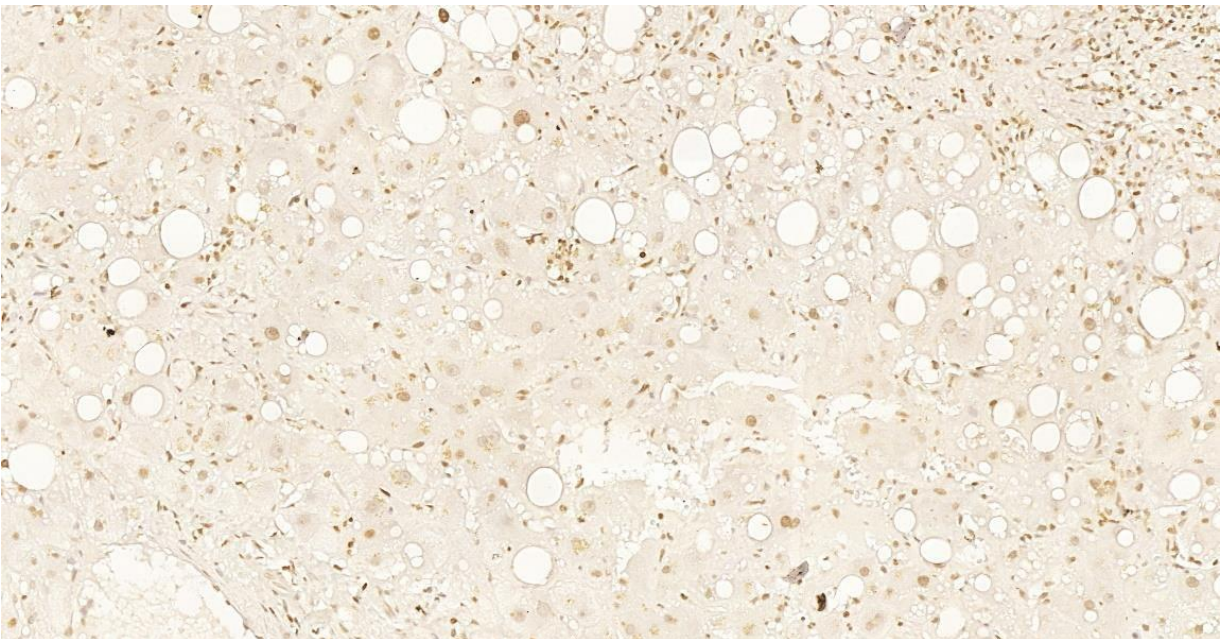


Figure 03 - Nuclear labeling of IGF-1R present in the cirrhotic liver (magnification: 200x).

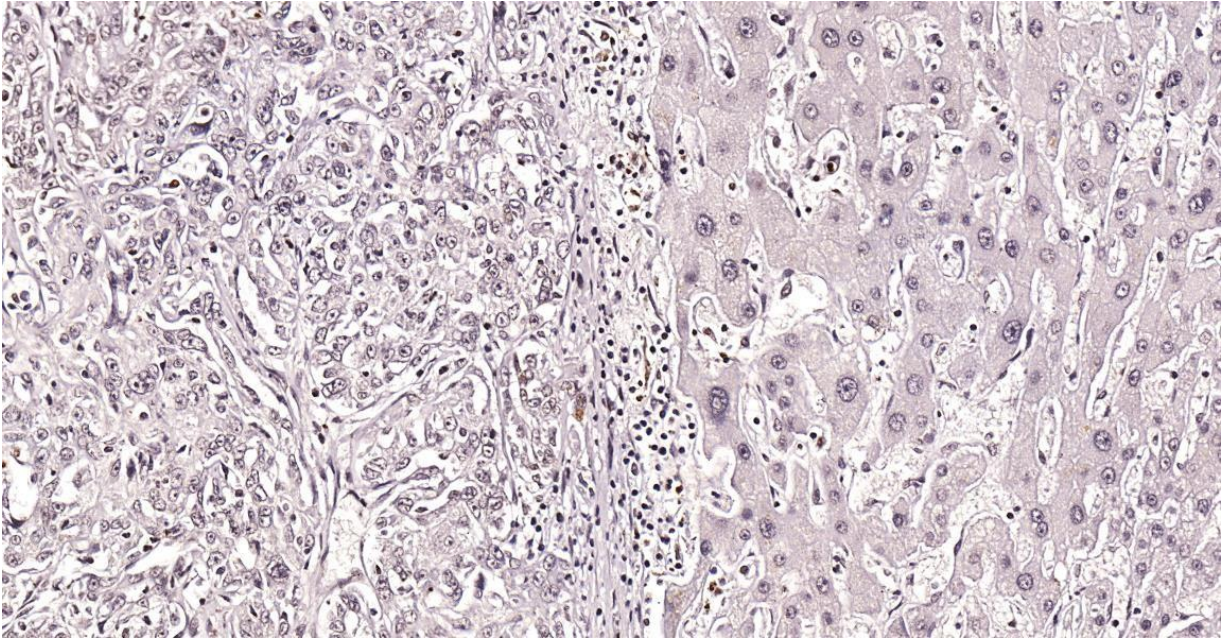


Figure 04 - IGF-1R nuclear labeling absent in HCC (left) and absent in adjacent cirrhotic liver (right). (100x magnification).

Of the 38 cases in whose tumor the IGF-1R was expressed, 7 (18.4%) had cirrhosis of cryptogenic etiology, 7 (18.4%) of ethanolic origin, six (15.8%) of hepatitis B, 16 (42.1%) of hepatitis C, two (5.3%) by NAFLD and no case of autoimmune etiology and hemochromatosis. Of these cases, 7 (18.4%) were well differentiated and 31 (81.6%) were moderately/poorly differentiated.

Of the 13 cases that express IGF-1R in cirrhosis, two (15.4%) had cryptogenic etiology, one (7.7%) had an ethanolic origin, six (46.2%) had hepatitis B, two (15.4%) had hepatitis C, two (15.4%) had NAFLD and no case of autoimmune etiology and hemochromatosis.

In the univariate model, when analyzing the association of clinical and anatomopathological data with the immunohistochemical findings, a more frequent nuclear expression of IGF-1R was observed in the tumor than in cirrhosis ($p < 0.001$), greater nuclear expression in cases of cirrhosis caused by HBV ($p < 0.002$), and higher nuclear expression in tumors classified as moderately/poorly differentiated ($p < 0.001$). In the multivariate model, higher nuclear expression of IGF-1R was observed in the tumor than in cirrhosis ($p < 0.001$) and higher nuclear expression in tumors classified as moderately/poorly differentiated ($p < 0.001$). However, no significant association was observed between the presence of immunoeexpression and HBV etiology (0.999)

The median serum AFP value was 9.05 ng/ml (with an interquartile range of 3.89-49.85), and no statistical significance was observed regarding the nuclear expression of IGF-1R in the tumor or in the cirrhotic parenchyma ($p = 0.790$ and $p = 0.736$, respectively). In this parameter, of the 111 patients, data were available in 86.

The median MELD score was 20 (and interquartile range of 15-23), and no statistical significance was observed in relation to nuclear IGF-1R expression in tumor and cirrhotic samples ($p = 0.893$ and $p = 0.491$, respectively). In this parameter, of the 111 patients, data were available in 77.

As seen in tables 2 and 3, there were no difference regarding clinicodemographic parameters between the groups according to the expression of IGF-R1.

Table 02 – Association between clinical and anatomopathological characteristics and nuclear expression of IGF-1R in HCC

Variable	Nuclear expression of IGF-1R		<i>p value</i>
	Absent	Present	
Tumor differentiation^a			< 0,001 *
Well differentiated	47 (42,3%)	7 (6,3%)	
moderately/ poorly differentiated	26 (23,4%)	31(27,9%)	
Vascular Invasion^b			0,659
Present	5 (4,5%)	0(0%)	
Absent	68(61,2%)	38 (34,2%)	
Number of nodules^b			0,978
1	38 (34,2%)	21 (18,9%)	
2	18 (16,2%)	8 (7,2%)	
3	5 (4,5%)	1 (0,9%)	
4	6 (5,4%)	3 (2,7%)	
5	1 (0,9%)	1 (0,9%)	
7	1 (0,9%)	1 (0,9%)	
10 or more	4 (3,8%)	3 (2,7%)	
Etiology^b			0,708
Hepatitis C	33 (29,7%)	16 (14,4%)	

Cryptogenic	12 (10,8%)	7 (6,3%)	
Ethanollic	11 9,9	7 (6,3%)	
Hepatitis B	12 (10,8%)	6(5,4%)	
Autoimmune	3(2,7%)	0 (0%)	
NAFLD	0 (0%)	3 (2,7%)	
Hemochromatosis	2 (1,8%)	0 (0%)	
Size of the largest nodule (cm)^c	3,0(1,2-4,0)	3,0 (1,16- 4,2)	0,855
MELD value^{*c}	20 (14,75-24,0)	20 (7-32)	0,893
AFP (ng/ml)^{**c}	11,40 (3,97-42,55)	8,90 (3,55-56,55)	0,790

Data are expressed as absolute numbers (percentage) or median (interquartile range).
 *Presence of a significant association between IGF-1R expression and moderately/poorly differentiated cases in the univariate analysis **Score obtained in 77 cases ***Serum level identified in 86 cases. NAFLD- non-alcoholic fatty liver disease; AFP-alpha-fetoprotein; MELD- Model for end-stage liver disease. Test used: ^aChi-square. ^bFisher's exact test. ^cMann-Whitney.

Table 03 – Association between clinical and anatomopathological characteristics and nuclear expression of IGF-1R in cirrhotic liver

Variable	Nuclear expression of IGF-1R		<i>p value</i>
	Absent	Present	
Tumor differentiaion^a			0,300
Well differentiated	49 (44,14%)	5(4,5%)	
moderately/ poorly differentiated	49 (44,14%)	8 (7,2%)	
Vascular Invasion^b			1,000
Present	5 (4,5%)	0 (0%)	
Absent	93 (83,7%)	13 (11,7 %)	
Number of nodules^b			0,603
1	52 (46,8%)	7 (6,3%)	
2	23 (20,7%)	3 (2,7%)	
3	6 (5,4%)	0 (0%)	
4	8 (7,2%)	1 (0,9%)	
5	1 (0,9%)	1 (0,9%)	
7	2 (1,8%)	0 (0%)	
10 or more	5 (4,5%)	2 (1,8%)	

Etiology^b			0,003 *
Hepatitis C	47 (42,3%)	2 (1,8%)	
Cryptogenic	17 (15,3%)	2 (1,8%)	
Ethanollic	17 (15,3%)	1 (0,9%)	
Hepatitis B	12 (10,8%)	6 (5,4%)	
Autoimmune	3 (2,7%)	0 (0%)	
NAFLD	0 (0%)	2 (1,8%)	
Hemochromatosis	2 (1,8%)	0 (0%)	
Size of the largest nodule (cm)^c	3,0(2,0-4,0)	2,75 (2,0-4,2)	0,285
MELD value*^c	20 (14,75-24,00)	16 (16-20)	0,491
AFP (ng/ml)**^c	9,05 (3,97-42,55)	25,50 (3,55-56,55)	0,736

Data are expressed as absolute numbers (percentage) or median (interquartile range). *Presence of a significant association between IGF-1R expression and hepatitis B etiology in univariate analysis **Score obtained in 77 cases ***Serum level identified in 86 cases. NAFLD- non-alcoholic fatty liver disease; AFP-alpha-fetoprotein; MELD- Model for end-stage liver disease. Test used: ^aChi-square. ^bFisher's exact test. ^cMann-Whitney.

HCC recurrence was identified in 11 (10.7%) of the 102 patients who remained in follow-up, although it may also have occurred in patients who died without recognition. Clinically proven recurrence followed by death was observed in eight patients. The event rate was 30.4% (31 relapses or deaths from any cause of the 102 patients analyzed). Nine patients were lost to follow-up. No significant difference was identified between the presence of events and the event-free time and the presence or absence of IGF-1R nuclear expression in HCC and cirrhotic parenchyma (Tables 3 and 4).

Table 3 – Clinical outcomes according to IGF-1R nuclear expression in HCC.

Variable	Nuclear expression of IGF-1R		<i>p value</i>
	Absent	Present	
Recurrence	7/102 (6,8%)	4/102 (3,9%)	0,744
Death	18/102(17,6%)	7/102 (6,8%)	0,684
Event-free survival (months)	49,0(12,0-109,5)	35,0(12,0-80,0)	0,249

Data are expressed as absolute numbers (percentage) and median (interquartile range).

Table 4 – Clinical outcomes according to IGF-1R expression in cirrhotic liver.

Variable	Nuclear expression of IGF-1R		<i>p value</i>
	Absent	Present	
Recurrence	8/102(7,8%)	3/102 (2,9%)	0,05
Death	22/102 (21,5%)	3/102 (2,9%)	0,831
Event-free survival (months)	49,5(12,0-96,25)	26,5(15,0-72,0)	0,252

Data are expressed as absolute numbers (percentage) and median (interquartile range).

Despite the association of IGF-R1 nuclear expression with poor tumor differentiation, a marker of poor clinical prognosis, no impact in clinical outcomes was demonstrated. In the survival analysis, the median event-free survival was 65 months. The overall event-free survival rate at 12 and 24 months was 84.0% and 80.6%, respectively. When analyzing the presence of IGF-1R nuclear immunoexpression in tumor and cirrhosis, the Kaplan-Meier curves (Figures 5 and 6) showed overlap ($p=0.667$ and $p=0.589$, respectively).

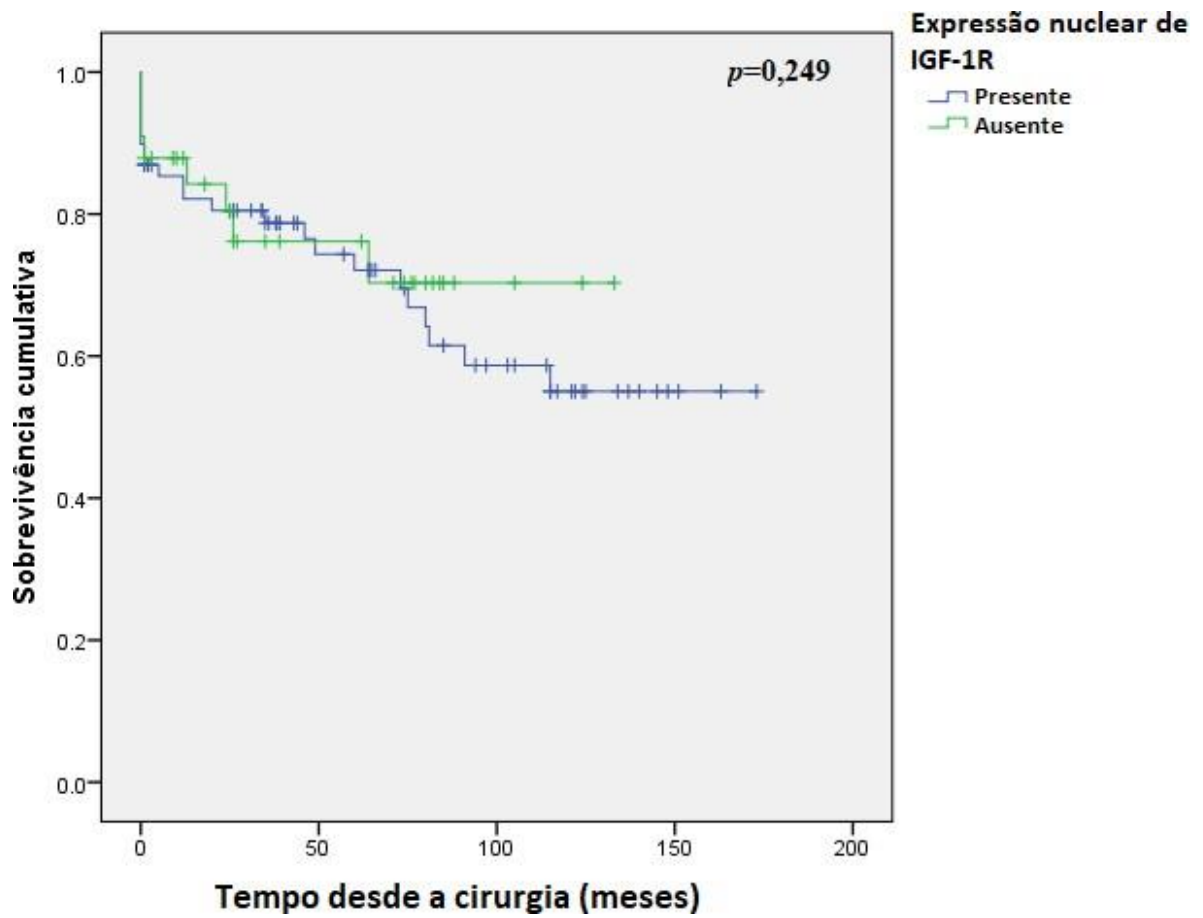


Figure 05 - Comparison of Kaplan-Meier curves among patients with nuclear IGF-1R expression in the HCC.

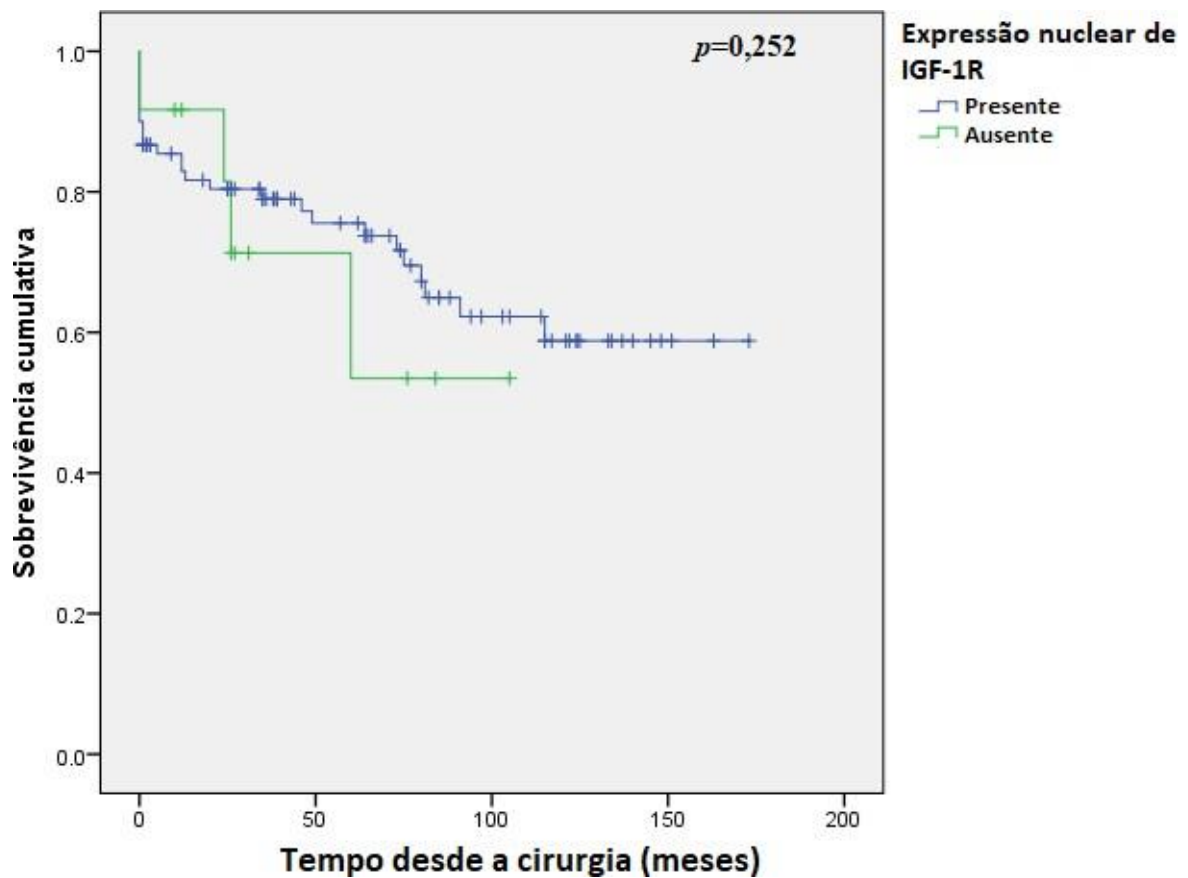


Figure 06 - Comparison of Kaplan-Meier curves among patients with nuclear IGF-1R expression in cirrhotic liver.

DISCUSSION

Many studies have shown a correlation between the expression of IGF-1R, in different types of neoplastic cells, and a worse clinical outcome or even a more aggressive behavior^{19,20,21}. In addition, more recent studies have sought to better understand the translocation process of this receptor to the nucleus, and have even pointed to a correlation of this event, in HCC cell lines, with increased resistance to drugs used for the treatment of neoplasms^{18, 22}. However, the present study is the first to assess comparatively the nuclear immunohistochemical expression of this receptor in hepatocytes present in HCC and cirrhotic liver, using samples obtained from liver explants and partial hepatectomies. It is also the first to correlate this expression with pathological data (such as degree of tumor differentiation, vascular invasion, size and number of neoplastic foci), with the etiology of

cirrhosis, with one of the main preoperative survival scores (MELD score) and demographics and laboratory data.

In another study by our research group, a higher expression of MAPK pathway proteins was identified in HCCs whose etiology of chronic liver disease was viral. It is known that activation of this pathway can occur through the binding of IGF-1R with its ligands²³. So, IGF-1R overexpression, by itself, may explain changes in hepatocarcinogenesis like the one already demonstrated in viral etiology. Much is already known about the relationship among HBV, cirrhosis and HCC. However recent studies have shown that the transactivating protein X, expressed by HBV, may play a key role in hepatocarcinogenesis, in addition to a correlation with a higher probability of metastases in patients with HCC associated with HBV^{24,25,26}. Kim et al also demonstrated that the transactivator protein X can promote an increase in the expression of IGF-1R²⁷. These data may indicate a fundamental role of IGF-1R in hepatocarcinogenesis of viral etiology. In the present study, an association of nuclear IGF-1R expression was identified in cirrhosis caused by HBV in the univariate analysis, which was not observed in the multivariate analysis. However, these findings may raise hypotheses for future studies to evaluate this translocation in a greater number of patients with HCC and cirrhosis with HBV as the etiology.

It is known that the degree of tumor differentiation is correlated with the more aggressive behavior of the neoplasm and, consequently, with a worse prognosis. In a study of Tamura et al., it was identified that the histological degree of differentiation of HCC may represent an independent prognostic factor, since patients with tumors of varying sizes, but of low grade, had higher survival rates in three years when compared to patients with high-grade lesions²⁸. Klintmalm demonstrated that worse degree of differentiation showed a relationship with larger, more advanced tumors and with a higher rate of recurrence, indicating an important association with worse prognosis in addition to other clinical and anatomopathological findings²⁹.

In the present study, a higher nuclear expression of IGF-1R was observed in poorly and moderately differentiated tumors when compared to well-differentiated tumors. Similarly, in the study published by Kang et al., a high membrane immunohistochemical

expression of IGF-1R was also observed in HCCs with worse degrees of differentiation³⁰. Thus, the nuclear expression of IGF-1R alone, or in association with other histopathological criteria, may indicate a worse prognosis. Thus, it can be used for this purpose, in association with other established markers, such as tumor size and vascular invasion.

Although, in this study, a higher nuclear expression of IGF-1R was identified in HCC samples with a higher histological grade and that the histological grade is correlated with worse outcomes, the expression of IGF-1R was not associated with worse clinical outcomes. Similar overall survival and event-free survival were observed between groups that expressed or did not express the receptor in the nuclei of tumor cells and cirrhotic parenchyma.

It is worth noting that the stage of the patients in our sample is more initial, since, in general, only patients in the earlier stages undergo surgical treatment, not being indicated for those with metastatic disease, for example. That is, it is possible that the nuclear translocation of IGF-1R may have this prognostic impact when evaluated in tumors with more advanced stages.

One of the limitations of our study that should also be considered is that not all patients were followed up until 2020, and recurrence or death may have occurred without our knowledge. In addition, there are other issues that interfere with the results that must also be taken into account, such as geographic variations and the occurrence of epigenetic events that are not covered by the methodology of this study. Certainly, this should be further investigated by other studies.

In the study by Zhang et al, lower survival was observed in patients who expressed higher levels of IGF-1R mRNA in HCC³¹. However, one of the limitations of this study is that mRNA levels do not necessarily reflect the expression and activation of the IGF-1R protein, much less its nuclear localization. However, these findings indicate that IGF-1R may play a role as a prognostic indicator of HCC, especially regarding the degree of tumor differentiation, but that still needs further investigation and follow-up.

Among the limitations of our study, those related to sample size and possible

information bias, characteristic of retrospective studies, stand out. Data collection took place in physical records, used before the implementation of electronic records, which have problems in filling out certain information about laboratory tests, such as AFP values and tests used in the calculation of the MELD score, and it is not possible to obtain these data for all patients included in the study. In addition, patients undergoing partial resection, because they did not have a clinical follow-up with the same frequency as those undergoing liver transplantation, often ended up losing follow-up (not returning to scheduled appointments or even changing follow-up to other institutions). that hampered the analysis of survival and assessment of outcomes

In summary, the findings presented and discussed demonstrate that the nuclear translocation of IGF-1R seems to be involved in hepatocarcinogenesis, especially in earlier events. Despite the univariate analysis, an association with viral etiology could not be demonstrated, but it needs to be assessed in further studies. In addition, it may also have a prognostic role, since it was associated with characteristics related with worse clinical outcomes, such as differentiation grade. Together, these data may contribute to new insights into hepatocarcinogenesis and contribute with the development of new therapeutic strategies, so awaited for the management of this very aggressive neoplasm.

INTEREST CONFLICTS

The authors declare no conflicts of interest.

BIBLIOGRAPHIC REFERENCES:

1. BOSMAN, F; CARNEIRO, F; HRUBAN, R. World Health Organization Classification of Tumours of the Digestive System. IARC, Lyon. Tumours of the liver and intrahepatic bile ducts. 2010.
2. BRAY, F. et al. "Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries." *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, v. 68, n. 6, p 394-424, 2018.
3. EL-SERAG, H. B. "Hepatocellular carcinoma: recent trends in the United States." *Gastroenterology*, v. 127, n. 5 Suppl 1, p27-34. 2004
4. EL-SERAG, H. B., LENHARD, R. K. "Hepatocellular carcinoma: epidemiology and

- molecular carcinogenesis.” *Gastroenterology*, v. 132,n. 7. 2007
5. LLOVET, J. et al. Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma. *The New England Journal of Medicine*. vol. 359,4. v. 378-390. 2008
 6. KUDO, M. et al. Lenvatinib versus sorafenib in first-line treatment of patients with unresectable hepatocellular carcinoma: a randomised phase 3 non-inferiority trial. *Lancet*. London, England, v. 391,10126, p.1163-1173.2018
 7. ABOU-ALFA, G.K.; MEYER, T.; CHENG, A-L. et al. Cabozantinib in patients with advanced and progressing hepatocellular carcinoma. *The New England Journal of Medicine*. v. 379, p. 54-63. 2018
 8. LIU, L.; CAO, Y.; CHEN, C.; et al. Sorafenib blocks the RAF/MEK/ERK pathway, inhibits tumor angiogenesis, and induces tumor cell apoptosis in hepatocellular carcinoma model PLC/PRF/5. *Cancer research*. v. 66, 24, p.11851–11858. 2006
 9. ZHANG Z, LEI B.; CHAI, W.; LIU, R.; LI, T. Increased expression of insulin-like growth factor-1 receptor predicts poor prognosis in patients with hepatocellular carcinoma. *Medicine*. Baltimore, v. 98,44, e17680. 2019.
 10. BRUIX, J.; GORES, G.J.; MAZZAFERRO, V. Hepatocellular carcinoma: clinical frontiers and perspectives. *Gut*. v. 63, p. 844–855. 2014.
 11. CHAPARRO M. et al. Review article: pharmacological therapy for hepatocellular carcinoma with sorafenib and other oral agents. *Alimentary pharmacology & Therapeutics*. v. 28,11-12, p.1269-1277. 2008.
 12. VILLANUEVA, A. et al. Pivotal role of mTOR signaling in hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology*. v.135,6, p.1972–1983.2008.
 13. SCHMITZ, K.J. et al. Activation of the ERK and AKT signalling pathway predicts poor prognosis in hepatocellular carcinoma and ERK activation in cancer tissue is associated with hepatitis C virus infection. *Journal of Hepatology*. v. 48,1,p 83–90. 2008
 14. POLLAK, M. The insulin and insulin-like growth factor receptor family in neoplasia: an update. *Nature Reviews. Cancer*. v. 12,3, p.159–169.2012
 15. MASATOSHI, K. Signaling Pathway and Molecular-Targeted Therapy for Hepatocellular Carcinoma. *Digestive Diseases*. Basel, Switzerland, v. 29,3, p.289–302. 2011
 16. LEROITH, D.; ROBERTS, C.T.Jr.The insulin-like growth factor system and cancer. *Cancer Letters*. v. 195,2, p. 127–137. 2003
 17. ADAMEK, A.; KASPRZAK, A. Insulin-Like Growth Factor (IGF) System in Liver Diseases. *International Journal of Molecular Sciences*. v. 19,5, p. 1308. 2018.
 18. SARFSTEIN, R.; WERNER, H. Minireview: Nuclear Insulin and Insulin-like Growth

- Factor-1 Receptors: A Novel Paradigm in Signal Transduction. *Endocrinology*. v. 154, p. 1672–1679. 2013.
19. ALEKSIC, T. et al. Type 1 insulin-like growth factor receptor translocates to the nucleus of human tumor cells. *Cancer Research*. v. 70,16, p. 6412–6419.2010.
 20. ZHAO, J. et al. The prognostic and clinicopathological significance of IGF-1R in NSCLC: a meta-analysis. *Cellular physiology and biochemistry: international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology*. v. 43,2, p. 697–704. 2017
 21. BIEGHS, L. et al. The insulin-like growth factor system in multiple myeloma: diagnostic and therapeutic potential. *Oncotarget*. v. 7, p. 48732–48752. 2016
 22. BODZIN, A.S. et al.. Gefitinib resistance in hcc mahlavu cells: Upregulation of cd133 expression, activation of igf-1r signaling pathway, and enhancement of igf-1r nuclear translocation. *J. Cell Physiol*. v. 227,7 p. 2947–2952. 2012
 23. MAPK pathway proteins expression and correlation with clinicopathological indices and long-term outcome according to the etiology of underlying chronic liver disease in hepatocellular carcinoma. Paulo Henrique Costa Diniz, Serena Dafne do Carmo Silva, Caio Cesar Lobo Sampaio, Paula Vieira Teixeira Vidigal, Marcelo Antonio Pascoal Xavier, Luciana Costa Faria, and Teresa Cristina de Abreu Ferrari *Journal of Clinical Oncology* 2019 37:4_suppl, 286-286
 24. WEI, Y. et al. Identification of β -1,4-galactosyltransferase I as a target gene of HBx-induced cell cycle progression of hepatoma cell. *Journal of Hepatology*. v 49, p 1029-1037. 2008.
 25. LIU, H. et al. Hepatitis B virus X protein promotes hepatoma cell invasion and metastasis by stabilizing Snail protein. *Cancer science*. v. 103, p. 2072-2081. 2012.
 26. LARA-PEZZI, E. et al. Effect of the hepatitis B virus HBx protein on integrin-mediated adhesion to and migration on extracellular matrix. *Journal of Hepatology*. v 34. P 403-415. 2001.
 27. KIM S.O. et al. Increased expression of the insulin-like growth factor I (IGF-I) receptor gene in hepatocellular carcinoma cell lines: Implications of IGF-I receptor gene activation by hepatitis B virus x gene product. *Cancer research*, v. 56, n. 16, p. 3831-3836, 1996.
 28. TAMURA S. et al. Impact of histological grade of hepatocellular carcinoma on the outcome of liver transplantation. *Arch Surg*. 2001 Jan;136(1):25-30; discussion 31. PMID: 11146770.
 29. KLINTMALM, G. B. Liver transplantation for hepatocellular carcinoma: a registry report

- of the impact of tumor characteristics on outcome. *Annals of surgery*. v. 228, n. 4. p. 479. 1998
30. KANG, G.H. et al. Prognostic significance of p53, mTOR, c-Met, IGF-1R, and HSP70 overexpression after the resection of hepatocellular carcinoma. *Gut Liver*. 2014 Jan;8(1):79-87. doi: 10.5009/gnl.2014.8.1.79. Epub 2014 Jan 13. PMID: 24516705; PMCID: PMC3916692.
 31. ZHANG. Z. et al. Increased expression of insulin-like growth factor-1 receptor predicts poor prognosis in patients with hepatocellular carcinoma. *Medicine (Baltimore)*. 2019 Nov;98(44):e17680. doi: 10.1097/MD.00000000000017680. PMID: 31689787; PMCID: PMC6946458.