

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

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

JOÃO PAULO IMPERES LIRA

AVALIAÇÃO IMUNOISTOQUÍMICA DA VIA DE SINALIZAÇÃO HEDGEHOG NO
CARCINOMA HEPATOCELULAR E CORRELAÇÃO COM FATORES
PROGNÓSTICOS.

Belo Horizonte

2019

JOÃO PAULO IMPERES LIRA

AVALIAÇÃO IMUNOISTOQUÍMICA DA VIA DE SINALIZAÇÃO HEDGEHOG NO
CARCINOMA HEPATOCELULAR E CORRELAÇÃO COM FATORES
PROGNÓSTICOS.

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

Orientadora: Prof.^a Paula Vieira Teixeira Vidigal

Coorientador: Dr. Thiago de Almeida Pereira

Belo Horizonte

2019

L768a Lira, João Paulo Imperes.
Avaliação imunohistoquímica da via de sinalização Hedgehog no carcinoma hepatocelular e correlação com fatores prognósticos. [manuscrito]. / João Paulo Imperes Lira. -- Belo Horizonte: 2019. 65 f.: il.
Orientador (a): Paula Vieira Teixeira Vidigal.
Coorientador (a): Thiago de Almeida Pereira.
Área de concentração: Patologia Médica.
Dissertação (mestrado): Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina.

1. Carcinoma Hepatocelular. 2. Proteínas Hedgehog. 3. Invasividade Neoplásica. 4. Cirrose Hepática. 5. Imuno-Histoquímica/métodos. 6. Prognóstico. 7. Dissertação Acadêmica. I. Vidigal, Paula Vieira Teixeira. II. Pereira, Thiago de Almeida. III. Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina. IV. Título.

NLM: WI 735

Bibliotecária responsável: Fabiene Letizia Alves Furtado CRB-6/2745



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA

UFMG

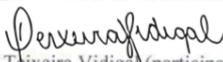
FOLHA DE APROVAÇÃO

AVALIAÇÃO IMUNOISTOQUÍMICA DA VIA DE SINALIZAÇÃO HEDGEHOG NO CARCINOMA HEPATOCELULAR E CORRELAÇÃO COM FATORES PROGNÓSTICOS

JOÃO PAULO IMPERES LIRA

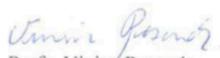
Dissertação submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em PATOLOGIA, como requisito para obtenção do grau de Mestre em PATOLOGIA, área de concentração PATOLOGIA INVESTIGATIVA.

Aprovada em 02 de agosto de 2019, pela banca constituída pelos membros:


Prof.ª Paula Vieira Teixeira Vidigal (participação a distância) - Orientadora
UFMG


Prof. Thiago de Almeida Pereira (participação a distância) - Coorientador
Stanford University Medical School


Prof.ª Mônica Maria Demas Álvares Cabral
UFMG


Prof.ª Vivian Resende
UFMG

Belo Horizonte, 02 de agosto de 2019.

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE: PATOLOGIA

Reitora: **Sandra Regina Goulart Almeida**

Vice-Reitor: **Alessandro Fernandes 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**

“Man, he took his time in the sun, had a dream to understand,
a single grain of sand”

Tuomas Holopainen

AGRADECIMENTOS

Em todos os momentos de nossas vidas, em especial as conquistas, sempre temos a guia e motivação de diversas pessoas ao nosso meio, mesmo que de forma involuntária e subconsciente, para a realização daquele feito. Dessa forma não seria diferente, e eu gostaria de agradecer profundamente a todos os que cito abaixo, por me ajudarem a trilhar este caminho e me permitirem chegar até esse momento.

Agradeço à toda minha família, em especial minha mãe Rosemere Imperes, meu irmão João Ricardo Imperes e minha avó Gonçala Imperes, por todos os ensinamentos e motivações ao longo de toda a vida, vocês foram a sustentação para todas as adversidades e me permitiram chegar até esse momento.

À Sophia, pela companhia e paciência; por me acompanhar em toda essa jornada, do início dos estudos para o processo seletivo, até os detalhes finais da apresentação definitiva. Sem você ao meu lado, eu definitivamente não conseguiria realizar este feito.

Aos meus amigos Emir Nunes, Ian Oliveira, José Taffarel, Lucas Henrique, Marco Philipe, Máriton Borges e Pedro Thiago, por toda a companhia e reflexões, mesmo que à distância.

À minha orientadora Paula Vidigal e ao meu coorientador Thiago, por toda ajuda e guia na elaboração e conclusão deste trabalho.

Aos colegas residentes e preceptores do HC/UFMG, em especial David, Francisco e Henrique, pela vivência, companhia e aprendizado.

Aos colegas de trabalho do laboratório Analys e do Hospital Felício Rocho, por todos os ensinamentos e discussões.

Ao Jesus Junior, pela ajuda ao longo do trabalho.

Ao professor Marcelo Pascoal, pela ajuda com os dados estatísticos.

À Fernanda Césari, pela ajuda na confecção das lâminas e pelos ensinamentos técnicos da imunistoquímica.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram mesmo que minimamente para a realização deste trabalho.

RESUMO

Introdução: o carcinoma hepatocelular (CHC) é a neoplasia maligna primária mais comum no fígado, e apresenta aumento de sua incidência e mortalidade com o avançar da idade. Esta neoplasia encontra-se intimamente associada à cirrose hepática como doença de base, que por sua vez têm como etiologia principal as infecções virais crônicas, como os vírus da hepatite B (HBV) e da hepatite C (VHC), responsáveis por aproximadamente 85% dos casos, além de injúrias hepáticas causadas por álcool e por esteato-hepatite não alcoólica. Além das várias vias de sinalização já descritas na hepatocarcinogênese, a via do Hedgehog pode ser destacada, já que desempenha importante papel na proliferação e diferenciação celulares durante o período embrionário. **Objetivo:** este estudo tem como objetivo avaliar a expressão do fator ligante Sonic Hedgehog (Shh) em amostras de CHC obtidas em amostras de pacientes submetidos a transplante hepático no Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais (HC-UFMG) e correlacionar os índices de marcação com fatores prognósticos clínicos e morfológicos. **Metodologia:** foi realizada avaliação imunoistoquímica da expressão do ligante Shh em 36 amostras de CHC arquivadas no departamento de anatomia patológica do HC-UFMG, bem como expressão no parênquima cirrótico adjacente. Os dados clínicos e morfológicos de todos os casos foram obtidos através de revisão dos prontuários, bem como das lâminas originais e laudos histopatológicos, arquivados no banco de dados do HC-UFMG. Foi então realizada correlação da expressão do Shh com o escore MELD, níveis séricos de alfa-fetoproteína, grau de diferenciação tumoral, presença ou ausência de invasão angiolinfática, número de nódulos tumorais identificados, tamanho do maior nódulo e etiologia da doença cirrose concomitante. **Resultados:** através de correlação entre variáveis dicotômicas pelo teste do qui-quadrado, dois fatores morfológicos identificados no exame convencional de HE (grau de diferenciação tumoral e invasão vascular) mostraram correlação direta com a intensidade de expressão citoplasmática da proteína Shh ($p = 0,014$ e $p = 0,003$, respectivamente). As demais variáveis não mostraram correlação estatisticamente significativa com a expressão tumoral ou parenquimatosa do Shh ($p > 0,05$). **Discussão:** a correlação direta entre o grau de diferenciação tumoral e a presença de invasão vascular com a expressão citoplasmática forte do Shh permite inferir que esta marcação é mais evidente em tumores com maior potencial de agressividade, já que esses parâmetros morfológicos são considerados fundamentais para estabelecimento prognóstico. **Conclusão:** a expressão citoplasmática forte da proteína Shh no carcinoma hepatocelular pode ser considerada como um fator associado a pior prognóstico do CHC. A

identificação dessa expressão estimula o desenvolvimento de estudos que considerem a utilização de quimioterápicos inibidores via Hedgehog para o tratamento clínico do CHC.

Palavras-chave: *carcinoma hepatocelular; Hedgehog; invasão vascular; cirrose hepática.*

ABSTRACT

Introduction: hepatocellular carcinoma (HCC) is the most common primary malignant neoplasm in the liver, with an increase in its incidence and mortality with advancing age. This neoplasm is closely associated with hepatic cirrhosis as the underlying disease, which has its main etiology in chronic viral infections, such as hepatitis B virus (HBV) and hepatitis C virus (HCV), responsible for approximately 85% of cases, in addition to liver injury caused by alcohol. In addition to the various signaling pathways already described in hepatocarcinogenesis, the Hedgehog pathway can be highlighted, since it plays an important role in cell proliferation and differentiation during the embryonic period. **Objective:** this study aims to evaluate the expression of binding protein Sonic Hedgehog (Shh) in HCC samples obtained from patients submitted to liver transplantation at the Clinical Hospital of the Federal University of Minas Gerais (HC-UFMG) and to correlate its marking indices with clinical and morphological prognostic factors. **Methodology:** immunohistochemical evaluation of Shh binding protein expression was performed in 36 CHC samples stored in the HC-UFMG pathology department, as well as expression in the adjacent cirrhotic parenchyma. The clinical and morphological data of all the cases were obtained through a review of the medical records, as well as review of original slides and histopathological reports, filed in the HC-UFMG database. Correlation of Shh expression with MELD score, alpha-fetoprotein levels, degree of tumor differentiation, presence or absence of angiolymphatic invasion, number of tumor nodules identified, size of largest nodule, and etiology of concomitant cirrhosis disease were performed. **Results:** two morphological factors identified in conventional HE examination (degree of tumor differentiation and vascular invasion) were directly correlated with the intensity of Shh protein expression ($p = 0.014$ and $p = 0.003$, respectively). The other variables did not show a statistically significant correlation with the tumor or parenchymal expression of SHH ($p > 0.05$). **Discussion:** the direct correlation between the degree of tumor differentiation and the presence of vascular invasion with the strong cytoplasmic expression of Shh allows us to infer that this expression is more evident in tumors with greater aggressiveness potential, since these morphological parameters are considered fundamental for prognostic establishment. **Conclusion:** the strong cytoplasmic expression of Shh protein in hepatocellular carcinoma can be considered as a factor associated with worse prognosis. The identification of this expression allow us to study and consider the use of chemotherapeutic agents that act blocking the Hedgehog pathway for the clinical treatment of HCC.

Keywords: *hepatocellular carcinoma; Hedgehog; vascular invasion; hepatic cirrhosis.*

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 - Incidência de novos casos de carcinomas hepáticos no ano de 2018	2
FIGURA 2 - Indicadores de incidência e mortalidade de câncer hepático no ano de 2018	2
FIGURA 3 – Esquema de representação da via do Hedgehog	6
FIGURA 4 - Representação esquemática dos processos de ativação da via de sinalização Hedgehog.	7
FIGURA 5 - Algoritmo de tratamento do CHC segundo o <i>Barcelona Clinic Liver Cancer</i> (BCLC).	13
FIGURA 6 - Imunoexpressão do Shh em fígado normal.	24
FIGURA 7 - Marcação citoplasmática forte da proteína ligante Shh em área tumoral com arquitetura pseudoacinar; marcação citoplasmática forte (hotspot) em área tumoral sólida.	25
FIGURA 8 - Marcação citoplasmática moderada da proteína ligante Shh em área tumoral com arquitetura trabecular; células tumorais com marcação ausente para o ligante Shh.	26
FIGURA 9 - Marcação citoplasmática forte da proteína ligante Shh em área tumoral com arquitetura pseudoacinar e marcação moderada em nódulos cirróticos adjacentes; marcação citoplasmática forte da proteína ligante Shh em área tumoral com arquitetura trabecular e marcação fraca em nódulos cirróticos adjacentes.	27
FIGURA 10 - Focos de embolização tumoral angiolinfática em vasos peritumorais. Marcação citoplasmática moderada.	28

LISTA DE TABELAS

- TABELA 1 - Distribuição dos dados clínicos e demográficos dos pacientes submetidos a transplantes hepáticos no HC-UFG no período entre 2003 e 2015. 22
- TABELA 2 - Dados morfológicos de 36 casos de CHC provenientes de transplantes hepáticos realizados no HC-UFG no período entre 2003-2015. 23
- TABELA 3 - Distribuição quantitativa do escore imunoistoquímico tumoral de 36 casos de CHC provenientes de transplante hepático realizados no HC-UFG no período entre 2003-2015. 29
- TABELA 4 - Distribuição quantitativa do escore imunoistoquímico no parênquima cirrótico peritumoral de 36 casos de CHC provenientes de transplantes hepáticos realizados no HC-UFG no período entre 2003-2015. 29
- TABELA 5- Correlação entre o escore imunoistoquímico do Shh no parênquima tumoral com parâmetros clínicos e morfológicos de 36 casos de CHC provenientes de transplante hepático realizados no HC-UFG no período entre 2003-2015. 31
- TABELA 6- Correlação entre o escore imunoistoquímico do SHH no parênquima cirrótico peritumoral com parâmetros clínicos e morfológicos de 36 casos de CHC provenientes de transplante hepático realizados no HC-UFG no período entre 2003-2015. 32

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AFP - Alfa-fetoproteína

ALT - Alanina aminotransferase

AJCC - *American Joint Comitee on Cancer*

AST - Aspartato aminotransferase

BCLC - *Barcelona Clinic Liver Cancer*

BT - Bilirrubina total

ATP – Adenosina trifosfato

CBC – Carcinoma basocelular

CHC – Carcinoma hepatocelular

COEP - Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG

COS-2 - *Kinesin-like protein Costal-2*

Dhh – Ligante Desert hedgehog

EGF/EGFR - *Epidermal growth factor/Epidermal growth factor receptor*

EMT – Transição epitelial-mesenquimal

EpCAM – Molécula de adesão de células epiteliais

NASH – *Nonalcoholic steatohepatitis*

FGF/FGFR - *Fibroblast growth factor/ Fibroblast growth factor receptor*

FA - Fosfatase alcalina

FU – *Fused*

GGT - Gama glutamil transferase

GLI - *Glioblastoma family transcription factors*

GPC3 – Glipicano 3

HBx – Proteína X do vírus da hepatite B

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

HGF/cMet - *Hepatocyte growth factor/Met*

HE - Hematoxilina e eosina

Hh – Hedgehog

Hhip - *Hedgehog interacting protein*

IAG - Instituto Alfa de Gastroenterologia

IGF/IGFR - *Insulin-like growth factor receptor*

Ihh – Ligante Indian hedgehog

INR - *International Normalized Ratio*

LDH - Lactato desidrogenase

JAK/STAT - *Janus activated kinases/signal transducers and activators of transcription*

IHh – Ligantes hedgehog

MELD - *Model for end-stage liver disease*

NASH – Esteato-hepatite não alcoólica

mTOR - *Mammalian target of rapamycin*

mRNA – RNA mensageiro

OMS – Organização Mundial de Saúde

PCR – *Polymerase chain reactin*

PDGF/PDGFR - *Platelet-derived growth factor/ Platelet-derived growth factor receptor*

PTCH – *Patched*

SEER - *National Cancer Institute's Surveillance, Epidemiology, and End Results*

SHARP - *Sorafenibe Hepatocellular Carcinoma Assessment Randomized Protocol*

Shh – Ligante Sonic hedgehog

SMO – *Smoothened*

SNB – Síndrome do nevo basaloide

SuFu - Supressor do *fused*

TAM - Macrófagos associados a tumores

UFMG – Universidade Federal de Minas Gerais

VEGF/VEGFR - *Vascular endothelial growth fator/ Vascular endothelial growth factor receptor*

VHB – Vírus da hepatite B

VHC – Vírus da hepatite C

WNT- β -catenina - *Wingless- β -catenin*

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Carcinoma Hepatocelular	1
1.2	Aspectos epidemiológicos	1
1.3	Etiopatogênese	3
1.3.1	A via de sinalização Hedgehog	4
1.3.2	A via de sinalização Hedgehog no fígado	8
1.4	Características morfológicas e fatores prognósticos relacionados ao CHC	10
1.5	Tratamento	12
2	JUSTIFICATIVAS	15
3	OBJETIVOS	16
3.1	Objetivo geral	16
3.2	Objetivos específicos	16
4	MATERIAIS E MÉTODOS	17
4.1	Considerações éticas	17
4.2	Delineamento e estratégias de estudo	17
4.3	Critérios de exclusão	17
4.4	Parâmetros clínicos e morfológicos analisados	17
4.5	Técnica de imunoistoquímica	18
4.6	Análise e escore imunoistoquímico	19
4.7	Análises estatísticas	20
5	RESULTADOS	21
5.1	Dados clínicos e laboratoriais	21
5.2	Dados morfológicos	22
5.3	Análise imunoistoquímica	23
5.4	Correlação entre os escores imunoistoquímicos e dados clínicos/morfológicos	29
6	DISCUSSÃO	33
7	CONCLUSÃO	39
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	40
9	ANEXOS	46

1 – INTRODUÇÃO

1.1– Carcinoma Hepatocelular

Carcinoma hepatocelular (CHC) é definido como o tumor maligno de diferenciação hepatocelular. Esta neoplasia encontra-se intimamente associada à cirrose hepática como doença de base. Esta, por sua vez, tem como etiologia principal as infecções virais crônicas, como os vírus da hepatite B (HBV) e da hepatite C (HCV), responsáveis por aproximadamente 85% dos casos, além de injúrias hepáticas causadas por álcool e por quadros de esteato-hepatite não alcoólica (NASH). A cirrose, portanto, é o principal fator de risco para o desenvolvimento tumoral, no qual o estímulo carcinogênico é progressivamente gerado após os frequentes processos de remodelamento e tentativas de reparação celular (1).

1.2 – Aspectos epidemiológicos

O CHC é a neoplasia maligna primária mais comum no fígado, e apresenta aumento de sua incidência e mortalidade com o avançar da idade, sendo mais comum em pacientes do sexo masculino em uma proporção de 3:1 (2).

Segundo estimativas da Organização Mundial da Saúde (OMS), no ano de 2018, os CHCs foram responsáveis por 4,7% dos novos casos de câncer, com um índice de mortalidade de 8,2% (o quarto maior índice, atrás apenas das neoplasias pulmonares, colorretais e gástricas).
FIGURAS 1 E 2.

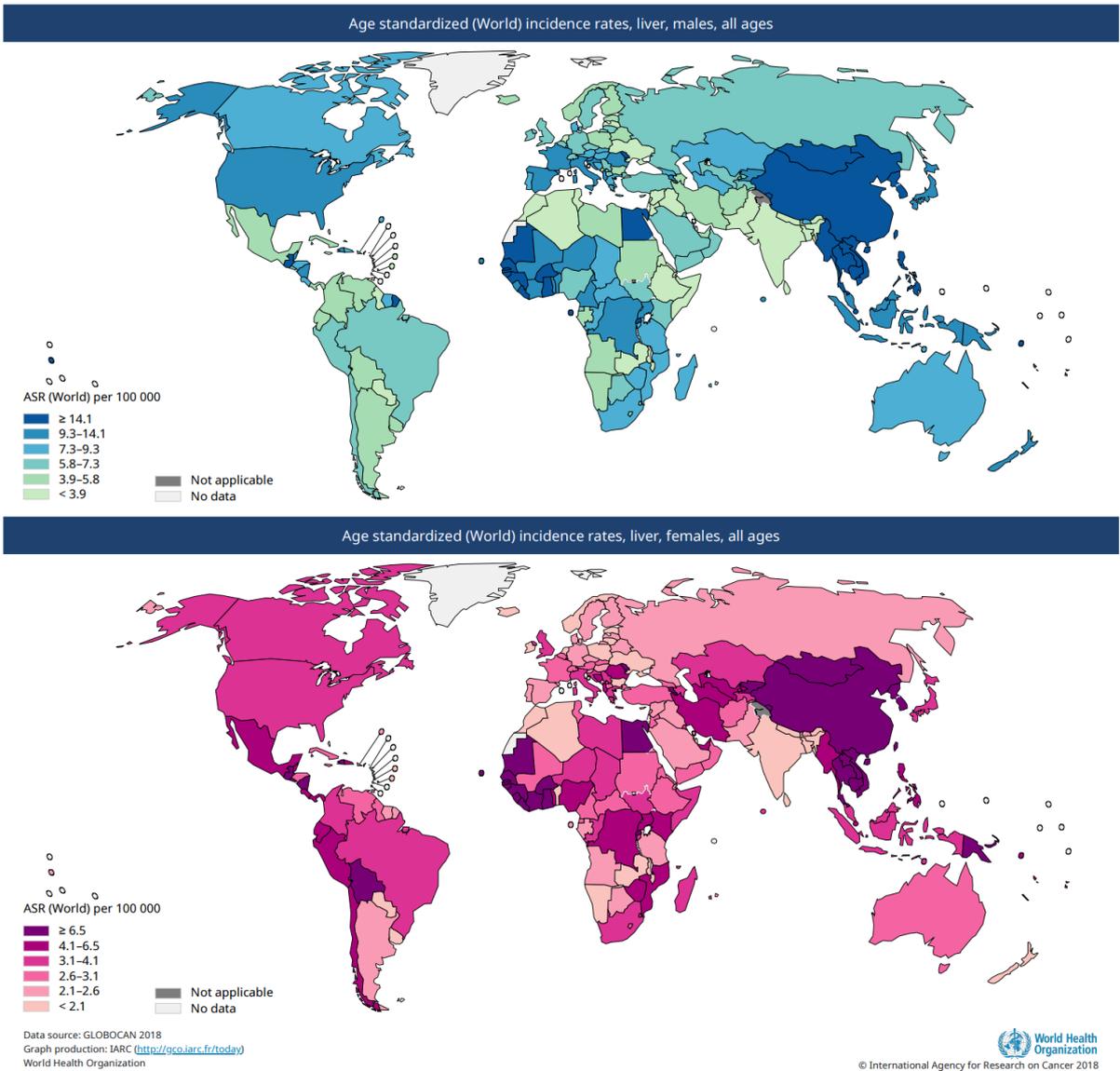


Figura 01- Incidência de novos casos de carcinomas hepáticos no ano de 2018. Acima: sexo masculino, abaixo: sexo feminino. Fonte: <https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/cancers/11-liver-fact-sheet.pdf>. Acesso em 07/07/2019.

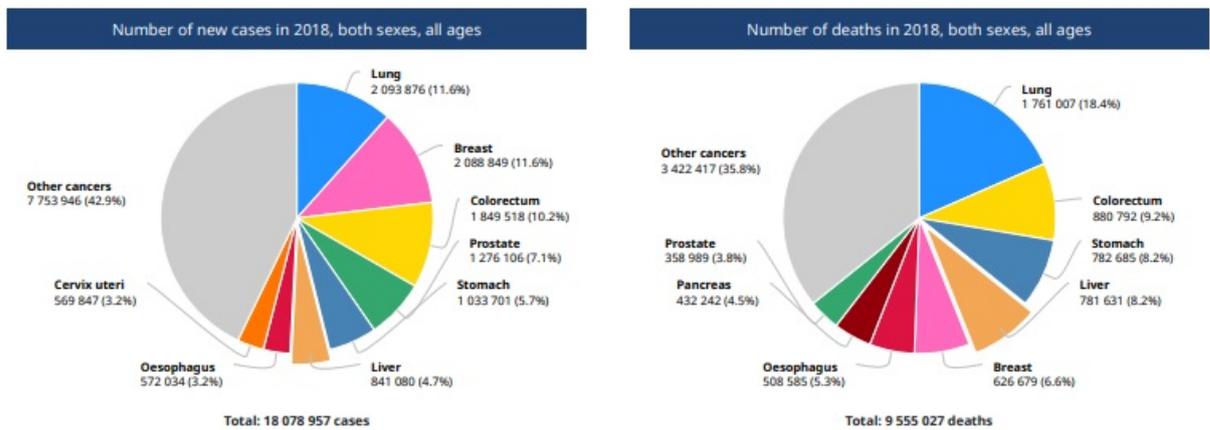


Figura 02- Indicadores de incidência (à esquerda) e mortalidade (à direita) de câncer hepático no ano de 2018. A doença apresenta a sexta maior incidência entre todas as neoplasias e possui a quarta maior taxa de óbito. Fonte: <https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/cancers/11-Liver-fact-sheet.pdf>. Acesso em 07/07/2019.

De acordo com dados americanos do *National Cancer Institute's Surveillance, Epidemiology, and End Results* (SEER), nos anos de 2003 a 2005, a incidência de casos de CHC foi três vezes maior em pacientes de descendência de países asiáticos ou de ilhas do Pacífico (3). No Brasil, segundo dados do Instituto Nacional do Câncer, o carcinoma hepatocelular foi responsável por um total de 9710 óbitos no ano de 2015, sendo 5647 em homens e 4063 em mulheres (4).

1.3 - Etiopatogênese

O CHC desenvolve-se de forma lenta e gradativa, sendo macroscopicamente observado como nódulos isolados ou múltiplos. Trata-se de uma lesão desenvolvida a partir de múltiplas etapas geradas por estímulos diversos nos hepatócitos ou células progenitoras hepáticas, resultando em processos de proliferação/apoptose, o que pode culminar em neoplasia (5,6).

O mecanismo pelo qual os vírus das hepatites B e C (responsáveis pela maioria dos casos de CHC) atuam na hepatocarcinogênese já é bem entendido atualmente. O VHB, ao integrar seu DNA viral no material genético da célula hospedeira, induz instabilidade cromossômica e mutações específicas que culminam na ativação de oncogenes (6). A produção de proteínas virais, principalmente a proteína X (HBx), pode agir como ativador de vias de sinalização celular, tais quais o Hedgehog, JAK/STAT, RAS/RAF, MAPK e Wnt- β -catenina, além de estimular fatores de transcrição, como o c-myc e o c-jun, que por sua vez levarão a maior expressão de genes reguladores do ciclo celular (6, 8, 51).

Já o VHC, um vírus de RNA, tem seu mecanismo carcinogênico diferente do observado no VHB, sendo gerado através das suas proteínas virais *core*, NS3 e NS5A (6). A proteína *core* é associada a estímulos apoptóticos ou proliferativos a partir de sua interação com os genes tp53 e Wnt-1, além de induzir estímulo na via Hedgehog (9, 52, 70). Por sua vez, as proteínas NS3 e NS5A são responsáveis por inibição e degradação de proteínas celulares (9, 10).

A partir do desenvolvimento gradativo de técnicas mais precisas de biologia celular e molecular, o reconhecimento de vias de sinalização intracelulares passou a ser de fundamental importância para o entendimento dos processos de carcinogênese e conseqüentemente abriu portas para o desenvolvimento de terapias medicamentosas direcionadas para tipos específicos de tumores. Essas vias são associadas a vários processos de proliferação e diferenciação celulares, agindo como gatilhos para o desenvolvimento neoplásico.

No CHC, destacam-se múltiplas vias de sinalização, sendo até o presente momento mais estudadas as seguintes: *Wingless- β -catenina* (WNT- β -catenina), *Janus activated kinases/signal transducers and activators of transcription* (JAK/STAT), *vascular endothelial growth factor receptor* (VEGF/VEGFR), *platelet-derived growth factor receptor* (PDGF/PDGFR), *epidermal growth factor receptor* (EGF/EGFR), *fibroblast growth factor receptor* (FGF/FGFR), *insulin-like growth factor receptor* (IGF/IGFR), *hepatocyte growth factor/Met* (HGF/cMet), via da *mammalian target of rapamycin* (mTOR) e MAPK (6 e 7).

Além das já citadas acima, a via de sinalização Hedgehog (Hh) tem um importante papel mediador e estimulador de processos de proliferação e diferenciação celulares, sendo encontrada ativada em múltiplas neoplasias (11), e será o foco principal deste estudo.

1.3.1 – A via de sinalização Hedgehog

A via Hedgehog foi primeiramente identificada em estudos com exemplares da espécie *Drosophila* (12) e é essencial nos processos de embriogênese, através da regulação tanto de proliferação como diferenciação de células tronco, além de estar envolvida nos eventos de cicatrização de tecidos adultos, incluindo o fígado (13).

Toda a via é caracterizada pela presença de sete componentes principais: ligantes Hedgehog (Ihh), *Patched* (PTCH), *Smoothed* (SMO), *glioblastoma family transcription factors* (GLI), *kinesin-like protein Costal-2* (COS-2), *fused* (FU) e supressor do *fused* (SuFu) (14), sendo que os três últimos não estão presentes em organismos superiores, como os mamíferos (15).

Os ligantes Hedgehog são o Sonic hedgehog (Shh), Indian hedgehog (Ihh) e Desert hedgehog (Dhh), cuja produção é estimulada a partir de vários fatores de crescimento, citocinas

e certos tipos de estresse celular (16). Como exemplo, podemos destacar o EGF (*Epidermal growth factor*), que estimula células parietais, como as células estreladas hepáticas, a produzirem o fator ligante Shh (17). Apesar de alguns dados demonstrarem a presença de ligantes diferentes em tecidos específicos (58), em um mesmo tecido pode ocorrer a produção de mais de um deles, como é o caso dos hepatócitos, colangiócitos e células estreladas hepáticas, que são capazes de produzir tanto Shh quanto Ihh (16, 59).

Tem sido demonstrado que os demais componentes da via Hh encontram-se presentes em uma estrutura celular chamada de cílio primário, composta de microtúbulos e capaz de realizar comunicações diversas entre o meio ambiente externo e o meio intracelular. Esta estrutura encontra-se presente em praticamente todas as células dos mamíferos, usualmente localizada acima do centro celular (15 e 60).

Classicamente, a ativação da via do Hedgehog é iniciada a partir da ligação de um dos fatores ligantes com o receptor de membrana *Patched* (PTCH), que se encontra associado ao correceptor citoplasmático *Smoothened* (SMO). Em situações de inatividade (na ausência dos fatores ligantes), o SMO encontra-se inibido pelo PTCH, e ambos ficam localizados em vesículas situadas na base do cílio primário e, portanto, geograficamente afastados dos fatores de transcrição *glioblastoma family transcription factors 1, 2 e 3* (GLI-1,2,3), que se encontram aglutinados no ápice (18). Após a ligação do fator estimulante (Shh, Ihh ou Dhh) ao Patched, há uma internalização deste receptor, gerando um deslocamento do correceptor *Smoothened* para o topo do cílio, permitindo ativação dos fatores de transcrição, que por sua vez migram para o núcleo e ativam genes alvo da via do Hedgehog (18). A FIGURA 3 mostra de forma ilustrativa todo o processo descrito acima.

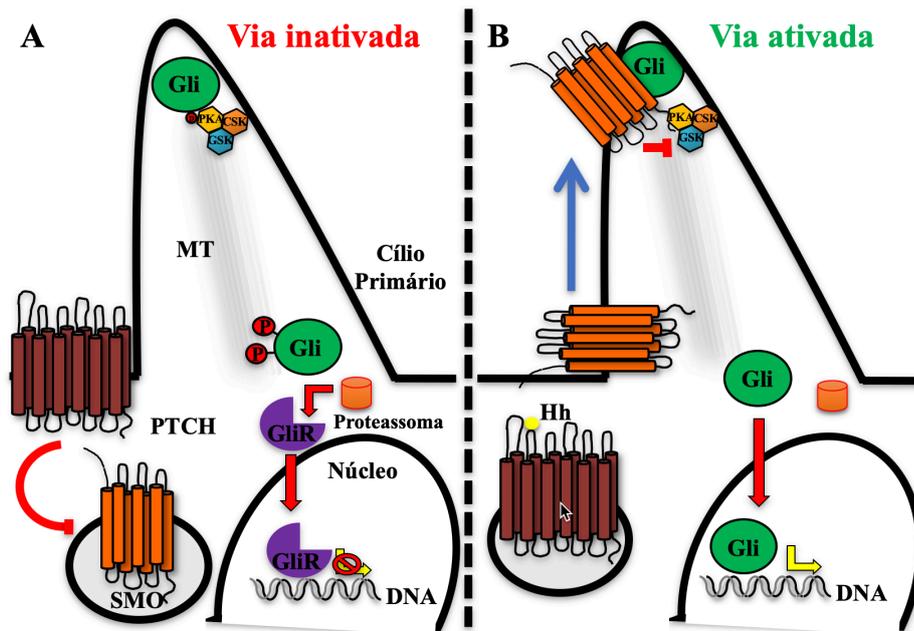


Figura 03- Esquema de representação da via do Hedgehog. **A)** Na ausência de ligantes Hh, o receptor Patched inibe o correceptor Smoothened, restringindo este receptor em vesículas na base do cílio primário e impedindo a ativação dos fatores de transcrição Gli 1,2,3 que ficam no topo. Nesse estado, Glis são fosforilados, ubiquinados e transportados pro proteassoma onde Gli1 e Gli2 são degradados e Gli3 é processado em Gli3-repressor e direcionado pro núcleo, onde inibe a expressão de genes alvos da via. **B)** Na presença de ligantes Hh, o receptor Patched é internalizado permitindo a migração do Smoothened para o topo do cílio primário inibindo as cinases e promovendo a ativação dos fatores de transcrição Gli, que são direcionados pro núcleo induzindo a expressão de genes alvos da via. Fonte: Pereira TA *et al.* Liver International, 2013; 33(1):149-61.

A via do Hedgehog é exposta a diversas formas de regulação e alguns de seus componentes são genes alvo dos fatores de transcrição dela própria, como o PTCH, GLI-1, GLI-2, levando a uma forma de auto-regulação (16). Os dois reguladores negativos são o glicano 3 (GPC3) e o *hedgehog interacting protein* (Hhip) (46, 19), que funcionam como competidores do receptor PTCH, em virtude da sua afinidade pelos ligantes Hh. Os principais reguladores positivos são conhecidos por *Cell adhesion molecule-related downregulated by oncogenes* (Cdo), *Brother of Cdo* (Boc) e *Growth Arrest Specific 1* (Gas1) (61,62).

Diversos estudos já mostraram associação entre a ativação da via Hh e vários tipos de neoplasia, e essa ativação pode se dar a partir de quatro eventos (20,21,23). Os eventos tipo I são relacionados a fatores ligante-independentes, havendo ativação da via Hh através de mutações em moléculas reguladoras negativas, como o PTCH, ou por meio de hiperativação do

SMO e GLI. Os eventos tipo II são relacionados a fatores ligante-dependentes autócrinos, onde as próprias células neoplásicas produzem e secretam fatores estimuladores do Hh. Os eventos IIIa são associados a eventos parácrinos ligante-dependentes, através da ativação do Hh em células estromais a partir da produção de moléculas estimuladoras nas células tumorais. Por fim, os eventos IIIb surgem a partir de um mecanismo ligante-dependente parácrino reverso, onde a cascata Hh é ativada nas células neoplásicas a partir da produção de fatores desencadeantes nas células estromais (13). A FIGURA 04 resume de forma esquemática os quatro mecanismos de ativação descritos acima.

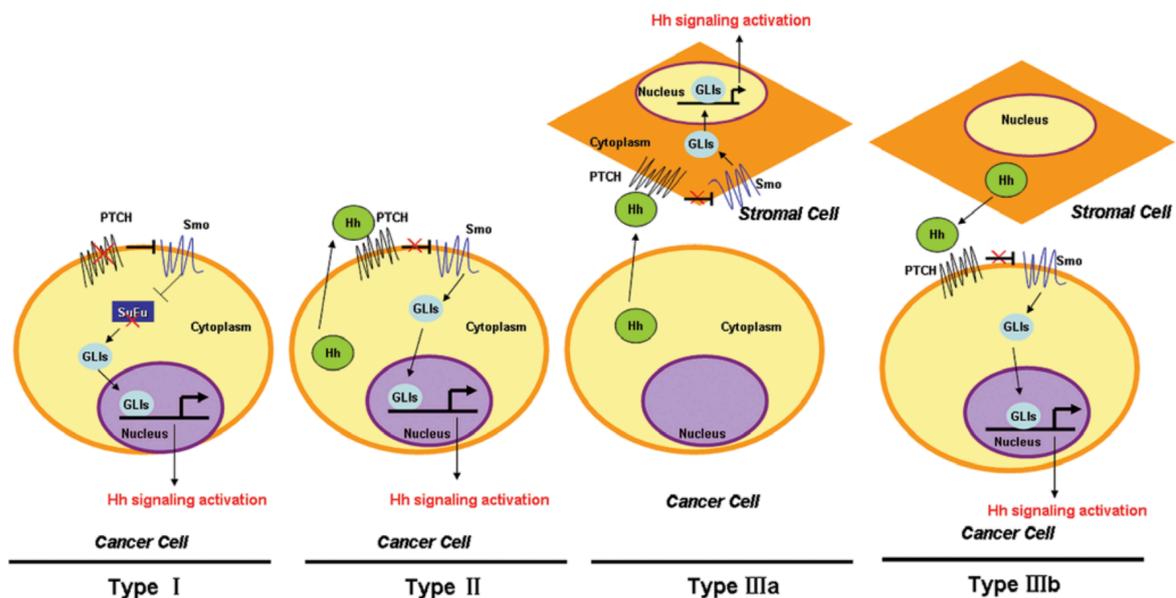


Figura 04 – Representação esquemática dos processos de ativação da via de sinalização Hedgehog. Fonte: Zheng, X., *et al.* Role of the Hedgehog pathway in hepatocellular carcinoma (Review). *Oncology Reports*, 2013; 30: 2020-2026.

Nos carcinomas basocelulares (CBC), estudos mostram que a inativação do gene PTCH1 é a alteração mais encontrada nos casos de tumor esporádico ou em pacientes portadores da síndrome do nevo basaloide (SNB), também conhecida como síndrome de Gorlin. Nessas situações, a inativação do componente PTCH causa a liberação do SMO e consequentemente a ativação dos fatores de transcrição (evento tipo I) (20).

De forma semelhante, já foi demonstrado que a via Hh possui importante participação no desenvolvimento embrionário da próstata e que estaria ativada nos carcinomas desta glândula (21). Esses estudos mostram que, em geral, o desenvolvimento desses tumores está

relacionado a processos ligante dependentes, sejam eles autócrinos, parácrinos, ou mesmo ambas as formas ao mesmo tempo (21). Dessa forma, há uma interação entre as células tumorais e as células estromais ou endoteliais que compõe o microambiente tumoral, favorecendo a progressão tumoral.

Alguns trabalhos evidenciaram também como a via Hh relaciona-se com o microambiente tumoral, através, por exemplo, do recrutamento de macrófagos (macrófagos associados ao tumor- TAM), que por sua vez assumem um perfil pró-tumoral desempenhando importante papel na progressão do câncer com múltiplas ações biológicas, como apresentação de antígenos, remoção de corpos estranhos, indução da imunidade, remodelamento tecidual, citotoxicidade celular dirigida, trombose, endocitose e estímulo a angiogênese (22).

Valverde *et al.* demonstraram a ativação da via Hedgehog em biópsias de carcinomas de células escamosas oral. Os componentes da via foram identificados tanto nas células tumorais, como também em macrófagos peritumorais e em células endoteliais associadas a neovascularização. Para tal resultado, foi utilizada a técnica de dupla marcação imunohistoquímica (GLI-2/CD 163, SHH/CD 163, IHH/CD 163 e GLI-2/CD 105). Este estudo mostra a importância da ativação da via Hh no crescimento neoplásico e na manutenção de um microambiente tumoral adequado (23).

O conhecimento detalhado de toda a via de sinalização Hedgehog permitiu o início de estudos relacionados ao desenvolvimento de quimioterápicos que objetivam a inibição da cascata Hh, o primeiro deles (ciclopamina) descoberto no ano de 1998 (40). A partir de então, vários outros moduladores vêm sendo estudados, e procuram agir principalmente no SMO, GLI e SHH. Alguns deles já foram testados para tratamento de carcinomas basocelulares e meduloblastomas, como é o caso do Vismodegib, Sonidegib, Itraconazol e Trióxido de Arsênio (20, 41, 63).

1.3.2 – A via de sinalização Hedgehog no fígado

No fígado adulto saudável, a via Hh encontra-se dormente devido a baixa produção dos seus ligantes e expressão elevada dos seus inibidores, como a Hhip (16). No entanto, as células hepáticas estreladas, alguns colangiócitos, linfócitos e progenitores hepáticos são ainda capazes

de produzir os ligantes da família Hedgehog em baixa quantidade (16). Estes, por sua vez, são responsáveis pela diferenciação de células progenitoras em colangiócitos e hepatócitos maduros (64).

Em situações de agressão hepática aguda ou crônica, vários tipos celulares que residem no parênquima passam a produzir os ligantes Shh e/ou Ihh (69), incluindo hepatócitos danificados (como é o caso dos hepatócitos balonizados encontrados na esteato-hepatite), colangiócitos agredidos (nos casos de colangiopatias com reação ductular), células estreladas miofibroblásticas (durante a fibrogênese), células endoteliais (durante a capilarização) e células imunes (16, 65, 66, 67). Já foi demonstrado, por exemplo, que os ligantes Hh agem de forma parácrina nos colangiócitos em cultura, gerando indução da transição epitelial-mesenquimal (EMT) e por fim promovendo um mecanismo capaz de gerar miofibroblastos (65). Além disso, há redução dos reguladores negativos da via, como é o caso do Hhip (68). Todas essas modificações permitem a criação de um microambiente adequado para transcrição de genes alvo e conseqüentemente proliferação e diferenciação celulares.

Alguns estudos já evidenciaram também associação entre os vírus VHB e VHC com a via Hh. Pereira e colaboradores observaram que, nas hepatites virais B e C, os níveis de ligantes Hh (Shh e Ihh) encontram-se muito elevados mesmo em pacientes com fibrose ausente ou estágio 1, o que levou os autores à hipótese de que fatores virais poderiam influenciar os níveis desse ligantes (70). A expressão da proteína HBx já foi correlacionada com níveis mais elevados dos componentes Hh (fatores ligantes e transcricionais) em amostras de CHC associados com o VHB, bem como no parênquima hepático de modelos murinos transgênicos portadores dessa proteína viral (51). Outro experimento, realizado *in vitro*, demonstrou que a infecção pelo vírus da hepatite C JFH-1 em cultura de células Huh7 induz a produção do ligante Shh (52).

Em relação ao carcinoma hepatocelular, estudo realizado por Huang *et.al.* demonstrou, através de técnicas de hibridização *in situ* e *real time PCR*, a ativação da cascata de sinalização em amostras da neoplasia (24). Chan *et.al.* também demonstraram que há secreção de Shh no CHC, que por sua vez é capaz de induzir glicólise em miofibroblastos adjacentes, levando a produção de ATP e lactato, que podem ser utilizados como fonte de energia para o tumor, sugerindo um mecanismo parácrino de ativação (25).

Zheng *et al.* analisaram a expressão do GLI-1 através da sua expressão imunoistoquímica, correlacionando os dados com a imunomarcção para proteínas relacionadas a transição epitelial-mesenquimal (S100a4 e E-caderina). Os resultados obtidos mostraram que o fator de transcrição GLI-1 se encontra mais expresso em tumores com características histopatológicas mais avançadas e, portanto, com maior potencial metastático (26).

Modelos animais de CHC também já foram testados e evidenciaram expressão proteica de SHH, PTCH, SMO e GLI-1 através de marcadores imunoistoquímicos. Nesta situação, houve correlação direta entre o nível de marcação com o grau de diferenciação tumoral (27).

1.4 – Características morfológicas e fatores prognósticos relacionados ao CHC.

As características histopatológicas clássicas do CHC consistem em tumores bem vascularizados, com formação de trabéculas espessas (mais de três camadas de células), padrão proeminentemente trabecular, atipias citológicas, atividade mitótica, invasão vascular, rarefação de células de Kupffer e perda da trama reticulínica sustentacular (28).

Edmondson e Steiner (29) classificaram as variações estruturais do CHC em quatro grandes grupos, avaliando parâmetros de acordo com características celulares, como tamanho do núcleo, formato da célula, relação núcleo-citoplasma e presença de hiper Cromasia. O critério usado atualmente é (30):

grau 1 (G1) – as células geralmente apresentam-se com distribuição trabecular, estando enfileiradas ou conjuntas, em forma de haste, com citoplasma abundante e irregularidades nucleares mínimas, assemelhando-se, portanto, ao parênquima hepático normal;

grau 2 (G2) – há pleomorfismo nuclear mais intenso e hiper Cromasia, nucléolos evidentes, citoplasma abundante e eosinofílico;

grau 3 (G3) – as alterações nucleares são mais evidentes e acompanhadas de angulação significativa;

grau 4 (G4) – há pleomorfismo intenso e presença de células gigantes.

Essas diferenciações podem variar entre os pacientes e até mesmo entre diferentes nódulos encontrados em um único paciente. Os graus 1 e 2 são correspondentes a tumores mais

bem diferenciados (baixo grau) e os graus 3 e 4 correspondentes a tumores pouco diferenciados ou de alto grau (30).

Os principais fatores prognósticos que influenciam a sobrevida do paciente portador de carcinoma hepatocelular podem ser enquadrados em quatro diferentes grupos: fatores ligados diretamente ao tumor (como o grau de diferenciação tumoral); fatores ligados ao parênquima hepático adjacente ao tumor (como a etiologia da cirrose); fatores ligados ao quadro clínico do paciente (níveis séricos de alfa-fetoproteína e marcadores de função hepática), e fatores ligados ao tratamento (31).

Atualmente em sua oitava edição, o *American Joint Comitee on Cancer* (AJCC) reconhece como principais fatores determinantes para o estadiamento patológico do CHC o tamanho da lesão (utilizando pontos de corte de 2cm e 5cm), bem como o número de nódulos (único ou múltiplos) e a presença ou ausência de invasão angiolinfática (32).

Em estudo inglês realizado no *Royal Free Hospital*, no ano de 2012, observou-se haver uma sobrevida livre de doença três anos menor nos pacientes tratados com transplante hepático e diagnosticados com CHC e invasão vascular concomitante, em relação aos pacientes com invasão vascular não identificada. Da mesma forma, pacientes com CHC e invasão vascular tratados com ressecção hepática parcial apresentaram uma redução de três a cinco anos na sobrevida livre de doença quando comparados a pacientes sem invasão detectável (33). Este dado reforça a importância da invasão vascular como critério prognóstico.

O escore MELD (*model for end-stage liver disease*) foi criado inicialmente com o propósito de avaliação de sobrevida de pacientes submetidos a *shunt* portossistêmico intra-hepático transjugular (34). Depois, o modelo passou a ser utilizado como método de avaliação de sobrevida em pacientes com níveis variados de doenças hepáticas. Atualmente, o escore foi validado como um preditor de mortalidade pré-operatória em pacientes com doenças hepáticas terminais, no intervalo de 3 meses (idealmente devendo levar em consideração outros parâmetros clínicos), sendo calculado a partir de um valor logarítmico envolvendo os níveis séricos de creatinina, bilirrubina total e *International Normalized Ratio* (INR). Considera-se que valores cada vez mais elevados sejam indicativos de pior sobrevida, sendo considerado de péssimo prognóstico aqueles pacientes com escore em torno de 40 (34, 35).

Ademais, os níveis séricos da alfa-fetoproteína são de importante destaque na avaliação do paciente portador de uma doença hepática. Trata-se de uma glicoproteína associada ao crescimento tumoral e normalmente é produzida em células hepáticas durante o período fetal, não sendo secretado pelos hepatócitos adultos. Este marcador, entretanto, passa a ser produzido novamente em células neoplásicas, como é o caso do CHC e alguns tumores gonadais de células germinativas. Níveis acima de 10ng/mL já são considerados elevados, e níveis acima de 100 ng/mL são suspeitos para neoplasia concomitante (42, 56, 57).

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 grupos (0, A, B, C e D), de acordo com variáveis prognósticas pré-estabelecidas, que os alocam em grupos de tratamento específicos (36). A versão mais atual desta classificação encontra-se resumida na FIGURA 05.

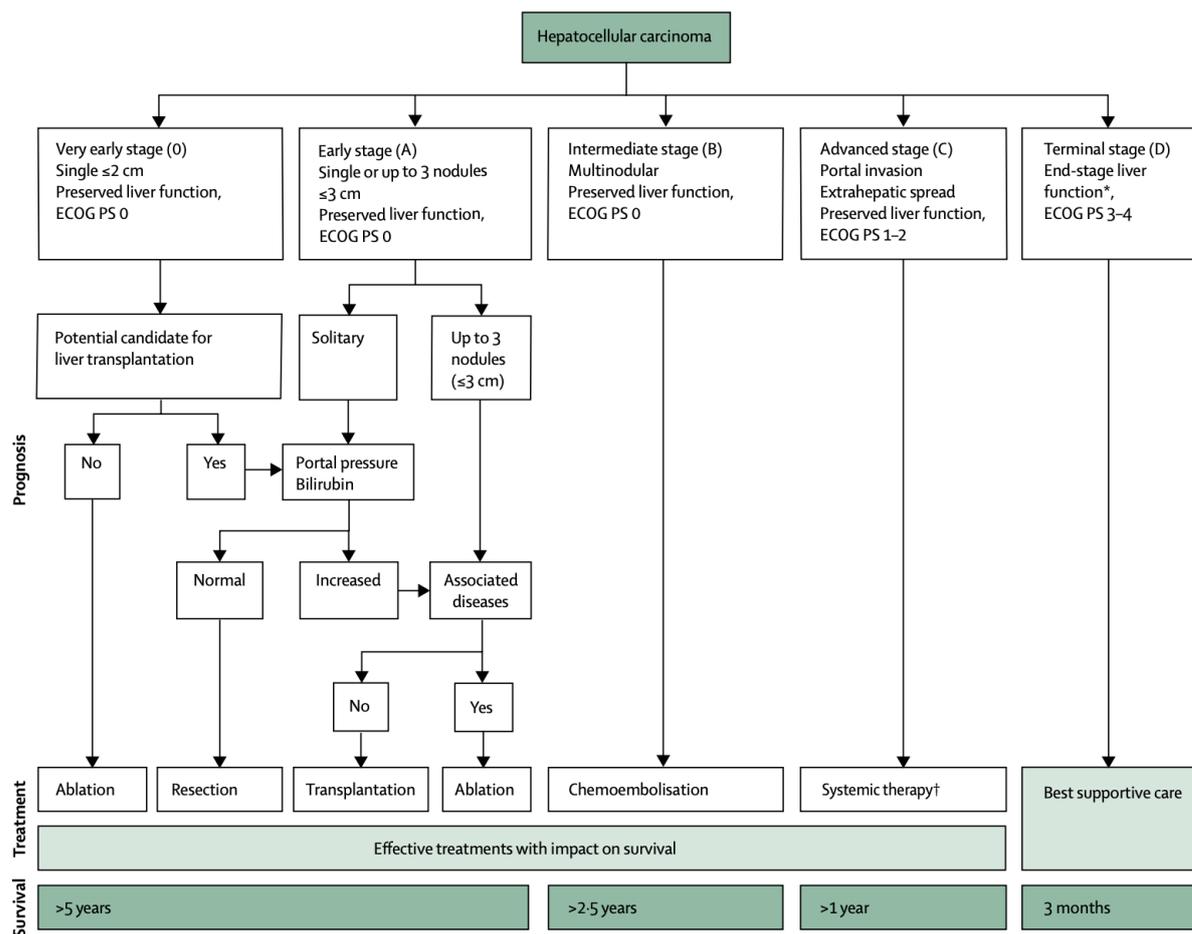


Figura 05 – Algoritmo de tratamento do CHC segundo o *Barcelona Clinic Liver Cancer* (BCLC). Fonte: adaptado de Bruix *et al.* ECOG PS - *Eastern Cooperative Oncology Group Performace Status*.

O transplante hepático, atualmente, figura-se como a melhor opção de tratamento ao paciente, já que nesta situação torna-se possível a cura da neoplasia e da doença de base associada (cirrose), porém atualmente a realização do procedimento é dificultada em virtude da escassez de órgãos e conseqüentemente longas filas de espera por doadores, bem como problemas logísticos envolvendo o transporte dos enxertos (37).

A ressecção cirúrgica tornou-se o tratamento de escolha principalmente nos casos de CHC desenvolvidos em fígados não cirróticos. Especialmente nos casos de pacientes cirróticos, há necessidade de avaliação do *status* hepático, com avaliação da pressão portal e dos níveis de bilirrubina, para melhor avaliação pré-operatória (37).

A ablação tumoral guiada é uma opção terapêutica viável nos casos de tumores detectados em estágios iniciais. Esta abordagem consiste em induzir a necrose do tecido neoplásico através de modificações de temperatura (radiofrequência, micro-ondas, *laser* ou crioablação) ou injeção de substâncias químicas, mais frequentemente o etanol (36).

Das publicações disponíveis até o presente, nenhum ensaio clínico fase III comprovou benefício da quimioterapia citotóxica convencional na redução da mortalidade pelo CHC. Somente em 2008, o estudo *Sorafenibe Hepatocellular Carcinoma Assessment Randomized Protocol* (SHARP), controlado e randomizado, que incluiu pacientes com CHC, demonstrou aumento de pouco mais de dois meses da sobrevida global entre os pacientes tratados com o sorafenibe, um inibidor multiquinase, quando comparados com placebo (38). No ano de 2017, outro estudo fase III foi publicado e mostrou aumento modesto em sobrevida global com o uso de outro inibidor multiquinase, o regorafenibe, desta vez em pacientes em segunda linha de tratamento (39).

2 - JUSTIFICATIVAS

O CHC configura-se ainda como uma das poucas neoplasias que apresenta incidência e mortalidade crescentes (2), e apesar dos diversos trabalhos existentes na literatura, esta lesão ainda apresenta características biológicas desconhecidas, o que dificulta o desenvolvimento de parâmetros clínicos e morfológicos que auxiliem no estabelecimento do prognóstico e tratamento do paciente.

Portanto, o estudo das vias de sinalização carcinogênicas, como o Hedgehog, torna-se útil para a caracterização de fatores prognósticos mais fiéis em relação aos atualmente empregados, podendo ser incorporado em rotinas de diagnóstico e estadiamento do carcinoma hepatocelular, além de ajudar a esclarecer e gerar opções mais individualizadas de tratamentos quimioterápicos, que atualmente é pouco utilizado em comparação às modalidades cirúrgicas.

3 - OBJETIVOS

3.1 - Objetivo geral

Avaliar a expressão do ligante Sonic Hedgehog (Shh) em amostras provenientes de pacientes com diagnóstico de carcinoma hepatocelular.

3.2 - Objetivos específicos

3.2.1- Caracterizar os parâmetros clínicos dos pacientes submetidos a transplante hepático.

3.2.2 - Caracterização morfológica dos carcinomas hepatocelulares identificados em pacientes submetidos a transplante hepático.

3.2.3- Caracterizar a expressão imunoistoquímica do fator ligante Shh em amostras de carcinoma hepatocelular diagnosticado ao exame histopatológico convencional (H&E).

3.2.4- Avaliar a expressão imunoistoquímica do fator ligante Shh no fígado cirrótico adjacente e correlacionar com a sua etiologia.

3.2.5- Correlacionar a expressão imunoistoquímica do fator ligante Shh no tumor e no parênquima cirrótico adjacente.

3.2.6- Correlacionar a expressão imunoistoquímica tumoral e cirrótica do fator ligante Shh com parâmetros clínicos dos pacientes.

3.2.7- Correlacionar a expressão imunoistoquímica tumoral e cirrótica do fator ligante Shh com parâmetros morfológicos do CHC.

4 - MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 - Considerações éticas

O projeto seguiu todas as normas de pesquisas envolvendo seres humanos contidas na Resolução 466 / 2012 do Conselho Nacional de Saúde, para salvaguardar os direitos e o bem-estar das pessoas estudadas. Este projeto foi encaminhado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG (COEP) sob o número CAAE 71206617.8.0000.5149 (ANEXO 1).

4.2 – Delineamento e estratégias de estudo

Trata-se de estudo observacional, retrospectivo e comparativo, de investigação da expressão do ligante Sonic Hedgehog em pacientes portadores de CHC, submetidos a transplante hepático no Instituto Alfa de Gastroenterologia (IAG) do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais (HC-UFMG).

Foram estudadas amostras de fígado (tumoral e não-tumoral próximo ao tumor) de 36 pacientes, maiores de 18 anos, que receberam o diagnóstico de CHC associado a hepatopatia crônica de diversas etiologias, que foram submetidos a transplante hepático no Grupo de Transplante Hepático do Instituto Alfa de Gastroenterologia do Hospital das Clínicas da UFMG. As amostras selecionadas foram colhidas e arquivadas no Serviço de Anatomia Patológica do Hospital das Clínicas da UFMG, no período de 2003 a 2015.

Todas as lâminas coradas em HE foram revistas para escolha do bloco com maior representatividade tumoral, para posterior confecção dos novos cortes que foram então corados pelo método imunohistoquímico (vide detalhamento posterior).

4.3- Critérios de exclusão

Foram excluídas todas amostras inadequadas ou insuficientes, bem como aquelas que não apresentavam representação de parênquima cirrótico peritumoral.

4.4 – Parâmetros clínicos e morfológicos analisados

Todos os dados clínicos e laboratoriais analisados foram obtidos a partir de análise dos prontuários eletrônicos do Instituto Alfa de Gastroenterologia do HC-UFMG.

O escore MELD foi recalculado retrospectivamente utilizando os dados laboratoriais que foram obtidos, sendo possível de ser realizado em 28 dos 36 pacientes, desconsiderando a pontuação adicional recebida em casos de paciente portador de CHC clinicamente detectado.

Foram revistas as lâminas de HE originais também no intuito de avaliar os dados histológicos referentes ao tumor, entre eles padrão histológico, padrão citológico, grau de diferenciação tumoral pela classificação de Edmondson e Steiner (29), presença de invasão vascular e avaliação do parênquima hepático não tumoral. Estes dados foram listados e organizados de acordo com o protocolo de microscopia de peça de explante hepático utilizado no serviço de anatomia patológica do HC-UFMG (Anexo 02).

4.5 – Técnica de imunoistoquímica

A proteína Shh foi investigada por imunoistoquímica empregando-se kit comercializado (Reveal Biotin-free Polyvalent HRP - Spring Bioscience, Estados Unidos da América) segundo protocolo padronizado pelo Laboratório de Patologia Molecular do Departamento de Anatomia Patológica da Faculdade de Medicina da UFMG.

Lâminas com cortes parafinados de 5µm de espessura foram colocadas *overnight* em estufa a aproximadamente 56°C, desidratadas em xilol e reidratadas em álcool etílico 100% e 80%. A recuperação antigênica foi realizada pelo aquecimento das lâminas a 90°C no vapor, durante 20 minutos, em citrato de sódio 0,01M (pH 6,0).

Para o bloqueio da peroxidase foram adicionados às lâminas aproximadamente 400 µl da solução bloqueadora com posterior lavagem em solução TRIS. Em seguida, foi adicionada a mesma quantidade da solução de bloqueio da proteína repetindo o processo de lavagem da etapa anterior. Foi, então, acrescentado o seguinte anticorpo primário, diluído em tampão fosfato-salino (PBS): anticorpo anti-Shh (EPITOMICS 1843-1), na concentração de 1:1000. Após incubação por dezesseis horas (*overnight*), as lâminas foram então lavadas em solução TRIS. Seguiu-se a adição da solução de bloqueio pós-primário e nova lavagem em TRIS.

Para a revelação da reação foram adicionados 400µl da solução do polímero (Reveal Biotin-free Polyvalent HRP - Spring Bioscience, Estados Unidos da América), por 30 minutos e lavadas. As lâminas foram cobertas com aproximadamente 200µl da solução reveladora contendo diamino-benzidina (DAB), cujo preparo foi 1ml do substrato para cada 50µl do DAB, por 2 minutos. Após lavagem, as lâminas foram embebidas em Hematoxilina de Harris por 15 segundos para contra-coloração, lavadas em água corrente por dois minutos, álcool etílico por dois minutos e xilol por um minuto. Em seguida foram cobertas com lamínula e avaliadas por microscopia óptica.

4.6 – Análise e escore imunoistoquímico

Para discriminar as marcações da proteína nos tumores e no parênquima cirrótico adjacente, análise microscópica foi realizada por dois patologistas em duas etapas: graduação da intensidade da marcação e quantificação do número de células marcadas. Vale ressaltar que a análise foi feita ao longo da totalidade da amostra presente na lâmina, sendo utilizado como controle positivo uma amostra tumoral com marcação forte e como controle negativo uma amostra de parênquima hepático normal. Logo em seguida foi realizado cálculo para definição da marcação de forma específica, de acordo com a seguinte fórmula (53):

Escore imunoistoquímico = graduação da intensidade da marcação x quantificação do número de células marcadas.

A intensidade da marcação vista por microscopia óptica foi categorizada em ausente, fraca e forte, enumeradas de 0 a 4 – sendo que a ausência de marcação foi representada pelo número 0, marcação fraca representada pelos números 1 e 2 e a marcação forte pelos números 3 e 4. A quantificação do número de células marcadas foi definida pela quantidade encontrada por campo de acordo com a seguinte classificação:

1- 0 – 25%

2- 26 – 50%

3- 51 – 75%

4- 76 – 100%

Para graduação do score final, foram definidos intervalos entre 0 e 16 adotando-se os seguintes valores para a referência:

0 – 4	Marcação ausente
5 – 8	Marcação fraca
9 – 12	Marcação moderada
13 – 16	Marcação forte.

4.7 - Análises estatísticas

Para observação e distribuição dos dados quantitativos foi utilizado o software SPSS Statistics®, sendo as variáveis quantitativas discretas e as nominais expressas como números e porcentagens. As variáveis contínuas foram apresentadas como medianas e valores extremos.

Utilizando o Microsoft® Excel para Mac, todas as variáveis foram dicotomizadas da seguinte forma: escore imunoistoquímico – ausente/fraco ou moderado/forte; escore MELD – menor que 20 ou maior que 20; nível sérico de alfa-fetoproteína - maior ou menor que 10 ng/mL, grau de diferenciação tumoral segundo Edmonson-Steiner (29) - baixo grau (G1/G2) ou alto grau (G3/G4); quantidade de nódulos – único ou múltiplos; tamanho do maior nódulo – maior ou menor que 2,0 cm; invasão vascular – presente ou ausente; etiologia da doença de base – viral (VHC) ou não viral (etanólica/criptogênica).

Todos as variáveis foram correlacionadas no software Minitab® 19, utilizando-se do teste de associação do qui-quadrado. Os valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

5 – RESULTADOS

Neste estudo, foram analisadas 36 amostras de carcinoma hepatocelular (n = 36), obtidas exclusivamente de pacientes submetidos a transplante hepático, realizados no IAG do HC-UFMG entre os anos de 2003 e 2015 e armazenadas em blocos de parafina provenientes do Serviço de Anatomia Patológica da UFMG.

5.1 – Dados clínicos e laboratoriais

Do total de amostras, 32 (88,8%) são provenientes de pacientes do sexo masculino e 4 (11,2%) de pacientes do sexo feminino; o paciente mais jovem submetido ao transplante hepático tinha 41 anos e o mais velho 74 anos, enquanto a mediana da idade dos pacientes na época do transplante foi de 55,5 anos. Todos os casos de CHC do presente estudo foram obtidos de fígado cirróticos, sendo que 16 (44,4%) tinham como doença de base a hepatite etanólica, 14 casos (38,9%) a hepatite por vírus C, além de 6 casos (16,7%) de cirrose criptogênica.

Em relação a dados laboratoriais das amostras, temos os seguintes: alanina aminotransferase (ALT) com valor mínimo de 11,0 U/L, máximo de 275,0 U/L e mediana igual a 48,0 U/L; aspartato aminotransferase (AST) variando de 20,6 a 177,0 U/L, com mediana igual a 53,0 U/L; bilirrubina total (BT) variando de 0,6 a 8,7 mg/dL, com mediana igual a 2,15 mg/dL; fosfatase alcalina (FA) variando de 28,4 a 416,0 U/L, com mediana igual a 136,0 U/L; gama glutamil transferase (GGT) variando de 25,0 a 915,0 U/L, com mediana igual a 62,3 U/L; lactato desidrogenase (LDH) variando de 169,0 a 682,0 U/L, com valor mediano igual a 356,5 U/L; albumina variando de 2,1 a 3,9 g/dL, com mediana igual a 2,95 g/dL; razão normalizada internacional (RNI) variando de 0,99 a 2,51, com mediana igual a 1,49; ureia variando de 12,0 a 72,12 mg/dL, com mediana igual a 26,0 mg/dL; creatinina variando de 0,4 a 3,0 mg/dL, com mediana igual a 0,89 mg/dL; alfa-fetoproteína (AFP) variando de 1,07 a 537,0 ng/ml, com mediana igual a 5,5 ng/ml. A análise dos valores do escore MELD evidenciou uma variação de 6 a 34 pontos, com mediana de 15 pontos (TABELA 1).

Tabela 01 – Distribuição dos dados clínicos e demográficos dos pacientes submetidos a transplante hepático no HC-UFMG no período entre 2003 e 2015.

Dados demográficos/clínicos	
Sexo	
Masculino	32 (88,8%)
Feminino	4 (11,2%)
Idade (anos): mediana (mínima - máxima)	55,5 (41 – 74)
Etiologia	
Etanólica	16 (44,4%)
VHC	14 (38,9%)
Criptogênica	6 (16,7%)
Dados laboratoriais:	Mediana (valor mínimo - máximo):
ALT (U/L)	48,0 (11,0 - 275,0)
AST (U/L)	53,0 (20,6 - 177,0)
BT (mg/dL)	2,15 (0,6 – 8,7)
FA (U/L)	136 (28,4 - 416,0)
GGT (U/L)	62,3 (25,0 - 915,0)
LDH (U/L)	356,5 (169 - 682,0)
Albumina (g/dL)	2,95 (2,1 – 3,9)
RNI	1,49 (0,99 - 2,51)
Ureia (mg/dL)	26 (12,0 - 72,12)
Creatinina (mg/dL)	0,89 (0,4 - 3,0)
AFP (ng/ml)*	5,5 (0,07 - 537)
MELD**	15 (6 - 34)

*nível sérico identificado em 23 casos

**escore calculado em 28 casos

5.2 – Dados morfológicos

Das 36 amostras, temos os seguintes parâmetros: 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 1,0 a 5,2 cm, sendo 2,75 cm a mediana dos nódulos. Invasão vascular foi detectada em 12 (33,3%) casos pelo HE, estando ausente em 24 (66,7%). Em se tratando do grau de diferenciação tumoral, 27 (75%) casos foram classificados como baixo grau, sendo que destes, 8 (22,2%) foram considerados como grau I e 19 (52,8%) como grau II; e 9 casos (25%) foram classificados como alto grau, sendo 7 (19,4%) considerados grau III e 2 (5,6%) considerados grau IV. Em relação ao padrão histológico da neoplasia, 21 (58,3%) casos possuíam padrão trabecular, 5 (13,9%) casos padrão pseudoacinar, 1 (2,8%) padrão sólido e 9 (25%) tinham padrão misto (TABELA 2).

Tabela 2 – Dados morfológicos de 36 casos de CHC provenientes de transplante hepático realizados no HC-UFMG no período entre 2003-2015.

Número de nódulos por caso	1 a 10; mediana: 2
Tamanho dos nódulos	1,0 a 5,2 cm; mediana: 2,75 cm
Invasão vascular	
Presente	12 (33,3%)
Ausente	24 (66,7%)
Grau de diferenciação*	
Baixo grau (I/II)	27 (75%)
Grau I	8 (22,2%)
Grau II	19 (52,8%)
Alto grau (III/IV)	9 (25%)
Grau III	7 (19,4%)
Grau IV	2 (5,6%)
*Segundo o escore de Edmonson-Steiner (29)	
Padrão histológico	
Trabecular	21 (58,3%)
Pseudoacinar	5 (13,9%)
Sólido	1 (2,8%)
Misto	9 (25%)

5.3 – Análise imunoistoquímica

Os principais padrões de marcação imunoistoquímica para o anticorpo Shh encontram-se ilustrados nas FIGURAS 6 a 10. As TABELAS 3 e 4 mostram a distribuição quantitativa do escore imunoistoquímico nas lesões tumorais e no respectivo parênquima cirrótico adjacente.

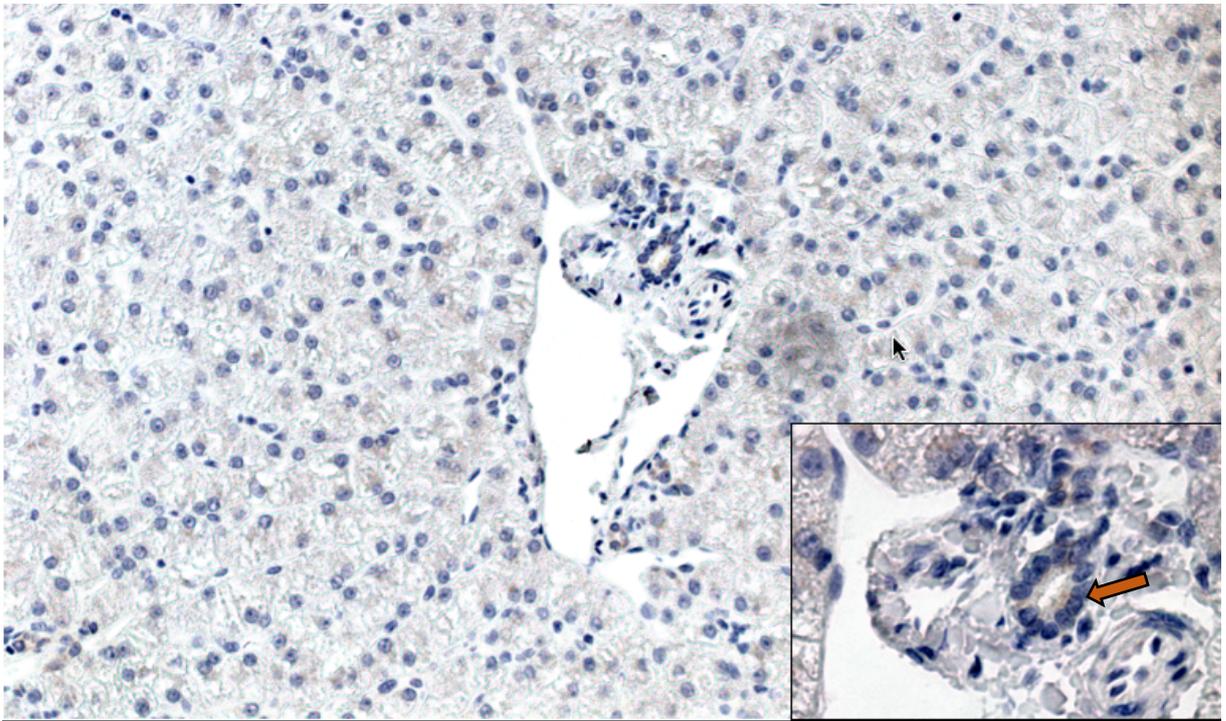


Figura 06 - Imunoexpressão do Shh em fígado normal (aumentos: 200x e 600x). Observa-se apenas marcação focal em colangiócitos (seta).

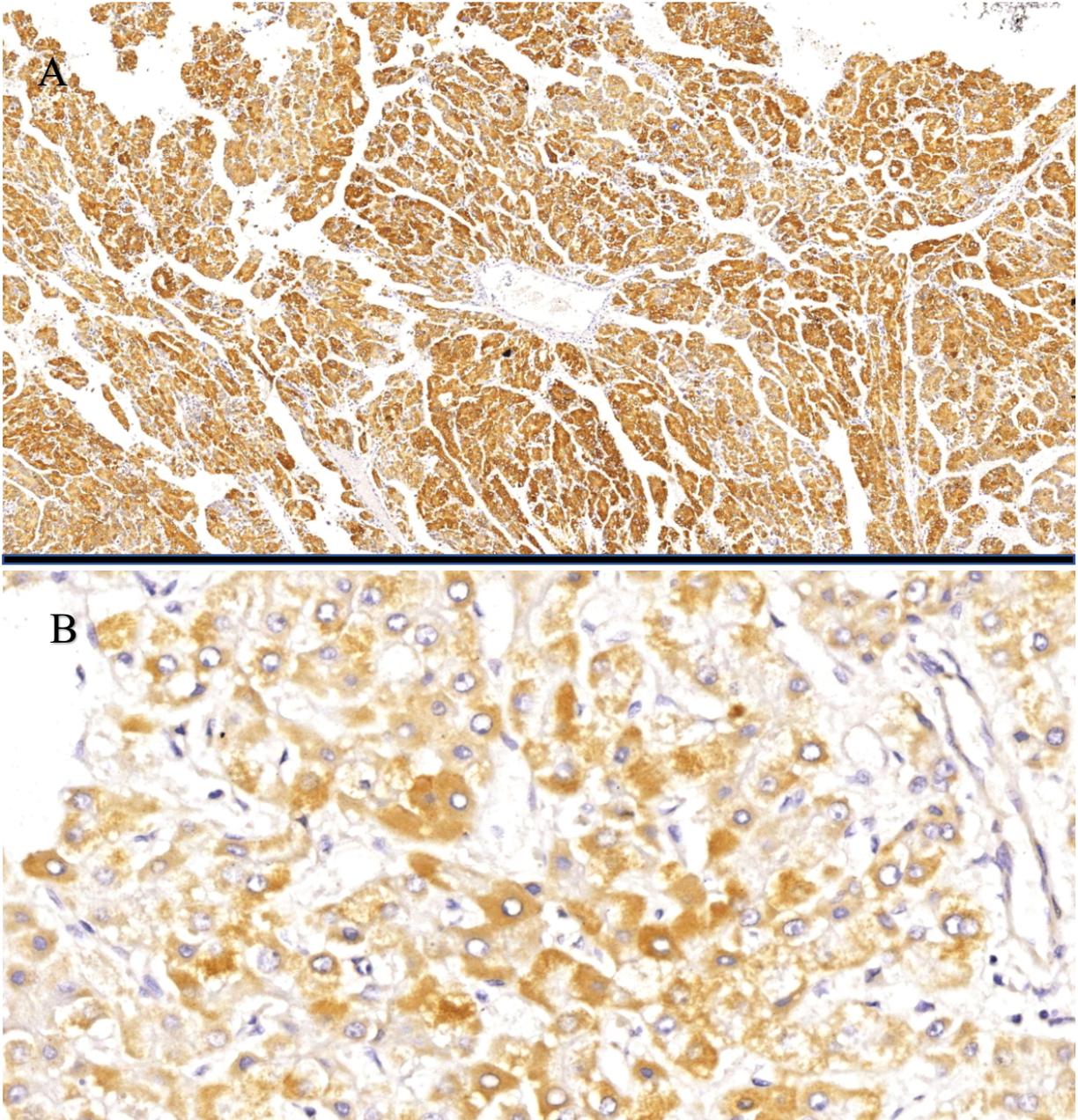


Figura 07 – A- Marcação citoplasmática forte da proteína ligante Shh em área tumoral com arquitetura pseudoacinar (aumento de 100x). B – Marcação citoplasmática forte (hotspot) em área tumoral sólida (aumento: 400x).

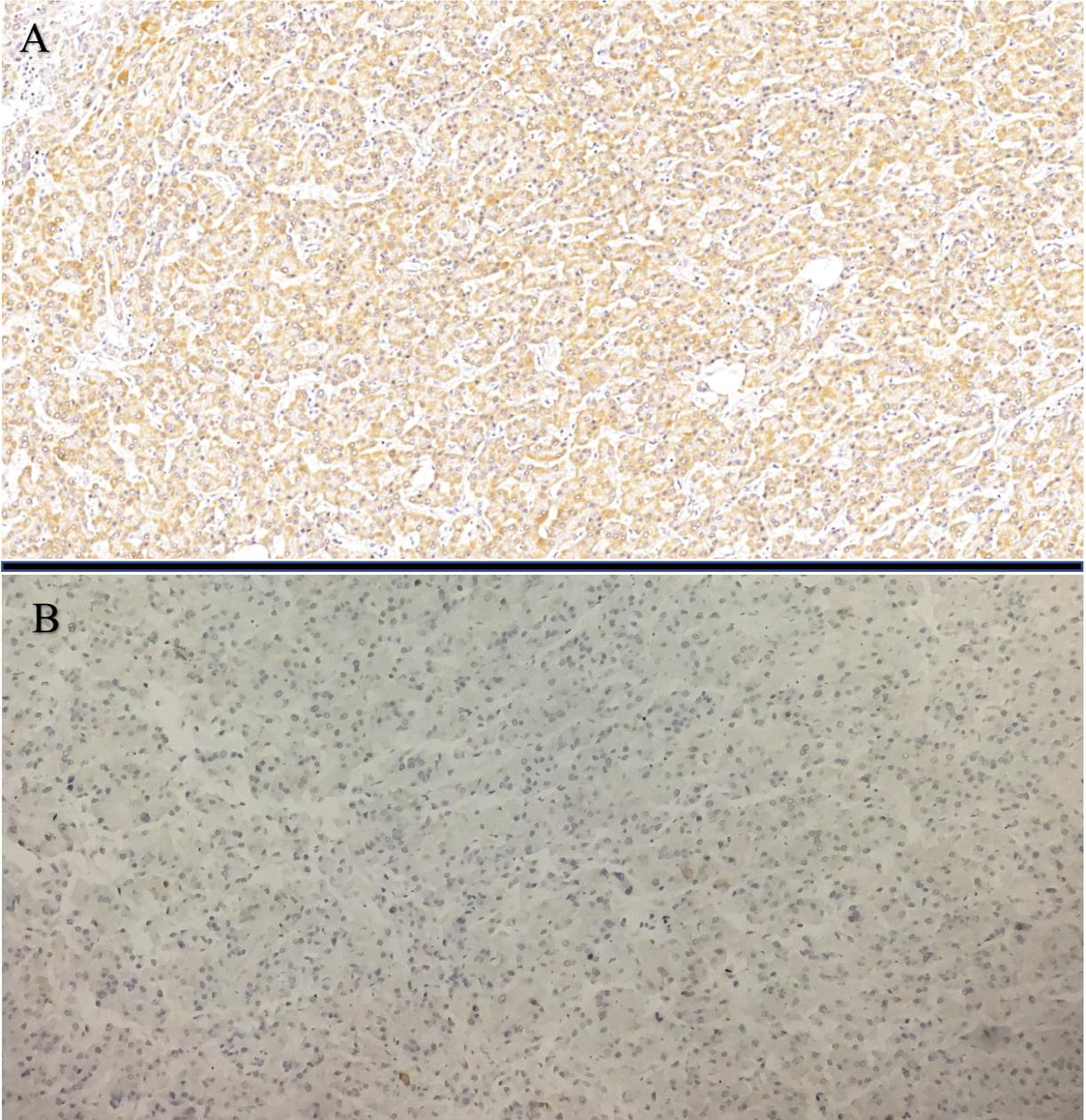


Figura 08 – A- Marcação citoplasmática moderada da proteína ligante Shh em área tumoral com arquitetura trabecular (aumento de 100x). B – Células tumorais com marcação ausente para o ligante Shh (aumento de 100x).

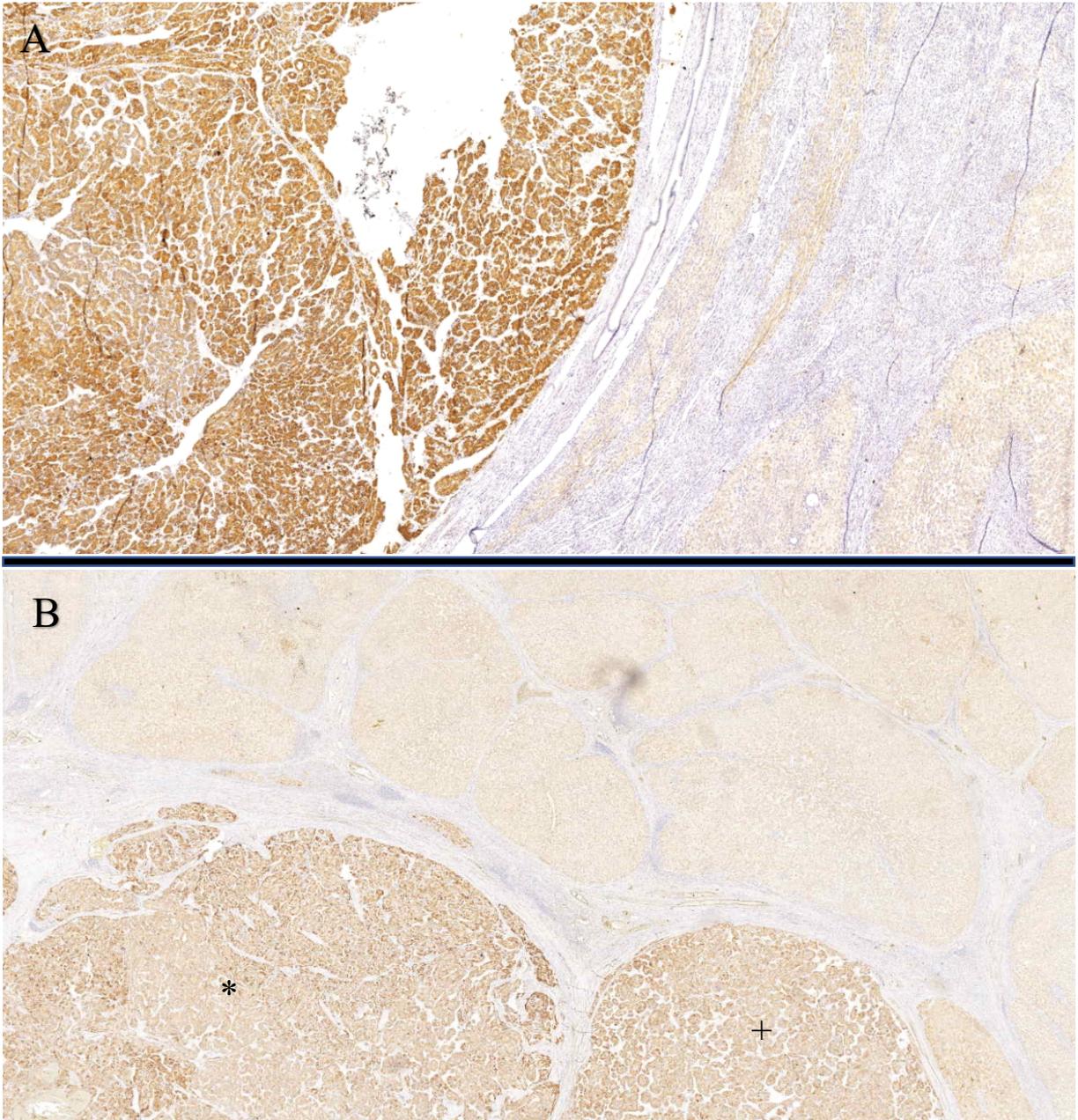


Figura 09 – A- Marcação citoplasmática forte da proteína ligante Shh em área tumoral (à esquerda) com arquitetura pseudoacinar e marcação moderada em nódulos cirróticos adjacentes (à esquerda). Visão panorâmica. B – Marcação citoplasmática forte da proteína ligante SHH em área tumoral (região inferior) com arquitetura trabecular (*) e pseudoacinar (+). Marcação fraca em nódulos cirróticos adjacentes (região superior). Visão panorâmica

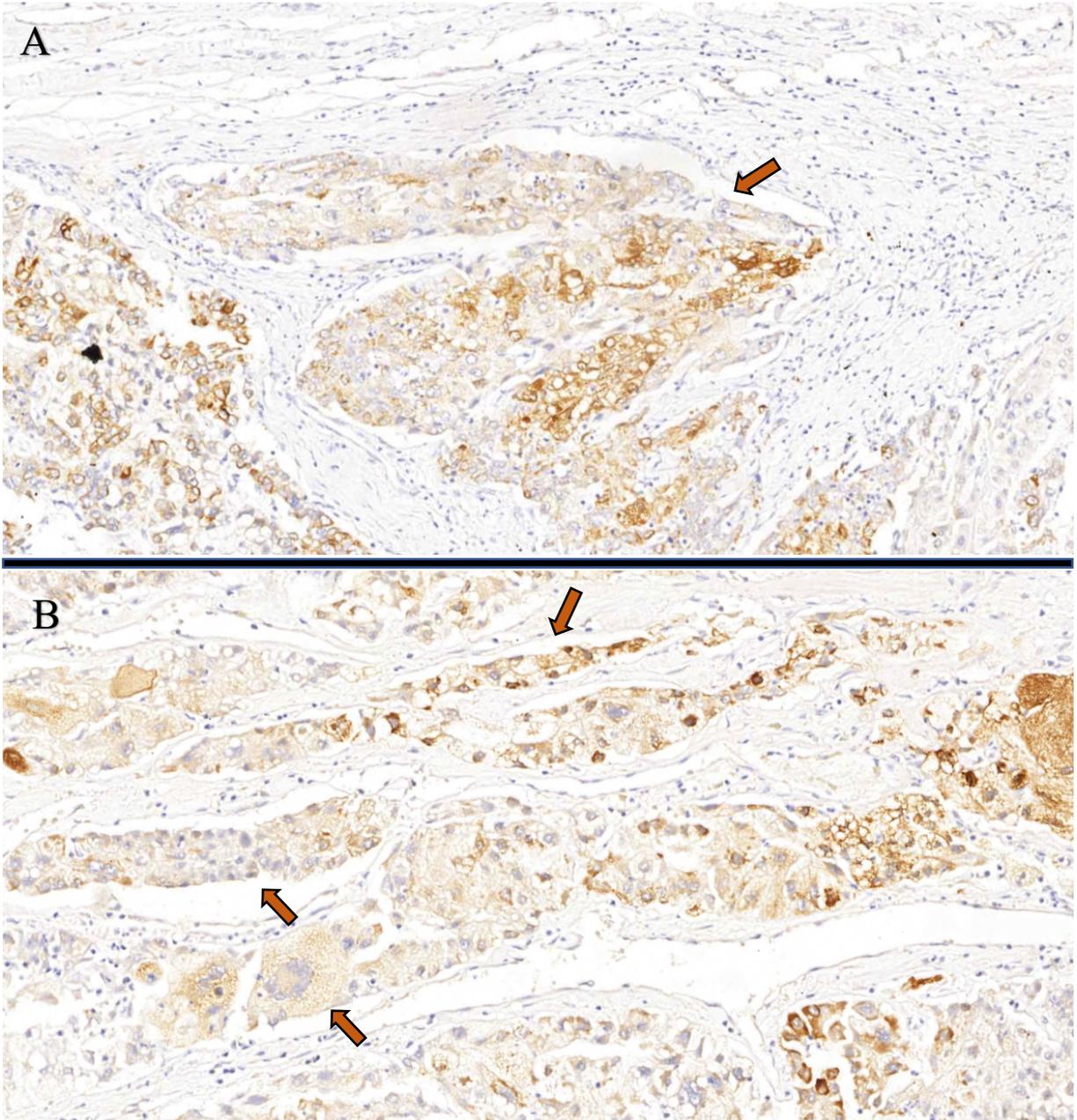


Figura 10 – A e B- Focos de embolização angiolinfática (setas) em vasos peritumorais. Marcação citoplasmática moderada nas células tumorais (aumento de 200x).

Tabela 03 – Distribuição quantitativa do escore imunoistoquímico tumoral de 36 casos de CHC provenientes de transplantes hepáticos realizados no HC-UFMG no período entre 2003-2015.

Escore Imunoistoquímico Tumoral	Quantidade de casos
0 (Ausente)	16 (44,4%)
1 (Fraca)	8 (22,2%)
2 (Moderada)	10 (27,8%)
3 (Forte)	2 (5,6%)

Tabela 04 – Distribuição quantitativa do escore imunoistoquímico no parênquima cirrótico peritumoral de 36 casos de CHC provenientes de transplantes hepáticos realizados no HC-UFMG no período entre 2003-2015.

Escore Imunoistoquímico Tumoral	Quantidade de casos
0 (Ausente)	16 (44,5%)
1 (Fraca)	17 (47,2%)
2 (Moderada)	3 (8,3%)
3 (Forte)	0 (0%)

5.4 – Correlação entre os escores imunoistoquímicos e dados clínicos/morfológicos

A análise do escore imunoistoquímico tumoral permitiu correlação estatística entre este parâmetro e o grau de diferenciação do tumor ($p = 0,014$), onde dos 27 casos que foram considerados como baixo grau (G1/G2), 21 (77,8%) apresentaram marcação ausente/fraca. Dos 9 casos considerados como alto grau (G3/G4), 6 (66,7%) obtiveram marcação moderada/forte. Também houve correlação significativa entre o grau de expressão tumoral e a presença ou

ausência de invasão vascular ($p = 0,003$), observando-se que do total de 24 casos em que não houve identificação de invasão vascular, 20 (83,3%) apresentaram marcação ausente/fraca e que dos 12 casos com presença de invasão, 8 (66,7%) evidenciaram marcação moderada/forte. Não foi obtida correlação com os parâmetros etiologia da doença de base ($p = 0,227$), quantidade de nódulos ($p = 0,157$) e tamanho do tumor ($p = 0,551$).

Em relação ao escore imunoistoquímico observado no parênquima cirrótico, observou-se relevância estatística após correlação com a presença de invasão vascular ($p = 0,011$), não sendo identificada correlação com o grau de diferenciação tumoral ($p = 1,000$), etiologia da doença de base ($p = 0,303$), quantidade de nódulos ($p = 0,546$) e tamanho do maior nódulo ($p = 1,000$).

Após análise da expressão citoplasmática do ligante Shh na lesão tumoral e no parênquima cirrótico adjacente, observou-se relevância estatística diante da correlação entre estes dois parâmetros ($p = 0,011$), onde notou-se que os 24 casos com escore tumoral ausente/fraco também obtiveram o mesmo escore no parênquima cirrótico. Dos 12 casos com marcação tumoral moderada/forte, 3 (25%) deles também obtiveram este escore no parênquima cirrótico.

Em relação aos níveis séricos de alfa-fetoproteína (obtidos em 23 casos), não foram observadas correlações entre os níveis séricos maiores ou menores que 10ng/ml e a expressão do SHH tumoral ou no parênquima cirrótico ($p = 0,526$ e $p = 1,000$, respectivamente)

O cálculo do escore MELD foi possível de ser obtido em apenas 28 pacientes, não sendo observada correlação entre a expressão do Shh nas amostras tumorais e cirróticas com o escore maior ou menor que 20 ($p = 0,291$ e $p = 1,000$, respectivamente).

As TABELAS 05 e 06 resumem as correlações descritas acima.

Tabela 05 – Correlação entre o escore imunoistoquímico do Shh no parênquima tumoral com parâmetros clínicos e morfológicos de 36 casos de CHC provenientes de transplantes hepáticos realizados no HC-UFMG no período entre 2003-2015.

Variável	Expressão do SHH tumoral		Valor de <i>p</i>
	Ausente/fraca	Moderada/Forte	
Diferenciação tumoral			
Baixo Grau	21 (58,3%)	6 (16,7%)	0,014
Alto Grau	3 (8,3%)	6 (16,7%)	
Invasão Vascular			
Presente	4 (11,1%)	8 (22,2%)	0,003
Ausente	20 (55,6%)	4 (11,1%)	
Número de nódulos			
Único	14 (38,9%)	4 (11,1%)	0,157
Múltiplos	10 (27,8%)	8 (22,2%)	
Etiologia			
Viral	11 (30,6%)	3 (8,3%)	0,227
Não viral	13 (36,1%)	9 (25%)	
Tamanho dos nódulos			
> 2,0 cm	20 (55,6%)	9 (25%)	0,551
< 2,0 cm	4 (11,1%)	3 (8,3%)	
Valor de MELD*			
> 20	3 (10,75%)	3 (10,75%)	0,291
< 20	16 (57,1%)	6 (21,4%)	
AFP**			
>10ng/ml	3 (13%)	3 (13%)	0,526
<10ng/ml	11 (48%)	6 (26%)	

* escore calculado em 28 casos
** nível sérico identificado em 23 casos

Tabela 06 – Correlação entre o escore imunoistoquímico do SHH no parênquima cirrótico peritumoral com parâmetros clínicos e morfológicos de 36 casos de CHC provenientes de transplantes hepáticos realizados no HC-UFMG no período entre 2003-2015.

Variável	Expressão do SHH cirrótico		Valor de <i>p</i>
	Ausente/fraca	Moderada/Forte	
Diferenciação tumoral			
Baixo Grau	26 (72,2%)	1 (2,8%)	1,000
Alto Grau	7 (19,4%)	2 (5,6%)	
Invasão Vascular			
Presente	9 (25%)	3 (8,3%)	0,011
Ausente	24 (66,7%)	0 (0%)	
Número de nódulos			
Único	16 (44,4%)	2 (5,6%)	0,546
Múltiplos	17 (47,2%)	1 (2,8%)	
Etiologia			
Viral	12 (33,3%)	2 (5,6%)	0,303
Não viral	21 (58,3%)	1 (2,8%)	
Tamanho dos nódulos			
> 2,0 cm	27 (75%)	2 (5,6%)	1,000
< 2,0 cm	6 (16,6%)	1 (2,8%)	
Valor de MELD*			
> 20	6 (21,4%)	0 (0%)	1,000
< 20	20 (71,4%)	2 (7,2%)	
AFP**			
>10ng/ml	5 (21,7%)	1 (4,35%)	1,000
<10ng/ml	16 (69,6%)	1 (4,35%)	

* escore calculado em 28 casos
** nível sérico identificado em 23 casos

6 – DISCUSSÃO

O carcinoma hepatocelular, como a neoplasia maligna primária mais comum no fígado e sendo responsável pelo quarto maior índice de mortalidade entre os tumores malignos em pacientes de ambos os sexos (2), é alvo de diversos estudos que procuram avaliar múltiplas características intrínsecas desta lesão, que vão desde suas nuances epidemiológicas até as formas de apresentação clínica/morfológica, critérios prognósticos e propostas terapêuticas.

No presente estudo, ao avaliar os aspectos epidemiológicos de 36 amostras de CHC, observamos predomínio amplo em pacientes do sexo masculino, que abrangem um total de 88,8% dos casos estudados, um achado ainda mais expressivo quando se compara com os dados da literatura atual, onde a lesão foi identificada mais frequentemente nos homens em uma proporção 3:1 (2). A mediana de idade nos pacientes deste estudo, de 55,5 anos, também corrobora os dados da literatura, onde observa-se o desenvolvimento da neoplasia em pacientes com idade mais avançada (1).

Em relação aos parâmetros morfológicos observados, observou-se que grande parte das lesões, da mesma forma que o descrito na literatura, apresentavam aspecto morfológico do tipo trabecular (58,3% dos casos), seguido pelos padrões mistos (25%) (1). Além disso, o grau de diferenciação tumoral, quantidade de nódulos, tamanho do maior nódulo e a presença ou ausência de invasão vascular são importantes parâmetros a serem avaliados quando do estabelecimento do diagnóstico e do estadiamento patológico (32). Neste estudo, 75% dos casos foram considerados como de baixo grau, segundo os critérios de Edmonson-Steiner (29), 66,7% não apresentavam invasão vascular identificada, 50% apresentavam nódulo único e a mediana de tamanho do nódulo dominante foi de 2,75 cm. No serviço de transplante hepático do HC-UFMG, a indicação do procedimento para tratamento do CHC baseia-se nos critérios de Milão (55), onde pacientes portadores de nódulos únicos de tamanho menor ou igual a 5 cm ou até três nódulos de até 3 cm são candidatos ideais para sua realização. Os nossos dados observados são compatíveis, em sua maioria, com os critérios utilizados, porém vale destacar que seis pacientes do total se apresentaram com mais de 3 nódulos (um deles com nódulo dominante maior que 3 cm) após realização do exame macroscópico do explante. Esse achado é justificado pela forma de abordagem pré-operatória das lesões, onde são utilizados exames de imagem e critérios estabelecidos pelo *Barcelona Clinic Liver Cancer* (BCLC) para o estadiamento clínico da neoplasia e indicação do melhor tratamento (36). Com isso, podem ser gerados dados

discrepantes e lesões de tamanho mais reduzido podem não apresentar aspecto radiológico típico e não serem identificadas nos exames de imagem pré-operatórios.

O escore MELD, atualmente utilizado como um preditor de mortalidade pré-operatória em pacientes com doença hepática avançada, apresentou mediana de 15 pontos, um valor que reflete a condição clínica satisfatória dos pacientes submetidos ao transplante hepático para tratamento da neoplasia. Vale destacar que os pacientes também receberam pontuação adicional por conta da neoplasia concomitante e, portanto, recebem maior prioridade na fila do transplante mesmo apresentando condições clínicas favoráveis.

Seguindo a mesma linha de raciocínio dos parâmetros clínicos utilizados para cálculo do escore MELD, os níveis de alfa-fetoproteína (AFP), considerada como um dos principais marcadores para rastreamento e estadiamento do CHC (42, 56, 57), apresentavam níveis mais baixos que os normalmente observados na literatura para pacientes portadores da lesão, usualmente acima de 100ng/mL (42, 56). Neste trabalho, a mediana dos valores de AFP foi de somente 5,5 ng/mL e apenas dois pacientes apresentavam níveis superiores a 100 ng/mL. No entanto, vale ressaltar que, durante a revisão dos prontuários eletrônicos, somente 23 pacientes, dos 36 estudados, apresentavam registro dos níveis séricos de AFP.

Em estudo realizado por Lima *et al.*, observou-se que os níveis séricos de AFP, quando elevados, apresentavam correlação com a imunexpressão da Molécula de Adesão de Células Epiteliais (*EpCAM*), considerado um biomarcador de células progenitoras responsáveis por processos de proliferação, diferenciação e renovação celular, além de ser um gatilho para lesões neoplásicas. Nesse trabalho, a mediana do nível sérico da proteína foi de 59 ng/mL, visto que foram utilizadas somente amostras oriundas de ressecções hepáticas parciais (54). Isso mostra a importância deste marcador como um fator ligado a vias carcinogênicas a partir de seus estímulos de proliferação e diferenciação celulares, tal qual é a via Hedgehog. No nosso trabalho, entretanto, não observamos correlação entre a imunexpressão tumoral e cirrótica do Shh e os níveis séricos de AFP maiores que 10 ng/mL ($p = 0,526$ e $p = 1,000$, respectivamente). A avaliação de apenas um dos fatores ligantes da via Hh, associado ao reduzido número de amostras e limitação do perfil amostral para somente pacientes submetidos a transplante, podem ter contribuído para não obtermos correlações significantes.

Em estudo de avaliação e caracterização genômica do carcinoma hepatocelular, foi identificada expressão da via Hh especialmente em tumores associados à baixa assinatura no p53, o que sugere uma regulação, pelo menos de forma parcial, deste gene pela ativação do PTCHD4 (73). Este achado corrobora ainda mais a importância dos componentes da via Hh na hepatocarcinogênese, levando à necessidade cada vez maior de estudos que avaliem esta cascata de sinalização nesta neoplasia.

Neste trabalho, podemos observar imunomarcção positiva do ligante Sonic Hedgehog (Shh), identificada em 55,6% dos casos. Estes achados corroboram estudo realizado por Xie *et al.*, que observaram a ativação da via Hh (incluindo detecção do Shh) em 59,2% das amostras, utilizando-se técnicas de hibridização *in situ* e *real time* PCR (43). Nesse estudo citado, porém, a detecção do Shh no parênquima hepático adjacente foi observada na minoria dos casos, o que contrasta com o nosso resultado de 55,5% dos casos apresentando marcação, mesmo que fraca, no parênquima cirrótico peritumoral. Esta diferença observada pode ser explicada pelo fato de que, no primeiro estudo, foram utilizadas amostras de CHC não necessariamente associadas à cirrose ou amostras desprovidas de representação de parênquima peritumoral.

A ativação da via Hh em casos de hepatopatias e sua evolução para cirrose já foram bem caracterizadas anteriormente. O primeiro estudo que mostrou tal associação data de 2001, onde Shakel *et al* observaram aumento na expressão dos marcadores PTCH e GLI em análises de *microarray* de amostras de fígado obtidas de pacientes com diagnóstico de colangite biliar primária e colangite esclerosante primária (44). Pereira TA *et al.* observaram que, nas hepatites virais B e C, houve aumento gradativo na expressão dos componentes da via Hh em amostras com fibrose hepática ausente até casos de fibrose avançada e cirrose (70). Em outro estudo deste mesmo autor, através de análises em casos humanos e em culturas de células, observou-se associação entre a ativação da via de sinalização em processos de fibrose hepática esquistossomótica, através da observação de aumento na expressão dos ligantes e fatores de transcrição em células fibrogênicas, ao passo que a marcação não foi demonstrada no parênquima hepático normal (45). Younossi e colaboradores validaram a imunexpressão do fator ligante Shh em amostras de pacientes portadores de esteato-hepatite não alcoólica (NASH) (71). Os autores desse trabalho avaliaram de forma computacional as amostras digitalizadas e mostraram relação entre a imunexpressão do Shh e parâmetros morfológicos utilizados rotineiramente para o diagnóstico de NASH, como balonização, presença de corpúsculos de Mallory-Denk, grau de atividade inflamatória e mesmo fibrose (71).

Neste estudo, além de observarmos de forma satisfatória a expressão do ligante Shh no parênquima cirrótico, também realizamos a correlação entre estes dados obtidos e imunomarcção do Shh no parênquima tumoral associado. A partir disso, notamos uma correlação estatisticamente significativa ($p = 0,011$), com a ressalva de que a marcação na cirrose adjacente adquire um escore ligeiramente mais fraco do que o observado nas células neoplásicas. Esse dado pode sugerir que há uma maior produção do ligante nas células tumorais em relação ao parênquima adjacente ou mesmo que este componente possa estar sendo alvo de modulação mais eficaz, através de seus inibidores, no parênquima não neoplásico (46). Para confirmação destas hipóteses, estudos adicionais com os fatores de transcrição se fazem necessários.

O grau de diferenciação tumoral da neoplasia possui correlação com o comportamento mais agressivo da neoplasia e conseqüentemente pior prognóstico. De acordo com estudo realizado com Tamura *et al.*, o grau histológico de diferenciação tumoral, isoladamente, pode representar um fator prognóstico independente, já que tumores de baixo grau apresentam um aumento de três anos na taxa de sobrevivência em pacientes com nódulos de tamanhos variáveis quando comparados a pacientes portadores de lesões de alto grau (47). Cai *et al.* demonstraram correlação entre os níveis de marcação do Shh e o grau de diferenciação tumoral em CHCs, porém utilizando modelos murinos experimentais (27).

Também utilizando modelos experimentais *in vivo*, Kumari *et al.* obtiveram correlação entre o nível da expressão do fator ligante Shh, receptor PTCH e fatores de transcrição GLI1/2 com o grau de diferenciação tumoral, ao mesmo passo que houve decréscimo na expressão da via Wnt/ β -catenina (48). Hong H., utilizando amostras humanas não obteve relevância estatística ao correlacionar a ativação dos fatores transcricionais GLI-1 e GLI-2 com o grau de diferenciação tumoral, apesar de serem obtidas correlações entre esses fatores e algumas proteínas associadas a transição epitelial-mesenquimal e conseqüente potencial metastático (49). O mesmo resultado também foi obtido no estudo realizado por Huang *et al.* (24). No nosso estudo, entretanto, obtivemos correlação positiva ($p = 0,014$) entre o grau de marcação tumoral forte/moderada do Shh e tumores considerados de alto grau. Esta correlação não foi encontrada em outros trabalhos na literatura de forma estatisticamente significativa, utilizando-se de amostras humanas.

A presença de invasão vascular também é um valioso critério utilizado para estadiamento do CHC, inclusive sendo utilizado no protocolo do *American Joint Comitee on Cancer* (AJCC) em sua última edição (32). Não encontramos nenhum outro trabalho na literatura que avalie a correlação entre a presença de invasão vascular e a intensidade de marcação dos componentes da via de sinalização Hedgehog. Obtivemos uma correlação estatisticamente válida ($p = 0,003$) ao correlacionar esses dois parâmetros. Esta associação, juntamente com a observada com o grau de diferenciação tumoral, nos permite afirmar que o nível de marcação citoplasmática do Shh pode ser considerado um fator prognóstico associado a pior comportamento da lesão. Vale destacar ainda que obtivemos correlação válida ($p = 0,011$) ao avaliar o escore imunoistoquímico no parênquima cirrótico e a presença de invasão vascular, o que nos permite considerar o fato de que o estudo do parênquima cirrótico pode vir a ser útil na tentativa de prever o comportamento biológico da lesão tumoral associada, estabelecer uma avaliação prognóstica e mesmo auxiliar na definição de tratamentos.

Como os demais estudos já realizados, não obtivemos correlação estatística ao realizar a análise do grau de expressão do Shh no parênquima tumoral e cirrótico com os parâmetros tamanho da lesão dominante e multiplicidade de nódulos (24, 47,48,49,50).

No que se refere à etiologia da cirrose peritumoral, alguns estudos já evidenciaram que a expressão da via de sinalização Hedgehog encontra-se aumentada em células infectadas pelos vírus das hepatites B e C, como já foi citado anteriormente (51 e 52). Pereira TA *et al* observaram que tanto na hepatite B quanto na hepatite C, os níveis de componentes da via do Hh correlacionaram-se com o grau de fibrose, havendo também expressão em miofibroblastos, células endoteliais sinusoidais ativadas e células progenitoras. Além de contribuir diretamente para o processo de fibrogênese nesses casos, a via do Hh pode estar associada com a hepatocarcinogênese, visto que é uma via de sobrevivência de células tronco do câncer. Na população desse estudo (amostras humanas infectadas com o VHB ou VHC), houveram poucos casos com CHC concomitante, nos quais não foi observada ativação da via no tecido tumoral, apenas nas regiões peritumorais. Para corroborar este achado com os deste presente trabalho, estudos adicionais com o fator de transcrição GLI são fundamentais.

Chan *et al* mostraram relação entre a ativação do Hh e lesões hepáticas causadas pelo álcool. Os autores analisaram um modelo de hepatocarcinogênese associada à ingesta alcoólica

e obtiveram correlação válida entre a exposição ao álcool e elevação dos níveis dos fatores ligantes e fatores de transcrição Hh (72).

No nosso estudo, entretanto, não obtivemos correlação estatística entre o grau de expressão tumoral e cirrótica com a etiologia da doença de base, seja ela viral ou associada ao consumo etanólico, apesar de observarmos expressão tumoral moderada/forte em 3 casos considerados como de etiologia viral (VHC) e em 9 casos de etiologia não viral. Porém, estudos posteriores são necessários para comprovar a ativação da via através dos fatores de transcrição, já que o tecido pode não ser responsivo ao fator ligante, conseqüentemente não sendo realizada a ativação de genes-alvo. Além disso, as amostras consideradas como de etiologia criptogênica podem ter prejudicado a análise estatística, já que estes casos poderiam ser reagrupados em etiologias diversas, como por exemplo NASH.

Ren *et al.* evidenciaram não só que a via de sinalização hedgehog encontra-se ativada no carcinoma hepatocelular, como também a expressão do fator de transcrição GLI-1 encontra-se diretamente associada a pior sobrevida livre de doença em 4 anos, com apenas 8,9% de sobrevida livre de doença nos pacientes que apresentaram expressão positiva e 50,4% nos pacientes com expressão negativa. Neste mesmo estudo foi obtida correlação entre a expressão do fator SMO e o tamanho da neoplasia (50). Devemos ressaltar, porém, que esse trabalho analisou a expressão dos componentes da via de sinalização hedgehog através de técnicas de PCR, com sequenciamento de DNA e *Western blot*, que apesar de serem técnicas precisas, são de alto custo e pouco exequíveis na maioria dos serviços brasileiros. A técnica de imunistoquímica apresenta-se mais viável para ser incorporada em rotinas de pesquisa, diagnóstico e prognóstico do CHC na maioria dos laboratórios.

Em suma, os resultados apresentados e discutidos demonstram que a via Hedgehog parece ter importância não somente nos mecanismos patogênicos do carcinoma hepatocelular e da cirrose hepática, como também abre perspectivas para estudo dos seus componentes como forma de avaliação prognóstica e estabelecimento de métodos para intervenções terapêuticas.

7 – CONCLUSÃO

Considerando que:

- Há imunexpressão do fator ligante Sonic Hedgehog no CHC e no parênquima cirrótico adjacente;

- Há correlação estatística entre o escore imunoistoquímico tumoral do Shh com o grau de diferenciação tumoral e a presença de invasão angiolímfática;

- Há correlação entre o nível de expressão do Shh no parênquima cirrótico adjacente e a marcação tumoral (com expressão mais fraca na cirrose adjacente), bem como com a presença de invasão angiolímfática;

- Não há correlação estatística entre a expressão tumoral e cirrótica do Shh quando comparadas com o escore pré-operatório MELD, nível sérico de alfa-fetoproteína, tamanho da lesão, quantidade de nódulos e etiologia da doença de base;

Este estudo nos permite corroborar dados da literatura e, portanto, sugerem e estimulam estudos posteriores da via de sinalização Hh no CHC como forma de utilizá-lo como um critério prognóstico e avaliar o potencial efeito benéfico de inibidores da via em pacientes portadores desta neoplasia.

As perspectivas para além deste trabalho buscam avaliar outros componentes da via, como o Ihh, recentemente correlacionada com tumores associados a esteato-hepatite não alcoólica (71), Gli-2 (gene alvo e fator de transcrição), Patched (receptor e gene alvo) e osteoponina (gene alvo), de forma a tentarmos estabelecer correlações não só com os níveis de expressão dos fatores ligantes, mas com toda a cascata de ativação no CHC.

8 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- 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.
- 2- Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2013. *CA Cancer J Clin*, 2013; 63:11–303.
- 3- Altekruse SF, McGlynn KA, Reichman ME. Hepatocellular carcinoma incidence, mortality, and survival trends in the United States from 1975 to 2005. *J Clin Oncol*, 2009; 27:1485–91
- 4- <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/figado>, acesso em 20 de junho de 2019.
- 5- Roskams T, Kojiro M. Pathology of Early Hepatocellular Carcinoma: Conventional and Molecular Diagnosis. *Semin Liver Dis*, 2010; 30: 17-25.
- 6- Shin JW, Chung Y-H. Molecular targeted therapy for hepatocellular carcinoma: Current and future. *World J Gastroenterol*, 2013; 19: 6144-6155.
- 7- Bronte F, Bronte G, Cusenza S, et al. Targeted Therapies in Hepatocellular Carcinoma. *Curr Med Chem*, 2014; 21: 966-974.
- 8- Chirillo P, Falco M, Puri PL, Artini M, Balsano C, Levrero M, Natoli G. Hepatitis B virus pX activates NF-kappa B-dependent transcription through a Raf-independent pathway. *J Virol*, 1996; 70: 641-646.
- 9- Fukutomi T, Zhou Y, Kawai S, Eguchi H, Wands JR, Li J. Hepatitis C virus core protein stimulates hepatocyte growth: correlation with upregulation of wnt-1 expression. *Hepatology*, 2005; 41: 1096-1105.
- 10- Florese RH, Nagano-Fujii M, Iwanaga Y, Hidajat R, Hotta H. Inhibition of protein synthesis by the nonstructural proteins NS4A and NS4B of hepatitis C virus. *Virus Res*, 2002; 90: 119-131.
- 11- Moeini A, Cornella H, Villanueva A. Emerging Signaling Pathways in Hepatocellular Carcinoma. *Liver Cancer*, 2012; 83–93.
- 12- Nusslein-Volhard C, Wieschaus E. Mutations affecting segment number and polarity in drosophila. *Nature*, 1980; 287:795–801.
- 13- Zheng X, *et al.* Role of the Hedgehog pathway in hepatocellular carcinoma (Review). *Oncology Reports*, 2013; 30 : 2020-2026.
- 14- Rubin LL, *et al.* Targeting the hedgehog pathway in cancer. *Nat Rev Drug Discov*, 2006; 5: 1026-1033.

- 15- Corbit KC *et al.* Vertebrate Smoothed functions at the primary cilium. *Nature*, 2005; v.437, n. 7061, p. 1018-1021.
- 16- Omenetti A *et al.* Hedgehog signaling in the liver. *Journal of Hepatology*, 2011; v.54, n.2, p.366-73.
- 17- Stepan, V *et al.* Regulation and function of the sonic hedgehog signal transduction pathway in isolated gastric parietal cells. *Journal of Biological Chemistry*, 2005 v.280, n.16, p.15700-8.
- 18- Teglung S, Tofgard R. Hedgehog beyond medulloblastoma and basal cell carcinoma. *Biochimica and Biophysica Acta* 2010, v.1805, p.181-208.
- 19- Chuang PT, McMahon AP. Vertebrate Hedgehog signalling modulated by induction of a Hedgehog-binding protein. *Nature*, 1999, v.397, n.6720, p.617-621.
- 20- Danhof R, Lewis, K, Brown, M. Small Molecule Inhibitors of the Hedgehog Pathway in the Treatment of Basal Cell Carcinoma of the Skin. *American Journal of Clinical Dermatology*, 2017; 19(2), 195–207.
- 21- Fan, L, Pepicelli, CV, Dibble, CC, Catbagan, W, Zarycki, JL, Laciak, R, Laciak, R, Gipp, J, Shaw, A, Lamm, MLG, *et al.* Hedgehog signaling promotes prostate xenograft tumor growth. *Endocrinology*, 2004; 145, 3961–3970.
- 22- Shirabe K, *et al.* Role of tumor-associated macrophages in the progression of hepatocellular carcinoma. *Surg Today*, 2012, 42:1–7.
- 23- Valverde *et. al.* Macrophages and endothelial cells orchestrate tumor-associated angiogenesis in oral cancer via hedgehog pathway activation. *Tumor Biol*, 2016; 37: 9233-9241.
- 24- Huang S, *et al.* Activation of the hedgehog pathway in human hepatocellular carcinomas. *Carcinogenesis*, 2006; 27:1334–1340.
- 25- Chan IS, Guy CD, Chen Y, *et al.* Paracrine Hedgehog signaling drives metabolic changes in hepatocellular carcinoma. *Cancer Res*, 2012; 72: 6344-6350.
- 26- Liu Q *et al.* Evaluation of glioma-associated oncogene 1 expression and its correlation with the expression of sonic hedgehog, E-cadherin and S100a4 in human hepatocellular carcinoma. *Mol Med Rep.* 2010; Nov-Dec;3(6):965-70
- 27- Cai H, *et al.* Sonic hedgehog signaling pathway mediates development of hepatocellular carcinoma. *Tumor Biol*, 2016; 16: 5463-5466.
- 28- Shafizadeh N, Kakar S. Diagnosis of well-differentiated hepatocellular lesions: role of immunohistochemistry and other ancillary techniques. *Adv Anat Pathol*, 2011; 18: 438-445 .
- 29- Edmondson HA, Steiner PE. Primary carcinoma of the liver: a study of 100 cases among 48900 necropsis. *Cancer*, 1954; 7: 462-503.

- 30- Schlageter M, Terracciano LM, D'Angelo S, Sorrentino P. Histopathology of hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol*, 2014; 20: 15955-15964.
- 31- Tandon P, Garcia-Tsao G. Prognostic indicators in hepatocellular carcinoma: a systematic review of 72 studies. *Liver Int*, 2009; 29 (4): 502-10.
- 32- Amin MB, Edge SB, Greene FL, *et al*, eds. *AJCC Cancer Staging Manual*. 8th ed. New York: Springer; 2017.
- 33- 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.
- 34- Kamath PS, Wiesner RH, Malinchoc M, Kremers W, Therneau TM, Kosberg CL, D'Amico G, Dickson ER, Kim WR. Predict survival in patients with end-stage liver disease. *Hepatology*, 2001; 33(2) : 264-270.
- 35- Moraes ACO, Oliveira PC, Fonseca-Neto OCLD. The Impact of the MELD score on liver transplant allocation and results: an integrative review. *Arq Bras Cir Dig*. 2017; Jan-Mar; 30(1): 65-68.
- 36- Bruix J, Forner, A, Reig, M. Hepatocellular carcinoma. *The Lancet*, 2018; 391 (10127): 1301-1314.
- 37- Llovet JM, Fuster J, Bruix J. Intention-to-treat analysis of surgical treatment for early hepatocellular carcinoma: resection versus transplantation. *Hepatology*, 1999; 30:1434– 1440.
- 38- Llovet JM, Ricci S, Mazzaferro V, *et al*. Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med*, 2008; 359: 378-390.
- 39- Bruix J, Qin S, Merle P, *et al*. Regorafenib for patients with hepatocellular carcinoma who progressed on sorafenib treatment (RESORCE): a randomised, double-blind, placebocontrolled, phase 3 trial. *Lancet*, 2017; 389: 56-66.
- 40- Cooper MK *et al*. Teratogen-mediated inhibition of target tissue response to Shh signaling. *Science*, 1998; 280: 1603-1607.
- 41- Wahid *et al*. Vismodegib, itraconazole and sonidegib as hedgehog pathway inhibitors and their relative competencies in the treatment of basal cell carcinomas. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2016; 98:235-41.
- 42- Ataide EC, Machado RR, Ribeiro MBC, *et al*. Correlação do nível de alfafetoproteína, índice de sobrevida e recidiva tumoral em pacientes submetidos a transplante hepático. *Arq Bras Cir Dig*, 2011; 24: 43-47.
- 43- Xie J, *et al*. Activation of the hedgehog pathway in human hepatocellular carcinomas. *Carcinogenesis*, 2006; 27; 7 : 1334–1340.

- 44- Shackel NA, McGuinness PH, Abbott CA, Gorrell MD, McCaughan GW. Identification of novel molecules and pathogenic pathways in primary biliary cirrhosis: cDNA array analysis of intrahepatic differential gene expression. *Gut*. 2001; 49: 565–76.
- 45- Pereira TA *et al*. Macrophage-derived hedgehog ligands promotes fibrogenic and angiogenic responses in human schistosomiasis mansoni, *Liver Int*. 2013; Jan; 33(1): 149-61.
- 46- Capurro MI *et al*. Glypican-3 inhibits Hedgehog signaling during development by competing with patched for Hedgehog binding. *Developmental Cell*, 2008; v.14, n.5, p.700-711.
- 47- Tamura S, Kato T, Berho M, Misiakos EP, O'Brien C, Reddy KR, Nery JR, Burke GW, Schiff ER, Miller J, *et al*. Impact of histological grade of hepatocellular carcinoma on the outcome of liver transplantation. *Arch Surg*. 2001; 136:25–30.
- 48- Kumari R, Tripathy A, *et al*. The molecular connection of histopathological heterogeneity in hepatocellular carcinoma: A role of Wnt and Hedgehog signaling pathways. *PLoS One*. 2018; Dec 4;13(12).
- 49- Chun HW, Hong R. Significance of the hedgehog pathway-associated proteins Gli-1 and Gli-2 and the epithelial-mesenchymal transition-associated proteins Twist and E-cadherin in hepatocellular carcinoma. *Oncol Lett*. 2016 Sep;12(3):1753-1762.
- 50- Ren J, Jia J, Yan-Hua Y, Li C. Activation of sonic hedgehog signaling pathway is an independent potential prognosis predictor in human hepatocellular carcinoma patients. *Chin J Cancer Res*. 2012; Dec; 24(4): 323–331.
- 51- Feitelson M *et al*. Hedgehog signaling blockade delays hepatocarcinogenesis induced by hepatitis B virus X (HBx) protein. *Cancer Res*. 2012; Nov 15; 72(22): 5912–5920.
- 52- Choi S *et al*. Upregulation of Hedgehog Pathway is Associated with Cellular Permissiveness for Hepatitis C Virus Replication. *Hepatology*. 2011; Nov; 54(5): 1580–1590.
- 53 - Chen L, Shi Y, Jiang C.Y, Wei LX, Wang YL, Dai GH. Expression and prognostic role of pan-Ras, Raf-1, pMEK1 and pERK1/2 in patients with hepatocellular carcinoma. *EJSO* 2011; 37:513-520.
- 54- Lima LDP, *et al*. Immunohistochemical Coexpression of Epithelial Cell Adhesion Molecule and Alpha-Fetoprotein in Hepatocellular Carcinoma. *Can J Gastroenterol Hepatol*. 2018; 2018: 5970852.
- 55 - European Association for the Study of the Liver. EASL Clinical Practice Guidelines: Management of hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 2018; 69: 182-236.
- 56 - Forner A, Reig M, Bruix J. Alpha-fetoprotein for hepatocellular carcinoma diagnosis: the demise of a brilliant star. *Gastroenterology*. 2009; Jul;137(1):26-9.

- 57- Hirata K, *et al.* Prognostic roles of preoperative α -fetoprotein and des- γ -carboxy prothrombin in hepatocellular carcinoma patients. *World J Gastroenterol.* 2015; Apr 28; 21(16): 4933–4945.
- 58- Cohen MM. Hedgehog signaling update. *American Journal of Medical Genetics Part A,* 2010; v.152, n.8, p.1875-1914.
- 59- Jung Y. *et al.* Signals from dying hepatocytes trigger growth of liver progenitors. *Gut,* 2010; v. 59, n.5, 655-665.
- 60- Goetz SC, Anderson KV. The primary cilium: a signalling centre during vertebrate development. *Nature Reviews Genetics,* 2010; v.11, n.5, p.331-44.
- 61- Mclellan JS, *et al.* The mode of Hedgehog binding to Ihog homologues is not conserved across different phyla. *Nature,* 2008; v.455, n.7215, p.979-983.
- 62- Allen BL, Tenzen T, McMahon AP. The Hedgehog-binding proteins Gas1 and Cdo cooperate to positively regulate Shh signaling during mouse development. *Genes & Development,* 2007; v. 21, n. 10, p. 1244-1257.
- 63 – Kim J *et al.* Itraconazole and arsenic trioxide inhibit Hedgehog pathway activation and tumor growth associated with acquired resistance to smoothened antagonists. *Cancer Cell.* 2013; Jan 14;23(1):23-34.
- 64- Sicklick, JK *et al.* Role for hedgehog signaling in hepatic stellate cell activation and viability. *Laboratory Investigation,* 2005; v.85, n.11, p.1368-80.
- 65- Omenetti A *et al.* The hedgehog pathway regulates remodelling responses to biliary obstruction in rats. *Gut,* 2008b; v.57, n9, p.1275-82.
- 66- Omenetti A *et al.* Hedgehog-mediated mesenchymal-epithelial interactions modulate hepatic response to bile duct ligation. *Laboratory Investigation,* 2007; v.87, n.5, 499-514.
- 67- Xie G, Choi SS, Syn WK, Michelotti GA, Swiderska M, Karaca G, *et al.* Hedgehog signalling regulates liver sinusoidal endothelial cell capillarisation. *Gut* 2013;62:299–309.
- 68- Michelotti GA, Xie G, Swiderska M, Choi SS, Karaca G, Krüger L, *et al.* Smoothened is a master regulator of adult liver repair. *J Clin Invest* 2013; 123:2380–2394.
- 69- Machado MV, Diehl AM. Hedgehog signalling in liver pathophysiology. *J Hepatol.* 2018; Mar;68(3):550-562.
- 70- Pereira TA *et al.* Viral factors induce Hedgehog pathway activation in humans with viral hepatitis, cirrhosis, and hepatocellular carcinoma. *Laboratory Investigation,* 2010; v. 90, n. 12, p. 1690-1703.

71- Younossi ZM. Hepatic sonic hedgehog protein expression measured by computer assisted morphometry significantly correlates with features of non-alcoholic steatohepatitis. *BMC Gastroenterol.* 2019; Feb 11;19(1):27.

72- Chan IS *et al.* Alcohol activates the hedgehog pathway and induces related procarcinogenic processes in the alcohol-preferring rat model of hepatocarcinogenesis. *Alcohol Clin Exp Res* 2014; 38: 787-800.

73- Cancer Genome Atlas Research Network, Comprehensive and Integrative Genomic Characterization of Hepatocellular Carcinoma. *Cell.* 2017; Jun 15;169(7):1327-1341.

9 – ANEXOS

9.1 – Anexo 1- Carta de aprovação do COEP UFMG.



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

Projeto: CAAE 71206617.8.0000.5149

**Interessado(a): Profa. Paula Vieira Teixeira Vidigal
Depto. Anatomia Patológica
Faculdade de Medicina - UFMG**

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP aprovou, no dia 13 de setembro de 2017, o projeto de pesquisa intitulado “ **Estudo imunohistoquímico da via de sinalização hedgehog no carcinoma hepatocelular e sua relação com macrófagos associados ao tumor, neo-vasculogênese tumoral e impacto prognóstico.**” 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 através da Plataforma Brasil.

A handwritten signature in blue ink, reading 'Vivian Resende'.

Profa. Dra. Vivian Resende
Coordenadora do COEP-UFMG

9.2 – Anexo 2- 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 hiper Cromáticos, 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)