

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

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

HENRIQUE VALLADÃO PIRES GAMA

CONCORDÂNCIA INTRA E INTEROBSERVADOR DA AVALIAÇÃO DE
MICROINVASÃO ANGIOLINFÁTICA EM CARCINOMA HEPATOCELULAR
UTILIZANDO OS MÉTODOS DE HISTOLOGIA CONVENCIONAL E
IMUNOISTOQUÍMICA

Belo Horizonte

2019

HENRIQUE VALLADÃO PIRES GAMA

CONCORDÂNCIA INTRA E INTEROBSERVADOR DA AVALIAÇÃO DE
MICROINVASÃO ANGIOLINFÁTICA EM CARCINOMA HEPATOCELULAR
UTILIZANDO OS MÉTODOS DE HISTOLOGIA CONVENCIONAL E
IMUNOISTOQUÍMICA

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.

Orientador: Prof.^a Paula Vieira Teixeira Vidigal

Coorientador: Prof. Agnaldo Soares Lima

Belo Horizonte

2019

G184c Gama, Henrique Valladão Pires.
Concordância intra e interobservador da avaliação de microinvasão angiolímfática em carcinoma hepatocelular utilizando os métodos de histologia convencional e imunistoquímica [manuscrito]: subtítulo. / Henrique Valladão Pires Gama. - - Belo Horizonte: 2019.
60f.: il.
Orientador (a): Paula Vieira Teixeira Vidigal.
Coorientador (a): Agnaldo Soares Lima.
Área de concentração: Patologia Investigativa.
Dissertação (mestrado): Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina.

1. Carcinoma Hepatocelular. 2. Procedimentos Cirúrgicos Minimamente Invasivos. 3. Dissertações Acadêmicas. I. Vidigal, Paula Vieira Teixeira. II. Lima, Agnaldo Soares. III. Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina. IV. Título.

NLM: WO 505

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

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE: PATOLOGIA

Reitora: **Sandra Regina Goulart Almeida**

Vice-Reitor: **Alessandro Moreira**

Pró-Reitor de Pós-Graduação: **Fábio Alves da Silva Júnior**

Pró-Reitora Adjunta de Pós-Graduação: **Silvia Helena Paixão Alencar**

Pró-Reitor de Pesquisa: **Mario Fernando Montenegro Campos**

Pró-Reitor Adjunto de Pesquisa: **André Ricardo Massensini**

Diretor da Faculdade de Medicina: **Humberto José Alves**

Vice-Diretora da Faculdade de Medicina: **Alamanda Kfoury Pereira**

Coordenador Geral do Centro de Pós-Graduação: **Tarcizo Afonso Nunes**

Subcoordenador Geral do Centro de Pós-Graduação: **Eli Iola Gurgel Andrade**

Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde - Patologia: **Geovanni Dantas Cassali**

Chefe do Departamento de Anatomia Patológica e Medicina Legal: **Cristiana Buzelin Nunes**

“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê.”

Arthur Schopenhauer

AGRADECIMENTOS

Na vida, geralmente temos simplificada e duas escolhas, dois caminhos. Um caminho é quase todo ele uma reta, é plano, com boa iluminação, asfaltado como um tapete bem liso e está repleto de sinalizações nos indicando para onde ir. O outro caminho, geralmente é cheio de curvas, feito de terra batida, com pedregulhos e muitas subidas em meio a lugares pouco iluminados, em que mal enxergamos o que há a nossa frente, muito menos as poucas placas que há pelo caminho. Só que no fim de cada caminho da vida, as recompensas também são distintas. O primeiro caminho apesar de nos proporcionar a chegada ao destino, por ser tranquilo demais, simplesmente nos leva ao fim, sem grandes dificuldades, não nos enriquecendo durante o trajeto. Já o segundo caminho, o tortuoso, por mais sofrido que seja, sempre nos ensina. Digo isso porque a jornada que me trouxe até aqui foi árdua, turbulenta e com alguns empecilhos, mas a escolha pelos desafios da vida e por sempre querer algo a mais e novo me levou a uma trajetória de muito aprendizado, essencial para o meu crescimento. Claro, que atravessar esse caminho sozinho teria sido muito mais difícil e não poderia deixar de agradecer as pessoas que foram fundamentais em toda essa jornada.

A toda minha família, em especial a meus pais, Paulo Roberto e Ana Maria e ao meu irmão Guilherme, por serem o alicerce da minha vida, exemplos em casa e em suas profissões, pelo apoio incondicional, amor imensurável e por proporcionarem tudo para tornar reais meus sonhos.

À Luciana, pelo amor, companheirismo, apoio, cumplicidade, pela paciência, por sempre me respeitar, me entender e ser uma grande incentivadora.

Aos meus queridos amigos de infância, que são irmãos que a vida me deu a oportunidade de escolher, pela torcida e por entenderem minha ausência em alguns momentos.

À Profa. Paula Teixeira Vidigal por me conceder a oportunidade deste aprendizado, por confiar em mim, pela amizade, pela orientação ao me ajudar, incentivar e/ou me acalmar quando necessário.

Ao Prof. Agnaldo Soares Lima pela coorientação.

Ao Prof. Moisés Salgado Pedrosa, pelos ensinamentos, pela oportunidade diária de aprendizado e pela amizade.

Ao Prof. Marcelo Antônio Pascoal Xavier e a meu primo Adriano Valladão pela colaboração fundamental nas análises estatísticas.

À Fernanda Césari, do Laboratório de Patologia Molecular da UFMG, pelo auxílio na execução dos experimentos.

Ao Ronniel Moraes pela ajuda ao longo do projeto.

Aos meus amigos e colegas de residência, em especial David, Francisco e João pela amizade e por tornarem mais leve essa jornada.

Aos funcionários, professores e preceptores do laboratório de anatomia patológica do HC/UFMG, que foram fundamentais para a conclusão dessa trajetória.

E a todos aqueles que, direta ou indiretamente, colaboraram para que este trabalho fosse realizado com sucesso.

RESUMO

Introdução: O carcinoma hepatocelular (CHC) é a neoplasia maligna primária mais comum do fígado (até 80% dos casos), sendo a 4^a no mundo em mortalidade. Com incidência e mortalidade crescentes, a melhor opção de tratamento é cirúrgica, reservada principalmente para tumores em estágio inicial. A invasão angiolinfática é o fator independente mais importante para o prognóstico, predição de recorrência e sobrevida do paciente. Pela sua relevância, é utilizada no estadiamento patológico do CHC (*AJCC/TNM*), sendo um dos critérios da mudança do estágio pT1 para pT2 ou pT4, porém necessita de melhor definição conceitual para aumentar sua reprodutibilidade e confiabilidade. O objetivo deste estudo foi avaliar a concordância intra e interobservador de microinvasão vascular (MIV) e sua associação com fatores morfológicos e laboratoriais, em amostras de CHC. **Métodos:** Três patologistas avaliaram 76 amostras de CHC provenientes de transplante hepático com intuito de caracterizar a presença de MIV por meio das colorações de hematoxilina-eosina (HE) e imunoistoquímica (IHQ) para CD34 e D2-40. A avaliação foi feita individualmente em dois momentos, com intervalo de dois meses entre eles. Os dados morfológicos do tumor foram obtidos por revisão de todos os casos e os dados laboratoriais foram obtidos por meio da revisão dos prontuários e análise do banco de dados do HC-UFMG. Os resultados foram analisados pelo coeficiente de Kappa (K) e por modelos de regressão logística para análises uni e multivariadas. **Resultados:** Por modelos de regressão logística das análises univariadas de todos os parâmetros morfológicos e clínicos, a variável independente “índice mitótico” foi a única que apresentou limiar de significância estatística ($p = 0,05$), com valor de *Odds Ratio* (OR) de 1,07 (IC 95% de 0,99 a 1,15), quando relacionada à MIV. Sobre a avaliação de MIV, a concordância interobservador por HE foi moderada no primeiro momento ($K = 0,485$) e razoável (0,320) no segundo ($p < 0,0001$). A avaliação pelo CD34 apresentou concordância razoável (0,234 e 0,218), em ambos os momentos ($p < 0,001$). A pesquisa pelo D2-40 não apresentou significância estatística, uma vez que não houve concordância ($p > 0,05$). A concordância intraobservador por HE foi quase perfeita ($K = 0,837$) para o examinador A, moderada (0,546) para o examinador B e substancial (0,682) para o examinador C ($p < 0,0001$). Na avaliação pelo CD34 a concordância foi substancial (0,636 e 0,629) para os examinadores A e B e quase perfeita (0,972) para o examinador C ($p < 0,0001$). Não houve correlação estatística válida pelo D2-40. Utilizando a Curva ROC para verificar a acurácia do CD34, em relação ao HE, observamos em análise intraobservador para os examinadores A e B, que o CD34 tende a ter uma especificidade alta, variando de 82,1% a quase 100%, com

sensibilidade de 46,9% a 81,1%. Em análise interobservador, o CD34 também possui especificidade alta (84,3% a 85,5%), enquanto a sensibilidade é um pouco menor (81,2% a 84,3%). **Discussão:** Nosso estudo demonstrou concordância semelhante para invasão vascular entre os métodos de HE e CD34, independente da comparação ter sido feita inter ou intraobservador. Entretanto, os valores de concordância intraobservador pelos dois métodos foi superior ao interobservador, o que nos permite inferir que cada examinador empregou critérios próprios de detecção de invasão, reforçando a necessidade de padronização. Pela análise das curvas ROC, o método de pesquisa pelo CD34 pode ser considerado mais específico do que sensível, apontando que este método não deve ser usado como um exame inicial (de triagem), mas pode ser útil em casos previamente vistos pelo em HE para auxiliar na pesquisa de invasão. **Conclusão:** O índice mitótico é um fator independente para predição de MIV. Os critérios para avaliação de invasão angiolinfática devem ser mais bem definidos em HE. O CD34 pode ser utilizado como método diagnóstico auxiliar de MIV.

Palavras-chave: Carcinoma hepatocelular; Invasão vascular; Imunoistoquímica; Interobservador; Intraobservador

ABSTRACT

Introduction: Hepatocellular carcinoma (HCC) is the most common primary neoplasia of the liver (up to 80% of the cases), being the 4th in mortality worldwide. Its incidence and mortality are growing and the best treatment option is surgery, reserved mainly for initial stage tumors. The angiolymphatic invasion is the most important independent factor for prognosis, recurrence prediction and disease-free survival of the patient. Because of its relevance, the AJCC/TNM pathological staging system includes vascular invasion as a criteria, playing important role to change from pT1 stage to pT2 or even pT4, but it still needs better conceptual definition to increase its reproducibility and reliability. The aim of this study was to evaluate the inter and intraobserver agreement of microvascular invasion (MVI) and its association with morphological and laboratorial parameters in samples of HCC.

Methods: Three pathologists performed the analysis of 76 HCC explants to characterize the presence of MVI using the hematoxylin eosin (HE) stain and immunohistochemistry (IHC) for CD34 and D2-40. The evaluations were made individually, in two moments, with a two months gap. Morphological data were collected by reviewing all cases and laboratorial data were collected by reviewing medical records and database analysis from HC-UFG. Results were analyzed by the Kappa's coefficient (K) and logistic regression models for uni and multivariate analyzes.

Results: By logistic regression models of the univariate analyzes of all morphological and laboratorial data, the independent variable "mitotic index" was the only to present threshold of statistical significance ($p=0.05$) with Odds Ratio of 1.07 (CI 95% of 0.99 to 1.15) when related to MVI. About the MVI, the interobserver agreement by HE was moderate in the first attempt ($K=0.485$) and fair (0.320) in the second ($p<0.0001$). The CD34 evaluation revealed fair agreement (0.234 and 0.218) in both attempts ($p<0.001$). The MVI search by D2-40 didn't present statistical significance, since there was no agreement ($p>0,05$). The intraobserver agreement by HE was almost perfect ($K=0.837$) for examiner A, moderate ($K=0.546$) for examiner B and substantial ($K=0.682$) for examiner C ($p<0.0001$). The CD34 evaluation revealed substantial agreement (0.636 and 0.629) for examiners A and B and almost perfect agreement (0.972) for examiner C ($p<0.0001$). There was no valid statistic correlation for D2-40. Using the ROC Curve to verify the accuracy of CD34 in relation to HE we note in intraobserver analysis for examiners A and B that CD34 tends to a high specificity, ranging from 82.1 to almost 100%, with sensitivity of 46.9 to 81.1%. In interobserver analysis, CD34 also has a high specificity (84.3 to 85.5%) while its sensitivity is a little shorter (81.2 to 84.3%).

Discussion: Our study demonstrated similar agreement for MVI

between HE and CD34 methods, regardless the comparison have been made inter or intraobserver. However, the intraobserver agreement values for both methods were higher than the interobserver ones, which allows us to infer that each pathologist employed own criteria to search for invasion, reinforcing the need of standardization. By the analysis of the ROC Curves, the CD34 method could be considered more specific than sensitive, pointing to the fact that this method shouldn't be used as a trial exam, but it could be useful in cases previously seen by HE to help confirming MVI. **Conclusion:** The mitotic index is an independent factor to predict MVI. The MVI evaluation criteria should be improved in HE. The CD34 can be used as auxiliary diagnostic method for MVI.

Keywords: Hepatocellular carcinoma; Vascular invasion; Immunohistochemistry; Interobserver; Intraobserver

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

| | |
|--|----|
| FIGURA 1 - Incidência estimada de novos casos de câncer de fígado, por 100.000 habitantes, no mundo, em 2018 | 2 |
| FIGURA 2 - Incidência e mortalidade por câncer de fígado no mundo, em 2018 | 2 |
| FIGURA 3 - Grupos de estágios prognósticos da AJCC 2018 para carcinoma hepatocelular baseado no sistema <i>TNM</i> de estadiamento | 6 |
| FIGURA 4 - Estadiamento e estratégia de tratamento – <i>Barcelona Clinic Liver Cancer (BCLC)</i> | 9 |
| FIGURA 5 - Padrão trabecular de carcinoma hepatocelular de baixo grau | 19 |
| FIGURA 6 - Padrão pseudoacinar de carcinoma hepatocelular de baixo grau | 19 |
| FIGURA 7 - Padrão sólido de carcinoma hepatocelular | 20 |
| FIGURA 8 - Carcinoma hepatocelular de alto grau | 20 |
| FIGURA 9 - Exemplos de invasão vascular por CHC em vasos de parede fina em coloração pelo método de HE | 23 |
| FIGURA 10 - Exemplos de invasão vascular por CHC em vasos de parede fina utilizando método de imunohistoquímica (D2-40) | 23 |
| FIGURA 11 - Exemplos de invasão vascular por CHC em vasos de parede fina utilizando método de imunohistoquímica (CD34) | 24 |
| FIGURA 12 - Curvas ROC – Análise intraobservador da acurácia da associação entre os métodos HE (padrão) e imunohistoquímica por CD34 | 30 |
| FIGURA 13 - Curvas ROC – Análise interobservador da acurácia da associação entre os métodos HE (padrão) e imunohistoquímica por CD34 | 31 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| TABELA 1 - Anticorpos utilizados na técnica de imunoistoquímica | 14 |
| TABELA 2 - Dados demográficos, clínicos e laboratoriais de 76 pacientes submetidos a transplante hepático no HC-UFG (2002-2017) | 17 |
| TABELA 3 - Dados morfológicos de 76 casos de CHC provenientes de transplante hepático realizados no HC-UFG (2002-2017) | 18 |
| TABELA 4 - Avaliação de invasão vascular por três examinadores em dois momentos distintos | 21 |
| TABELA 5 - Casos positivos e negativos para invasão vascular em CHC, quando pelo menos dois examinadores atribuíram a mesma classificação para cada caso, em dois momentos avaliados | 22 |
| TABELA 6 - Associação entre padrão arquitetural do tumor e invasão vascular por HE e CD34, em dois momentos distintos | 25 |
| TABELA 7 - Associação entre grau de diferenciação tumoral e invasão vascular por HE e CD34, em dois momentos distintos | 25 |
| TABELA 8 - Associação entre as variáveis contínuas e invasão vascular por HE e CD34, em dois momentos distintos | 26 |
| TABELA 9 - Variação interobservador de invasão vascular em CHC | 26 |
| TABELA 10 - Variação intraobservador de invasão vascular em CHC | 27 |
| TABELA 11 - Concordância interobservador de avaliação de invasão vascular, em dois momentos distintos | 28 |
| TABELA 12 - Concordância intraobservador de avaliação de invasão vascular, em dois momentos distintos | 28 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AFP - Alfa-fetoproteína

AJCC - *American Joint Committee on Cancer*

ALT - Alanina aminotransferase

APM/FM – UFMG - Departamento de Anatomia Patológica e Medicina Legal da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais

AST - Aspartato aminotransferase

BCLC - *Barcelona Clinic Liver Cancer*

BD - Bilirrubina direta

BI - Bilirrubina indireta

BT - Bilirrubina total

CGA – Campos de grande aumento

CHC – Carcinoma hepatocelular

COEP - Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG

DAB - Diaminobenzidina

EX - Examinador

FA - Fosfatase alcalina

GGT - Gama glutamil transferase

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

HE - Hematoxilina e eosina

IAG - Instituto Alfa de Gastroenterologia

IC – Intervalo de confiança

IHQ – Imunoistoquímica

INCA - Instituto Nacional do Câncer

K – Coeficiente de Kappa

LDH - Lactato desidrogenase

MELD - *Model for End-stage Liver Disease*

MIV – Microinvasão vascular

NAFLD - Doença hepática gordurosa não alcoólica

NASH - Esteatohepatite não alcoólica

OR – *Odds Ratio*

RNI - Razão normalizada internacional

TNM - *Tumor Node Metastasis*

UICC - *International Union Against Cancer*

VEGF - Fator de crescimento endotelial vascular

VHB – Vírus da hepatite B

VHC – Vírus da hepatite C

UFMG – Universidade Federal de Minas Gerais

ÍNDICE

| | | |
|-------|---|----|
| 1 | INTRODUÇÃO | 1 |
| 1.1 | Carcinoma hepatocelular | 1 |
| 2.1.1 | Epidemiologia | 1 |
| 2.1.2 | Fatores de risco | 3 |
| 2.1.3 | Fatores prognósticos | 3 |
| 2.1.4 | Estadiamento e invasão vascular | 4 |
| 2.1.5 | Tratamento | 8 |
| 2 | JUSTIFICATIVAS | 10 |
| 3 | OBJETIVOS | 11 |
| 3.1 | Objetivo geral | 11 |
| 3.2 | Objetivos específicos | 11 |
| 4 | MATERIAIS E MÉTODOS | 12 |
| 4.1 | Considerações éticas | 12 |
| 4.2 | Delineamento e estratégias de estudo | 12 |
| 4.3 | Critérios de exclusão | 13 |
| 4.4 | Análise imunoistoquímica | 14 |
| 4.5 | Análises estatísticas | 15 |
| 5 | RESULTADOS | 16 |
| 5.1 | Correlação entre invasão vascular e parâmetros morfológicos e clínicos/laboratoriais. | 21 |
| 5.2 | Concordância intra e interobservador de invasão vascular | 26 |
| 5.3 | Invasão vascular: HE x CD34 | 29 |
| 6 | DISCUSSÃO | 33 |
| 7 | CONCLUSÃO | 38 |
| 8 | REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 39 |
| 9 | ANEXOS | 43 |
| 9.1 | Anexo 1 – Protocolo de microscopia de peça de explante hepático | 43 |
| 9.2 | Anexo 2 - Carta de aprovação do comitê de ética | 45 |

1 - INTRODUÇÃO

1.1 – Carcinoma hepatocelular

O carcinoma hepatocelular (CHC) é a neoplasia maligna primária mais comum do fígado, que surge a partir da transformação maligna dos hepatócitos, células de origem epitelial que são o principal componente do parênquima hepático, representando aproximadamente 70 a 80% dos tumores deste órgão (1). Os maiores fatores de risco para o seu desenvolvimento são a doença hepática crônica e a cirrose hepática, independente de sua etiologia (2). O CHC afeta principalmente os homens, em uma incidência três vezes maior do que as mulheres, acometendo em especial pacientes da quarta a sétima décadas de vida (3). Na maioria dos casos (90%), o paciente é assintomático ou apresenta dor abdominal discreta e o aparecimento dos sinais e sintomas, como perda ponderal, prostração, febre, icterícia e ascite estão diretamente relacionados ao tamanho tumoral e seu crescimento. Portanto, no momento do diagnóstico, o CHC geralmente já se apresenta em estágios mais avançados (4).

1.1.1 – Epidemiologia

O CHC é o quinto tumor maligno mais frequente em homens e o oitavo em mulheres no mundo, sendo que sua ocorrência se eleva com a idade, tendo seu pico aproximadamente aos 70 anos, raramente ocorrendo antes dos 40 anos (3). O CHC tem maior incidência no leste e sudeste asiáticos, oeste africano e nas regiões da Polinésia e Micronésia, sendo sua prevalência mundial alta, com aproximadamente 800 mil novos casos reportados anualmente. Sua incidência e mortalidade estão em ascensão ano após ano (1), sendo a quarta causa de morte por câncer no mundo atualmente (3,5,6), como pode ser observado nas FIGURAS 1 e 2. No Brasil em 2015, os cânceres de fígado foram responsáveis por 9711 mortes no total, sendo 5647 casos em homens e 4063 em mulheres segundo o Instituto Nacional do Câncer – INCA (7). O CHC é a principal causa de óbito em indivíduos portadores de cirrose hepática (8).

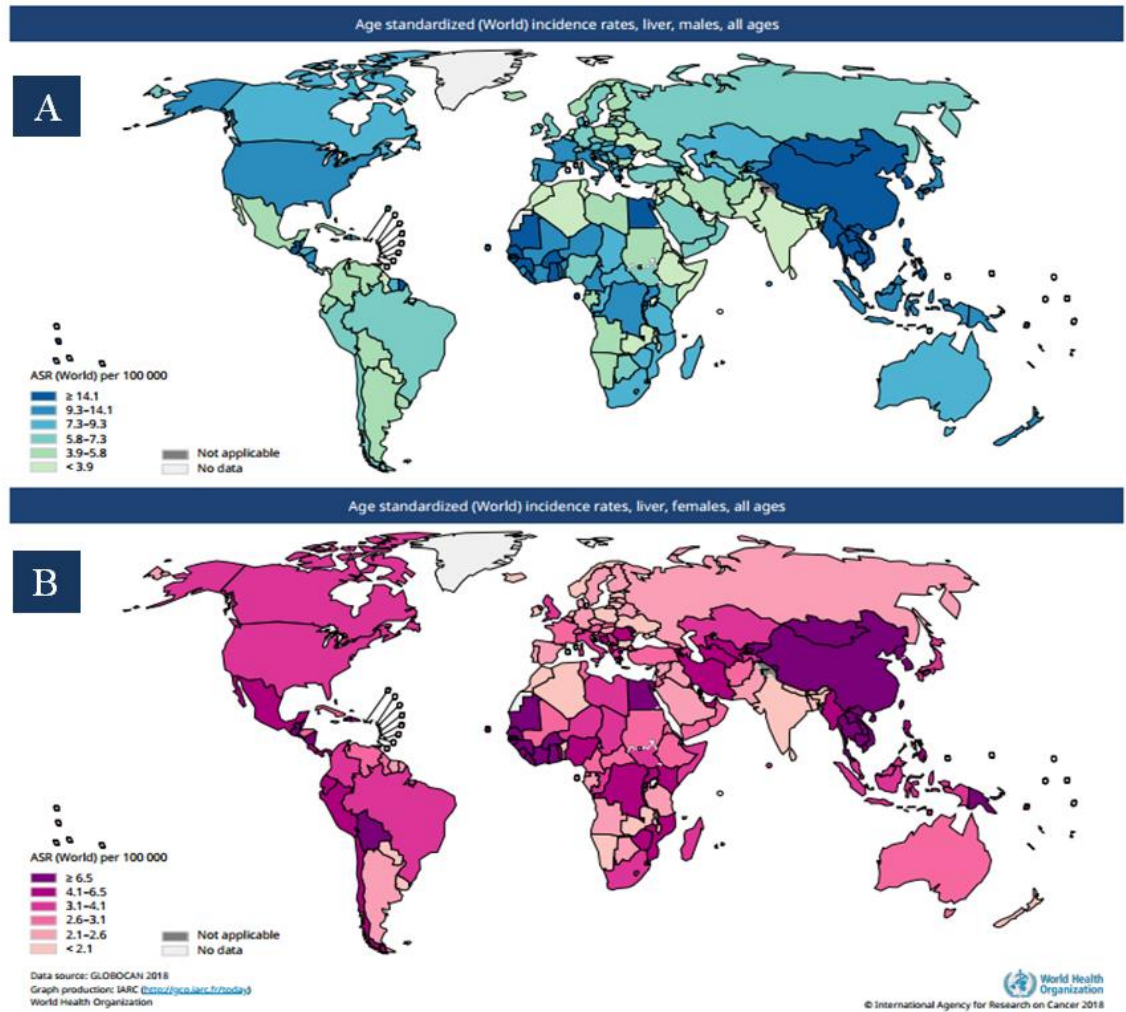


Figura 1 - Incidência estimada de novos casos de câncer de fígado, por 100.000 habitantes, no mundo, em 2018: (A) Sexo Masculino; (B) Sexo feminino. De acordo com a legenda quanto mais forte a intensidade das cores azul e rosa, maior o número de casos encontrados na região. Fonte: <https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/cancers/11-Liver-fact-sheet.pdf>

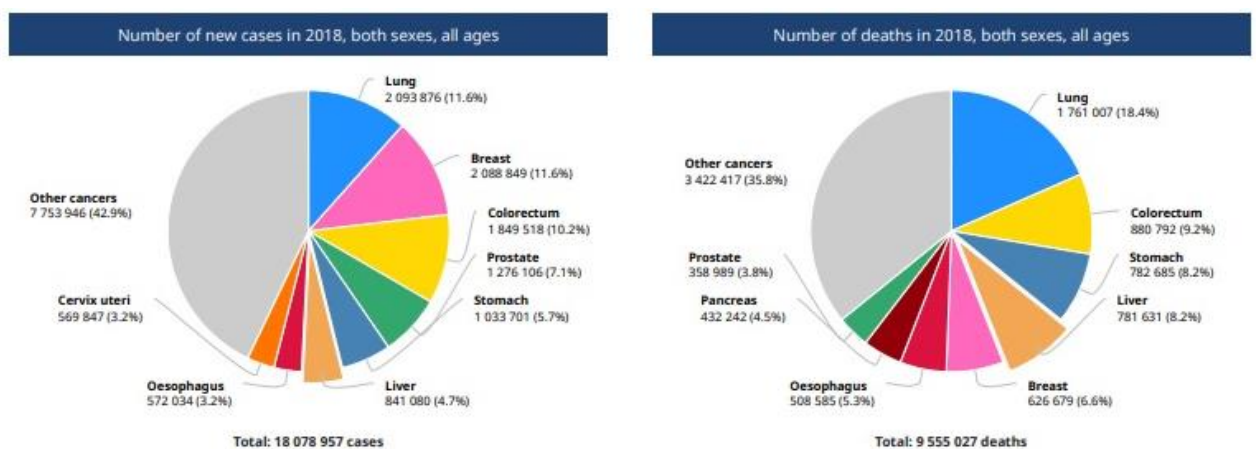


Figura 2 - Incidência e mortalidade por câncer de fígado no mundo, em 2018. Em termos de novos casos anuais, o câncer de fígado ocupa a 6ª posição e em número de mortes situa-se na 4ª posição. Fonte: <https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/cancers/11-Liver-fact-sheet.pdf>

1.1.2 – Fatores de risco

Estudos epidemiológicos indicam que a cirrose hepática, principal condição para o desenvolvimento de CHC, está associada a fatores ambientais de exposição a infecções virais e hábitos de vida, além de fatores genéticos, que mesmo em menor proporção, também tem relevância etiológica (3,9). São considerados fatores de risco para esse tipo de câncer: infecção viral crônica (principalmente hepatites virais B e C), sendo esta responsável por aproximadamente 85% dos casos; ingestão de bebidas alcoólicas, apontada como o principal fator não viral; a esteatohepatite não alcoólica (NASH), em conjunto com a doença hepática gordurosa não alcoólica (NAFLD) vem se tornando mais importante com o passar dos anos, em indivíduos obesos e diabéticos; o tabagismo; dieta contendo altas quantidades de aflatoxina, uma micotoxina produzida pelo fungo do gênero *Aspergillus*; uso de esteroides anabolizantes; além de desordens metabólicas, como hemocromatose hereditária, tirosinemia hereditária, deficiência de α -1-antitripsina, doença de Wilson, entre outras causas (2,3).

1.1.3 – Fatores prognósticos

Em se tratando de CHC, podemos dividir os fatores prognósticos que influenciam a sobrevida do paciente em quatro grupos principais, que são: fatores relacionados ao tumor; fatores relacionados ao fígado que alberga o tumor; fatores relacionados ao estado geral do paciente e fatores relacionados ao tratamento (10).

Para o presente estudo, abordaremos principalmente aqueles relacionados ao tumor, sendo considerados fatores independentes de prognóstico, os quais podem ser incluídos: grau de diferenciação tumoral; tamanho do tumor; número de nódulos neoplásicos; invasão local; invasão vascular; metástases e nível de alfa-fetoproteína (10,11).

O grau de diferenciação histológico do tumor, em geral, é feito utilizando-se o sistema de graduação proposto por Edmondson e Steiner, que o classifica de I a IV, variando de bem diferenciado a indiferenciado (12,13). Sabe-se que tumores menos diferenciados (graus III e IV – alto grau) em conjunto com outros fatores morfológicos, como tamanho tumoral maior que 5,0 cm e multinodularidade, possuem pior prognóstico implicando em menor sobrevida para o paciente, sendo ainda preditores de recorrência, segundo alguns autores, após o tratamento do CHC seja por, quimioembolização transarterial, ablação tumoral, por ressecção hepática parcial ou transplante (11,14,15).

A alfa-fetoproteína, uma glicoproteína sintetizada pelos hepatócitos, frequentemente está aumentada em casos de CHC e foi demonstrado que níveis elevados desta proteína (>200 ng/ml) também são um bom preditor para recorrência do tumor, havendo ainda correlação com a sobrevida dos pacientes segundo alguns estudos (16,17).

Destes fatores relacionados ao tumor, a presença de invasão vascular é o fator independente mais importante para o prognóstico, predição de recorrência e sobrevida do paciente (18) e será o foco principal do presente estudo.

1.1.4 – Estadiamento e invasão vascular

O CHC é um tumor altamente vascularizado com uma grande propensão a invasão vascular, em uma frequência que aumenta com o crescimento tumoral, o que altera tanto o estadiamento da doença quanto o prognóstico do paciente (15,19,20).

Durante a progressão do CHC, principalmente em tumores maiores que 2 centímetros (cm) de diâmetro, o achado de invasão vascular se torna mais frequente, seja ela macro ou microvascular sanguínea e também linfática, predispondo ao surgimento de metástases linfonodais ou em órgãos à distância. A avaliação da presença ou ausência de êmbolos tumorais é de extrema importância, pois além de alterar o estadiamento da doença, foi descrita como um dos fatores mais importantes de predição de recorrência do CHC (11).

O sistema de estadiamento histopatológico mais comumente utilizado e aceito mundialmente é o sistema *American Joint Committee on Cancer (AJCC) /International Union Against Cancer (UICC) tumor node metastasis (TNM)*, que em sua 5ª edição no ano de 1998 reconheceu a invasão vascular como fator prognóstico e a incorporou no sistema de estadiamento. Atualmente utiliza-se a sua 8ª edição, revista em 2018, que manteve a invasão vascular em sua classificação. Este sistema de estadiamento analisa as características do tumor (T), a presença de metástases em linfonodos (N) e em órgãos à distância (M). Sua aplicação é fundamental para a definição do diagnóstico, terapêutica e prognóstico dos pacientes com CHC (21-24).

Neste sistema, em relação ao tumor primário (T), a classificação pode variar de T1 a T4, sendo o tamanho, a invasão vascular e o número de nódulos os parâmetros utilizados. Comparativamente ao sistema anterior da 7ª edição (2010) houve pequenas alterações. Na nova edição, levam-se em consideração duas medidas de tumor como ponto de corte, 2,0 e 5,0

cm, enquanto na edição antiga levava-se apenas o valor de 5,0 cm em conta. O T1 que não tinha subdivisões foi desmembrando em T1a e T1b tendo em vista o tamanho do tumor. O T2 permanece inalterado e o T3 que era desmembrado em T3a e T3b foi novamente reagrupado em uma categoria única, tendo em vista que o antigo T3b, que levava em consideração a invasão vascular de ramo maior de veia porta ou hepáticas foi elevado à categoria T4 (24).

A classificação mais recente da AJCC/UICC para o estadiamento anatomopatológico (pTNM) discrimina os carcinomas hepatocelulares da seguinte maneira (24):

- **pT – Tumor primário**
 - pTX – Não pode ser avaliado
 - pT0 – Nenhuma evidência de tumor primário
 - pT1 – Tumor solitário ≤ 2 cm ou > 2 cm sem invasão vascular
 - pT1a – Tumor solitário ≤ 2 cm
 - pT1b – Tumor solitário > 2 cm sem invasão vascular
 - pT2 – Tumor solitário > 2 cm com invasão vascular ou tumores múltiplos (nenhum > 5 cm)
 - pT3 – Tumores múltiplos (pelo menos um > 5 cm)
 - pT4 – Tumor único ou tumores múltiplos de qualquer tamanho envolvendo um ramo maior de veia porta ou de veias hepáticas; ou tumor (es) com invasão direta de órgão adjacentes, que não a vesícula biliar ou com perfuração do peritônio visceral

- **pN – Linfonodos regionais**
 - pNX – Linfonodos regionais não podem ser avaliados
 - pN0 – Ausência de metástases em linfonodos regionais
 - pN1 – Metástases em linfonodos regionais

- **pM – Metástases a distância**
 - pMX – Não aplicável
 - pM0 – Ausência de metástases a distância
 - pM1 – Metástases a distância (especificar o sítio)

Analisando-se a classificação acima, a adequada avaliação anatomopatológica da presença ou ausência de invasão vascular é de fundamental importância para melhor refinamento do estadiamento dos pacientes portadores de CHC. Um exemplo simples consiste em um paciente com lesão única maior que 2,0 cm, em que a não visualização de invasão vascular o definirá como pT1b, enquanto a identificação de microinvasão levará seu estadiamento a pT2 ou até mesmo a pT4, se houver envolvimento de ramo maior de veia porta ou hepática (24). Além disso, de acordo com estudo de Rodríguez-Perálvares et al. (25) realizado no ano de 2013, a presença de invasão em vasos de parede muscularizada ou em vasos distando mais de 1 cm da borda do tumor implica em pior prognóstico. Portanto, levando-se em consideração apenas o quesito invasão vascular percebe-se sua importância em relação ao estadiamento tumoral (8).

Ademais, o estadiamento do tumor está diretamente relacionado à classificação do grupo prognóstico dos pacientes (FIGURA 3), que pode auxiliar na definição da melhor terapêutica a ser adotada (24).

AJCC PROGNOSTIC STAGE GROUPS

| When T is... | And N is... | And M is... | Then the stage group is... |
|--------------|-------------|-------------|----------------------------|
| T1a | N0 | M0 | IA |
| T1b | N0 | M0 | IB |
| T2 | N0 | M0 | II |
| T3 | N0 | M0 | IIIA |
| T4 | N0 | M0 | IIIB |
| Any T | N1 | M0 | IVA |
| Any T | Any N | M1 | IVB |

Figura 3 - Grupos de estágios prognósticos da AJCC 2018 para carcinoma hepatocelular baseado no sistema TNM de estadiamento. Fonte: adaptado de *AJCC CANCER STAGING MANUAL*. 8 Ed. Chicago, IL. Springer, 2018.

Uma revisão sistemática de vinte estudos observacionais realizada em 2012 pelo departamento de oncologia do *Royal Free Hospital* em Londres na Inglaterra mostrou haver um decréscimo de três anos de sobrevida livre de doença em pacientes diagnosticados com

CHC com invasão microvascular e tratados com transplante hepático em relação aos pacientes sem invasão microvascular detectável, tratados da mesma maneira. Da mesma forma, pacientes com CHC e invasão microvascular tratados com ressecção hepática apresentaram uma redução de três a cinco anos na sobrevida livre de doença quando comparados a pacientes sem invasão microvascular detectável, que receberam o mesmo tratamento (25).

Entretanto os trabalhos científicos levantados na literatura e realizados até o presente momento mostram que a identificação de invasão vascular é um grande desafio para os patologistas, uma vez que os critérios variam entre os profissionais e estudos comparativos entre os examinadores mostraram graus estatisticamente relevantes de discordância em relação à ausência ou presença de invasão vascular (25,26).

A invasão vascular pode ser identificada macroscopicamente quando é visível o acometimento vascular a olho nu durante análise do espécime recebido, ou microscopicamente quando essa visualização só acontece com ajuda da microscopia óptica (27).

A definição clássica de invasão vascular microscópica, aceita pelos patologistas cirúrgicos em geral, é definida pela presença de células tumorais em um espaço vascular revestido por células endoteliais (28,29). Entretanto, além deste critério universalmente aceito, há critérios variáveis entre os patologistas, podendo tornar esta avaliação um pouco mais subjetiva. Entre eles pode-se destacar a presença de adesão das células tumorais a parede vascular, a presença de hemácias permeando as células tumorais no interior do espaço vascular e a identificação de parede muscular ou lâmina elástica em vasos sanguíneos mais calibrosos (25,26).

Um estudo publicado em 2010 e realizado nos Estados Unidos da América, no *Cedars-Sinai Medical Center*, em Los Angeles, utilizou uma amostragem de 126 casos de ressecções cirúrgicas de CHC já com o diagnóstico confirmado e que foram analisados separadamente por seis patologistas, com idades variadas de experiência prática e também experiência variável com patologia hepática com o objetivo simples de definir se havia ou não invasão vascular tumoral. Cada patologista fez sua análise a partir do método de histologia convencional, isto é, em coloração Hematoxilina-Eosina (HE), de todos os 126 casos e em dois momentos distintos, com intervalo de quatro meses entre eles. Portanto, criou-se uma base de dados para a realização de uma comparação estatística inter e intraobservador dos resultados obtidos. Ao final, o trabalho mostrou que houve variação considerada estatisticamente moderada tanto inter quanto intraobservador, com pouca influência do tempo

de experiência profissional ou de atuação específica em hepatopatologia e que em casos considerados difíceis e desafiantes, esta discordância foi ainda maior. Estes dados, juntamente com outros trabalhos já realizados na literatura, mostram que há uma necessidade de melhores critérios para a definição da presença de invasão vascular, uma vez que isto impacta diretamente no prognóstico do paciente (25,26).

1.1.5 – Tratamento

Atualmente, o sistema de classificação *Barcelona Clinic Liver Cancer* (BCLC) para CHC, já extensamente validado, engloba parâmetros clínicos e morfológicos, sendo o mais comumente utilizado para o estadiamento e tratamento dos pacientes. Eles são subdivididos em 5 estádios (0, A, B, C e D), de acordo com variáveis prognósticas pré-estabelecidas, que os alocam em grupos de tratamento específicos (30):

1-Estadio 0 (muito inicial): presença de nódulo único ≤ 2 cm de diâmetro sem invasão vascular ou extra-hepática, paciente em boa condição de saúde e função hepática preservada. Estes pacientes podem ser submetidos à ablação tumoral, ressecção hepática do segmento acometido ou transplante hepático.

2- Estadio A (inicial): pacientes que apresentam tumores únicos ou até 3 nódulos com tamanho ≤ 3 cm de diâmetro sem invasão vascular ou extra-hepática, paciente em boa condição de saúde e função hepática preservada. Estes pacientes podem ser submetidos à ablação tumoral, ressecção hepática do segmento acometido ou transplante hepático.

3- Estadio B (intermediário): pacientes com doença multifocal, assintomáticos, sem evidências de invasão vascular ou extensão extra-hepática e função hepática preservada. São candidatos a quimioembolização transarterial.

4- Estadio C (avançado): pacientes com um ou mais dos seguintes fatores: doença multifocal, com sintomas relacionados ao câncer, com evidência de invasão da veia porta ou metástases extra-hepáticas. Estes podem receber quimioterapia sistêmica com inibidores de tirosina-quinase, como sorafenibe e regorafenib, com o objetivo de prolongar a sobrevida.

5- Estadio D (terminal): pacientes com função hepática severamente alterada ou graves sintomas relacionados ao câncer, se apresentando muito debilitados pelo tumor, inviabilizando o transplante hepático por terem um prognóstico ruim, sendo os cuidados de suporte a melhor opção para estes pacientes.

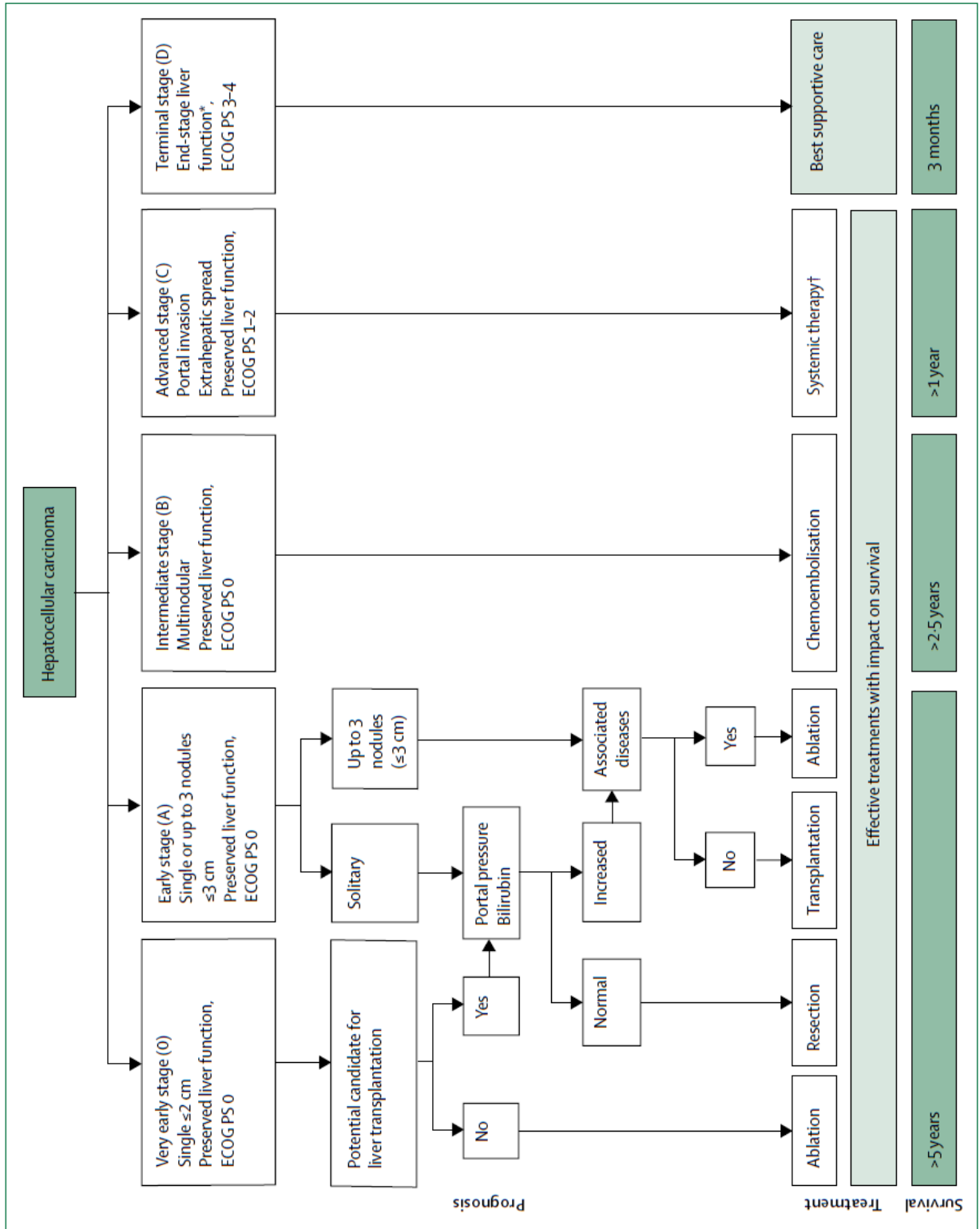


Figura 4 - Estadiamento e estratégia de tratamento – *Barcelona Clinic Liver Cancer (BCLC)*.
 Fonte: adaptado de Bruix, *et al.*, 2018

2 – JUSTIFICATIVAS

Não foram encontrados na literatura estudos sobre CHC em relação à variabilidade intra e interobservador de invasão linfática, nem a utilização de técnica de imunoistoquímica (IHQ) com marcadores vasculares sanguíneo e linfático, CD34 e D2-40 respectivamente. A IHQ poderia desempenhar um papel de prever se a concordância entre os examinadores teria uma menor variabilidade estatística e se esta técnica poderia ser estatisticamente superior a metodologia convencional da microscopia óptica com a utilização da coloração rotineira do HE. Trabalhos semelhantes foram realizados em estudos de invasão linfovascular em adenocarcinoma colorretal (31).

Em face dos fatos expostos, em se tratando de estudos sobre CHC, todos os esforços são justificados na tentativa de se identificar com maior acuidade a presença de invasão vascular tanto por meio de estudos convencionais em HE, quanto por estudos imunoistoquímicos. Esses esforços são particularmente importantes, sobretudo, pelo fato da invasão vascular mudar o estadiamento do paciente, ser um fator prognóstico e um dos maiores fatores preditivos de recorrência do CHC após tratamento curativo, seja por ressecção cirúrgica do tumor ou por transplante hepático.

3 - OBJETIVOS

3.1 - Objetivo geral

Estudar a ocorrência de invasão vascular utilizando os métodos de histologia convencional pela coloração de Hematoxilina-Eosina (HE) e de imunoistoquímica (IHQ) em uma série de pacientes com diagnóstico de CHC, em que o mesmo foi removido por transplante hepático.

3.2 - Objetivos específicos

3.2.1. Pesquisar a presença de invasão vascular angiolinfática por meio de estudo histopatológico convencional, utilizando a coloração de HE.

3.2.2. Pesquisar a presença de invasão vascular angiolinfática por meio de estudo IHQ, utilizando os anticorpos marcadores de endotélio vascular sanguíneo e linfático CD34 e D2-40, respectivamente.

3.2.3. Comparar os achados de invasão vascular obtidos pela análise histopatológica convencional, com a coloração de HE com aqueles obtidos por IHQ com os marcadores de endotélio vascular CD34 e D2-40.

3.2.4. Comparar os achados de invasão vascular obtidos pelos métodos de HE e IHQ, por meio de análise intra e interobservador.

3.2.5. Correlacionar os achados de invasão vascular com outros dados histológicos observados e dados clínicos/laboratoriais de evolução dos pacientes.

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 parecer nº CAAE 0643.0.203.000-11.

4.2 – Delineamento e estratégias de estudo

Trata-se de estudo observacional, retrospectivo e comparativo de investigação de embolização angiolinfática neoplásica em 76 casos de pacientes portadores de CHC, que foram tratados por meio de transplante hepático realizados no Instituto Alfa de Gastroenterologia (IAG) do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais (HC-UFMG) e arquivados no Laboratório de Anatomia Patológica do HC-UFMG, entre os anos de 2002 e 2017.

Todas as lâminas de HE de todos os casos foram revistas para análise dos dados histológicos referentes ao tumor, entre eles padrão histológico, presença de necrose, padrão citológico, características intracelulares, índice mitótico, grau de diferenciação tumoral pela classificação de Edmondson e Steiner (13), presença de invasão angiovascular e avaliação do parênquima hepático não tumoral. Estes elementos estão listados e melhor elucidados no Anexo 1 (Protocolo de microscopia de peça de explante hepático).

A partir da análise dos casos em lâminas de HE, selecionamos as lâminas mais representativas do tumor. Do arquivo do Laboratório de Anatomia Patológica do HC-UFMG, resgatamos os blocos de parafina correspondentes, sempre respeitando as características histológicas e critérios de exclusão (descritos posteriormente) para confecção de novos cortes histológicos a serem corados por método imunoistoquímico.

As análises histológica e IHQ foram realizadas por três patologistas vinculados ao Laboratório de Pesquisa em Patologia Molecular do Departamento de Anatomia Patológica e Medicina Legal da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais (APM/FM – UFMG). Eles possuem tempo de experiência variando de 03 a 18 anos, e também possuem experiência variável em patologia hepática.

Os três patologistas analisaram todos os casos com intuito de avaliar a presença ou ausência de invasão tumoral angiolímfática, utilizando os métodos de HE e IHQ. A avaliação IHQ foi feita por meio da marcação do endotélio vascular sanguíneo e linfático, utilizando os anticorpos CD34 e D2-40 respectivamente, com o objetivo de delimitar o contorno dos vasos e porventura facilitar a determinação de um espaço vascular verdadeiro para a pesquisa de êmbolos neoplásicos.

A avaliação pelos patologistas foi feita separadamente, sem conhecer ou discutir os achados entre si, sendo que cada patologista examinou cada caso em dois momentos distintos, com intervalo de dois meses entre eles. Além disso, as lâminas de HE, CD34 e D2-40 foram misturadas antes de serem entregues a cada examinador, sendo a análise feita em ordem aleatória. Dessa forma, todos os casos foram avaliados duas vezes por cada patologista, sem conhecimento prévio das análises, em ordem aleatória, proporcionando assim resultados passíveis de comparação tanto na forma inter, quanto intraobservador.

Os dados clínicos como idade, gênero, etiologia da doença de base e dados clínicos/laboratoriais foram obtidos por meio da revisão dos prontuários e análise do banco de dados do Serviço de Transplante Hepático do IAG do HC-UFMG para correlação com os achados histológicos obtidos.

4.3 - Critérios de exclusão

Foram excluídas as amostras que preencheram os seguintes critérios:

- Casos com lâminas histológicas contendo apenas tumor, sem parênquima hepático não neoplásico adjacente;
- Casos com necrose secundária a quimioembolização tumoral;
- Casos com blocos de parafina com amostras insuficientes ou danificadas impedindo a realização dos exames imunoistoquímicos.

4.4 – Análise imunoistoquímica

Para análise imunoistoquímica, 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 incubados em estufa a 56°C por 12 horas (*overnight*) para desparafinização e desidratação, além de serem tratados com três lavagens em xilol, por cinco minutos cada, e três lavagens em álcoois etílicos absoluto e hidratados com concentrações distintas (95%, 75%), também por cinco minutos e água destilada, para reidratação.

Posteriormente, foi realizada reativação antigênica induzida pelo calor com citrato de sódio 0,01M por 30 minutos, a uma temperatura de 90°. Na sequência, foi feito o bloqueio da peroxidase endógena (Novocastra™ *Peroxidase block*) com incubação por 10 minutos. Para minimizar a marcação inespecífica, as amostras foram submetidas ainda ao bloqueio de proteína (Novocastra™ *Protein Block*) por 10 minutos, antes da aplicação dos anticorpos primários. Utilizamos em cortes histológicos distintos, os anticorpos CD34 e D2-40, que estão descritos em conjunto com as condições de tratamento da amostra e a diluição na TABELA 1, após padronização em nosso laboratório. Posteriormente a lavagem das amostras com os anticorpos incubados, foi utilizado o sistema de bloqueio pós-primário (Novocastra™ *Post Primary*), bem como um polímero sintético (Novolink™ *Polymer*), um anticorpo secundário, ambos incubados por 30 minutos. Em seguida foi adicionada solução de 3,3-diaminobenzidina (DAB) por aproximadamente 2 minutos para revelação da reação imunoistoquímica. Por fim, todas as lâminas foram coradas com hematoxilina de Harris (Sigma) por dois minutos, sendo lavadas na sequência em água corrente e banhadas em soluções de álcool e xilol, posteriormente sendo montadas com as lamínulas.

Tabela 1 – Anticorpos utilizados na técnica de imunoistoquímica

| Proteína | Fabricante/Clone | Tratamento | Diluição | Incubação |
|-----------------|-------------------------|------------------------|-----------------|------------------|
| CD34 | DAKO/QBEnd 10 | Citrato de Sódio 0,01M | 1:100 | 1 hora |
| D2-40 | DAKO/Podoplanin | Citrato de Sódio 0,01M | 1:75 | 1 hora |

As lâminas foram analisadas utilizando-se os microscópios ópticos Olympus CX41 e Nikon E200, em que se observaram a marcação IHQ com os anticorpos CD34 e D2-40 evidenciando o endotélio de vasos sanguíneos e linfáticos, respectivamente, permitindo a delimitação de um espaço vascular. Todas as nossas amostras tiveram a trama vascular fortemente corada pelo método descrito, funcionando como controle interno positivo.

4.5 - Análises estatísticas

Os dados foram armazenados em planilhas eletrônicas do Microsoft Office Excel e todos os cálculos estatísticos foram realizados utilizando os programas estatísticos R (versão 3.5.2), Minitab 17® e SPSS 18®, sendo os gráficos e tabelas confeccionados pelo RStudio (versão 7.8) e no próprio Excel.

A análise descritiva de todas as variáveis foi apresentada em forma de números e porcentagens. Foram feitas análises estatísticas entre invasão vascular e os parâmetros morfológicos, clínicos e laboratoriais, sendo empregado o Teste Exato de Fisher para as variáveis categóricas e Teste U de Mann-Whitney para as variáveis numéricas. A correlação entre os observadores foi efetuada através do coeficiente de concordância de Kappa (32). O valor de Kappa é classificado em diferentes níveis de concordância: 0,00-0,20 (mínima); 0,21-0,40 (razoável); 0,41-0,60 (moderada); 0,61-0,80 (substancial); 0,81-1,00 (praticamente perfeita). A técnica da Curva ROC foi utilizada para comparação entre dois métodos observacionais. Para análise da predição de invasão foram ajustados modelos de regressão logística. As diferenças estatisticamente significativas foram consideradas quando $p < 0,05$.

5 - RESULTADOS

O estudo foi realizado com 76 amostras de carcinoma hepatocelular (n = 76), obtidas exclusivamente de pacientes submetidos a transplante hepático, realizados IAG do HC-UFMG entre os anos de 2002 e 2017 e armazenadas em blocos de parafina provenientes do Serviço de Anatomia Patológica e Citopatologia do Hospital das Clínicas da UFMG.

Dessas amostras, 58 (76,3%) são provenientes de pacientes do sexo masculino e 18 (23,7%) de pacientes do sexo feminino; o paciente mais jovem submetido ao transplante hepático tinha 22 anos e o mais velho 71 anos, enquanto a mediana da idade dos pacientes na época do transplante foi de 58 anos. Todos os casos de CHC do presente estudo foram obtidos de fígado cirróticos, sendo que 32 (42,1%) tinham como doença de base a hepatite C, 19 (25,0%) casos a hepatite etanólica, 15 (19,7%) casos de cirrose criptogênica, 5 (6,6%) casos a hepatite B, 1 (1,3%) caso a hemocromatose, 1 (1,3%) caso a hepatite autoimune e 3 (4,0%) casos tinham etiologia mista.

Em relação a dados laboratoriais das 76 amostras, temos os seguintes: alanina aminotransferase (ALT) com valor mínimo de 11,0 U/L, máximo de 325,0 U/L e mediana igual a 56,5 U/L; aspartato aminotransferase (AST) variando de 18,0 a 267,0 U/L, com mediana igual a 61,0 U/L; bilirrubina total (BT) variando de 0,5 a 12,0 mg/dL, com mediana igual a 2,0 mg/dL; bilirrubina direta (BD) variando de 0,1 a 5,6 mg/dL, com mediana igual a 0,6 mg/dL; bilirrubina indireta (BI) variando de 0,3 a 6,4 mg/dL, com mediana igual a 1,4 mg/dL; fosfatase alcalina (FA) variando de 28,4 a 416,0 U/L, com mediana igual a 156,5 U/L; gama glutamil transferase (GGT) variando de 9,0 a 915,0 U/L, com mediana igual a 111,5 U/L; lactato desidrogenase (LDH) variando de 2,5 a 819,0 U/L, com valor mediana igual a 385,5 U/L; albumina variando de 1,8 a 5,78 g/dL, com mediana igual a 3,0 g/dL; razão normalizada internacional (RNI) do tempo de protrombina variando de 0,99 a 2,91, com mediana igual a 1,38; ureia variando de 11,0 a 92,0 mg/dL, com mediana igual a 28,0 mg/dL; creatinina variando de 0,4 a 3,0 mg/dL, com mediana igual a 0,9 mg/dL; alfa-fetoproteína (AFP) variando de 0,89 a 1941,4 ng/ml, com mediana igual a 9,0 ng/ml (TABELA 2).

A Escala MELD (*Model for End-stage Liver Disease*), um sistema de pontuação que se atribui a um paciente com doença hepática crônica, cujo emprego principal é a quantificação da urgência para a realização de um transplante hepático, utilizando os valores séricos de bilirrubina total, creatinina e RNI na tentativa de prever sobrevida para o paciente (33). O MELD da nossa amostra variou de 6 a 34, com mediana igual a 15 pontos.

Tabela 2 – Dados demográficos, clínicos e laboratoriais de 76 pacientes submetidos a transplante hepático no HC-UFMG (2002-2017) em números absolutos e percentual.

Dados demográficos/clínicos

Sexo

| | |
|-----------|------------|
| Masculino | 58 (76,3%) |
| Feminino | 18 (23,7%) |

Idade (anos): mediana (mínima - máxima) 58 (22 - 71)

Etiologia

| | |
|--------------------------|------------|
| VHC | 32 (42,1%) |
| Etanólica | 19 (25,0%) |
| Criptogênica | 15 (19,7%) |
| VHB | 5 (6,6%) |
| Outras e etiologia mista | 5 (6,6%) |

Dados laboratoriais:

Mediana (valor mínimo - máximo):

| | |
|--------------------|----------------------|
| ALT (U/L) | 56,5 (11,0 - 325,0) |
| AST (U/L) | 61,0 (18,0 - 267,0) |
| BT (mg/dL) | 2,0 (0,5 - 12,0) |
| BD (mg/dL) | 0,6 (0,1 - 5,6) |
| BI (mg/dL) | 1,4 (0,3 - 6,4) |
| FA (U/L) | 156,5 (28,4 - 416,0) |
| GGT (U/L) | 111,5 (9,0 - 915,0) |
| LDH (U/L) | 385,5 (2,5 - 819,0) |
| Albumina (g/dL) | 3,0 (1,8 - 5,78) |
| RNI | 1,38 (0,99 - 2,91) |
| Ureia (mg/dL) | 28 (11,0 - 92,0) |
| Creatinina (mg/dL) | 0,9 (0,4 - 3,0) |
| AFP (ng/ml) | 9,0 (0,89 - 1941,4) |
| MELD | 15 (6 - 34) |

Em relação aos dados morfológicos das 76 amostras, temos os seguintes: número de nódulos encontrados no parênquima hepático variando de 1 a 10 por paciente, sendo a mediana igual a 2 nódulos; já em relação ao tamanho dos nódulos, eles variaram de 0,9 a 10,5 cm, sendo 2,8 cm a mediana dos nódulos. Sobre o índice mitótico, ele foi calculado pelo número de mitoses presentes em 10 campos de grande aumento (/10 CGA), variando de 1 a 34 mitoses/10 CGA, com mediana igual a 2 mitoses/10 CGA. A invasão vascular foi detectada inicialmente em 32 (42,1%) casos pelo HE, estando ausente em 44 (57,9%). Em se tratando do grau de diferenciação tumoral, 65 (85,5%) casos foram classificados como baixo grau, sendo que destes, 16 (21,0%) foram considerados como grau I e 49 (64,5%) como grau II; e 11 casos (14,5%) foram classificados como alto grau, sendo 8 (10,5%) considerados grau III e 3 (4,0%) considerados grau IV. Em relação ao padrão histológico da neoplasia 56 (73,6%) casos possuíam padrão trabecular, 4 (5,3%) casos padrão pseudoacinar, 4 (5,3%) padrão sólido e 12 (15,8%) tinham padrão misto (TABELA 3).

Tabela 3 – Dados morfológicos de 76 casos de CHC provenientes de transplante hepático realizados no HC-UFMG (2002-2017) em números absolutos e percentual.

| | |
|-----------------------------------|------------------------------------|
| Número de nódulos por caso | 1 a 10; mediana: 2 |
| Tamanho dos nódulos | 0,9 a 10,5 cm; mediana: 2,8 cm |
| Índice mitótico (/10 CGA) | 1 a 34 mitoses; mediana: 2 mitoses |
| Invasão vascular | |
| Presente | 32 (42,1%) |
| Ausente | 44 (57,9%) |
| Grau de diferenciação | |
| Baixo grau (I/II) | 65 (85,5%) |
| Grau I | 16 (21,0%) |
| Grau II | 49 (64,5%) |
| Alto grau (III/IV) | 11 (14,5%) |
| Grau III | 8 (10,5%) |
| Grau IV | 3 (4,0%) |
| Padrão histológico | |
| Trabecular | 56 (73,6%) |
| Pseudoacinar | 4 (5,3%) |
| Sólido | 4 (5,3%) |
| Misto | 12 (15,8%) |

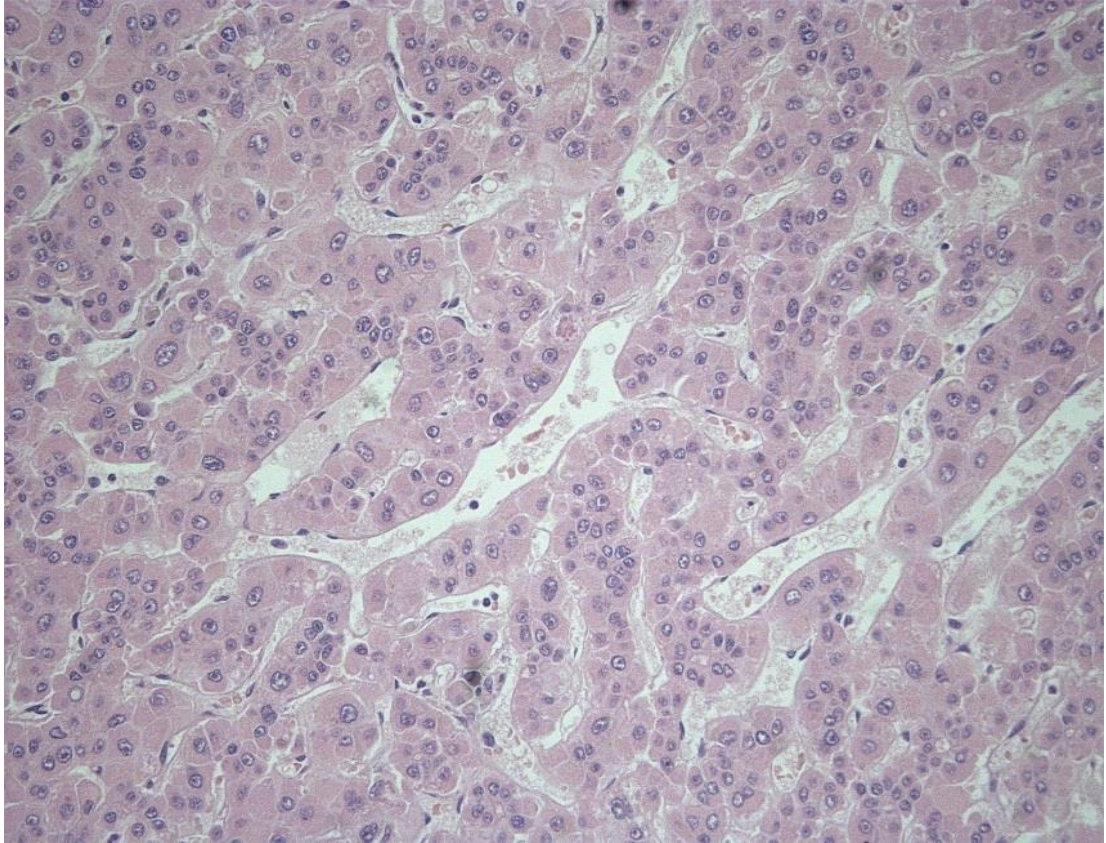


Figura 5 - Padrão trabecular de carcinoma hepatocelular de baixo grau. (HE, 400x)

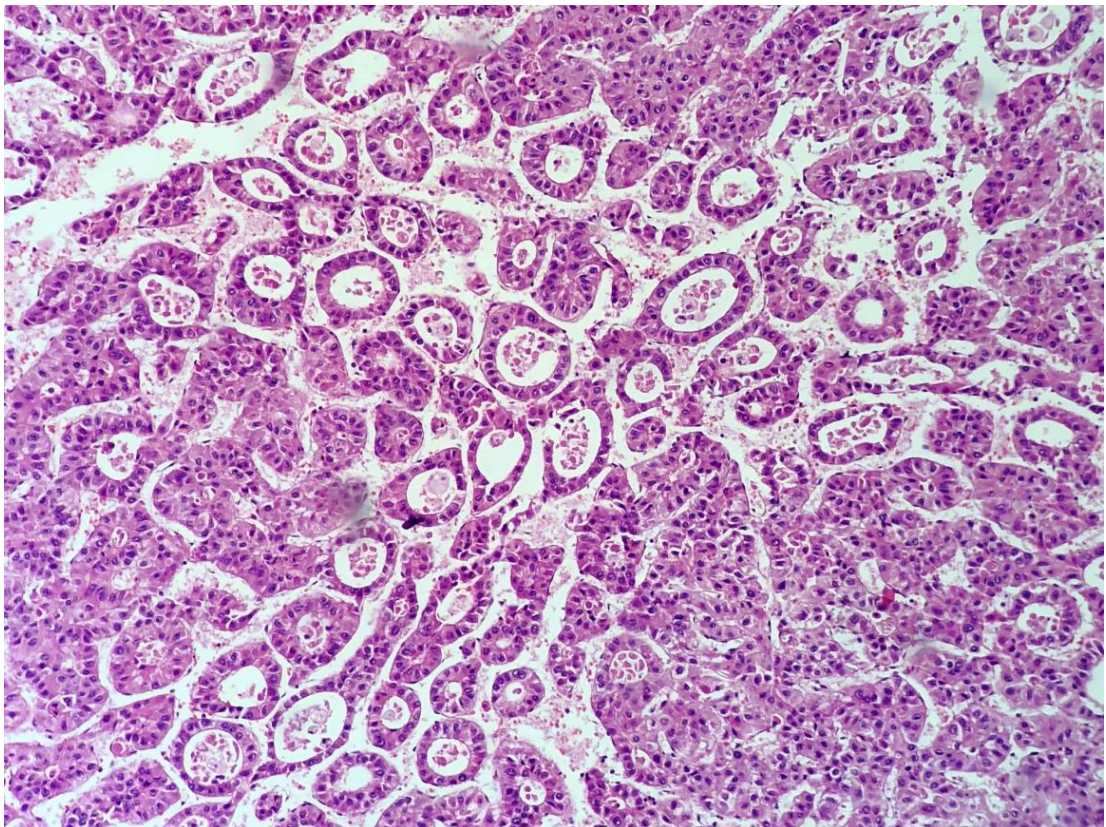


Figura 6 - Padrão pseudoacinar de carcinoma hepatocelular de baixo grau. (HE, 200x)

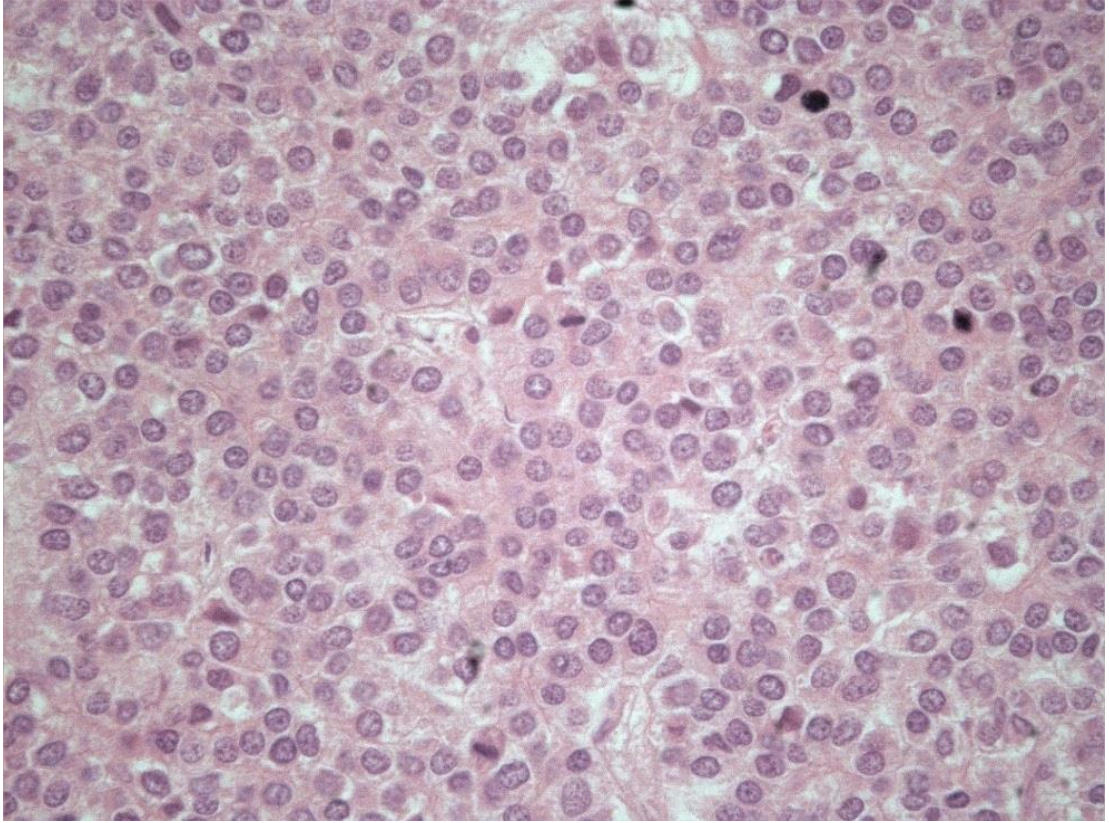


Figura 7 - Padrão sólido de carcinoma hepatocelular. (HE, 400x)

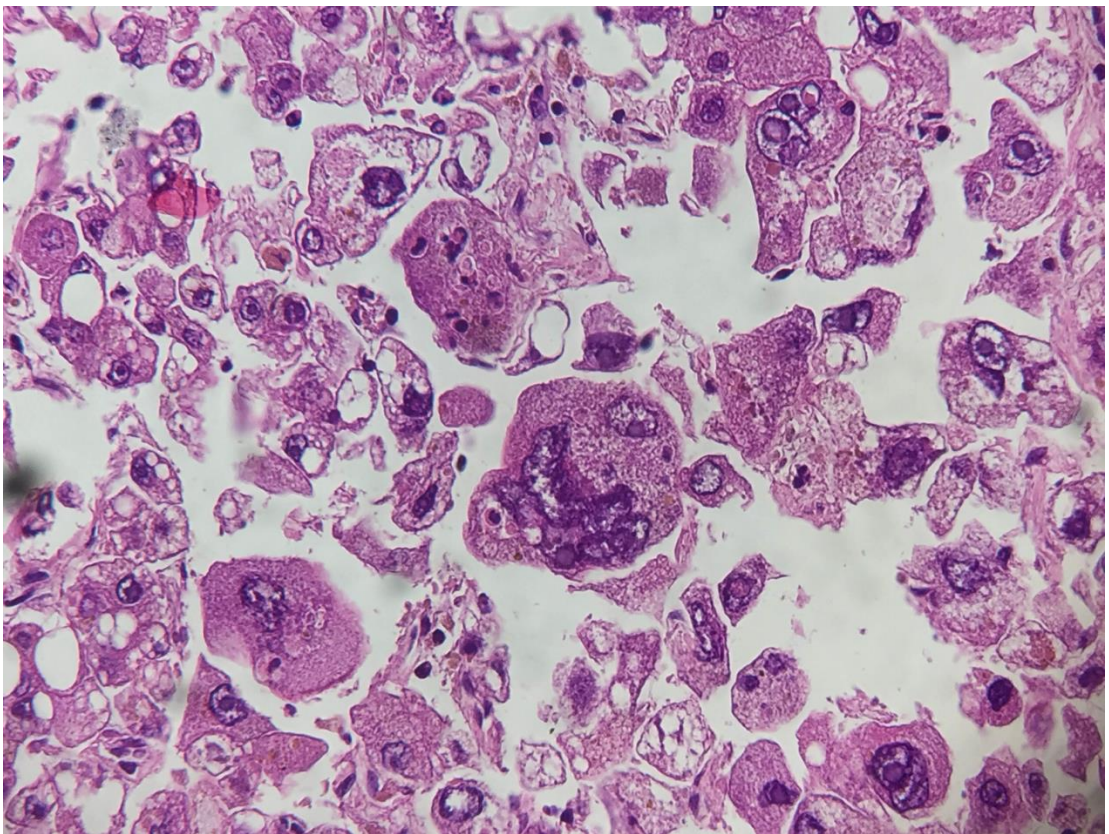


Figura 8 - Carcinoma hepatocelular de alto grau. (HE, 400x)

A TABELA 4 abaixo resume e apresenta os resultados obtidos pelos três patologistas em relação à presença ou não de microinvasão vascular nas 76 amostras analisadas, em dois momentos distintos com intervalo de 2 meses entre eles, utilizando-se os três métodos já descritos: pesquisa em microscopia óptica em lâminas coradas por HE e pesquisa por IHQ em lâminas coradas pelos anticorpos CD34 e D2-40.

Tabela 4 – Avaliação de invasão vascular por três examinadores (EX.A, EX.B e EX.C) em dois momentos distintos (1º- primeiro; 2º- segundo momento).

| Método de avaliação | Com invasão | Sem invasão | Total |
|----------------------------|--------------------|--------------------|--------------|
| HE | | | |
| EX.A-1º | 32 (42%) | 44 (58%) | 76 (100%) |
| EX.A-2º | 30 (39%) | 46 (61%) | 76 (100%) |
| EX.B-1º | 37 (49%) | 39 (51%) | 76 (100%) |
| EX.B-2º | 30 (39%) | 46 (61%) | 76 (100%) |
| EX.C-1º | 32 (42%) | 44 (58%) | 76 (100%) |
| EX.C-2º | 38 (50%) | 38 (50%) | 76 (100%) |
| CD34 | | | |
| EX.A-1º | 16 (21%) | 60 (79%) | 76 (100%) |
| EX.A-2º | 20 (26%) | 56 (74%) | 76 (100%) |
| EX.B-1º | 37 (49%) | 39 (51%) | 76 (100%) |
| EX.B-2º | 33 (43%) | 43 (57%) | 76 (100%) |
| EX.C-1º | 47 (62%) | 29 (38%) | 76 (100%) |
| EX.C-2º | 48 (63%) | 28 (37%) | 76 (100%) |
| D240 | | | |
| EX.A-1º | 1 (1%) | 75 (99%) | 76 (100%) |
| EX.A-2º | 1 (1%) | 75 (99%) | 76 (100%) |
| EX.B-1º | 0 (0%) | 76 (100%) | 76 (100%) |
| EX.B-2º | 0 (0%) | 76 (100%) | 76 (100%) |
| EX.C-1º | 2 (3%) | 74 (97%) | 76 (100%) |
| EX.C-2º | 1 (1%) | 75 (99%) | 76 (100%) |

5.1 – Correlação entre invasão vascular e parâmetros morfológicos e clínicos/laboratoriais.

O nosso estudo, como explicitado anteriormente, tem como um de seus objetivos estudar a presença de invasão angiolinfática em CHC e comparar a sua ocorrência a outros parâmetros morfológicos do tumor, e também a parâmetros clínicos e laboratoriais dos pacientes, a fim de verificar se existe alguma relação entre eles.

Entre os parâmetros morfológicos, utilizamos o padrão arquitetural, o grau de diferenciação tumoral, tamanho do tumor, número de nódulos e índice mitótico. Entre os parâmetros laboratoriais e clínicos utilizamos o nível de alfa-fetoproteína sérico e a escala MELD.

A TABELA 5 leva em consideração a concordância da presença ou ausência de invasão vascular por pelo menos dois patologistas (dois ou três) para cada método de pesquisa (HE, CD34 e D2-40), em cada um dos dois momentos de avaliação. Por exemplo, no primeiro momento para o HE, dois ou três examinadores consideraram positiva a invasão vascular para 34 casos, representando 45% do total. Dessa forma, temos sucessivamente, ainda pelo HE, 55% dos casos negativos para invasão no primeiro momento, além de 39,0% positivos e 61,0% negativos para invasão no segundo momento. Em relação ao primeiro momento de avaliação pelo CD34, temos 46% de casos positivos e 54% negativos, e 41,0% positivos e 59,0% negativos no segundo.

Tabela 5 – Casos positivos e negativos para invasão vascular em CHC, quando pelo menos dois examinadores atribuíram a mesma classificação para cada caso, em dois momentos avaliados.

| Método e Momento | Positivo para invasão | Negativo para invasão |
|-------------------------|------------------------------|------------------------------|
| HE | | |
| 1º momento | 34 (45,0%) | 30 (39,0%) |
| 2º momento | 42 (55,0%) | 46 (61,0%) |
| CD34 | | |
| 1º momento | 35 (46,0%) | 31 (41,0%) |
| 2º momento | 41 (54,0%) | 45 (59,0%) |
| D2-40 | | |
| 1º momento | 0 (0%) | 0 (0%) |
| 2º momento | 76 (100%) | 76 (100%) |

O método de pesquisa de invasão vascular pelo D2-40 não apresentou resultados passíveis de comparação estatística, uma vez que tivemos 0% de concordância para a presença de invasão em ambos os momentos e conseqüentemente 100,0% de concordância para sua ausência, também em ambos os momentos, como pode ser observado na TABELA 5.

Abaixo, nas FIGURAS 8, 9 e 10, encontram-se exemplos em que a invasão vascular foi observada pelos examinadores que participaram do presente estudo nos três métodos utilizados. É importante ressaltar que a avaliação pelo método imunoistoquímico utilizando o

anticorpo D240 foi considerada positiva em apenas 3 das 76 amostras (TABELA 4), apresentando baixa acurácia, como está detalhado nas TABELAS 11 e 12.

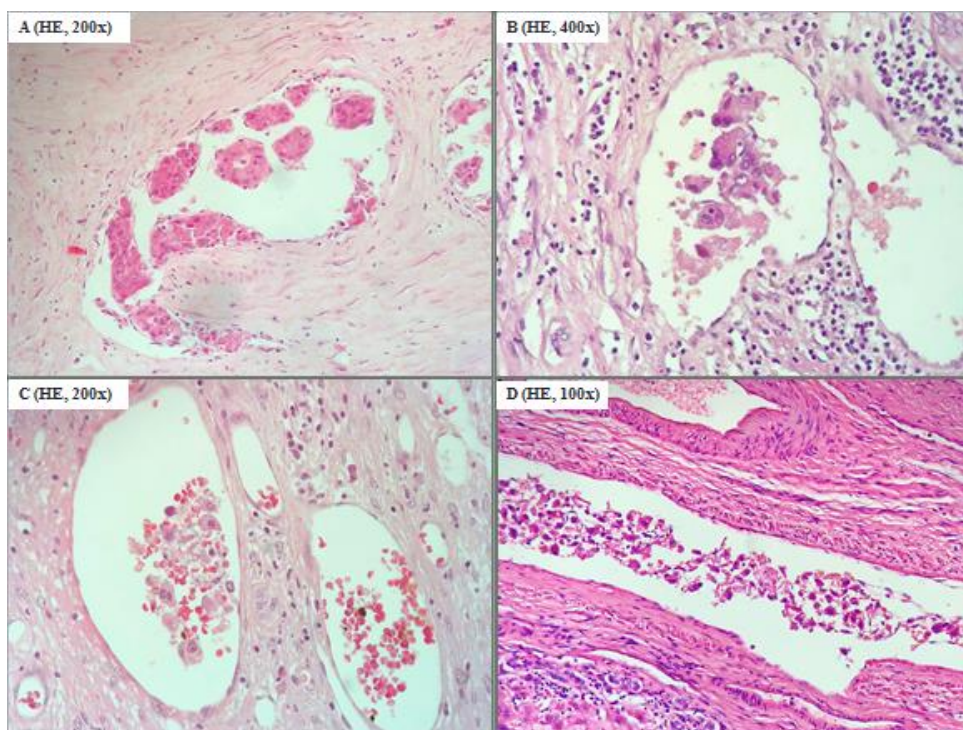


Figura 9 - Exemplos de invasão vascular por CHC em vasos de parede fina em coloração pelo método de HE. Em A, B, C e D observa-se canais vasculares revestidos por endotélio, contendo êmbolos neoplásicos.

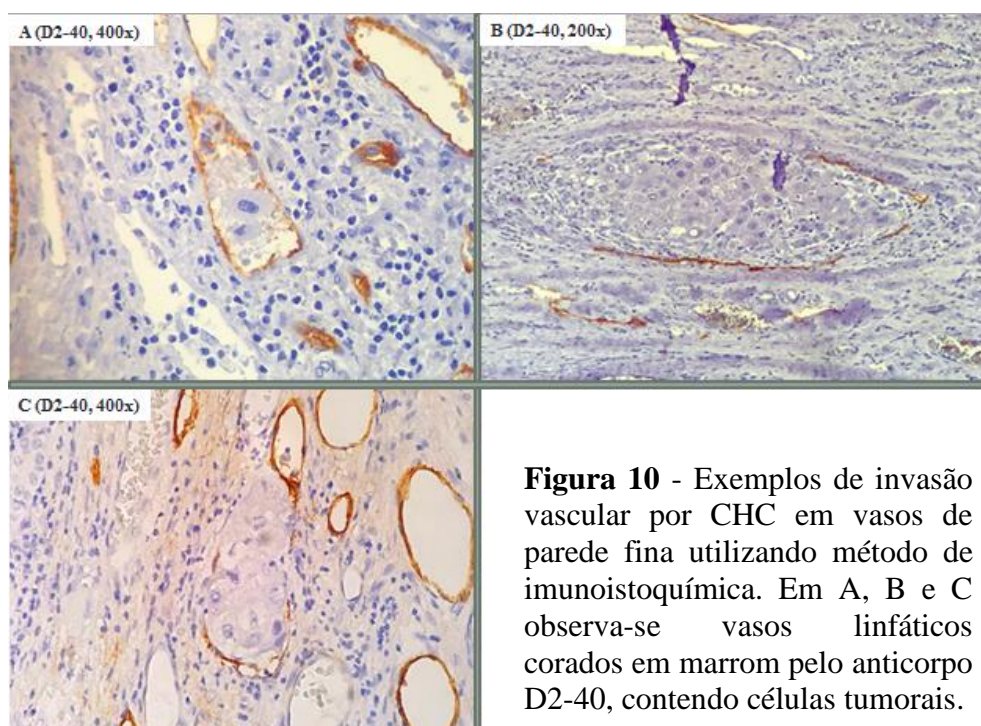


Figura 10 - Exemplos de invasão vascular por CHC em vasos de parede fina utilizando método de imunohistoquímica. Em A, B e C observa-se vasos linfáticos corados em marrom pelo anticorpo D2-40, contendo células tumorais.

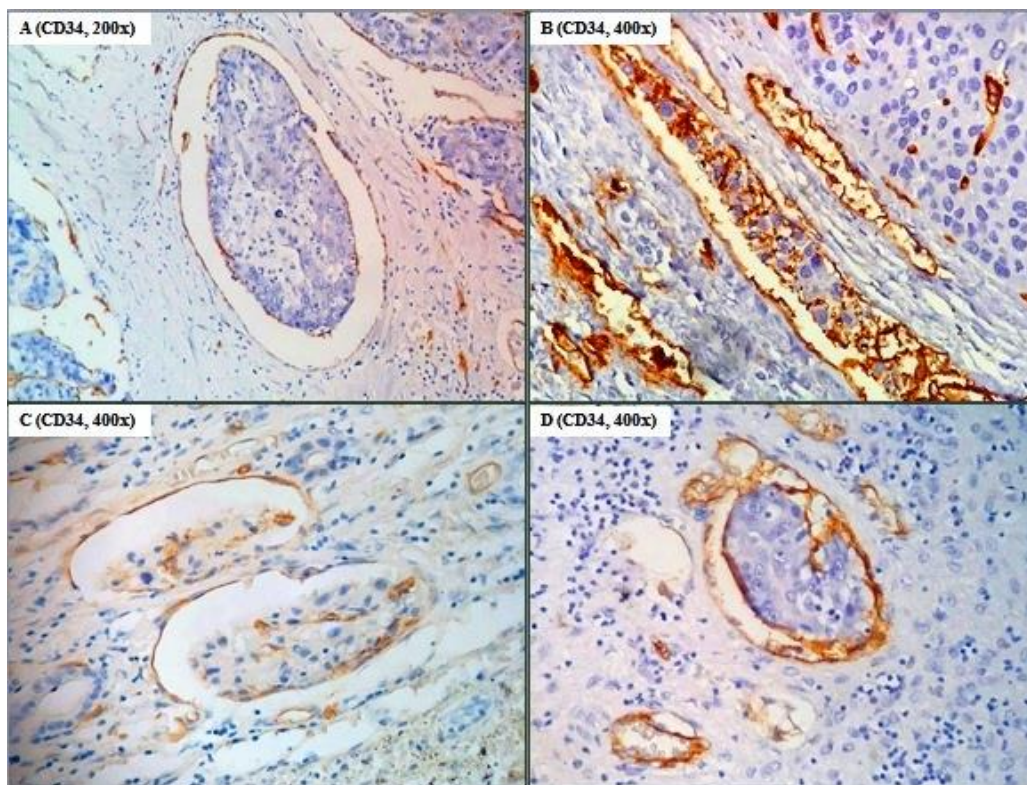


Figura 11 - Exemplos de invasão vascular por CHC em vasos de parede fina utilizando método de imunohistoquímica. Em A, B, C e D observa-se vasos sanguíneos corados em marrom pelo anticorpo CD34, contendo células tumorais.

Correlacionamos esses dados de positividade ou negatividade para invasão vascular da TABELA 5 com cinco critérios morfológicos obtidos pela revisão das lâminas em HE e com dois parâmetros clínicos/laboratoriais obtidos por meio da revisão de prontuários médicos e do banco de dados do Serviço de Transplante Hepático do IAG do HC-UFMG.

As TABELAS 6 e 7 abaixo contém os resultados numéricos obtidos pela associação de invasão vascular com duas variáveis categóricas, padrão arquitetural e grau de diferenciação sendo que o p-valor deve ser inferior a 0,05 para que a associação seja considerada estatisticamente significativa.

Tabela 6 – Associação entre padrão arquitetural do tumor e invasão vascular por HE e CD34, em dois momentos distintos (1° e 2°).

| Padrão Arquitetural | Invasão | 1° HE | 2° HE | 1° CD34 | 2° CD34 |
|----------------------------|----------------|--------------|--------------|----------------|----------------|
| Trabecular | Sim | 22 | 20 | 23 | 20 |
| | Não | 34 | 36 | 33 | 36 |
| Pseudoacinar | Sim | 3 | 2 | 2 | 2 |
| | Não | 1 | 2 | 2 | 2 |
| Sólido | Sim | 1 | 0 | 1 | 1 |
| | Não | 1 | 2 | 1 | 1 |
| Misto | Sim | 8 | 8 | 9 | 8 |
| | Não | 6 | 6 | 5 | 6 |
| TOTAL | | 76 | 76 | 76 | 76 |
| p-valor | | 0,314 | 0,322 | 0,286 | 0,328 |

Tabela 7 – Associação entre grau de diferenciação tumoral e invasão vascular por HE e CD34, em dois momentos distintos (1° e 2°).

| Grau de Diferenciação | Invasão | 1° HE | 2° HE | 1° CD34 | 2° CD34 |
|------------------------------|----------------|--------------|--------------|----------------|----------------|
| Baixo grau (I) | Sim | 7 | 5 | 7 | 3 |
| | Não | 9 | 11 | 9 | 13 |
| Baixo grau (II) | Sim | 20 | 19 | 22 | 23 |
| | Não | 29 | 30 | 27 | 26 |
| Alto grau (III) | Sim | 5 | 5 | 5 | 4 |
| | Não | 3 | 3 | 3 | 4 |
| Alto grau (IV) | Sim | 2 | 1 | 1 | 1 |
| | Não | 1 | 2 | 2 | 2 |
| TOTAL | | 76 | 76 | 76 | 76 |
| p-valor | | 0,621 | 0,519 | 0,785 | 0,200 |

Analisando as TABELAS 6 e 7 acima podemos observar que todas as variáveis categóricas possuem p-valor superior a 0,05 e portanto não foi encontrada associação estatística significativa entre cada uma delas e invasão vascular, pelo modelo de análise univariada.

Tabela 8 – Associação entre as variáveis contínuas e invasão vascular por HE e CD34, em dois momentos distintos (1° e 2°).

| Variável | Valor de <i>p</i> | | | |
|---------------------------------|-------------------|-------|---------|---------|
| | 1° HE | 2° HE | 1° CD34 | 2° CD34 |
| Número de nódulos | 0,199 | 0,125 | 0,147 | 0,295 |
| Tamanho (cm) | 0,263 | 0,526 | 0,811 | 0,600 |
| Índice mitótico (/10CGA) | 0,026 | 0,023 | 0,133 | 0,01 |
| AFP (ng/ml): | 0,246 | 0,068 | 0,317 | 0,433 |
| MELD | 0,738 | 0,790 | 0,830 | 0,681 |

Analisando a TABELA 8 acima podemos observar que todas as variáveis contínuas, com exceção do índice mitótico, possuem p-valor superior a 0,05 e portanto não foi encontrado correlação estatística significativa entre cada uma delas e invasão vascular. Em relação ao índice mitótico, três das quatro colunas mostram um p-valor inferior a 0,05, o que significa que nessas avaliações houve correlação estatisticamente significativa entre o número de mitoses e a invasão vascular.

Após essas análises, ajustamos o modelo de regressão logística das análises univariadas de todos os parâmetros avaliados para análises multivariadas, mas não observamos achados estatisticamente significativos ($p > 0,05$) em nenhum dos tipos de exames ou momentos em que foram realizados. Em seguida, foi constituída uma variável dependente com a união dos resultados das análises em HE e em CD34. Foram ajustados novos modelos de regressão logística das análises univariadas de todos os parâmetros e a variável independente “Índice mitótico (/10CGA)” apresentou limiar de significância estatística ($p = 0,05$), com valor de *Odds Ratio* (OR) de 1,07 (IC 95% de 0,99 a 1,15). Os demais parâmetros não demonstraram associação estatística satisfatória ($p > 0,05$).

5.2 – Concordância intra e interobservador de invasão vascular

O principal foco de nosso estudo foi avaliar a presença ou ausência de invasão angiolinfática por meio da comparação de análises intra e interobservador, utilizando os métodos de histologia convencional em HE e imunoistoquímica.

As TABELAS 9 e 10 abaixo apresentam os resultados de invasão vascular obtidos por meio das concordâncias inter e intraobservador, respectivamente:

Tabela 9 – Variação interobservador de invasão vascular em CHC

| Método | 1º Momento: n° (%) | 2º Momento: n° (%) |
|---------------|---------------------------|---------------------------|
| HE | 47 (62,0%) | 38 (50,0%) |
| CD34 | 33 (43,0%) | 32 (42,0%) |
| D2-40 | 73 (96,0%) | 74 (97,0%) |

Tabela 10 – Variação intraobservador de invasão vascular em CHC

| Método | Exam. A: n° (%) | Exam. B: n° (%) | Exam. C: n° (%) |
|---------------|------------------------|------------------------|------------------------|
| HE | 70 (92,0%) | 59 (78,0%) | 64 (84,0%) |
| CD34 | 66 (87,0%) | 62 (82,0%) | 75 (99,0%) |
| D240 | 76 (100%) | 76 (100%) | 75 (99,0%) |

A TABELA 9 mostra que 62,0% dos casos receberam a mesma classificação de presença ou ausência de invasão vascular pelos três examinadores no primeiro momento em que os casos foram avaliados, caindo para 50,0% no segundo momento, tratando-se do método de avaliação por HE. Esses percentuais tiveram uma queda para 43,0% de concordância quando empregada a avaliação pelo CD34 em um primeiro momento, havendo ainda ligeira redução para 42,0% no segundo momento. A avaliação pelo D2-40 foi considerada de pouca valia pelos três observadores, tanto é que apenas 3 das 76 amostras (TABELA 4) foram consideradas positivas em algum momento por dois dos três patologistas, sendo que um patologista considerou negativa a invasão vascular em todas as amostras nos dois momentos, o que diminui a validade estatística do método como será visto nas TABELAS 11 e 12.

A TABELA 10 mostra que a concordância intraobservador em relação ao examinador A ocorreu em 92,0% dos casos pelo método de HE, em 87,0% dos casos pelo método de imunoistoquímica utilizando o anticorpo CD34 e em 100% dos casos pelo método de imunoistoquímica utilizando o anticorpo D240. Para examinador B, a concordância ocorreu em 78,0% dos casos pelo HE, em 82,0% dos casos pelo CD34 e em 100% dos casos pelo D240. Por sua vez, o examinador C concordou consigo mesmo em 84,0% dos casos pelo HE, 99,0% dos casos pelo CD34 e 99,0% dos casos pelo D240. Vale salientar que a concordância

pelo D240 foi muito alta para todos os examinadores pelo fato de não ter sido detectada invasão vascular na grande maioria dos casos.

Os dados obtidos por cada um dos três patologistas, conforme descritos na TABELA 2, foram correlacionados e pareados entre si utilizando o método do coeficiente de concordância de Kappa (32), que é classificado em diferentes níveis de concordância: 0,00-0,20 (mínima); 0,21-0,40 (razoável); 0,41-0,60 (moderada); 0,61-0,80 (substancial); 0,81-1,00 (praticamente perfeita). Este método permite avaliar a variação e conseqüentemente o grau de concordância entre as observações ao que se diz respeito a comparação inter e intraobservador de invasão vascular, como podem ser observados nas TABELAS 11 e 12, a seguir:

Tabela 11 – Concordância interobservador de avaliação de invasão vascular, em dois momentos distintos.

| Método e Momento | Valor de Kappa (K) | Concordância | p-valor | IC 95% |
|-------------------------|---------------------------|---------------------|----------------|---------------|
| HE | | | | |
| 1º Momento | 0,485 | Moderada | <0,0001 | 0,36 – 0,61 |
| 2º Momento | 0,32 | Razoável | <0,0001 | 0,19 – 0,45 |
| CD34 | | | | |
| 1º Momento | 0,234 | Razoável | <0,0001 | 0,10 – 0,36 |
| 2º Momento | 0,218 | Razoável | 0,001 | 0,09 – 0,35 |
| D2-40 | | | | |
| 1º Momento | - 0,0133 | Sem concordância | 0,84 | -0,14 – 0,12 |
| 2º Momento | 0,00885 | Sem concordância | 0,894 | -0,14 – 0,12 |

Tabela 12 – Concordância intraobservador de avaliação de invasão vascular, em dois momentos distintos.

| Método e Momento | Valor de Kappa (K) | Concordância | p-valor | IC 95% |
|-------------------------|---------------------------|---------------------|----------------|---------------|
| HE | | | | |
| Examinador A | 0,837 | Quase perfeita | <0,0001 | 0,61 – 1,06 |
| Examinador B | 0,546 | Moderada | <0,0001 | 0,32 – 0,77 |
| Examinador C | 0,682 | Substancial | <0,0001 | 0,46 – 0,91 |
| CD34 | | | | |
| Examinador A | 0,636 | Substancial | <0,0001 | 0,41 – 0,86 |
| Examinador B | 0,629 | Substancial | <0,0001 | 0,4 – 0,85 |
| Examinador C | 0,972 | Quase perfeita | <0,0001 | 0,75 – 1,2 |
| D240 | | | | |
| Examinador A | 1,000 | Perfeita | 0 | 0,78 – 1,22 |
| Examinador B | - | - | - | - |
| Examinador C | 0,66 | Substancial | <0,0001 | 0,44 – 0,88 |

Em relação à TABELA 11, a concordância em se tratando da comparação interobservador pelo método de HE foi moderada no primeiro momento e razoável no segundo, pelo coeficiente de Kappa. Por sua vez, a avaliação pelo CD34 apresentou concordância razoável em ambos os momentos. Já o método empregando o anticorpo D240 não apresentou significância estatística, uma vez que não houve concordância pelo Kappa e o p-valor foi superior a 0,05.

Pela TABELA 12, a concordância intraobservador pelo método de HE foi considerada quase perfeita para o examinador A, moderada para o examinador B e substancial para o examinador C, pelo coeficiente de Kappa. Quando o método empregado foi o CD34, a concordância foi substancial para os examinadores A e B e quase perfeita para o examinador C. Em relação ao D240, não houve validade estatística para os examinadores A e B como se pode observar na tabela acima, enquanto para o examinador C houve concordância substancial.

5.3 – Invasão vascular: HE x CD34

Além do coeficiente de Kappa, utilizamos a técnica da Curva ROC para verificar a acurácia do anticorpo CD34, considerando o HE como método padrão, que de maneira geral é o que ocorre rotineiramente em laboratórios de anatomia patológica. Os eixos Y e X desta curva foram representados pela sensibilidade e pelo inverso da especificidade, respectivamente. Elaboramos seis curvas de avaliação intraobservador, comparando a avaliação de invasão vascular por HE e CD34 em dois momentos distintos, conforme se observa na FIGURA 12, a seguir:

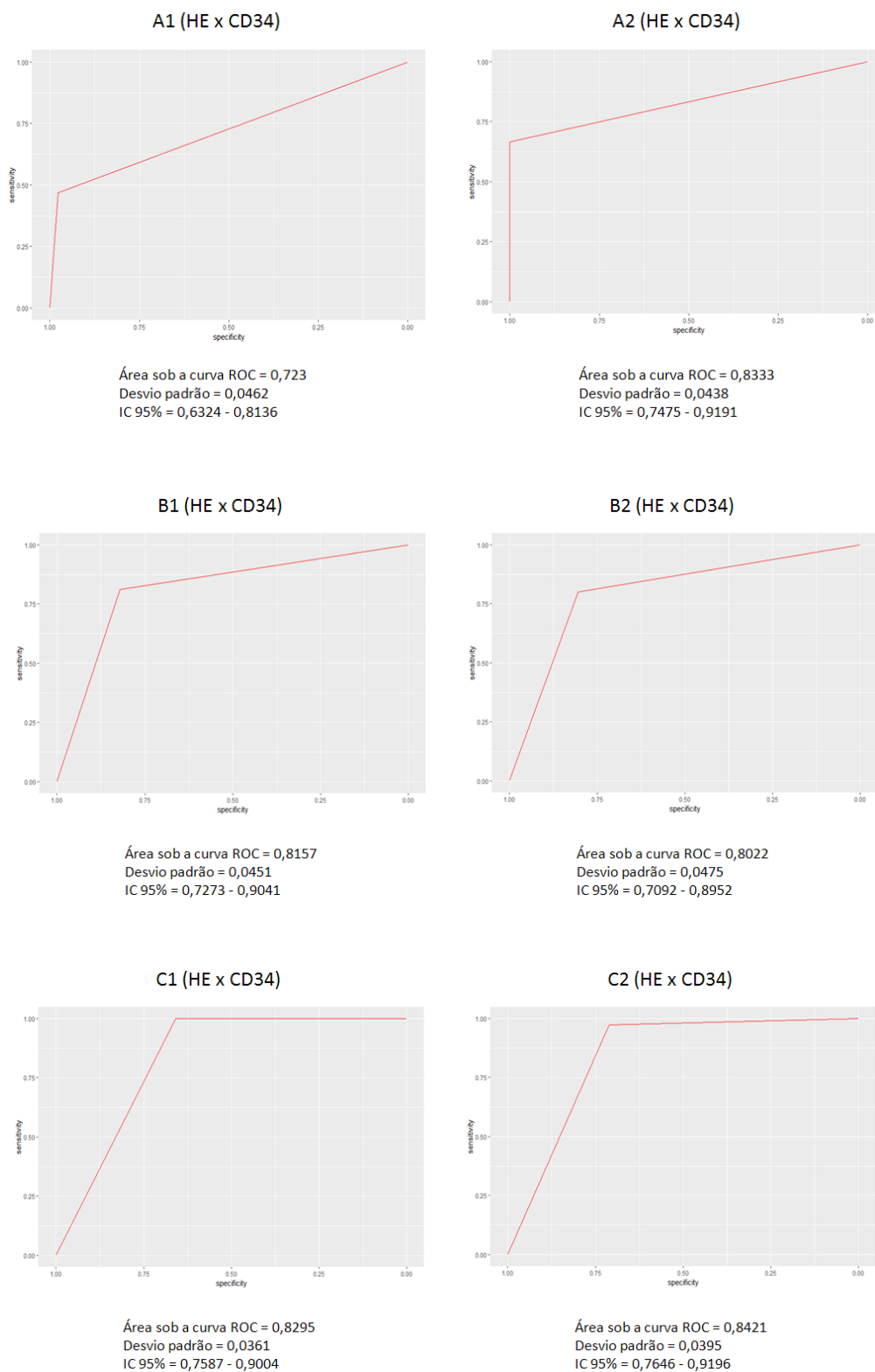


Figura 12 - Curvas ROC – Análise intraobservador da acurácia da associação entre os métodos HE (padrão) e imunoistoquímica por CD34. (A1) Examinador A-1º momento; (A2) Examinador A-2º momento; (B1) Examinador B-1º momento; (B2) Examinador B-2º momento; (C1) Examinador C-1º momento; (C2) Examinador C-2º momento.

Em todos os gráficos da FIGURA 12 temos uma área sob a curva, cujo valor é superior a 0,700 e dentro do intervalo de confiança. Quanto mais próximo a 1,000, maior a sensibilidade e especificidade do método. Em relação aos examinadores A e B, observamos que quando comparado ao método de HE, a avaliação pelo CD34 tende a ter uma especificidade alta nos 4 gráficos, variando de 82,1% a quase 100% no ponto de quebra da curva, enquanto a sensibilidade variou de 46,9% a 81,1%. Já pra o examinador C, a comparação entre a avaliação por CD34 em relação ao HE mostrou uma especificidade variando de 65,9 a 71,1% e sensibilidade maior, variando de 97,4 a quase 100%.

Ainda utilizando a técnica da Curva ROC, também com o objetivo de verificar a acurácia do anticorpo CD34, considerando o HE como método padrão, elaboramos gráficos para a avaliação interobservador de invasão vascular. Para tal, consideramos um caso positivo ou negativo para invasão aquele em que pelo menos 2 dos 3 examinadores assim o avaliaram (TABELA 5), possibilitando condensar as informações obtidas em apenas dois gráficos. Desta forma, elaboramos duas curvas ROC de avaliação interobservador, comparando a avaliação de invasão vascular por HE e CD34 em dois momentos distintos, conforme se observa na FIGURA 13, a seguir:

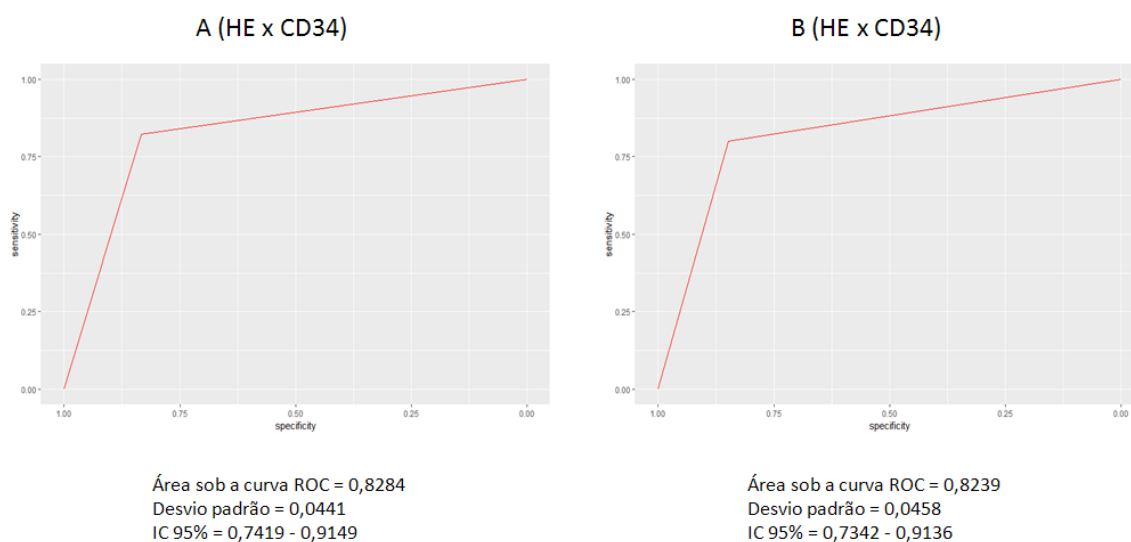


Figura 13 - Curvas ROC – Análise interobservador da acurácia da associação entre os métodos HE (padrão) e imunohistoquímica por CD34. (A) 1º momento; (B) 2º momento.

Os dois gráficos da FIGURA 13 são semelhantes, onde temos valores elevados das áreas sob as curvas, sendo superiores a 0,800 e dentro do intervalo de confiança. Observamos que quando comparado ao método de HE, a avaliação pelo CD34 tende a ter uma especificidade alta nos 2 gráficos, variando de 84,3% a quase 85,5% no ponto de quebra da curva, enquanto a sensibilidade é um pouco menor, mas também se mantém alta, variando de 81,2% a 84,3%.

6 – DISCUSSÃO

O carcinoma hepatocelular é a neoplasia maligna primária mais comum do fígado, representando até 80% dos casos. Com incidência e mortalidade crescentes, a melhor opção de tratamento é a cirúrgica (transplante ou hepatectomia parcial), mas de maneira geral é reservada para tumores em seu estágio mais inicial. Dentre os fatores considerados como prognósticos podemos destacar o tamanho e o número de nódulos, hoje utilizados como definidores dos critérios de transplante (30,34), no entanto, em relação a recorrência do tumor tomando por base esses fatores, a literatura mostra resultados divergentes, com trabalhos dizendo que não são preditores precisos de recorrência (35,36) e outros apontando que número de nódulos >3 e tamanho >5 cm são bons preditores de recorrência (37,38). A invasão angiolinfática é utilizada no estadiamento patológico (AJCC/TNM) do CHC e é um dos critérios definidores da mudança do estágio pT1 para pT2 ou pT4, no entanto, a avaliação de sua presença pelo patologista necessita de melhor definição conceitual, com o intuito de aumentar sua reprodutibilidade e confiabilidade.

Alguns trabalhos na literatura estudam associação entre presença de invasão vascular com fatores clínicos/laboratoriais dos pacientes e morfológicos da neoplasia, na tentativa de verificar se alguns parâmetros podem ser preditores de invasão vascular. Nessa linha, um trabalho anterior do nosso grupo de estudos, conduzido por Osório *et al* (39), corrobora os resultados desse estudo atual onde foi encontrada associação entre índice mitótico e invasão vascular, sendo ele um fator independente para predição de invasão angiolinfática. A diferença entre nossos trabalhos se deu pelo fato de Osório *et al* (39) utilizarem o índice mitótico, como variável categórica, o subdividindo em índice baixo quando < 2 mitoses/CGA e alto quando ≥ 3 mitoses/CGA, enquanto o presente estudo trabalhou o índice mitótico como variável numérica, agregando ainda mais valor a esse parâmetro.

Acreditamos que por nossa casuística ser toda proveniente de transplantes hepáticos, que em sua maioria se enquadraram nos critérios de Milão (lesão única ≤ 5 cm ou até 3 lesões ≤ 3 cm), os casos avaliados possuem, em sua maioria, tumores pequenos (mediana: 2,8 cm) e pequeno número de nódulos por paciente (mediana: 2), o que pode ter influenciado em uma não associação estatística entre tamanho e número de tumores com invasão vascular em nosso estudo, como mostram Pawlik *et al*, McHugh *et al*, Sumie *et al*, entre outros trabalhos na literatura (15,22,40).

Da mesma forma temos o grau de diferenciação tumoral, uma vez que a maior parte dos casos correspondem a tumores pequenos e em pequeno número (tumores em estágios

iniciais), a maioria dos nossos casos (n=65 – 85,5%) foram tumores de baixo grau e apenas poucos (n=11 – 14,5%) foram de alto grau. Logo, a positividade para invasão vascular concentrou-se mais nos tumores de baixo grau em números absolutos, não criando espaço para uma associação estatística válida entre grau de diferenciação e invasão vascular, como também mostram Osório *et al*, Sumie *et al*, entre outros trabalhos na literatura (39,40).

Dos 76 casos que utilizamos nesse estudo, obtivemos o valor sérico de alfa-fetoproteína em apenas 31 (40,7%) pela revisão de prontuários e banco de dados do Serviço de Transplante Hepático do IAG do HC-UFMG. Este número não foi suficiente para realizar os cálculos após o ajuste de modelos de regressão logística das análises univariadas. McHugh *et al* demonstraram que pacientes com CHC e valores séricos de AFP >100 ng/ml tem maior risco de microinvasão vascular, enquanto Pawlik *et al* mostrou que esses valores de AFP devem ser de pelo menos 1000ng/ml para predizer invasão (15, 22).

A maioria dos trabalhos da literatura científica que estudam neoplasias malignas em geral e sua associação com invasão vascular enfocam o método tradicional de microscopia óptica em HE, sendo este um dos poucos estudos a associar o HE com o método de imunoistoquímica, com o propósito de marcar o endotélio de vasos sanguíneos e linfáticos para pesquisa de êmbolos tumorais, e o primeiro a comparar a variabilidade intra e interobservador utilizando os dois métodos em conjunto.

No estudo de Fan *et al* sobre invasão vascular em carcinoma hepatocelular, foi avaliada a variação intra e interobservador somente pelo método de HE, em que a concordância interobservador foi moderada (valor de Kappa: 0,5), assim como a concordância intraobservador (valor médio de Kappa: 0,45; variação de 0,23 a 0,56). Não houve variação estatística significativa entre os patologistas, independente do tempo de profissão ou experiência em hepatopatologia. Com esses resultados, os autores observaram uma necessidade de melhor definição de critérios para invasão vascular, mas não mencionaram a imunoistoquímica como possível fator colaborador para essa definição (26).

Em estudos sobre invasão vascular em outros tipos de tumores extra-hepáticos, Franc *et al* também analisaram a concordância intra e interobservador pelo método de HE, em casos de carcinoma folicular da tireoide, encontrando concordância moderada (valor de Kappa 0,51) e mínima (valor de Kappa: 0,20), respectivamente (41). Assim como Rakha *et al* realizaram estudo semelhante em carcinomas de mama também utilizando somente a coloração de HE, entretanto apenas com variabilidade interobservador, em que encontraram concordância

razoável (valor de Kappa: 0,4; variação de 0,23 a 0,56) em se tratando de invasão vascular (42).

A dificuldade de se assegurar a presença ou ausência de êmbolos tumorais reside em alguns fatores, entre eles, a morfologia da neoplasia. O CHC, em geral, possui uma estrutura de arranjos trabeculares revestidos por capilares sinusoides, que podem imitar canais vasculares verdadeiros e ser um dificultador para a classificação de uma possível invasão (26), daí a importância de se tentar assegurar uma menor variabilidade estabelecendo critérios ou tentando utilizar outros métodos, entre eles, a imunoistoquímica.

Nesse sentido, Harris *et al* ao estudarem a concordância interobservador de invasão vascular em câncer colorretal, aliaram os métodos de microscopia convencional pelo HE à imunoistoquímica utilizando marcadores vasculares CD31 e D2-40, semelhantes ao que utilizamos em nosso estudo. Harris *et al* não acharam relação estatística importante em nenhum dos métodos, uma vez que a concordância interobservador para vasos pequenos foi razoável (valor de Kappa: 0,28) e mínima para vasos maiores (valor de Kappa: 0,18), quando as amostras foram vistas ao HE, não havendo melhora estatística significativa dos valores quando aplicados os anticorpos CD31 (vasos pequenos = Kappa: 0,26; vasos maiores = Kappa: 0,42) e D2-40 (Kappa: 0,32) (20).

Nosso estudo demonstrou uma concordância interobservador razoável (em seu limite superior, quase na faixa de moderada) pelo método convencional de HE (valor médio de Kappa: 0,4025; variação de 0,32 a 0,485). Quando utilizamos o anticorpo CD34 a concordância manteve-se como razoável (valor médio de Kappa: 0,226; variação de 0,218 a 0,234), porém em seu limite inferior.

Já em relação à concordância intraobservador, nossos achados foram classificados como substanciais para o método de HE (valor médio de Kappa: 0,688; variação de 0,546 a 0,837), assim como pela utilização do anticorpo CD34 (valor médio de Kappa: 0,746; variação de 0,629 a 0,972).

Em se tratando do anticorpo D2-40 para a pesquisa de êmbolos neoplásicos no interior de vasos linfáticos, não obtivemos resultados que apresentassem correlação estatística significativa em relação à concordância interobservador em nenhum dos dois momentos de avaliação. Já em relação à variação intraobservador, apenas um dos examinadores apresentou dados estatísticos válidos, sendo ele classificados como concordância substancial (valor de Kappa: 0,66).

Nossos dados, aliados aos observados por outros estudiosos (26,31,41,42), demonstram a dificuldade em se avaliar a presença ou ausência de invasão vascular em neoplasias de modo geral. Nosso estudo, especificamente sobre carcinoma hepatocelular, demonstrou concordância semelhante entre os métodos de microscopia óptica convencional por HE e por imunistoquímica utilizando o anticorpo CD34, independente da comparação ter sido feita inter ou intraobservador.

Entretanto, ao compararmos os resultados obtidos pela concordância intraobservador com a concordância interobservador, podemos notar que a primeira foi substancial e a segunda foi apenas razoável, em termos do coeficiente de Kappa, o que nos permite inferir que cada examinador empregou critérios próprios de detecção de invasão vascular e se manteve relativamente fiel a eles quando fez a avaliação nos dois momentos. Esses achados apontam para a necessidade de padronização de critérios gerais de invasão vascular, uma vez que a concordância é maior quando o examinador estabelece seus próprios critérios.

Pelos dados obtidos pelas Curvas ROC, observados na FIGURA 12, a pesquisa de microinvasão vascular pelo método imunistoquímico de CD34, quando analisamos as concordâncias intraobservador A e B correspondentes a examinadores com experiência em hepatopatologia, mostra-se mais específico do que sensível. Já os gráficos correspondentes à concordância intraobservador C, de um patologista generalista, apresentam valores de sensibilidade maior que a especificidade. Quando analisamos a concordância interobservador na FIGURA 13, a pesquisa pelo CD34 também pode ser considerada ligeiramente mais específica do que sensível. Esse conjunto de dados aponta que este tipo de exame de IHQ não deve ser usado como um exame inicial, no sentido de triagem de invasão vascular, mas pode ter alguma utilidade em casos previamente vistos pelo método convencional em HE para auxiliar na confirmação ou não da invasão.

Nessa linha, Salizzoni *et al* demonstraram que o CD34 tem uma maior especificidade em relação ao HE, em estudo comparativo intraobservador entre os métodos em pacientes que tiveram recorrência de CHC. Neste estudo, foram examinadas 136 amostras, sendo a invasão detectada em 22 casos pelo HE e em 16 pelo CD34. Destas 22 detectadas em HE, 6 tiveram recorrência e das 16 detectadas pelo CD34, 8 recorreram, o que corresponde a um percentual de 27,27% e 50,00%, respectivamente, apontando para uma maior especificidade da detecção de invasão vascular pelo método imunistoquímico do CD34 (43).

Acreditamos que alguns fatores morfológicos das amostras tenham sido responsáveis pelo baixo índice de concordância em alguns casos. Entre estes fatores destacamos dois:

artefatos de retração simulando um falso espaço vascular e a capilarização sinusoidal. Esta consiste na transformação de sinusoides hepáticos normais (fenestrados) em capilares sanguíneos contínuos, pelo estímulo do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) acarretando em deposição de laminina e membrana basal entre as células endoteliais e os hepatócitos, tornando-os física e quimicamente semelhantes a um vaso sanguíneo, com marcação positiva para o CD34 (44). Esses dois fatores podem confundir o patologista, no sentido de existir dúvida se está avaliando um vaso sanguíneo peritumoral verdadeiro com presença de êmbolo neoplásico ou apenas um falso espaço vascular criado por artefatos de processamento do material ou mesmo um sinusóide tumoral modificado e portanto, também marcado pelo CD34.

Além disso, em alguns casos, o corte dos blocos de parafina para a confecção das lâminas em HE e por imunistoquímica foram feitos em momentos distintos, sendo assim, o desgaste desses blocos pode ter modificado um pouco o nível da superfície de corte a ser avaliada, talvez impedindo, em alguns casos, a visualização ou confirmação da invasão vascular previamente vista em HE.

O conjunto destes fatores podem levar, na prática, a um subestadiamento ou superestadiamento tumoral, o que impacta diretamente no prognóstico do paciente e também em seu tratamento.

Os dados do presente estudo não demonstram a superioridade do método imunistoquímico utilizando anticorpos marcadores de vasos linfáticos e sanguíneos em relação ao HE, mas estes podem contribuir em casos considerados difíceis, como observado nas Curvas ROC de comparação das duas técnicas.

A definição de critérios morfológicos mais precisos em HE para invasão vascular parece ser a melhor alternativa para diminuir a discordância entre examinadores, com consequente aumento na acurácia do estadiamento da neoplasia.

6 – CONCLUSÃO

O presente estudo não mostrou diferença estatística na detecção de invasão angiolímfática em CHC entre os métodos de histologia convencional em HE ou por imunistoquímica com anticorpo CD34. A pesquisa pelo anticorpo D2-40 não apresentou boa acurácia.

A concordância intraobservador de invasão vascular foi substancial para HE e CD34, enquanto a interobservador foi apenas razoável para os mesmos métodos.

A pesquisa de invasão vascular pelo CD34 é um método mais específico do que sensível, quando comparado à pesquisa pelo HE.

Os nossos dados mostraram que o índice mitótico é um fator independente para predição de invasão angiolímfática, enquanto outros parâmetros morfológicos e clínicos/laboratoriais não foram.

Assim, esse trabalho, produziu conhecimento para auxiliar na melhor forma de se pesquisar invasão angiolímfática em CHC e sua relação com outros parâmetros clínicos/laboratoriais do paciente e morfológicos do tumor. Nossos achados levantam perspectivas de continuidade dessa linha de pesquisa para melhorar a acuidade da detecção de invasão vascular com o intuito de aprimorar o estadiamento tumoral e conseqüentemente o tratamento do paciente.

8 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Altekruse SF, Henley SJ, Cucinelli JE, *et al.* Changing hepatocellular carcinoma incidence and liver cancer mortality rates in the United States. *Am J Gastroenterol*, 2018; 109(4): 542–553.
2. Balogh J, Victor D 3rd, Asham EH, Burroughs SG, Boktour M, Saharia A, Li X, Ghobrial RM, Monsour HP Jr. Hepatocellular carcinoma: a review. *J Hepatocell Carcinoma*, 2016; 3:41-53.
3. Boseman FT, Carneiro F, Hruban RH, Theise ND, editors. World Health Organization Classification of Tumours of the Digestive System. 4. Lyon: IARC, 2010. Tumours of the liver and intrahepatic bile ducts; pp. 195–262.
4. Patel N, Yopp AC, Singal AG. Diagnostic delays are common among patients with hepatocellular carcinoma. *J Natl Compr Canc Netw*, 2015; 13: 543-549.
5. <http://www.healthdata.org/results/presentations>, acesso em 06 de janeiro de 2019.
6. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin*. 2011; 61:69-90.
7. <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/figado>, acesso em 05 de janeiro de 2019.
8. Roayaie S, Blume IN, Thung SN, Guido M, Fiel MI, Hiots S *et al.* A system of classifying microvascular invasion to predict outcome after resection in patients with hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology*, 2009; 137:850-5.
9. Waller PL, Deshpande V, Nyrsopoulos N. Hepatocellular carcinoma: a comprehensive review. *World J Hepatol*, 2015; 7(26): 2648–2663.
10. Tandon P, Garcia-Tsao G. Prognostic indicators in hepatocellular carcinoma: a systematic review of 72 studies. *Liver Int*, 2009; 29 (4): 502-10.
11. Colecchia A, Schiumerini R, Cucchetti A, *et al.* Prognostic factors for hepatocellular carcinoma recurrence. *World J Gastroenterol*, 2014; 20 (20): 5935-5950.
12. Schlageter, M, Terracciano, LM, D'angelo S, *et al.* Histopathology of hepatocellular carcinoma, 2014; 20 (43): 15955-15964.
13. Edmondson HA, Steiner PE. Primary carcinoma of the liver: a study of 100 cases among 48,900 necropsies. *Cancer*, 1954; 7 (3):462-503.
14. Selcuk H. Prognostic factors and staging systems in hepatocellular carcinoma. *Exp Clin Transplant*, 2017; 15 (Suppl 2): 45-49.

15. Pawlik TM, Delman KA, Vauthey JN et al. Tumor size predicts vascular invasion and histologic grade: implications for selection of surgical treatment for hepatocellular carcinoma. *Liver Transpl*, 2005; 11:1086-92.
16. Schraiber LS, Mattos AA, Zanutelli ML, *et al.* Alpha-fetoprotein level predicts recurrence after transplantation in hepatocellular carcinoma. *Medicine (Baltimore)*, 2016; 95 (3): e2478.
17. Lee S, Hyuck DK, Man KJ, *et al.* Time of hepatocellular carcinoma recurrence after liver resection and alpha-fetoprotein are important prognostic factors for salvage liver transplantation. *Liver Transpl*, 2014; 20 (9):1057-63.
18. Dudek K, Kornasiewicz O, Remiszewski P, *et al.* Impact of tumor characteristic on the outcome of liver transplantation in patients with hepatocellular carcinoma. *Transplant Proc*, 2009; 41 (8): 3135-7.
19. Yang ZF, Poon RT. Vascular changes in hepatocellular carcinoma. *Anat. Rec. (Hoboken)*, 2008; 291:721-34.
20. Lim KC, Chow PK, Allen JC, *et al.* Microvascular invasion is a better predictor of tumor recurrence and overall survival following surgical resection for hepatocellular carcinoma compared to the milan criteria. *Ann Surg*. 2011; 254: 108-13.
21. Kikuchi LO, Paranaguá-Vezozzo DC, Chagas AL *et al.* Nodules less than 20 mm and vascular invasion are predictors of survival in small hepatocellular carcinoma. *J Clin Gastroenterol*, 2009; 43:191-5.
22. McHugh PP, Gilbert J, Vera S, Koch A, Ranjan D, Gedaly R. Alpha-fetoprotein and tumor size are associated with microvascular invasion in explanted livers of patients undergoing transplantation with hepatocellular carcinoma. *HPB (Oxford)*, 2010; 12:56-61.
23. Duseja A. Staging of hepatocellular Carcinoma. *J Clin Exp Hepatol*, 2014; 4: S74-9.
24. Sobin L, Gospodarowicz M, Wittekind C. TNM classification of malignant tumors. 7. Ed. Wiley-Blackwell, 2009.
25. Rodríguez-Perálvarez M, Luong TV, Andreana L, Meyer T, Dhillon AP *et al.* A systematic review of microvascular invasion in hepatocellular carcinoma: diagnostic and prognostic variability. *Ann Surg Oncol*, 2013; 20: 325-39.

26. Fan L, Mac MT, Frishberg DP, et al. Interobserver and intraobserver variability in evaluating vascular invasion in hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol Hepatol*. 2010; 25:1556-61.
27. Chen XP, Qiu FZ, Wu ZD, et al. Effects of location and extension of portal tumor thrombus on long-term outcomes of surgical treatment of hepatocellular carcinoma. *Ann Surg Oncol*, 2006; 13:940-946.
28. Fujita N, Aishima S, Iguchi T, et al. Histologic classification of microscopic portal venous invasion to predict outcome after resection in patients with hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology*, 2009; 137:850-5.
29. Orbo A, Stalsberg H, Kunde D. Topographic criteria in the diagnosis of tumor emboli in intramammary lymphatics. *Hum. Pathol*. 1982; 13:170-2.
30. Bruix J, Forner, A, Reig, M. Hepatocellular carcinoma. *The Lancet*, 2018; 391 (10127): 1301-1314.
31. Harris EI, Lewin DN, Wang HL et al. Lymphovascular invasion in colorectal cancer: an interobserver variability study. *Am J. Surg. Pathol*. 2008; 32: 1816-21.
32. Brennan PF, Hays BJ. The kappa statistic for establishing interrater reliability in the secondary analysis of qualitative clinical data. *Res Nurs Health*, 1992; 15(2):153-8.
33. Kamath PS, Kim WR. The model for end-stage liver disease (MELD). *Hepatology*, 2007; 45 (3): 797-805.
34. Otto G, Schuchmann M, Hoppe-Lotichius M, Heise M, *et al*. How to decide about liver transplantation in patients with hepatocellular carcinoma: size and number of lesions or response to TACE?. *J Hepatol*, 2013; 59 (2):329-84.
35. Grasso A, Stigliano R, Morisco F, *et al*. Liver transplantation and recurrent hepatocellular carcinoma: predictive value of nodule size in a retrospective and explant study. *Transplantation*, 2006; 81 (11):1532-41.
36. Truant S, Boleslawski E, Duhamel A, *et al*. Tumor size of hepatocellular carcinoma in noncirrhotic liver: a controversial predictive factor for outcome after resection. *Eur J Surg Oncol*, 2012; 38 (12):1189-96.
37. Lim C, Mise Y, Sakamoto Y, *et al*. Above 5 cm, size does not matter anymore in patients with hepatocellular carcinoma. *World J Surg*, 2014; 38 (11):2910-8.
38. Pérez-Saborido B, de los Galanes SJ, Menéu-Díaz JC, *et al*. Tumor recurrence after liver transplantation for hepatocellular carcinoma: recurrence pathway and prognostic factors. *Transplant Proc*, 2007; 39 (7):2304-7.

39. Osorio FM, Vidigal PV, Ferrari TC, *et al.* Histologic grade and mitotic index as predictors of microvascular invasion in hepatocellular carcinoma. *Exp Clin Transplant*, 2015; 13(5):421-5.
40. Sumie S, Kuromatsu R, Okuda K, *et al.* Microvascular invasion in patients with hepatocellular carcinoma and its predictable clinicopathological factors. *Ann Surg Oncol*, 2008; 15 (5):1375-82.
41. Franc B, De La Salmonière P, Hoang C, *et al.* Interobserver and intraobserver reproducibility in the histopathology of follicular thyroid carcinoma. *Hum Pathol*, 2003; 34(11):1092-100.
42. Rakha EA, Abbas A, Ellis IO, *et al.* Diagnostic concordance of reporting lymphovascular invasion in breast cancer. *J Clin Pathol*, 2018; 71(9):802-805.
43. Salizzoni M, Romagnoli R, Lupo F, *et al.* Microscopic vascular invasion detected by anti-CD34 immunohistochemistry as a predictor of recurrence of hepatocellular carcinoma after liver transplantation. *Transplantation*, 2003; 76(5):844-8.
44. Yang ZF, Poon RT. Vascular changes in hepatocellular carcinoma. *Anat Rec (Hoboken)*, 2014; 291(6): 721-34.

9 – ANEXOS

9.1 Anexo 1 – Protocolo de microscopia de peça de explante hepático

Serviço de Anatomia Patológica do HC-UFMG

Prontuário: _____ Número do exame: _____

FÍGADO - Procedimento cirúrgico:

Hepatectomia total (transplante)

Exame microscópico:

Tipo histológico: Carcinoma Hepatocelular.

- Padrão histológico: Trabecular
 Pseudoacinar
 Sólido
 Fibrolamelar
- Necrose : sim não
- Padrão citológico: hepatocítico células claras
 oncocítico células fusiformes
 células gigantes pleomórfico
- Mitoses: ____/10 CGA
- Características intracelulares: Esteatose (leve moderada acentuada)
 Pigmento biliar Corpúsculo de Mallory
 Vidro Fosco Glóbulos hialinos
 Degeneração Baloniforme Outra: _____
- Grau de diferenciação (Edmondson-Steiner modificado):
 Baixo grau (Grau I/II)
 Alto grau (Grau III/IV)

➤ Gradação (Edmondson-Steiner, 1954)

- Grau I – quando o tumor é bem diferenciado, composto por células pequenas semelhantes aos hepatócitos, com disposição trabecular.
 - Grau II – quando as células são maiores, com núcleos irregulares, citoplasma eosinofílico, com ou sem disposição glanduliforme.
 - Grau III – observam-se células neoplásicas gigantes com frequência.
 - Grau IV – as células apresentam núcleos intensamente hipercromáticos, escasso citoplasma e perda do padrão trabecular.
- Presença de embolização sanguínea ou linfática em HE: não sim
- Presença de embolização sanguínea ou linfática em IHQ:
- CD34 : não sim
 - D2-40: não sim
- Parênquima hepático não tumoral:
- Histologicamente dentro dos limites da normalidade.
 - Alterações secundárias a processo expansivo intraparenquimatoso.
 - Presença de hepatopatias crônicas não cirróticas.
 - Cirrótico
 - Atividade inflamatória crônica: não sim, grau: ____ (1 a 4, METAVIR)

9.2 Anexo 2 – Carta de aprovação do comitê de ética



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - COEP

Projeto: CAAE – 0643.0.203.000-11

**Interessado(a): Profa. Cláudia Alves Couto
Departamento de Clínica Médica
Faculdade de Medicina - UFMG**

DECISÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP aprovou, no dia 08 de fevereiro de 2012, após atendidas as solicitações de diligência, o projeto de pesquisa intitulado "**Correlação entre aspectos histológicos do carcinoma hepatocelular e a sobrevida após o tratamento**" bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

O relatório final ou parcial deverá ser encaminhado ao COEP um ano após o início do projeto.


Profa. Maria Teresa Marques Amaral
Coordenadora do COEP-UFMG