

Universidade Federal de Minas Gerais

Faculdade de Medicina

Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Saúde do Adulto

Expressão de proteínas das vias de sinalização intracelular *mitogen activated protein kinases* (MAPK) e PI3K/AKT/mTOR e sua associação com parâmetros clínico-patológicos e desfechos clínicos em portadores de carcinoma hepatocelular de acordo com a etiologia da hepatopatia crônica subjacente

PAULO HENRIQUE COSTA DINIZ

Belo Horizonte - MG

2019

PAULO HENRIQUE COSTA DINIZ

Expressão de proteínas das vias de sinalização intracelular *mitogen activated protein kinases* (MAPK) e PI3K/AKT/mTOR e sua associação com parâmetros clínico-patológicos e desfechos clínicos em portadores de carcinoma hepatocelular de acordo com a etiologia da hepatopatia crônica subjacente

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Saúde do Adulto, da Universidade Federal de Minas Gerais, como parte dos requisitos para o título de Doutor em Saúde do Adulto.

Orientadora: Profa. Dra. Teresa Cristina de Abreu Ferrari

Co-orientadora: Profa. Dra. Paula Vieira Teixeira Vidigal

**FACULDADE DE MEDICINA
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
BELO HORIZONTE**

2019

D585 Diniz, Paulo Henrique Costa.
Expressão de proteínas das vias de sinalização intracelular mitogen activated protein kinases (MAPK) e PI3K/AKT/mTOR e sua associação com parâmetros clínico-patológicos e desfechos clínicos em portadores de carcinoma hepatocelular de acordo com a etiologia da hepatopatia crônica subjacente [manuscrito]. / Paulo Henrique Costa Diniz. - - Belo Horizonte: 2019. 125f.: il.

Orientador (a): Teresa Cristina de Abreu Ferrari.
Coorientador (a): Paula Vieira Teixeira Vidigal.
Área de concentração: Ciências Aplicadas à Saúde do Adulto.
Tese (doutorado): Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina.

1. Carcinoma Hepatocelular. 2. Transplante de Fígado. 3. Carcinogênese. 4. Transdução de Sinais. 5. Dissertação Acadêmica. I. Ferrari, Teresa Cristina de Abreu. II. Vidigal, Paula Vieira Teixeira. III. Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina. IV. Título.

NLM: QU 55

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Reitora: Profa. Sandra Regina Goulart Almeida

Vice-Reitor: Prof. Alessandro Fernandes Moreira

Pró-Reitor de Pós-Graduação: Prof. Fabio Alves da Silva Junior

Pró-Reitor de Pesquisa: Prof. Mário Fernando Montenegro Campos

Diretor da Faculdade de Medicina: Prof. Humberto José Alves

Vice-Diretora da Faculdade de Medicina: Profa. Alamanda Kfoury Pereira

Coordenador do Centro de Pós-Graduação: Prof. Tarcizo Afonso Nunes

Subcoordenadora do Centro de Pós-Graduação: Profa. Eli Iola Gurgel Andrade

Chefe do Departamento de Clínica Médica: Profa. Valéria Maria Augusto

Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Saúde do Adulto: Profa. Teresa Cristina de Abreu Ferrari

Subcoordenadora do Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Saúde do Adulto: Profa. Suely Meireles Rezende

Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Saúde do Adulto:

Prof. Eduardo Garcia Vilela

Profa. Suely Meireles Rezende

Profa. Luciana Costa Faria

Profa. Teresa Cristina de Abreu Ferrari

Profa. Luciana Diniz Silva

Fernanda A. Barbosa – Discente Titular

Prof. Paulo Caramelli

Mariana Benevides Paiva Machado –
Discente Suplente

“Quem sabe mais pode decidir melhor.”

(Immanuel Kant)

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pois foi Ele quem me deu tudo o que foi necessário para essa conquista.

À Maira, Davi, e ao Isaac que ainda vai nascer, pelo amor que alivia todo esforço e cansaço, compreende, incentiva e faz tudo valer a pena.

Ao meu pai, sempre presente na memória, e minha mãe, que são modelos para meu crescimento, seguindo os princípios éticos e cristãos. Aos meus irmãos, cunhadas e sobrinhos, pelo agradável convívio.

À professora Teresa, por quem minha admiração vem desde nossos primeiros contatos, ainda no meu período de residência em Clínica Médica. Referência para minha formação e constante aprimoramento como médico, investigador e aprendiz.

À professora Paula, com quem venho aprendendo muito desde o período em que eu era monitor da sua disciplina, pelos ensinamentos constantes e por estimular em mim o amor e reconhecimento pela anatomia patológica.

Ao professor Marcelo, sempre presente e solícito, pela contribuição tão enriquecedora ao meu projeto e pensamento científico.

À Serena, com quem tive o privilégio de formar um grupo de pesquisa tão motivador. Espero que nossa parceria continue em muitos outros projetos.

Aos alunos de iniciação científica Tallys e Guilherme, que colaboraram na condução dos experimentos. Fico feliz por ver que reconhecem desde cedo o importante papel da nossa comunidade acadêmica em produzir conhecimento científico.

Ao Departamento de Anatomia Patológica e Medicina Legal e funcionários que tornaram possível a realização dos experimentos, em especial à Fernanda, do Laboratório de Patologia Molecular, que tanto me auxiliou nas rotinas do laboratório.

Ao estatístico do Centro de Pós Graduação da Faculdade de Medicina, Fernando, pela disponibilidade e auxílio em tantos momentos.

Ao grande apoio de pesquisadores tão vocacionados, verdadeira inspiração na desafiadora luta pela prática da pesquisa no nosso país, que me acolheram tão bem nos experimentos de RT-PCR. Em especial, agradeço a Ana Carolina Dias, pós doutoranda, Andressa França,

Marconi e toda equipe do laboratório de Sinalização de Cálcio, do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG.

Ao professor Agnaldo Soares Lima, pelo trabalho de excelência no grupo de Transplante Hepático do HC/UFMG e por tornar acessível os dados dos pacientes transplantados. Ao professor Cristiano Xavier Lima, pela expressiva colaboração, especialmente por tornar viável os experimentos de RT-PCR.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Saúde do Adulto, por nos preparar e tornar viável nossa formação acadêmica.

À instituição de ensino UFMG, onde tive o privilégio de caminhar em todas as etapas da minha formação acadêmica. Aos órgãos de fomento – CAPES e FAPEMIG – pela possibilidade da realização desse trabalho.

Às amizades prévias e as que construí durante esse período, aos parceiros do serviço de oncologia e aos meus residentes, pelo apoio e incentivo.

RESUMO

Introdução: Diferentes etiologias de hepatopatia crônica (HPC) potencialmente levam ao carcinoma hepatocelular (CHC) por mecanismos distintos, o que pode se traduzir em diferenças clínico-patológicas e prognósticas. O entendimento desse processo ajudaria a melhorar aspectos desafiadores na abordagem desses tumores, incluindo a identificação de preditores de resposta a modalidades de tratamento, como o transplante hepático (TH). Neste contexto, a expressão de proteínas das vias MAPK e PI3K/AKT/mTOR, importantes cascatas de sinalização no CHC, foi avaliada e associada a parâmetros clínicos e histopatológicos, além de desfechos clínicos relevantes, de acordo com a etiologia da HPC.

Métodos: Dados demográficos, clínico-laboratoriais e histopatológicos de uma coorte de 134 pacientes adultos submetidos a transplante hepático (TH) como tratamento do CHC num centro de referência no Brasil foram retrospectivamente selecionados e comparados de acordo com a etiologia da HPC subjacente. Destes, uma seleção aleatória de 80 pacientes foi realizada: 41 da etiologia viral (vírus da hepatite B ou C – HBV, HVC) e 39, não viral (abuso de álcool e criptogênica). Evento, definido como recorrência do tumor ou morte por qualquer causa, e sobrevida livre de evento (SLE) foram analisados. No fígado explantado, invasão microvascular (MIV) e grau histológico tumorais foram investigados; expressão de proteínas das vias de sinalização no tumor e cirrose adjacente foi avaliada por imunohistoquímica (IHQ); e RT-PCR foi realizada para quantificar o RNA mensageiro (mRNA) tumoral.

Resultados: Parâmetros clínico-patológicos e laboratoriais foram similares entre os grupos etiológicos. Evento ocorreu em 37 indivíduos (28,5%) e a SLE mediana foi 75 meses (variando de 24-116 meses). As proteínas das vias frequentemente foram fortemente expressas nos tumores, mas expressão forte (EF) do KRAS foi mais frequente nos tumores virais (26,8%) do que naqueles não virais (7,7%, $p=0,024$) ou na cirrose (0%, $p=0,004$). A EF da PI3K foi mais frequente no tumor do que na cirrose ($p=0,048$ e $p<0,01$) independentemente da etiologia, não havendo diferença quando se comparou a sua expressão apenas nos tumores desses grupos ($p=0,111$). mRNA do ERK1 e 2, PI3K e BRAF foi expresso nos tumores, sem diferença entre os grupos etiológicos, nem correspondência com achados da IHQ. Dentre os 80 pacientes selecionados, idade avançada e presença de MIV foram independentemente associadas à ocorrência de evento e apenas MIV à SLE mais curta. Houve associação entre presença de três ou menos nódulos e EF do KRAS, mas a expressão de nenhuma proteína se associou a evento ou SLE.

Conclusão: Não foram demonstradas diferenças em relação a desfechos clínicos entre os grupos etiológicos de HPC subjacente ao CHC em pacientes submetidos a TH para tratamento da neoplasia e não foi identificado nenhum preditor de resposta a essa modalidade de tratamento. Os resultados sugerem que, comparados à etiologia não viral, infecção pelo HBV e HCV podem levar a CHC por mecanismos diferentes; KRAS e PI3K podem ter papel na carcinogênese, visto que foram fortemente expressos no tumor e não na cirrose adjacente. Entretanto, possíveis implicações terapêuticas e prognósticas desses achados precisam ser investigadas.

Palavras-chave: Carcinoma hepatocelular, transplante hepático, etiologia, carcinogênese, vias de sinalização.

ABSTRACT

Background: Different etiologies of chronic liver disease (CLD) potentially lead to hepatocellular carcinoma (HCC) by multiple mechanisms, that can be translated into clinicopathological and prognostic differences. Understanding this process might improve many challenging aspects of HCC care, including identification of response predictors to treatment modalities, such as liver transplantation (LT). Thus, we evaluated the expression of proteins of MAPK and PI3K/Akt/mTOR pathways, important signalling cascades in HCC, and investigated their association with clinical and histopathological parameters, as well as long-term outcome, according to the etiology of the CLD.

Methods: Demographic, clinical, laboratory and histopathological data from a cohort of 134 patients who underwent LT for HCC treatment at a referral center in Brazil were retrospectively selected and compared according to the etiological group of the underlying CLD. Event, defined as or tumor recurrence or death from any cause, and event-free survival (EFS) were analyzed. Of these, 80 were aleatory selected: 41 viral (V) (Hepatitis B or C virus infection – HBV or HCV), 39 nonviral (NV) (alcohol abuse and cryptogenic) etiology. Their explanted liver was accessed for tumoral microvascular invasion (MIV) and histological grade. Moreover, expression of proteins in tumor and cirrhosis were evaluated by immunohistochemistry (IHQ) and RT-PCR was performed in tumoral tissue for quantitative mRNA expression.

Results: Etiologic groups were similar regarding laboratory and clinicopathological indices. Event occurred in 37 patients (28.5%), and median EFS were 75 months (range, 24-116 months). Pathways proteins were often strongly expressed in tumors, but strong expression (SE) of KRAS was more frequent in tumor of V group (26.8%) than NV group (7.7%, $p=0.024$) or cirrhosis (0%, $p=0.004$). The SE of PI3K, in both etiologies, was higher in tumor than cirrhosis ($p=0.048$ and $p<0.01$), but not if comparing the tumor groups ($p=0.111$). mRNA of ERK 1 and 2, PI3K and BRAF was expressed in tumor, without difference between etiologic groups or correspondence with IHQ findings. There was association between presence of three or less nodules and SE of KRAS, but no proteins expression was associated with E or EFS. Among the 80 patients in which complementary pathological data as well as molecular analysis were performed, greater age and MIV presence were independently associated to event occurrence. MIV was also related to shorter EFS.

Conclusion: Differences regarding clinical outcome among etiologic groups of CLD in HCC patients who underwent LT were not demonstrated and no predictor was identified. Data

suggest that HBV and HCV can lead to HCC by different mechanisms comparing to NV etiology. Moreover, KRAS and PI3K could have a role on carcinogenesis, given that their strong expression was more frequent in tumor than in cirrhosis. However, prognostic and therapeutic implications of these findings need to be established.

Keywords: Hepatocellular carcinoma, liver transplantation, etiology, carcinogenesis, signalling pathway.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1– Vias de sinalização intracelular -----	29
Figura 2 – Fluxograma do estudo -----	50
Figura 3 – Técnica de arranjo em matriz de amostras teciduais (<i>tissue microarray</i>) -----	51
Figura 4: Curva de <i>melting</i> para o GAPDH e expressão de mRNA do GAPDH e β -actina no CHC, de acordo com a etiologia da hepatopatia crônica subjacente -----	58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Anticorpos primários, especificações, diluição e tempo de incubação usados da IHQ -----	52
Tabela 2: Escore de graduação da expressão de proteínas por IHQ de acordo com a intensidade e extensão da marcação da amostra pelo anticorpo primário -----	54
Tabela 3: Sequências dos iniciadores usados no estudo de RT-PCR -----	56

LISTA DE ABREVIATURAS

AAV2 – *adeno-associated virus 2*

AFP – alfafetoproteína

AFP-L3 – alfafetoproteína isoforma L3

AKT – *murine thymoma viral oncogene*

ALT – alanina aminotransferase

APC – Polipose adenomatosa colônica

ARAF – *A-Raf proto-oncogene, serine/threonine kinase*

AST – aspartato aminotransferase

ATM – ataxia-telangectasia

BRAF – *B-Raf proto-oncogene, serine/threonine kinase*

CDKN2A – *cyclin-dependent kinase Inhibitor 2A*

CCNE1 – Ciclina E1

CHC – carcinoma hepatocelular

CM – Critérios de Milão

cMet – *tyrosin-protein kinase Met*

CRAF – *Raf-1 proto-oncogene, serine/threonine kinase*

Ct – *Cycle threshold*

CTC – células tumorais circulantes

CTNNB1 – *catenin beta 1*

EDTA – *ácido etilenodiamino tetra-acético*

EF – Expressão forte

EGF – *epidermal growth factor*

EGFR – *epidermal growth factor receptor*

ERK – proteína reguladora extracelular quinase

FA – fosfatase alcalina

FDA – *Food and Drug Administration*

FGF – *fibroblast growth factor*

FGFR – *fibroblast growth factor*

FOXO – *Forkhead box O3*

GAPDH – gliceraldeído-3-fosfatase desidrogenase

GGT – gama-glutamiltransferase

HBx – Proteína X do vírus da hepatite B

HC – Hospital das Clínicas
HGF– *hepatocyte growth factor*
HPC – hepatopatia crônica fibrosante
HRP – conjugados de peroxidase de rábano
H-RAS – *HRAS proto-oncogene, GTPase*
IGF – *insulin-like growth factor*
IGF1R – *insulin-like growth factor receptor*
IHQ – Imunoistoquímica
IL6ST – *Interleukin 6 Signal Transducer*
JAK – *Janus activated kinases*
JNK – Jun N-terminal quinase
K-RAS – *KRAS proto-oncogene, GTPase*
LDH – desidrogenase láctica
MAPK – *mitogen activated protein kinases*
MEK – *extracellular signal-regulated kinases*
MELD – *Model for End-stage Liver Disease*
MIV – Invasão microvascular
MAPK-1 - *mitogen-activated protein kinase phosphatase 1*
NAFLD – doença hepática gordurosa não alcoólica
mRNA – RNA mensageiro
mTOR – *mammalian target of rapamicine*
mTORC (1 e 2): *mammalian target of rapamycin complex*
Myc - *MYC proto-oncogene, bHLH transcription factor*
NS – *non-structural proteins (NS2, NS3, NS4A, NS5A e NS5B)*
N-RAS – *NRAS proto-oncogene, GTPase*
PBS – tampão fosfato-salino
PDGF – *platelet-derived growth factor*
PDGFR – *platelet-derived growth factor receptor*
PET/FDG Tomografia por emissão de pósitrons marcado com fluorodesoxiglicose
PI3K – fosfatidilinositol-3-quinase
PIP3 – fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato
PTEN – proteína homóloga da fosfatase e tensina
RAF – *v-raf murine sarcoma viral*
RAS – *rat sarcoma virus*

Rb/p16 – retinoblastoma

RNI – *international normalized ratio*

RT-PCR – reverse transcriptase polymerase chain reaction

SG – sobrevida global

SLE – Sobrevida livre de evento

SMARC – SWI/SNF-related, matrix-associated, actin-dependent regulators of chromatin

Src – *Rous sarcoma virus*

STAT – *signal transducers and activators of transcription*

TERT – ribonucleoproteínas da transcriptase reversa da telomerase

TGF – *transforming grown factor*

TGF β – *Wnt-transforming growth factor- β*

Tm – Curva de melting (ou curva de dissociação)

TRIS – trisaminometano

TSC 1 e 2 – complexo 1 e 2 da esclerose tuberosa

TH – Transplante hepático

UCSF – Universidade da Califórnia, São Francisco

UFMG – Universidade Federal de Minas Gerais

VEGF – *vascular endothelial growth factor*

VEGFR – *vascular endothelial growth factor receptor*

VHB – vírus da hepatite B

VHC – vírus da hepatite C

WNT(- β -catenina) – *Wingless-(β -catenina)*

SUMÁRIO

1	CONSIDERAÇÕES INICIAIS -----	18
1.1	Introdução -----	19
1.2	Antecedentes científicos -----	21
1.2.1	Hepatocarcinogênese -----	21
1.2.2	As vias de sinalização intracelular MAPK e PI3K/AKT/mTOR -----	27
1.2.2.1	A intercomunicação entre as vias de sinalização -----	30
1.2.3	Transplante hepático como tratamento do CHC -----	32
1.3	Referências bibliográficas -----	36
2	OBJETIVOS -----	45
2.1	Objetivo geral -----	46
2.2	Objetivos específicos -----	46
3	MATERIAIS E METODOS -----	47
3.1	Coorte -----	48
3.2	Imunoistoquímica -----	50
3.3	<i>Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR)</i> -----	54
3.4	Análises e etapas do estudo -----	58
3.5	Análise estatística -----	60
4	ARTIGOS -----	62
4.1	Artigo 1: <i>“Prediction of long-term outcome according to the etiology of underlying chronic liver disease in patients who underwent liver transplantation for hepatocellular carcinoma treatment”</i> -----	63
4.2	Artigo 2: <i>“MAPK pathway proteins expression and correlation with clinicopathological indices and long-term outcomes according to the etiology of chronic liver disease in hepatocellular carcinoma”</i> -----	82
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS -----	115

APÊNDICES

Apêndice A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido -----	118
Apêndice B – Protocolo de abordagem de pacientes a serem incluídos na investigação do estudo “Associação do IGF1R (<i>insulin-like growth factor-1 receptor</i>) e de proteínas das vias MAPK e PI3K/AKT/mTOR aos diferentes tipos etiológicos de carcinoma hepatocelular” -----	120
Apêndice C – Protocolo para análise histológica -----	122

ANEXOS

Anexo I - Carta de aprovação do Comitê de Ética -----	124
Anexo II - Submissão do artigo I à publicação -----	125
Anexo III - Folha de Aprovação da Defesa de Tese -----	126

1- CONSIDERAÇÕES INICIAIS

1.1 INTRODUÇÃO

O carcinoma hepatocelular (CHC), cuja incidência tem aumentado nos últimos 20 anos em muitos países, incluindo o Brasil, destaca-se pela magnitude dos números (1,2). Representa a sexta neoplasia maligna mais diagnosticada e a quarta maior causa de mortalidade por câncer no mundo. De acordo com as estimativas para 2018, no mundo são 841 mil novos casos e 782 mil mortes anualmente (3). No Brasil, considerado país de baixa incidência de CHC, foram reportados cerca de 5.000 novos casos/ano, mas os dados são considerados subestimados e os estudos epidemiológicos, escassos (4,5).

Apesar de também refletir questões sociodemográficas – dificuldades de acesso a programas de rastreamento, diagnóstico e tratamento em populações de baixa renda onde o CHC é um grave problema de saúde pública –, essa proximidade entre incidência e mortalidade traduz outros aspectos desafiadores na abordagem dessa neoplasia (6,7).

Além da natureza caracteristicamente agressiva do tumor, os pacientes com CHC apresentam doença hepática crônica, com cirrose concomitante em mais de 80% dos casos, configurando uma segunda doença dentro do mesmo contexto (8,9). O impacto dessa condição na reserva funcional do fígado é um dos principais determinantes da morbidade e mortalidade desses pacientes, e deve, portanto, ser considerado em toda avaliação prognóstica e recomendação terapêutica (10).

O CHC resulta de uma agressão crônica do fígado devido a etiologias bem estabelecidas e muito comuns no nosso meio, como infecção pelo vírus da hepatite B (VHB) e C (VHC), consumo excessivo de álcool, distúrbios autoimunes e metabólicos inatos, e doença hepática gordurosa não alcoólica (NAFLD), mais recentemente reconhecida. Outras causas que ainda não podem ser identificadas são chamadas criptogênicas. Além disso, a infecção pelo AAV2 (*adeno-associated vírus 2*) emerge como uma etiologia possível, especialmente em pacientes sem cirrose, e há países onde o consumo de aflatoxina B1 é uma etiologia frequente (11).

Tendo em vista a natureza assintomática da neoplasia em seus estágios iniciais e as limitações do emprego do rastreamento, cerca de 60-70% dos pacientes já se apresentam em fases mais avançadas da doença. Mesmo entre aqueles em estágios mais precoces, passíveis de tratamento potencialmente curativo, baseado em terapias cirúrgicas (ressecção ou transplante) ou procedimentos locorregionais (como a ablação por radiofrequência), aproximadamente 70% desenvolvem recorrência do tumor em cinco anos (12,13). Nos

pacientes em estágio intermediário e função hepática preservada, é indicada a quimioembolização, mas essa terapia locorregional está associada a sobrevida mediana de apenas 26 meses (14).

As opções de tratamento sistêmico, indicado para casos de tumores avançados ou recorrentes, são limitadas. O CHC é um tumor quimiorresistente e, embora o cenário tenha apresentado relativo avanço nos últimos anos com as drogas alvo, anticorpo monoclonal e imunoterapia, o impacto dessas estratégias terapêuticas na sobrevida global (SG), quando alcançados, tem sido apenas modesto (7). É o caso do sorafenibe, primeiro inibidor multiquinase introduzido para tratamento do CHC. No estudo original, caracteristicamente conduzido em pacientes com função hepática pouco alterada – classificação A no escore de Child-Pugh – houve SG de 10,7 meses, comparada a 7,9 no grupo placebo na primeira linha de tratamento (15).

Durante anos, essa era a única droga aprovada para tratamento do CHC. Hoje, o lenvatinibe também é indicado para a primeira linha de tratamento, baseado em um estudo de não inferioridade em relação ao sorafenibe (16). Para os que progridem em vigência de uma dessas drogas, as opções são os inibidores multiquinase regorafenibe (SG 10,6 versus 7,8 meses para o placebo), e cabozantinibe (SG 10,2 versus 8,0 meses para o placebo), embora este ainda não contemplado no Brasil para esta indicação (17,18). Se níveis séricos de alfafetoproteína (AFP) elevados (≥ 400 ng/mL) em vigência de progressão após primeira linha de tratamento, há ainda o anticorpo monoclonal ramucirumabe, recentemente aprovado nos Estados Unidos e no Brasil para esta indicação, cujo estudo mostrou SG de 8,5 versus 7,3 meses no grupo placebo (19). Interessante notar que, refletindo o valor prognóstico desses altos níveis de AFP, a sobrevida dos pacientes desse estudo foi menor quando comparada indiretamente ao grupo controle de outros ensaios. Apesar de aprovados pelo FDA (*Food and Drug Administration*) para segunda linha de tratamento baseados inicialmente em estudos fase II, a imunoterapia com nivolumabe e pembrolizumabe é considerada promissora (20,21). Entretanto, os primeiros dados de um dos tão esperados ensaios clínicos fase III, o KEYNOTE 240, no qual se avaliou o efeito do pembrolizumabe, mostraram que, em relação à sobrevida global e livre de progressão, o uso desse agente não alcançou a significância estatística pré especificada (21).

Outra importante barreira na abordagem do CHC é a ausência de biomarcadores para diagnóstico acurado em estágios iniciais do tumor, predição de recorrência e resposta

terapêutica, melhor seleção da modalidade de tratamento da qual um determinado paciente mais se beneficiaria, seja em estádios mais precoces ou avançados, além de determinação prognóstica. Muito esforço na identificação dessas ferramentas tem sido empregado nos últimos anos, tendo em vista o potencial e significativo efeito em melhorar os resultados clínicos dos portadores dessa doença, mas muitas questões ainda continuam não respondidas (22).

Em linhas gerais, todo esse cenário apontado que torna o CHC tão desafiador é a expressão da heterogeneidade da doença e das lacunas de conhecimento em relação à sua carcinogênese tão complexa. Os fatores de risco para esse câncer podem causar dano inicial ao fígado, mas muitas outras influências são necessárias para iniciar as multiplicidades de eventos que levam ao desenvolvimento da neoplasia. Visando a contribuir para melhor entendimento nesse campo, têm sido identificadas alterações genéticas e epigenéticas, aberrações cromossômicas, mutações e anormalidades em vias de sinalização (9). Entretanto, interpretar esses achados moleculares não é fácil, visto que há alterações que são importantes na biologia do câncer, enquanto outras são apenas de passagem, aparentemente sem papel definido. Além disso, sabe-se que todos esses pontos de regulação podem variar de acordo com a etiologia da doença hepática basal e do contexto genético em que o paciente se insere, tornando difícil as comparações entre diferentes regiões do mundo (23)

Dentro dessa perspectiva, é necessário maior conhecimento sobre a hepatocarcinogênese e mais estudos avaliando a associação de achados moleculares e características clínico-patológicas, bem como desfechos clinicamente relevantes, como recorrência do tumor e sobrevida. Como pode haver variações geográficas em relação aos mecanismos envolvidos no CHC que, em linhas gerais, refletem diferenças genéticas das várias regiões do mundo e multiplicidades de etiologias (23), a condução de estudos como este, que contemple particularidades da nossa população, é também uma demanda importante e cada vez mais atual.

1.2 ANTECEDENTES CIENTÍFICOS

1.2.1 Hepatocarcinogênese

Reconhecido como um processo complexo e pouco compreendido, nos últimos anos, os estudos sobre desenvolvimento do CHC têm avançado, permitindo identificar múltiplas etapas nas quais vários mecanismos moleculares podem cooperar entre si (24).

Pacientes com doença hepática crônica têm inflamação sustentada, fibrose e regeneração aberrante do hepatócito, que podem causar cirrose, substrato para o desenvolvimento do CHC em 80-90% dos casos (25). Nesse cenário, a ocorrência de eventos genéticos e epigenéticos tem sido implicada na mudança para um contexto de células altamente proliferativas, vascularizadas por vasos arteriais neoformados em vez de ramos da veia porta, e com potencial invasivo e metastático (26). Esse processo comumente envolve uma sequência bem definida de lesões: cirrose, nódulos displásicos de baixo grau, de alto grau, e, finalmente, CHC em estágio inicial e que, então, progride para fases mais avançadas (27).

Muitas linhas de evidência destacam o papel chave do telômero e da telomerase nessa patogênese da cirrose e iniciação do CHC (28). O telômero, sequência de repetições do DNA essenciais para proteção da porção terminal do cromossomo, encurta-se durante a divisão celular, devido à redução da atividade do complexo telomerase, levando à senescência da célula e apoptose, o que é necessário para o desenvolvimento da cirrose. Posteriormente a esse estágio, a reativação desse complexo enzimático é requerida como forma de o hepatócito readquirir sua capacidade proliferativa e escapar do envelhecimento, o que então leva ao surgimento do tumor (29).

Em mais de 90% dos casos de CHC, a telomerase está reativada, o que ocorre por alterações no promotor TERT, importante enzima que compõe o complexo (30). Isso pode ser em decorrência de mutação somática (50-60%), amplificação (5-6%), ou mesmo, no caso do VHB, pela capacidade de gerar mutações por inserções no genoma do hepatócito (31).

Embora esse seja reconhecidamente um evento precoce na carcinogênese, o CHC vai adquirindo uma diversidade genômica nos estádios mais avançados, resultado de combinação de mutações somáticas em regiões codificadoras ou mesmo deleções homozigóticas (27). Estudos demonstram uma média de 30-40 mutações por tumor, sendo apenas seis a oito consideradas *drivers*, ou seja, diretamente envolvidas na oncogênese e que, portanto, conferem vantagens no crescimento clonal das células tumorais (32).

Isso leva a alterações moleculares que influenciam várias funções celulares, como regulação da proliferação e sobrevivência celular, representada pelos fatores angiogênicos e de crescimento, juntamente com seus receptores, e vários oncogenes e vias de sinalização (2).

Em 3-6% desses tumores, mutações foram identificadas em genes inibidores da via WNT, como AXIN1 e 2, além de inativação do supressor tumoral APC (polipose adenomatosa colônica), levando a ativação dessa via, intimamente ligada a funções de crescimento e desenvolvimento tumoral (33). Adicionalmente, em 11-17% das neoplasias, ocorrem mutações ativadoras do CTNNB1, gene que codifica outra proteína dessa cascata, a β -catenina, envolvida no crescimento e metástase do câncer (34).

O gene TP53, que tem importante papel regulatório em relação ao dano do DNA no ciclo celular, é o supressor tumoral mais frequentemente mutado no CHC (12-48%), o que protege as células malignas contra apoptose e favorece a formação de tumores (27,33).

Dentre outros principais pontos comumente desregulados por essas alterações genéticas incluem-se PI3K/AKT/mTOR, RAS/RAF/MEK/ERK, moduladores do estresse oxidativo e processos responsáveis pelo remodelamento da cromatina (31). Há também alteração em vias oncogênicas como as do *transforming growth factor beta 1* (TGF- β 1), MYC, NOTCH (30, 35).

Algumas alterações moleculares têm sido analisadas mais profundamente e o papel delas como alvo potencial para o tratamento do CHC está sob investigação. O fator de crescimento derivado do endotélio vascular (VEGF) e fator de crescimento epidérmico (EGF), juntamente com seus receptores, são conhecidos pelo importante papel na iniciação, crescimento e disseminação do câncer. Já o *fibroblast growth factor* (FGF) e sua família de receptores têm sido reconhecidos por aumentar o crescimento do CHC, invasão e angiogênese (36). O c-MET, receptor de tirosina quinase cujo ligante é o fator de crescimento do hepatócito (HGF), também tem sido implicado neste câncer, inclusive na resistência a multidrogas, e representa um alvo que também está em intensa investigação, inclusive com estudos clínicos avaliando efeito de seus inibidores (37, 38). O *insulin-like growth factor-1 receptor* (IGF1R) ainda é pouco estudado na carcinogênese desses tumores, mas já foi demonstrado aumento da concentração do ligante IGF-2 durante a transformação maligna dos hepatócitos e concentrações mais elevadas do receptor em células tumorais (39). Além disso, há publicações associando desregulação dessa sinalização com a capacidade de metástase do CHC (40).

Apesar das alterações moleculares já demonstradas, o CHC está entre os tumores sólidos com menor número de mutações somáticas com potencial de constituir diretamente alvos de tratamento (41) e, até o momento, nenhuma mutação é usada na prática clínica para prever resposta terapêutica (42). Apenas cerca de 28% dos pacientes possuem pelo menos uma alteração genética que é alvo potencial para alguma droga já aprovada por agências regulatórias como o FDA, mesmo que para outra indicação (41)

Ainda que entre alguns portadores de CHC seja identificada determinada alteração genética para qual uma terapia alvo é conhecida, a eficácia terapêutica não é previsível. Uma das principais explicações é o fato de que o microambiente tumoral, não apenas as alterações genéticas das células neoplásicas, desempenha também papel crítico na biologia do tumor e, portanto, deve ser adicionalmente considerado (23). Um exemplo disto é a resistência inata de alguns tumores com mutação do gene BRAF às drogas alvo-direcionadas para essa alteração específica, como o vemurafenibe. Dados recentes permitem atribuir ao aumento da secreção de HGF pelas células estromais adjacentes, a explicação para esses achados clínicos inesperados (43).

Esse mecanismo constitui exemplo das implicações clínicas de eventos epigenéticos que podem estar envolvidos na carcinogênese. Durante o desenvolvimento e progressão do CHC, tem sido identificada grande diversidade de genes e vias de sinalização que são alvos de desregulação epigenética, a qual se dá por alterações na metilação do DNA, modificações na atividade das histonas – proteínas nucleares que compõem os nucleossomos e têm importante papel na regulação gênica – ou mesmo por silenciamento de genes mediado por RNA (44). Apesar de ainda pouco elucidado, a epigenética constitui uma explicação adicional para a complexidade desta neoplasia. De acordo com alguns estudos, lesões tumorais ou mesmo pré-malignas podem exibir assinaturas epigenéticas associadas a estágio tumoral e fatores de risco específicos, o que também sinaliza a importância de se explorar o papel desses eventos como biomarcadores e alvos terapêuticos (45).

Portanto, vale destacar que as terapias oncológicas devem ser consideradas de forma mais ampla do que meramente a identificação de alvos para aberrações genéticas, tendo em vista que o CHC constitui um ecossistema completo, que engloba também células não tumorais, como as do estroma e as imuno-relacionadas (42).

Mesmo que a maioria das alterações genéticas de fato ocorram em genes de passagem, sem implicações patogênicas, trata-se de uma heterogeneidade genômica impressionante,

principalmente considerando que há diferenças não só entre portadores dessa neoplasia, mas entre nódulos tumorais no mesmo paciente ou mesmo dentro do mesmo nódulo (23, 46). Essa heterogeneidade pode refletir a existência de clones distintos de células tronco que geram tumores diferentes, com evolução genômica diversa (23).

Essa diversidade genômica do CHC também pode variar de acordo com a etiologia da hepatopatia crônica subjacente e do contexto genético dos pacientes, tornando difícil comparações entre diferentes regiões do mundo (23).

Em 2015, Schulze e colaboradores publicaram um importante estudo de sequenciamento do exoma do CHC. Entre outros achados, foi demonstrado que os tumores associados à hepatopatia crônica por abuso de álcool frequentemente apresentavam alterações em genes como CTNNB1, TERT, CDKN2A, SMARCA 2 e HGF. Por sua vez, os tumores associados à infecção pelo HBV apresentavam grande número de mutações do TP53, enquanto mutações no IL6ST ocorreram exclusivamente no CHC em que a etiologia da hepatopatia crônica subjacente não podia ser definida (47).

Especificamente nos casos de CHC associados à infecção pelo VHB e VHC, importantes etiologias no Brasil e em vários outros países, associadas ou não à cirrose, há muitas particularidades em relação ao envolvimento viral com a carcinogênese. O genoma do VHB pode se integrar ao da célula hospedeira e induzir instabilidade e outras alterações cromossômicas, além de inserções mutagênicas e demais modificações nas funções de vários genes que levam ao câncer (48). Apesar de estudos identificarem alguns locais recorrentes em que essa integração ocorre, como nos genes TERT, MAPK1, CCNE1 (ciclina E1), esse processo é reconhecido como randômico e raramente leva à ativação direta de oncogenes e inativação de supressores tumorais comuns. Na verdade, essa inserção aleatória contribui para instabilidade genética do hepatócito, que será propagada ao longo do tempo com a proliferação celular em decorrência na atividade necroinflamatória da hepatite (49).

Outra forma de o HBV induzir a hepatocarcinogênese é por meio das proteínas do envelope e HBx, que podem contribuir diretamente pela transformação do hepatócito por meio de vias distintas e não superponíveis (49). Uma delas é por meio de um estresse celular via retículo endoplasmático, desencadeado pelas proteínas do envelope. Já a proteína HBx, que tem função regulatória no VHB, atua também diretamente como oncogene no hepatócito. Dessa forma, ela regula uma infinidade de genes envolvidos em vias de transdução de sinais

(como Src e Ras), controle do ciclo celular, metástase, regulação transcricional, resposta imune e metabolismo (50).

Por outro lado, o VHC não tem capacidade de se integrar ao genoma do hospedeiro, mas pode alterar a homeostase da glicose, levando a um ambiente de resistência à insulina (51). Adicionalmente, várias de suas proteínas, incluindo as do núcleo (*core*), do envelope e as não estruturais (como NS2, NS3, NS4A, NS5A e NS5B), têm mostrado propriedades oncogênicas (52). A proteína do *core* pode causar dano mitocondrial, e o estresse oxidativo resultante é reconhecido como gatilho para iniciação e desenvolvimento tumoral. Pode haver ainda redução da habilidade das células hospedeiras em detectar e reparar danos no DNA ao desregular a função de supressores tumorais, por meio de interferência na proteína quinase ATM (ataxia-telangectasia), inativação da proteína do retinoblastoma, ou mesmo interação com a atividade da p53 e RAS (49).

Tendo em vista essa heterogeneidade molecular do CHC e os múltiplos pontos possíveis de regulação da carcinogênese, o grande desafio é identificar em quais pacientes uma dada alteração é crítica. É improvável que alguma terapia alvo seja bem-sucedida sem selecionar o paciente cujo tumor é mais dependente de uma determinada via e, portanto, mais provável de se beneficiar. Além disso, identificação de marcadores preditivos de resposta é essencial para o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos (35).

Recentemente, tem sido proposta uma classificação para o CHC em subtipos moleculares, apontando características clínicas associadas, com base em estudos genômicos que avaliaram principalmente espécimes de ressecção hepática, e, portanto, pacientes em estádios mais precoces dessa neoplasia (27). Segundo ela, há a classe proliferativa, mais comumente vista em portadores de infecção pelo VHB, caracterizada por alterações que conferem comportamento mais agressivo do tumor, incluindo níveis mais elevados de AFP, alto grau de diferenciação, instabilidade cromossômica, mutação frequente do gene TP53 e ativação de vias oncogênicas de sinalização (como MAPK, PI3K/AKT/mTOR, cMET). Muitas das assinaturas genéticas associadas a desfechos clínicos mais desfavoráveis pertencem a esse grupo (42, 53). A outra classe, não proliferativa, associada à etiologia etanólica e ao VHC, caracteriza-se por maior frequência de mutações no gene da β -catenina (CTNNB1) e padrões de expressão genética mais próximas daquelas do hepatócito normal (42).

Apesar das limitações para o emprego na prática clínica, principalmente por ainda não haver dados que a apontem como preditora de resposta a modalidades de tratamento específicas, essa classificação mostra que as diferenças moleculares podem refletir diferentes etiologias da hepatopatia crônica subjacente e implicar características clínicas específicas.

É importante reconhecer ainda que, mesmo diante dessa diversidade molecular do CHC, algumas vias de sinalização intracelular estão frequentemente ativadas e envolvidas na sua carcinogênese, mas sua desregulação não pode ser explicada integralmente apenas por mutações diretas nos genes de suas proteínas. É o caso das vias MAPK (RAS/RAF/MEK/ERK) e PI3K/AKT/mTOR, ativadas em até 51% e de 15-41%, respectivamente, nesses tumores, mas frequentemente sem alterações genéticas identificadas nos seus integrantes diretos. Na maioria das vezes, a ativação dessas vias ocorre indiretamente por aumento da atividade de fatores de crescimento e receptores transmembrana que atuam à montante da cascata (54). Embora muitos pontos de desregulação dessas vias já tenham sido identificados, mecanismos adicionais ainda precisam ser esclarecidos e esse é um assunto que merece destaque (55).

1.2.2 As vias de sinalização intracelular MAPK e PI3K/AKT/mTOR

Para atuar como reguladores da função celular, entre as quais incluem-se proliferação, diferenciação e sobrevivência, moléculas extracelulares como fatores de crescimento e de diferenciação, hormônios, e demais substâncias promotoras tumorais convertem seus sinais por meio de uma cascata de fosforilação intracelular até promoverem a transcrição gênica no núcleo (56). Entre as principais vias de sinalização no CHC, destacam-se a MAPK e PI3K/AKT/mTOR, cuja ativação pode levar ao desenvolvimento do câncer, mas os mecanismos pelos quais essa desregulação ocorre ainda não estão completamente esclarecidos (55).

Habitualmente, a ativação dessas vias pode se dar de duas formas principais. Uma, a ativação específica, quando um ligante interage com seu receptor tirosina quinase na membrana celular, o que deflagra uma sequência de fosforilações que vão recrutando outras proteínas ao longo desse processo de transdução de sinal, até chegar ao núcleo. Este é considerado o principal mecanismo pelo qual essas vias são ativadas nesse tumor, hipótese sustentada pela demonstração de que receptores tirosina quinase como EGFR, IGFR,

VEGFR, FGFR e cMET estão hiperexpressos no CHC (57). Ou seja, a ativação da via é uma expressão final da atividade da família de receptores e seus ligantes.

A outra forma de ativação, bem menos frequente no CHC, é chamada de constitutiva (ou intrínseca), que é independente de ligante (58). Em geral, ocorre por uma alteração na atividade da própria proteína ou seus inibidores, seja por mutação ativadora ou por alguma molécula que atue como oncogene, como é o caso da proteína HBx e proteína do *core*, respectivamente do VHB e VHC, ou mesmo por inativação de um inibidor de alguma proteína (como no caso do PTEN, que regula negativamente a via PI3K/AKT/mTOR), levando à constante ativação à jusante da alteração (58-60).

No caso da via MAPK (Figura 1), a transdução de sinal se dá por meio de quatro famílias principais de proteínas: RAS (em suas três isoformas, KRAS, NRAS e HRAS), RAF (isoformas ARAF, BRAF e Raf-1), MEK (isoformas, MEK 1 a 5) e ERK (JNK1/2/3, ERK1/2, ERK5 e p38 MAPK) (56). Desta última, as isoformas ERK1 e ERK2, são as únicas ativadas pela MEK (especificamente MEK 1 e MEK2), conservam 85% de uma sequência idêntica de aminoácidos e estão expressas de maneira ubíqua, com a mesma localização celular e sem diferenças regulatórias evidentes (61). Por isso, ERK1/2 são frequentemente avaliadas em conjunto, e, quando ativadas, possuem cerca de 460 alvos identificados, tanto substratos à montante quanto à jusante, gerando uma série de efeitos na célula. A desregulação dessa via leva a atividade celular inapropriada, incluindo crescimento celular aumentado, diferenciação, inibição da apoptose e, então, o câncer (57).

Já a via PI3K/AKT/mTOR (Figura 1), outra cascata que controla a divisão, sobrevivência e metabolismo celular, consiste na ativação da lípide-quinase PI3K por intermédio do recrutamento direto pelo receptor transmembrana, ou indireto, envolvendo proteínas de ancoragem (62). Isso gera o fosfatidilinositol trifosfato (PIP3), que recruta a proteína quinase AKT para a membrana plasmática. Essa proteína pode fosforilar diretamente muitos fatores envolvidos na proliferação, motilidade e sobrevivência da célula, como também o complexo que contém a proteína mTOR, constituído pelo mTORC2, insensível à rapamicina, que regula a organização do citoesqueleto, proliferação celular e metabolismo lipídico, e mTORC1, essa última ativada por meio da inibição do supressor tumoral TSC 1 e 2 (complexo 1 e 2 da esclerose tuberosa), complexo envolvido na síntese de proteínas (63).

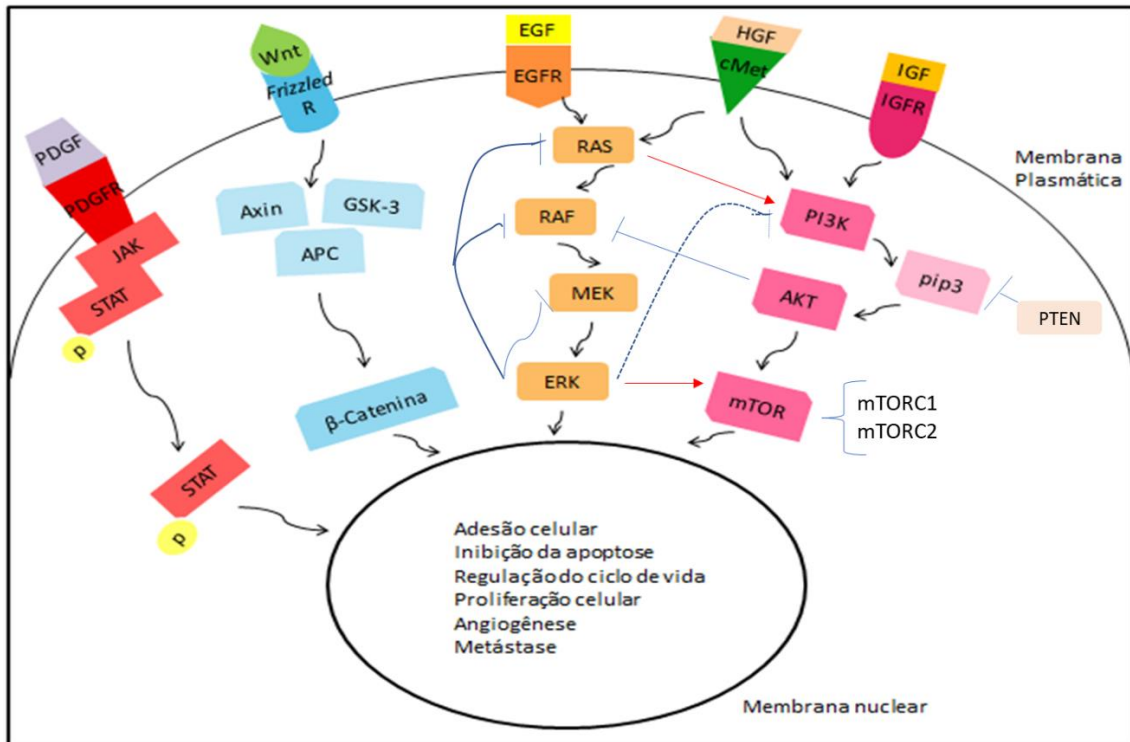


Figura 1 – Vias de sinalização intracelular. Representação esquemática e simplificada das vias de sinalização intracelular envolvidas no CHC, com suas principais proteínas, para fins didáticos (baseada em publicação de Mendoza, Er & Blenis, 2011[72]). Traços azuis indicam efeito inibitório. Linha tracejada azul indica efeito inibitório indireto. Setas vermelhas indicam ativação cruzada entre vias.

Dentre os mecanismos já identificados de alterações dessas vias no CHC estão a amplificação gênica em regiões que codificam os fatores FGF3, FGF4 e FGF19, presente em aproximadamente 5% dos tumores, e também mutações inativadoras no gene PTEN (1-3%), que regula negativamente a via PI3K/AKT/mTOR, e do TSC1 e TSC2 (3-8% dos casos), que levaria a ativação do complexo mTOR. Também são descritas mutações que inativam a proteína quinase ribossomal S6, que em linhas gerais, ativa a sinalização da RAS/RAF/MEK/ERK. Mutações ativadoras diretamente nos genes da família RAS são raramente identificadas (<2%) (55). Da mesma forma, genes cujas mutações estão comumente presentes em outros tumores sólidos, como EGFR, BRAF, PI3KCA, raramente estão mutados no CHC (64). Mas ainda tem sido conduzidos estudos buscando-se reconhecer e melhor caracterizar essas mutações e determinar sua frequência.

Especificamente em relação a mutações do BRAF, a V600E é a mais comum, mas com ampla variação geográfica. Em uma coorte italiana, foi identificada mutação em 23% dos portadores de CHC, enquanto em estudos conduzidos em populações da China e Alemanha, não foi detectada (65-67). Essa é mais uma evidência de que a complexidade da carcinogênese também reflete o contexto genético dos pacientes.

Compreender os mecanismos envolvidos na ativação dessas vias de sinalização é importante, pois além de indicar alvos terapêuticos potenciais, traz informações prognósticas, tendo em vista que estão associadas a comportamento mais agressivo do tumor e menor sobrevida (54, 68). Estudos mostram níveis mais altos dos efetores da proteína RAS em portadores de CHC que apresentaram sobrevida mais curta. Adicionalmente, a superexpressão do Raf-1 foi demonstrada como marcador independente de recorrência precoce do tumor e pior prognóstico (69). De maneira análoga, a ativação da via mTOR é associada a tumores menos diferenciados, pior prognóstico e recorrência mais precoce (70).

Apesar dos avanços no entendimento dessa sinalização, desenvolver ferramentas que atuem nesses alvos é uma questão complexa e os resultados clínicos têm sido desapontadores (64). Exemplo disso é o estudo EVOLVE-1, ensaio clínico randomizado fase 2 que avaliou o efeito do inibidor da mTOR everolimus na segunda linha de tratamento do CHC avançado, e que não demonstrou aumento na sobrevida global (71). Além da ausência de preditores de resposta e heterogeneidade tumoral – inclusive em relação às diferentes etiologias, diante da análise de subgrupo não planejada que sugere tendência a benefício entre portadores de VHB –, a complexidade das vias pode ser uma das explicações para o insucesso dessa terapia alvo.

Há complexas alças de retroalimentação que regulam estritamente a atividade de cada cascata, podendo, através de fosforilação em sítios distintos na mesma proteína, inibir ou ativar a sua função (56). Além disso, essas diferentes vias, por meio de interseções ou intercomunicações, podem regular uma a outra ou mesmo cooperar entre si para interferir em outros substratos (72). Dessa forma, drogas que atuam nesses alvos podem desempenhar diferentes papéis na inibição ou ativação dessa sinalização e ainda é necessário entender melhor esse cenário.

1.2.2.1 A intercomunicação entre as vias de sinalização

Classicamente, as vias de sinalização são compreendidas como cadeias lineares, em que o sinal é transmitido numa sequência simples e previsível, conforme modelo original proposto. Entretanto, sabe-se que estes são apenas os maiores condutos de propagação dos sinais, e, entre eles, existem pequenas alças que conectam essas vias entre si (73). Nos últimos anos, têm sido identificados muitos mecanismos pelos quais a intercomunicação entre MAPK e PI3K/AKT/mTOR ocorre (Figura 1). Enquanto algumas quinases envolvidas nessas cascatas, como RAS, MEK e mTORC1, são substrato-específicas, outras – como a ERK e AKT – fosforilam vários membros além das suas proteínas efetoras, realizando a integração entre as vias (72).

Assim, essa interação pode se dar por inibição cruzada, em que o membro de uma via regula negativamente um componente da outra, interferindo na sua capacidade de condução do sinal. É o que acontece, por exemplo, quando a AKT regula negativamente a ativação da ERK ao fosforilar um sítio inibitório do RAF e então a via deixa de responder a estímulos de fatores extracelulares como o IGF-1 (74).

Pode haver também a ativação cruzada, em que um membro de uma via regula positivamente o componente de outra, aumentando a atividade dessa cascata. É por esse mecanismo que a MAPK ativa a PI3K/AKT/mTOR. Dessa forma, a RAS pode ativar alostericamente a PI3K e a ERK pode levar a ativação do complexo mTORC1 (75, 76).

Um terceiro mecanismo de interação já reconhecido é a convergência das vias para um mesmo substrato, no qual duas ou mais vias agem diretamente na mesma proteína ou complexo. Isso pode resultar tanto numa ativação quanto inibição. Um exemplo é a fosforilação da FOXO3A pela ERK e AKT. A partir desse evento, esse fator de transcrição é sequestrado no citosol, impedindo sua chegada ao núcleo onde atuaria promovendo expressão de genes pro-apoptóticos (77).

Enfim, para os tão esperados avanços e personalização da abordagem do CHC, a intercomunicação entre essas duas vias, consideradas as mais importantes para o controle das funções celulares, diferenciação, proliferação, metabolismo e sobrevivência em resposta aos estímulos extracelulares, deve ser mais bem esclarecida, o que reforça a importância de mais estudos avaliando a complexidade dessa sinalização intracelular.

1.2.3 Transplante hepático como tratamento do CHC

O TH é a única opção terapêutica capaz de curar tanto o CHC quanto a hepatopatia subjacente, com taxas de sobrevida acima de 70% em muitas séries, o que é superior a qualquer outra modalidade de tratamento para essa neoplasia (78). De fato, o CHC foi uma das primeiras indicações do TH. Apesar dos resultados iniciais desapontadores, logo se tornou aparente que o sucesso do tratamento dependia da carga tumoral, tendo em vista que pacientes com doença extensa apresentavam desfechos muito desfavoráveis, enquanto aqueles com tumores pequenos podiam até mesmo ser curados (79, 80).

Assim, após longo período de indicações irrestritas para a abordagem dessa neoplasia, buscando promover o máximo benefício entre os receptores de fígado, de uma forma justa, ética e custo-efetiva, os Critérios de Milão (CM) foram introduzidos em 1996 e, atualmente, são um preditor de recorrência do CHC amplamente utilizado (80, 81). Dessa forma, um paciente é elegível para o TH se não for candidato à ressecção e apresentar um nódulo tumoral único de até 5 cm ou até três de no máximo 3 cm cada, na ausência de invasão macrovascular ou disseminação extra-hepática. Nesse caso, a taxa de sobrevida livre de recorrência em quatro anos chega a 83% entre os pacientes que preenchem esses critérios, enquanto a taxa de recorrência pode ultrapassar 41% nos demais. (81).

Apesar de ser amplamente utilizado, os CM têm limitações. Por serem baseados em parâmetros radiológicos, a extensão do CHC não é apropriadamente estimada em até 25% dos casos quando comparada com os achados patológicos do fígado explantado, mesmo com os avanços das técnicas de imagem (82). Além disso, a biologia tumoral, importante determinante do risco de recorrência após o TH, não é levado em conta por essa classificação (80).

Os CM são também considerados muito restritivos. Apenas 6% dos portadores de CHC preenchem esses critérios para serem elegíveis ao TH (83). Entretanto, uma significativa proporção de pacientes que ultrapasse os parâmetros do CM ainda poderia se beneficiar dessa modalidade de tratamento sem aumentar as taxas de recorrência (84). Nesse cenário, existem propostas de critérios mais permissíveis, que tentam expandir as recomendações atuais. Dentre eles, o maior destaque é para o critério UCSF, da Universidade da Califórnia, São Francisco (nódulo único de até 6,5 cm, ou até três nódulos sendo o maior de até 4,5 cm e um diâmetro total de até 8 cm), único validado prospectivamente e que mostrou resultados similares aos do CM (85).

Por outro lado, a expansão dos CM deve ser vista com cautela. Ser liberal demais pode comprometer não apenas os desfechos clínicos, mas também limitar o acesso ao TH por pacientes com outras doenças hepáticas, particularmente em regiões com prevalência elevada de CHC, tendo em vista a baixa disponibilidade de doadores cadavéricos em muitos países (86).

Vale destacar que, no Brasil, assim como em outras regiões do mundo, os portadores de CHC são alocados de forma prioritária para o transplante (87). Desde 2002 nos Estados Unidos e 2006 no Brasil, o MELD (*Model for End-Stage Liver Disease*), escore de avaliação da gravidade da cirrose e predição de mortalidade em 90 dias, é o que determina a posição do paciente na fila de espera para o órgão, permitindo que o TH seja realizado em casos mais graves (88). Entretanto, esse modelo não determina a mortalidade em situações em que pode não haver significativo comprometimento da função hepática, como no CHC, em que muitos pacientes recebem indicação de TH nas fases iniciais da doença. Há estudos mostrando que o escore fisiológico de MELD em pacientes com HCC é mais baixo do que nos sem neoplasia (89), mas eles são mais propensos a serem removidos da lista de TH por descompensação clínica ou desenvolvimento de metástase, o que ocorre em cerca de 20-50% dos casos (90).

Então, para que esses pacientes possam ter acesso ao TH sem longos períodos de espera em que a progressão do tumor poderia ocorrer e sob condições mais favoráveis, que permitam competir com candidatos com escores de MELD mais elevados pela doença hepática em si, eles recebem uma pontuação especial. De acordo com a legislação brasileira específica, publicada em 2006, portadores de CHC (nódulos a partir de 2cm) recebem inicialmente escore MELD de 20. Após três meses em lista de espera, a pontuação aumenta automaticamente para 24 e a partir de seis meses, sobe para 29 (88).

Há estudo mostrando que a adoção dessa exceção reduziu em 55,6% o tempo de espera por um doador cadavérico, que girava em torno de 10-12 meses (89). Simultaneamente, para os pacientes em situações para as quais não há pontuação especial, esse tempo pode ter aumentado em 180% (88, 90). Assim, toda tentativa de se expandir os CM necessita garantir pelo menos a manutenção dos resultados a longo prazo para outras doenças cujo tratamento também é o TH (86).

Outra importante questão a ser considerada é que as dimensões do tumor (tamanho, número de nódulos), avaliada por técnicas radiológicas, reconhecidamente não é o modelo mais adequado para prever a agressividade da neoplasia e definir isoladamente a indicação para

o TH como tratamento do CHC. Há tumores volumosos ou até mesmo múltiplos nem sempre associados a um fenótipo mais agressivo, enquanto outros, pequenos, podem ter uma replicação mais rápida (78). Isto porque o comportamento biológico do tumor é amplamente variável entre pacientes, regiões geográficas e possivelmente até mesmo entre etiologias da hepatopatia subjacente. Nesse sentido, existe muito esforço em se identificar biomarcadores para serem incorporados em um modelo mais racional, que leve em consideração também a biologia tumoral (86).

Características histológicas, como invasão microvascular (MIV), em que o tumor degrada a matriz extracelular em torno de estruturas vasculares e invade o lúmen dos vasos sanguíneos, podendo então originar metástases, assim como grau de diferenciação mais baixo, têm sido associados a maior índice de recorrência e redução das taxas de sobrevida (92, 93). Entretanto, obstáculos como a não realização de diagnóstico histológico, o que torna rotineiramente indisponível a biópsia pré-TH ou mesmo devido ao fato de pequenas amostras não representarem o tumor como um todo, dificultam a implementação desses parâmetros na prática (86).

Há também os marcadores séricos, que podem fornecer informações adicionais acerca do comportamento biológico do tumor. Dentre eles, a AFP, glicoproteína produzida pelo fígado, cuja expressão é aumentada em 60-70% dos pacientes com CHC, é associada à baixo grau de diferenciação, MIV, aumento das taxas de recorrência e redução da sobrevida pós transplante (94). Ainda não há um valor de corte definido para AFP que desencoraje o TH como tratamento do CHC, mesmo naqueles que estão fora dos CM, mas muitas instituições já exigem níveis menores que 400 ng/mL para considerar o paciente como potencial candidato a essa modalidade de tratamento (95).

Outros marcadores séricos como des-gama-carboxiprotrombina, AFP-L3, uma variante da AFP, osteopontina, índices como razão neutrófilo-linfócito, plaqueta-linfócito e linfócito-monócito têm sido apontados como preditores úteis, mas ainda necessitam validação externa (78, 96-98). Além deles, o uso da tomografia por emissão de pósitrons (PET/FDG) parece promissor (78, 99).

Outro destaque é a biópsia líquida, extensamente avaliada em diferentes tipos de neoplasias, devido a seu potencial como ferramenta translacional. É um método não invasivo e reprodutível que pode fornecer informações dinâmicas acerca da atividade tumoral. Assim, a detecção, em sangue periférico, de DNA do tumor ou mesmo células tumorais circulantes

(CTC) poderia contribuir para seleção de pacientes para TH ou predição de recorrência após a modalidade de tratamento (100). De fato, tem sido demonstrado associação independente entre sobrevida livre de recorrência após o TH e contagem pré-operatória de CTC (101).

Portanto, a combinação de características demográficas, fatores associados à hepatopatia crônica subjacente, dimensões do tumor, parâmetros histológicos e biomarcadores séricos é reconhecida como a chave para o aprimoramento e expansão segura dos CM, e, então, deve ser mais estudada (85). Como pode haver variações entre instituições, séries de diferentes centros de referência em TH podem contribuir para esse conhecimento.

O presente estudo traz dados do grupo de TH do Hospital das Clínicas da UFMG (HC/UFMG), importante centro de referência no Brasil. O primeiro transplante em paciente com CHC nesta instituição foi realizado em janeiro de 1998. Com a introdução do MELD no país, em julho de 2006, o número desses procedimentos para tratamento do CHC neste centro aumentou consideravelmente, e já em 2010 correspondia a 23% dos TH's realizados anualmente neste centro. Dessa forma, a análise dessa população pode trazer importante informação nesse cenário, além de representar uma das principais fontes de acesso ao tecido tumoral dos pacientes com CHC, tendo em vista que, assim como em várias outras instituições, o diagnóstico dessa neoplasia é baseado na maioria das vezes em critérios clínicos e de imagem, e a biópsia, apesar de cada vez mais encorajada por diretrizes internacionais (102), não é rotineiramente realizada.

1.3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- Global Burden of Disease Liver Cancer C, Akinyemiju T, Abera S, Ahmed M, Alam N, Alemayohu MA, et al. The burden of primary liver cancer and underlying etiologies from 1990 to 2015 at the global, regional, and national level: results from the global burden of disease study 2015. *JAMA Oncol* 2017;3(12):1683-91.
- 2- Alves RCP, Alves D, Guz B, et al. Advanced hepatocellular carcinoma. Review of target molecular drugs. *Ann Hep* 2011;10(1): 21-27.
- 3- Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin* 2018;68(6):394-424
- 4- Bosch FX, Ribes J, Cléries R, Díaz M. Epidemiology of hepatocellular carcinoma. *Clin Liver Dis* 2005;9:191-211.
- 5- Paranaguá-Veloso DC, Onu SK, Alvarado-Mora MV, et al. Epidemiology of HCC in Brazil: incidence and risk factors in a ten-year cohort. *Ann Hepatol* 2014;13(4):386-93
- 6- Rich NE, Hester C, Odewole M, et al. Racial and ethnic differences in presentation and outcomes of hepatocellular carcinoma. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2019; 17(3): 551-559.e1.
- 7- Finn RS. Emerging Targeted Strategies in Advanced Hepatocellular Carcinoma. *Semin Liver Dis* 2013;33(S1):S11–S19
- 8- Sanyal AJ, Yoon SK, Lencioni R. The etiology of hepatocellular carcinoma and consequences for treatment. *Oncologist* 2010;15(Suppl 4):14-22.
- 9- Lachenmayer A, Alsinet C, Chang CY, Llovet JM. Molecular approaches to treatment of hepatocellular carcinoma. *Dig Liver Dis* 2010;42(Suppl 3):S264-S272.
- 10- Shiani A, Narayanan S, Pena L, Friedman M. The Role of Diagnosis and Treatment of Underlying Liver Disease for the Prognosis of Primary Liver Cancer. *Cancer Control* 2017;24(3). [https://doi: 10.1177/1073274817729240](https://doi.org/10.1177/1073274817729240)
- 11- Nault JC, Datta S, Imbeaud S, et al. Recurrent AAV2-related insertional mutagenesis in human hepatocellular carcinomas. *Nat Genet* 2015;47(10):1187-93.
- 12- Forner A, Llovet JM, Bruix J. Hepatocellular carcinoma. *Lancet* 2012;379:1245-55.
- 13- Shiraha H, Yamamoto K, Namba M. Human hepatocyte carcinogenesis (review). *Int J Oncol* 2013;42(4):1133-38.

- 14- Llovet, JM, Bruix, J. Systematic review of randomized trials for unresectable hepatocellular carcinoma: chemoembolization improves survival. *Hepatology* 2003; 37:429-42.
- 15- Llovet JM, Ricci S, Mazzaferro V, et al. Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med* 2008;359:378-90.
- 16- Kudo M, Finn RS, Qin S, et al. Lenvatinib versus sorafenib in first-line treatment of patients with unresectable hepatocellular carcinoma: a randomised phase 3 non-inferiority trial. *Lancet* 2018;391:1163-73.
- 17- Bruix J, Qin S, Merle P, et al. Regorafenib for patients with hepatocellular carcinoma who progressed on sorafenib treatment (RESORCE): a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet* 2017;389:56-66.
- 18- Abou-Alfa GK, Meyer T, Cheng A-L, et al. Cabozantinib in patients with advanced and progressing hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med* 2018;379:54-63.
- 19- Zhu AX, Kang YK, Yen CJ, et al. Ramucirumab after sorafenib in patients with advanced hepatocellular carcinoma and increased α -fetoprotein concentrations (REACH-2): a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet Oncol* 2019; 20(2):282-96.
- 20- El-Khoueiry AB, Sangro B, Yau T, et al. Nivolumab in patients with advanced hepatocellular carcinoma (CheckMate 040): an open-label, non-comparative, phase 1/2 dose escalation and expansion trial. *Lancet* 2017;389(10088):2492-502.
- 21- Finn RS, Ryoo B-Y, Merle P, et al. Results of KEYNOTE-240: phase 3 study of pembrolizumab (Pembro) vs best supportive care (BSC) for second line therapy in advanced hepatocellular carcinoma (HCC). *J Clin Oncol* 2019;37(suppl 15):4004-04.
- 22- Choi KJ, Baik IH, Ye SK, Lee YH. Molecular Targeted Therapy for Hepatocellular Carcinoma: Present Status and Future Directions. *Biol Pharm Bull* 2015;38(7):986-91.
- 23- Bruix J, Gores GJ, Mazzaferro V. Hepatocellular carcinoma: clinical frontiers and perspectives. *Gut* 2014;63:844-55.
- 24- Chen C, Wang G. Mechanisms of hepatocellular carcinoma and challenges and opportunities for molecular targeted therapy. *World J Hepatol* 2015;7(15):1964-70.
- 25- Trevisani F, Cantarini MC, Wands JR, Bernardi M. Recent advances in the natural history of hepatocellular carcinoma. *Carcinogenesis* 2008;29(7):1299-305.

- 26- Farazi PA, Depinho RA. Hepatocellular carcinoma pathogenesis: from genes to environment. *Nat Rev Cancer* 2006; 6:674-87.
- 27- Zucman-Rossi, J, Villanueva, A, Nault, JC., Llovet, JM. The genetic landscape and biomarkers of hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 2015;5:1226-39.
- 28- Satyanarayana A, Manns MP, Rudolph KL. Telomeres and telomerase: a dual role in hepatocarcinogenesis. *Hepatology* 2004;40:276-83.
- 29- Farazi PA, Glickman J, Jiang S, et al. Differential impact of telomere dysfunction on initiation and progression of hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* 2003;63:5021-5027.
- 30- Totoki Y, Tatsuno K, Yamamoto S, et al. High-resolution characterization of a hepatocellular carcinoma genome. *Nat Genet* 2011;43:464-69.
- 31- Sung W-K, Zheng H, Li S, et al. Genome-wide survey of recurrent HBV integration in hepatocellular carcinoma. *Nat Genet* 2012;44:765-769.
- 32- Guichard C, Amaddeo G, Imbeaud S, et al. Integrated analysis of somatic mutations and focal copy-number changes identifies key genes and pathways in hepatocellular carcinoma. *Nat. Genet* 2012;44:694-98.
- 33- Wu MY, Yiang GT, Cheng PW, Chu PY, Li CJ. Molecular Targets in Hepatocarcinogenesis and Implications for Therapy. *J Clin Med* 2018;7(8):213. <https://doi.org/10.3390/jcm7080213>
- 34- de La Coste A, Romagnolo B, Billuart P, et al. Somatic mutations of the beta-catenin gene are frequent in mouse and human hepatocellular carcinomas. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95(15):8847-51.
- 35- Mazzanti R, Arena U, Tassi R. Hepatocellular carcinoma: Where are we? *World J Exp Med* 2016;6(1):21-36.
- 36- Sanz-Cameno P, Trapero-Marugán M, Chaparro M, Jones EA, Moreno-Otero R. Angiogenesis: from chronic liver inflammation to hepatocellular carcinoma. *J Oncol* 2010;2010:272170. <https://doi.org/10.1155/2010/272170>
- 37- Lasagna N, Fantappiè O, Solazzo M, et al. Hepatocyte growth factor and inducible nitric oxide synthase are involved in multidrug resistance-induced angiogenesis in hepatocellular carcinoma cell lines. *Cancer Res* 2006;66:2673-82.
- 38- Bouattour M, Raymond E, Qin S, et al. Recent developments of c-Met as a therapeutic target in hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2018;67(3):1132-49

- 39- Zhizhen Dong, Min Yao, Li Wang et al. Abnormal expression of insulin-like growth factor-I receptor in hepatoma tissue and its inhibition to promote apoptosis of tumor cells. *Tumor Biol* 2013;34:3397-405
- 40- Chen Y-W, Boyartchuk V, Lewis BC. Differential Roles of Insulin-like Growth Factor Receptor – and Insulin Receptor – mediated Signaling in the Phenotypes of Hepatocellular Carcinoma Cells. *Neoplasia* 2009;11(9):835-45.
- 41- Zehir A, Benayed R, Shah RH, et al. Mutational landscape of metastatic cancer revealed from prospective clinical sequencing of 10,000 patients. *Nat Med* 2017; 23: 703-13.
- 42- Villanueva A. Hepatocellular Carcinoma. *N Engl J Med*. 2019;380(15):1450-1462.
- 43- Straussman R, Morikawa T, Shee K, et al. Tumour micro-environment elicits innate resistance to RAF inhibitors through HGF secretion. *Nature* 2012;487:500-4.
- 44- Herceg Z, Paliwal A. Epigenetic mechanisms in hepatocellular carcinoma: how environmental factors influence the epigenome. *Mutat Res* 2011;727(3):55-61
- 45- Hernandez-Vargas H, Lambert MP, Le Calvez-Kelm F. Hepatocellular carcinoma displays distinct DNA methylation signatures with potential as clinical predictors. *PLoS One* 2010;5(3):e9749.
- 46- Lu LC, Hsu CH, Hsu C, Cheng AL. Tumor Heterogeneity in Hepatocellular Carcinoma: Facing the Challenges. *Liver Cancer* 2016;5:128-138.
- 47- Schulze K, Imbeaud S, Letouzé E, et al. Exome sequencing of hepatocellular carcinomas identifies new mutational signatures and potential therapeutic targets. *Nat Genet*. 2015;47(5):505-511.
- 48- Buendia MA, Neuveut C. Hepatocellular carcinoma. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2015;5(2):a021444. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a021444>
- 49- Ringelhan M, McKeating JA, Protzer U. Viral hepatitis and liver cancer. *Phil. Trans. R. Soc. B* 2017;372:20160274. <https://doi.org/10.1098/rstb.2016.0274>
- 50- Ringelhan M, O'Connor T, Protzer U, Heikenwalder M. 2015 The direct and indirect roles of HBV in liver cancer: prospective markers for HCC screening and potential therapeutic targets. *J. Pathol* 2015;235:355-67
- 51- Goossens N, Negro F. Insulin resistance, nonalcoholic fatty liver disease and hepatitis C virus infection. *Rev. Recent Clin. Trials* 2014;9:204-09.
- 52- Fung J, Lai CL, Yuen MF. Hepatitis B and C virus-related carcinogenesis. *Clin Microbiol Infect*. 2009;15(11):964-70

- 53- Hoshida Y, Nijman SM, Kobayashi M, Chan JA, Brunet JP, Chiang DY et al. Integrative transcriptome analysis reveals common molecular subclasses of human hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* 2009; 69:7385-92.
- 54- Villanueva A, Chiang DY, Newell P, et al. Pivotal role of mTOR signaling in hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 2008;135:1972-83.
- 55- Llovet JM, Zucman-Rossi J, Pikarsky E, et al. Hepatocellular carcinoma. *Nat Rev Dis Primers* 2016;2:16018. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2016.18>
- 56- Yang S, Liu G. Targeting the Ras/Raf/MEK/ERK pathway in hepatocellular carcinoma. *Oncol Lett* 2017;13(3):1041-47.
- 57- De Luca A1, Maiello MR, D'Alessio A, Pergameno M, Normanno N. The RAS/RAF/MEK/ERK and the PI3K/AKT signalling pathways: role in cancer pathogenesis and implications for therapeutic approaches. *Expert Opin Ther Targets* 2012;16(Suppl 2):S17-27
- 58- Zhou Q, Lui VW, Yeo W. Targeting the PI3K/Akt/mTOR pathway in hepatocellular carcinoma. *Future Oncol* 2011;7:1149-67.
- 59- Galuppo R, Maynard E, Shah M, et al. Synergistic inhibition of HCC and liver cancer stem cell proliferation by targeting RAS/RAF/MAPK and WNT/ β -catenin pathways. *Anticancer Res* 2014;34:1709-13.
- 60- Nakamura H, Aoki H, Hino O, Moriyama M: HCV core protein promotes heparin binding EGF-like growth factor expression and activates Akt. *Hepatol Res* 2011;41:455-462.
- 61- Buscà R, Pouysségur J, Lenormand P. ERK1 and ERK2 Map Kinases: Specific Roles or Functional Redundancy?. *Front Cell Dev Biol* 2016;4:53. <https://doi.org/10.3389/fcell.2016.00053>
- 62- Efeyan A, Sabatini DM. mTOR and cancer: many loops in one pathway. *Curr Opin Cell Biol* 2010;22(2):169-76.
- 63- Sengupta S, Peterson TR, Sabatini DM. Regulation of the mTOR complex 1 pathway by nutrients, growth factors, and stress. *Mol. Cell* 2010;40:310-22
- 64- Llovet JM, Hernandez-Gea V. Hepatocellular Carcinoma: Reasons for Phase III Failure and Novel Perspectives on Trial Design. *Clin Cancer Res* 2014;20(8):2072-9
- 65- Colombino M, Sperlongano P, Izzo F, et al. BRAF and PIK3CA genes are somatically mutated in hepatocellular carcinoma among patients from South Italy. *Cell Death Dis* 2012;3(1):e259. <https://doi.org/10.1038/cddis.2011.136>

- 66- Zuo Q, Huang H, Shi M, et al. Multivariate Analysis of Several Molecular Markers and Clinicopathological Features in Postoperative Prognosis of Hepatocellular Carcinoma. *The Anatomical Record* 2012;295:423-431.
- 67- Tannapfel A, Sommerer F, Benicke M, et al. Mutations of the BRAF gene in cholangiocarcinoma but not in hepatocellular carcinoma. *Gut* 2003;52(5):706-712.
- 68- Huynh H, Nguyen TT, Chow KH, Tan PH, Soo KC, Tran E. Over-expression of the mitogen-activated protein kinase (MAPK) kinase (MEK)-MAPK in hepatocellular carcinoma: its role in tumor progression and apoptosis. *BMC Gastroenterol* 2003;3:19.
- 69- Chen L, Shi Y, Jiang CY, Wei LX, Wang YL, Dai GH. Expression and prognostic role of pan-Ras, Raf-1, pMEK1 and pERK1/2 in patients with hepatocellular carcinoma. *Eur J Surg Oncol* 2011;37:513-20.
- 70- Matter MS, Decaens T, Andersen JB, Thorgeirsson SS. Targeting the mTOR pathway in hepatocellular carcinoma: current state and future trends. *J Hepatol* 2014;60(4):855-65.
- 71- Zhu AX, Kudo M, Assenat, E, et al. Effect of everolimus on survival in advanced hepatocellular carcinoma after failure of sorafenib: the EVOLVE-1 randomized clinical trial. *JAMA* 2014;312(1):57-67.
- 72- Mendoza MC, Er EE, Blenis J. The Ras-ERK and PI3K-mTOR pathways: cross-talk and compensation. *Trends Biochem Sci* 2011;36(6):320-8.
- 73- Nishi H, Demir E, Panchenko AR. Crosstalk between signaling pathways provided by single and multiple protein phosphorylation sites. *J Mol Biol* 2015;427(2):511-520.
- 74- Guan KL, Figueroa C, Brtva TR et al. (2000) Negative regulation of the serine/threonine kinase B-Raf by Akt. *J. Biol. Chem* 275:27354-59.
- 75- Suire S, Hawkins P, Stephens L. Activation of phosphoinositide 3-kinase gamma by Ras. *Curr. Biol* 2002;12:1068-1075.
- 76- Carriere A, Romeo Y, Acosta-Jaquez HA, et al. ERK1/2 phosphorylate Raptor to promote Ras-dependent activation of mTOR complex 1 (mTORC1). *J Biol Chem* 2011;286(1):567-77.
- 77- Greer EL, Brunet A. FOXO transcription factors at the interface between longevity and tumor suppression. *Oncogene* 2005;24:7410-25.

- 78- Amado V, Rodríguez-Perálvarez M, Ferrín G, De la Mata M. Selecting patients with hepatocellular carcinoma for liver transplantation: incorporating tumor biology criteria. *J Hepatocell Carcinoma* 2018;6:1-10.
- 79- Mazzaferro V, Chun YS, Poon RT, et al. Liver transplantation for hepatocellular carcinoma. *Ann Surg Oncol* 2008;15:1001-07
- 80- Clavien PA, Lesurtel M, Bossuyt PM, et al. Recommendations for liver transplantation for hepatocellular carcinoma: an international consensus conference report. *Lancet Oncol* 2012;13(1):e11-e22.
- 81- Mazzaferro V, Regalia E, Doci R, et al. Liver transplantation for the treatment of small hepatocellular carcinomas in patients with cirrhosis. *N Engl J Med* 1996;334:693-99.
- 82- Kneteman N, Livraghi T, Madoff D, de Santibañez E, Kew M. Tools for monitoring patients with hepatocellular carcinoma on the waiting list and after liver transplantation. *Liver Transpl* 2011;17(suppl 2):S117-S127.
- 83- Ulahannan SV, Duffy AG, McNeel TS, Kish JK, Dickie LA, Rahma OE, McGlynn KA, Greten TF, Altekruse SF. Earlier presentation and application of curative treatments in hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2014;60:1637-1644
- 84- Silva MF, Sherman M. Criteria for liver transplantation for HCC: what should the limits be? *J Hepatol* 2011;55:1137-47.
- 85- Yao FY, Xiao L, Bass NM, Kerlan R, Ascher NL, Roberts JP. Liver transplantation for hepatocellular carcinoma: validation of the UCSF-expanded criteria based on preoperative imaging. *Am J Transplant* 2007;7(11):2587-96
- 86- Guerrero-Misas M, Rodríguez-Perálvarez M, De la Mata M. Strategies to improve outcome of patients with hepatocellular carcinoma receiving a liver transplantation. *World J Hepatol* 2015;7(4):649-61.
- 87- Washburn K, Edwards E, Harper A, Freeman R. Hepatocellular carcinoma patients are advantaged in the current liver transplant allocation system. *Am J Transplant* 2010;10(7):1643-8.
- 88- Freitas ACT, Shiguihara RS, Monteiro RT, Pazeto TL, Coelho JCU. Comparative study on liver transplantation with and without hepatocellular carcinoma with cirrhosis: analysis of meld, waiting time and survival. *Arq. Bras. Cir. Dig* 2016;29(1):21-25.
- 89- Northup PG, Intagliata NM, Shah NL, Pelletier SJ, Berg CL, Argo CK. Excess mortality on the liver transplant waiting list: Unintended policy consequences and

- model for End-Stage Liver Disease (MELD) inflation. *Hepatology* 2015;61(1):285-291.
- 90- Goldberg D, French B, Abt P, Feng S, Cameron AM. Increasing disparity in waitlist mortality rates with increased MELD scores for candidates with versus without hepatocellular carcinoma. *Liver Transpl* 2012;18(4):434-443.
- 91- Mor E, Tur-Kaspa R, Sheiner P, Schwartz M. Treatment of hepatocellular carcinoma associated with cirrhosis in the era of liver transplantation. *Ann Intern Med* 1998;129(8):643-653.
- 92- Rodríguez-Perálvarez M, Luong TV, Andreana L, Meyer T, Dhillon AP, Burroughs AK. A systematic review of microvascular invasion in hepatocellular carcinoma: diagnostic and prognostic variability. *Ann Surg Oncol* 2013;20:325-339
- 93- Dubay D, Sandroussi C, Sandhu L, et al. Liver transplantation for advanced hepatocellular carcinoma using poor tumor differentiation on biopsy as an exclusion criterion. *Ann Surg* 2011;253(1):166-172.
- 94- Chan SL, Mo FK, Johnson PJ, et al. New utility of an old marker: serial alpha-fetoprotein measurement in predicting radiologic response and survival of patients with hepatocellular carcinoma undergoing systemic chemotherapy. *J Clin Oncol* 2009;27(3):446-452.
- 95- Charrière B, Maulat C, Suc B, Muscari F. Contribution of alphafetoprotein in liver transplantation for hepatocellular carcinoma. *World J Hepatol* 2016;8(21):881-890.
- 96- Meguro M, Mizuguchi T, Nishidate T, et al. Prognostic roles of preoperative α -fetoprotein and des- γ -carboxy prothrombin in hepatocellular carcinoma patients. *World J Gastroenterol* 2015;21(16):4933-4945.
- 97- Sieghart W, Wang X, Schmid K, et al. Osteopontin expression predicts overall survival after liver transplantation for hepatocellular carcinoma in patients beyond the Milan criteria. *J Hepatol* 2011;54(1):89-97.
- 98- Hong G, Suh KS, Suh SW, et al. Alpha-fetoprotein and (18)F-FDG positron emission tomography predict tumor recurrence better than Milan criteria in living donor liver transplantation. *J Hepatol* 2016;64(4):852-859.
- 99- Cheng J, Wang W, Zhang Y, et al. Prognostic role of pre-treatment serum AFP-L3% in hepatocellular carcinoma: systematic review and meta-analysis. *PLoS One*. 2014; 9(1):e87011.

- 100- Guo W, Sun YF, Shen MN, et al. Circulating tumor cells with stem-like phenotypes for diagnosis, prognosis, and therapeutic response evaluation in hepatocellular carcinoma. *Clin Cancer Res* 2018;24(9):2203-13.
- 101- Xue F, Shi S, Zhang Z, et al. Application of a novel liquid biopsy in patients with hepatocellular carcinoma undergoing liver transplantation. *Oncol Lett* 2018;15(4):5481-8.
- 102- Vogel A, Cervantes A, Chau I. Hepatocellular Carcinoma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* 2018 29(Suppl 4): iv238-iv255.

2- OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Investigar a expressão de proteínas das vias de sinalização intracelular MAPK e PI3K/AKT/mTOR e sua associação com parâmetros clínico-laboratoriais pré-TH e histopatológicos, bem como desfechos clinicamente relevantes, em pacientes com CHC submetidos a TH, de acordo com a etiologia da hepatopatia crônica subjacente.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar parâmetros clínicos e laboratoriais pré-TH, bem como dados histológicos do fígado explantado, de pacientes com CHC submetidos a TH como tratamento da neoplasia, e compará-los entre os diferentes grupos de etiologias da hepatopatia crônica subjacente;

Descrever desfechos clínicos a longo prazo (recidiva ou óbito e sobrevida livre desses eventos) dos pacientes submetidos a TH como tratamento do CHC e compará-los entre as diferentes etiologias da hepatopatia crônica subjacente;

Avaliar se algum parâmetro clínico, laboratorial ou histológico analisado pode atuar como preditor de resposta ao TH;

Investigar a expressão de proteínas das vias de sinalização MAPK e PI3K/AKT/mTOR no tumor e tecido cirrótico adjacente, e comparar esses achados entre os grupos etiológicos da hepatopatia crônica subjacente em portadores de CHC submetidos a TH;

Investigar a expressão tumoral do mRNA dos genes das proteínas das vias de sinalização MAPK e PI3K/AKT/mTOR em portadores de CHC submetidos a TH, e comparar esses achados entre os grupos etiológicos de acordo com a hepatopatia crônica subjacente.

3- MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 COORTE

Pacientes submetidos a TH como abordagem do CHC no Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais, entre 1998 e 2015 foram identificados (n=156). O diagnóstico patológico dessa neoplasia segue as recomendações do *International Consensus Group for Hepatocellular Neoplasia*, importante grupo internacional composto de 34 patologistas e dois clínicos de 13 países (1). Todos os 156 pacientes identificados possuíam fragmentos do tumor fixados em formalina, arquivados em blocos parafinados no Departamento de Anatomia Patológica e Medicina Legal da Faculdade de Medicina da UFMG. Os dados histológicos utilizados foram baseados no laudo anatomopatológico oficial do fígado explantado, realizado na ocasião do TH, e nenhuma revisão de lâminas foi feita especificamente para o estudo. Pacientes sem diagnóstico definitivo de CHC por exame histopatológico ou imunoistoquímica (IHQ) não foram incluídos no banco de dados (n=3).

Dados clínicos e demográficos pré-TH de cada paciente foram retrospectivamente coletados de prontuários médicos e dos registros eletrônicos do grupo de TH do HC/UFMG. Foram computados os seguintes parâmetros: gênero, idade na data do transplante, etiologia da hepatopatia crônica de base (se mais de uma etiologia identificada, a classificação era realizada de acordo com o componente viral), escores MELD (*Model For End-Stage Liver Disease*) e *CHILD-Pugh* – modelos prognósticos que avaliam a gravidade da doença hepática de base (2,3) – diabetes, níveis séricos de AFP, hemoglobina, contagem de plaquetas, RNI (*international normalized ratio*), nível sérico de albumina, bilirrubina total, enzimas hepáticas (aspartato aminotransferase [AST], alanina aminotransferase [ALT], gama-glutamiltransferase [GGT], fosfatase alcalina [FA]) e desidrogenase lática (LDH).

Para os dados clínicos e laboratoriais citados, foram consideradas as informações ambulatoriais mais próximas da data do TH, ou, se a consulta tivesse sido realizada a mais

-
- 1- International Working Party (2009) Pathologic diagnosis of early hepatocellular carcinoma: a report of the international consensus group for hepatocellular neoplasia. *Hepatology* 49:658–664
 - 2- Kamath PS, Wiesner RH, Malinchoc M, Kremers W, Therneau TM, Kosberg CL, D'Amico G, Dickson ER, Kim WR (2001). A model to predict survival in patients with end-stage liver disease. *Hepatology* 33:464. <https://doi.org/10.1053/jhep.2001.22172>
 - 3- Pugh RN, Murray-Lyon IM, Dawson JL, Pietroni MC, Williams R (1973) Transection of the oesophagus for bleeding oesophageal varices. *Br J Surg* 60:646.

de 60 dias, eram obtidas informações da internação logo antes do procedimento. Além disso, foram coletados dados histopatológicos do fígado explantado: número de nódulos, tamanho do maior nódulo, CM (se o paciente os preenche ou não) de acordo com o exame patológico.

O total de 80 pacientes foram aleatoriamente selecionados para etapa de exame imunohistoquímico e RT-PCR (*reverse transcription polymerase chain reaction*). Nestes casos foram ainda computadas informações sobre presença ou não de invasão microvascular (MIV), classicamente definida como êmbolo tumoral dentro de um espaço vascular, não detectável por técnicas radiológicas (4), e grau histológico de acordo com a classificação de Edmondson & Steiner (5).

Os tumores graus I e II são considerados de baixo grau histológico (células tumorais semelhantes ao hepatócito, citoplasma acidófilo e núcleos de tamanhos normais a levemente aumentados) e os III e IV, de alto grau (ou seja, pouco diferenciados, caracterizados por núcleos hipercromáticos de tamanhos variados, citoplasma menos acidófilo).

Para análise dos desfechos clínicos, evento foi definido ou como recorrência do tumor ou óbito por qualquer causa, o que ocorresse primeiro, no período de seguimento considerado, que foi até 20 de dezembro 2017. Sobrevida livre de evento (SLE) foi definida como o intervalo entre o TH e a ocorrência do evento ou término do período de seguimento.

Os casos de doenças autoimunes e metabólicas como causas da hepatopatia crônica foram poucos (n=6) e, portanto, não incluídos no estudo. Pacientes com dados muito incompletos (n=13) foram excluídos.

Esse estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais (CAAE – 44573615.7.0000.5149), conforme Anexo I, e consentimento informado foi obtido dos pacientes ou familiares (Apêndice A). Na Figura 2, um fluxograma sumariza os pacientes envolvidos no estudo. Nos apêndices B e C, estão os formulários utilizados para registro dos dados de cada paciente.

-
- 4- Rodríguez-Perálvarez M, Luong TV, Andreana L, Meyer T, Dhillon AP, Burroughs AK. A systematic review of microvascular invasion in hepatocellular carcinoma: diagnostic and prognostic variability. *Ann Surg Oncol*. 2013;20(1):325–339.
 - 5- Edmondson HA, Steiner PE. Primary carcinoma of the liver: a study of 100 cases among 48,900 necropsies. *Cancer* 1954; 7: 462.

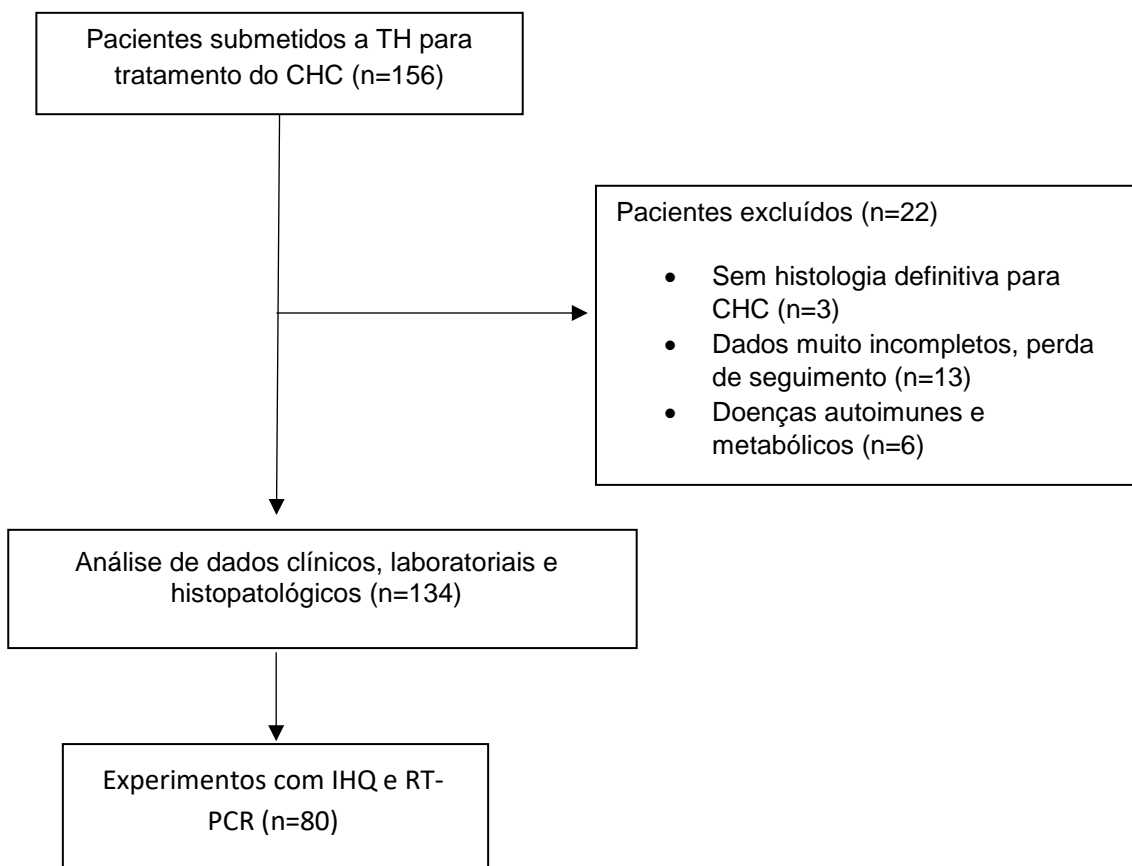


Figura 2 – Fluxograma do estudo. TH transplante hepático, CHC carcinoma hepatocelular, IHQ imunoistoquímica, RT-PCR *Reverse transcription polymerase chain reaction*

3.2 IMUNOISTOQUÍMICA

Arranjos em matriz de amostras teciduais (*tissue microarray*), técnica mundialmente reconhecida, na qual diferentes amostras são ordenadas no mesmo bloco parafinado, foram utilizados (6). Um corte circunferencial de 0,6 mm de espessura com representação da área do tumor de cada um dos 80 pacientes selecionados para análise, com cirrose adjacente sempre que possível, era posicionado em blocos de acordo com a etiologia da doença hepática crônica. Para identificação do início da sequência amostral, um controle era usado como referência (Figura 3).

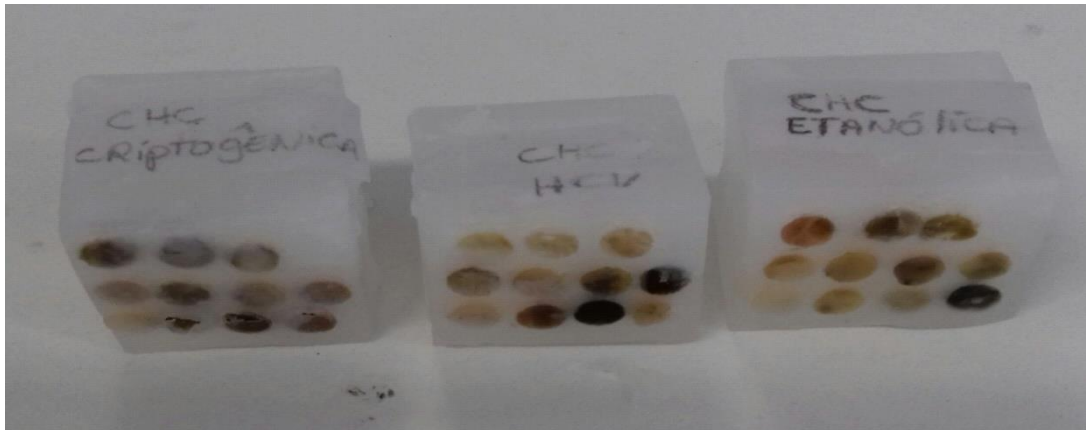


Figura 3 – Técnica de arranjo em matriz de amostras teciduais (*tissue microarray*). Cada bloco corresponde a cortes de diferentes pacientes, respectivamente das etiologias criptogênica, infecção pelo HCV e etanólica. Cada circunferência corresponde à representatividade do tumor contendo cirrose adjacente sempre que possível. HCV Vírus da hepatite C

Lâminas eram confeccionadas por meio de cortes de quatro micrômetros de espessura de cada bloco, colocadas na estufa a aproximadamente 56°C, desde a véspera do experimento. No dia seguinte, eram desparafinadas em xilol e reidratadas em álcool etílico 100% e 80%. A recuperação antigênica era realizada pelo aquecimento das lâminas a 96°C no vapor por 30 minutos em citrato de sódio 0,01M (pH 6,0), para lâminas nas quais seriam acrescentados os anticorpos anti-mTOR, PI3K e MEK, e em EDTA 1,0 mM pH 8.0 para os demais anticorpos. Para as próximas etapas, foi usado um *kit* comercial, o Novolink Polymer Detection Systems (Leica Biosystems, UK), que contém os reagentes das principais reações que se seguem.

O bloqueio da peroxidase era realizado com 400 µl da solução bloqueadora (Peróxido de hidrogênio 3-4%), por cinco minutos, com posterior lavagem em solução TRIS. Em seguida, era adicionada a mesma quantidade da solução de bloqueio da proteína (caseína 0,4% em tampão fosfato-salino [PBS]), também por cinco minutos, repetindo-se o processo de lavagem da etapa anterior, para evitar ligações não específicas de proteínas. Então, após nova

6- Andrade VP, Cunha IW, Silva EM et al. Tissue microarrays: high throughput and low cost available for pathologists. *J Bras Patol Med Lab* 2007; 43: 55-60.

lavagem, eram acrescentados os anticorpos primários (anti-KRAS, BRAF, MEK-1, ERK1/2, PI3K, AKT ou m-TOR), diluídos em PBS, de acordo com recomendações do fabricante (ver Tabela 1, com as especificações, diluição e tempo de incubação).

Tabela 1: Anticorpos primários, especificações, diluição e tempo de incubação usados da IHQ

Ac Primário	Especificações	Diluição	T. Incubação
KRAS	ABCAM, ab180772, Reino Unido	1:100	Noite inteira
BRAF	Santa Cruz Biotechnology, sc-900, EUA	1:200	Noite inteira
MEK-1	ABCAM, ab32091, Reino Unido	1:100	2 horas
ERK1/2	Santa Cruz Biotechnology, sc-135900, EUA	1:250	2 horas
PI3K	ABCAM, ab86714, Reino Unido	1:200	2 horas
AKT	ABCAM, ab8805, Reino Unido	1:500	30 min
mTOR	ABCAM, ab32028, Reino Unido	1:100	2 horas

Abreviaturas: IHQ imunoistoquímica, Ac. Primário anticorpo primário, T. Incubação tempo de incubação, min minutos.

As lâminas eram então incubadas por 30 minutos, em temperatura ambiente, com anticorpo secundário seguido do complexo terciário (anticorpo anti-IgG de coelho conjugado a Poli-*HRP*, complexo que tem atividade peroxidase), ambos por 30 min, sempre lavando com solução *TRIS* entre as incubações. A reação era revelada pelo emprego da solução cromógena diaminobenzidina líquida, por cinco minutos, e, finalmente, as lâmina eram contracoradas em solução de hematoxilina por um minuto, desidratadas em soluções com concentrações crescentes de etanol, diafanizadas em xilol e montadas. Controles negativos, nos quais os anticorpos primários eram omitidos, não mostraram marcação específica. Controles positivos eram obtidos de acordo com o manual de cada anticorpo primário.

A avaliação das lâminas no microscópio óptico foi realizada por dois patologistas experientes, que eram cegos em relação aos dados dos pacientes, e os resultados eram determinados

baseados na concordância entre eles. A expressão das proteínas foi graduada utilizando-se a adaptação de um escore previamente publicado (7), que integra intensidade e extensão da marcação de cada amostra por cada anticorpo (Tabela 2). Os casos – tumor e cirrose – foram categorizados de forma não pareada, em expressão ausente/fraca (escores 0 a 8), e expressão forte (escores 9 a 16).

-
- 7- Xu G, Zhang W, Bertram P, Zheng XF, McLeod H. Pharmacogenomic profiling of the PI3K/PTEN-AKT-mTOR pathway in common human tumors. *Int J Oncol* 2004; 24: 893-900

Tabela 2: Escore de graduação da expressão de proteínas por IHQ de acordo com a intensidade e extensão da marcação da amostra pelo anticorpo primário

Intensidade		Extensão	
0	Negativo	0	Negativo
1-2	Fraco	1	1-25%
3-4	Forte	2	26-50%
		3	51-75%
		4	76-100%
Pontuação Final		0-8	Expressão ausente/fraca
(Intensidade + Extensão):		9-16	Expressão forte

Abreviaturas: IHQ imuno-histoquímica. Extensão: refere-se à porcentagem de células marcadas na amostragem da lâmina

3.3 REVERSE TRANSCRIPTION POLYMERASE CHAIN REACTION (RT-PCR)

O RNA celular total era extraído de cortes de 6 µm da região tumoral de cada uma das amostras fixadas em bloco parafinado, utilizando o Kit RNeasy FFPE (Qiagen, 73504, Germany), de acordo com as recomendações do fabricante. A relação A260/A280 entre 1,8 e 2,0, medida no aparelho espectrofotômetro NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Technologies, USA), foi utilizada como critério de pureza do material, como habitualmente considerado nos estudos. Os ácidos nucleicos absorvem luz no comprimento de onda de 260 nm, enquanto as proteínas, no comprimento de 280 nm. Sendo assim, a relação A260/A280 fornece um parâmetro de avaliação da qualidade das preparações desse material.

Desse RNA extraído, alíquotas de 1,5 µg eram utilizadas para gerar a fita complementar de DNA por meio da transcrição reversa. Para isto, era utilizado o *kit* Superscript Vilo cDNA synthesis Master Mix kit (Invitrogen, 11766-050, USA), seguindo-se as recomendações contidas no manual do usuário. Em seguida, esse DNA era amplificado em tempo real, utilizando-se outro *kit* comercial, o SYBR Green PCR Supermix (Bio-Rad, USA), que

intercala reagentes fluorescentes na molécula de DNA. Nessa amplificação, é usado como molde 1 µl dos iniciadores (*primers*) (Ludwig Biotecnologia, Brasil), que são as sequências de interesse da região do DNA de cada gene especificado (Tabela 3). Essas reações eram realizadas em um aparelho termociclador, o Fast Real-Time PCR system (Applied Biosystems, USA), cuja leitura do padrão de liberação de fluorescência era obtida por meio do programa Bio-Rad software (Bio-Rad Laboratories, USA).

Tabela 3: Sequências dos iniciadores usados no estudo de RT-PCR

Identificação	Sequência
β -actina	5'-CATGTACGTTGCTATCCAGGC-3' (forward)
	5'-CTCCTTAATGTCACGCACGAT-3' (reverse)
GAPDH	5'-TTGCCATCAATGACCCCTTCA-3' (forward)
	5'-CGCCCCACTTGATTTTGGA-3' (reverse)
BRAF	5'-AAAATAGGTGATTTTGGTCTAGCTACAGA-3' (forward)
	5'-GACAACTGTTCAAAGTATGG-3' (reverse)
ERK-1	5'-CGCTTCCGCCATGAGAATGTC-3' (forward)
	5'-CAGGTCAGTCTCCATCAGGTCCTG-3' (reverse)
ERK2	5'-CGTGTTGCAGATCCAGACCATGAT-3' (forward)
	5'-TGGACTTGGTGTAGCCCTTGGAA-3' (reverse)
PI3K	5'-ATGGGGATGATTTACGGCAAGATA-3' (forward)
	5'-TTTCGCACCACCTCAATAAGTC-3' (reverse)
AKT	5'-CCCCCGAGGTGCTGGAGGACAAT-3' (forward)
	5'-AAGGGCAGGCGACCGCACATCAT-3' (reverse)
m-TOR	5'-GCTTGATTTGGTTCCCAGGACAGT-3' (forward)
	5'-GTGCTGAGTTTGCTGTACCCATGT-3' (reverse)

Abreviaturas: RT-PCR reverse transcription polymerase chain *reaction*, GAPDH gliceraldeído-3-fosfatase desidrogenase

As especificidades dos produtos amplificados eram analisadas por curva de dissociação (ou curva de *melting*, T_m), que demonstra a temperatura de dissociação da dupla fita de DNA quando o fluoróforo SYBR é liberado na desnaturação. Assim, sabe-se que amplificação das

amostras positivas ocorrem naquela T_m específica. Uma vez se tratando de uma curva específica, era então determinado o número de limiar de ciclos (Ct, do inglês *cycle threshold*), que é o número de ciclos necessários para o sinal de fluorescência ser emitido e ultrapassar um valor basal, acima do qual ocorre um crescimento exponencial da curva de amplificação (Figura 4a).

Por ser um método quantitativo relativo à amplificação de um gene de referência, foi testada a amplificação de dois genes habitualmente considerados nos estudos de PCR no CHC (8): gliceraldeído-3-fosfatase desidrogenase (GAPDH) e β -actina. Como não foi obtida curva representativa desta última para os experimentos com o grupo VHC, os valores de Ct foram, então, normalizados para os níveis de GAPDH (Figura 4b e c).

Os níveis de Ct são inversamente proporcionais à quantidade de ácido nucléico. Ou seja, o nível mais baixo de Ct relaciona-se à maior quantidade de ácido nucléico alvo na amostra. Dessa forma, para facilitar a leitura, a expressão relativa de mRNA era determinada por método comparativo com o nível de GAPDH em que, ao valor do Ct de cada *primer*, era subtraído o valor do Ct do GAPDH (ΔCt) e o resultado expresso na potência $2^{-\Delta Ct}$. Para cada amostra, os experimentos eram realizados em triplicatas, e o resultado expresso como média \pm erro padrão, em caso de distribuição normal (Gaussiana), ou mediana e intervalo interquartil caso os pressupostos para distribuição normal não fossem alcançados.

8- Fu LY, Jia HL, Dong QZ, et al. Suitable reference genes for real-time PCR in human HBV-related hepatocellular carcinoma with different clinical prognoses. BMC Cancer. 2009; 9:49.

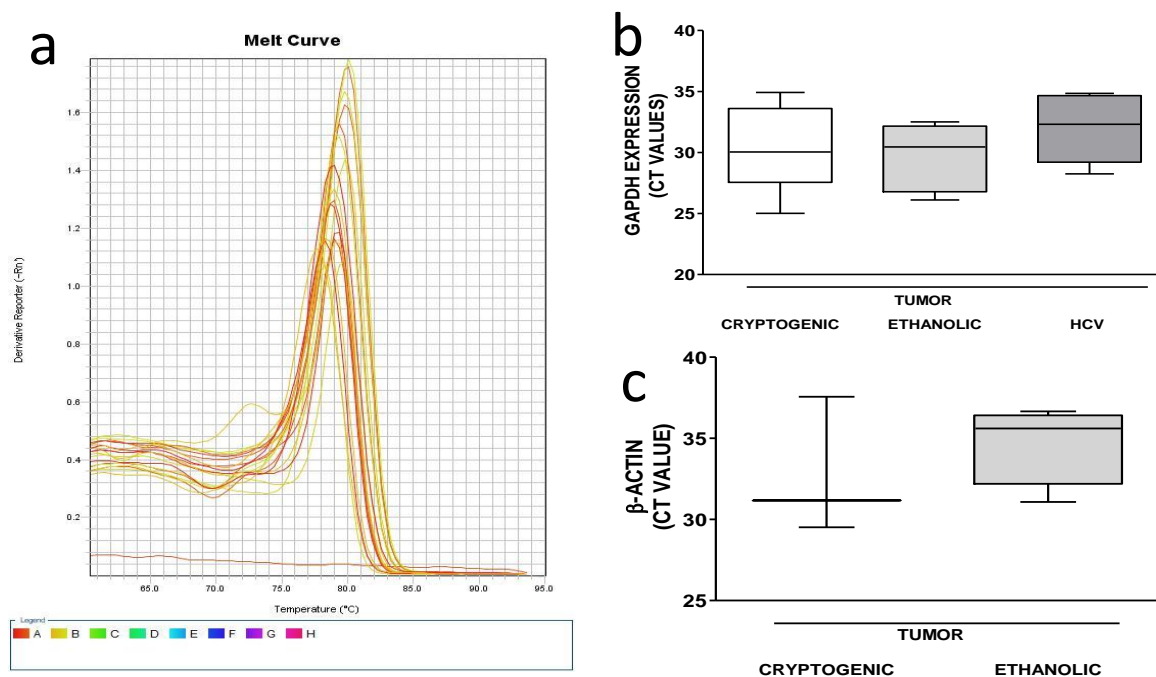


Figura 4: Curva de melting para o GAPDH e expressão de mRNA do GAPDH e β -actina no CHC, de acordo com a etiologia da hepatopatia crônica subjacente. a) curva de melting do GAPDH para exemplificar as análises realizadas para cada iniciador. Usando o software Bio-rad, foi avaliado o limiar de ciclos (Ct), definido como o número de ciclos requeridos para o sinal fluorescente ultrapassar um limiar determinado. b) expressão de mRNA do GAPDH (30,03 (27,55-33,60) n=8/10; 30,45 (26,78-32,16) n=8/9; 32,31 (29,20-34,65) n=10/11, p=0,24). c) expressão da β -actina (31,16 (29,51-) n=3/10; 35,60 (32,19-36,41) n=4/9, p=0,46). Dados foram expressos como mediana (intervalo interquartil), cada amostra em triplicatas, respectivamente para etiologias criptogênica, etanólica e infecção pelo HCV. n= número de amostras com marcação específica/número total de amostras analisadas. β -actina para o grupo HCV não está representada porque não foi identificada uma curva específica. Portanto, nos experimentos, a expressão relativa de mRNA de cada proteína estudada foi determinada pelo método de comparação normalizado para o nível de GAPDH. GAPDH gliceraldeído-3-fosfatase desidrogenase, HCV vírus da hepatite C, Ct limiar do ciclo.

3.4 ANÁLISES E ETAPAS DO ESTUDO

Inicialmente, um banco de dados foi construído com os parâmetros demográficos, clínicos, laboratoriais e histopatológicos de interesse para cada paciente submetido a TH no HC/UFMG como abordagem do CHC durante o período considerado.

Os pacientes foram categorizados de acordo com a etiologia da hepatopatia crônica basal: infecção pelo VHB, VHC, consumo abusivo de álcool (também chamada de etiologia etanólica/alcoólica), e criptogênica. Comparações entre esses grupos foram realizadas, assim como considerando-se duas categorias: etiologia viral (HVC e HBV) e não viral (etanólico e criptogênico). Essa categorização em dois grandes grupos é baseada em características que aproximam essas etiologias, como a possibilidade de os dois vírus levarem diretamente ao CHC sem passar pelo estágio de cirrose em alguns pacientes.

Entre os dados analisados, alguns eram variáveis categóricas (gênero, diabetes, presença ou não de MIV, grau histológico – baixo ou alto, se preenche ou não os CM, CHILD – A, B ou C), outros, numéricas contínuas (idade, AFP, tamanho dos nódulos, hemoglobina, contagem de plaquetas, AST, ALT, FA, GGT, LDH), e ainda outros, numéricas categóricas, com base em classificações muito utilizadas na prática clínica. Entre estas, RNI (se $<1,8$; $1,8$ a $2,3$; ou $>2,3$), albumina ($<2,8$; $2,8-3,5$; $>3,5$), bilirrubina total (<2 ; $2-3$; >3), que são as categorias consideradas na classificação de CHILD, e ainda número de nódulos (1, 2, 3, 4 ou 5 nódulos; ou mesmo se ≤ 3 ou >3). No caso do escore MELD, em algumas situações, foi analisado como variável contínua ou categorizado como ≤ 22 , $22-29$, ou >29 , destacando a pontuação mínima que os portadores de CHC recebem ao entrar na lista para TH ortotópico.

Após comparar os grupos etiológicos para avaliar se eles diferiram entre si em relação a algum desses parâmetros, foram analisados os desfechos clínicos relevantes: ocorrência do evento, sobrevida livre de evento, além da análise isolada da taxa de recorrência. Novamente, eram realizadas comparações entre grupos para avaliar se alguma etiologia está associada a uma evolução clínica diferente. Além disso, foram realizadas análises multivariadas para identificar se eventuais parâmetros clínico-laboratoriais eram independentemente associados ao evento ou EFS, o que poderia ajudar, por exemplo, na melhor seleção de pacientes candidatos a TH

Após essas primeiras análises, foram então selecionados 80 pacientes de acordo com a etiologia (41 da etiologia viral, sendo 10 com infecção pelo VHB e 31 pelo VHC; e 39 não viral, sendo 20 da etiologia etanólica e 19 da criptogênica). Avaliações histológicas adicionais no fígado explantado em relação à presença de MIV e grau histológico foram realizadas, bem como análises da expressão de proteínas pela técnica de IHQ e experimentos de RT-PCR para quantificar a expressão de mRNA das proteínas das vias de sinalização intracelular

estudadas. A EF das proteínas analisadas foi comparada em relação ao tumor e cirrose adjacente, e entre tumores de etiologias viral e não viral.

Foi ainda avaliado se a EF dessas proteínas tem associação com algum parâmetro clínico-patológico ou laboratorial analisado, na tentativa de se identificar algum preditor dessa expressão. Por fim, em outra análise, foi avaliado se a EF de alguma das proteínas analisadas tem associação com o evento ou EFS, como forma de avaliar a expressão clínica desses achados moleculares.

3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A estatística descritiva foi utilizada para resumir e organizar os dados, utilizando o *software* SPSS, versão 20 (SPSS, Chicago, IL). Variáveis categóricas (nominais ou ordinais) eram expressas em números e porcentagens. Se quantitativas (discretas ou contínuas), eram expressas em medianas com intervalos interquartis, tendo em vista que a grande maioria não apresentava os pressupostos de distribuição normal de acordo com o teste de normalidade Shapiro-Wilk.

Para comparações de proporções entre grupos etiológicos, foi usado o teste Z ou exato de Fisher, como apropriado, em se tratando de variáveis categóricas. No caso das variáveis contínuas, o teste Mann Whitney (se dois grupos) ou Kruskal-Wallis (a partir de três grupos) foi empregado, considerando que não houve distribuição normal. Nas comparações múltiplas, a correção de Bonferroni foi aplicada quando necessária.

Nos experimentos com IHQ e RT-PCR, o tamanho amostral foi calculado usando o programa Minitab 17 Statistical Software (Minitab, USA). Como a frequência de expressão das proteínas das vias intracelulares estudadas ainda não é bem estabelecida na literatura, e pode existir diferenças geográficas refletindo o contexto genético para população estudada, foi realizado inicialmente um estudo piloto, com 10 pacientes de cada etiologia (VHB, VHC, etanólica e criptogênica). Baseado nesses dados iniciais, foi estimado pelo teste Z que o estudo iria requerer 36 pacientes em cada grupo etiológico (viral versus não viral) para um poder de 80% em detectar pelo menos 25% de diferença entre eles na expressão forte do KRAS pela IHQ, assumindo um nível de significância de 0.05. O cálculo foi baseado na expressão do KRAS porque foi a proteína que mostrou diferença significativa entre os grupos etiológicos no estudo piloto.

Para estimar a probabilidade de sobrevida, curvas de Kaplan-Meier foram construídas considerando-se as quatro etiologias separadamente, ou agrupadas em etiologia viral versus não-viral. O teste Log-Rank foi usado para comparar as curvas.

O modelo de regressão multivariada de Poisson com estrutura de covariância foi utilizado para determinar as características independentemente associadas ao evento, enquanto o modelo de regressão de COX para EFS. Variáveis significativamente associadas ao desfecho na análise univariada ($p < 0,20$) foram incluídas no modelo multivariado. Significância estatística foi assumida se $p < 0,05$.

Nos experimentos com RT-PCR, cada amostra foi avaliada em pelo menos três repetições independentes (triplicatas). Como a análise só foi possível em pequeno número de amostras e não houve distribuição normal, as análises estatísticas foram baseadas em mediana e intervalo interquartil, os resultados representados em gráficos *box-plot* e os testes estatísticos foram Mann-Whitney (se comparações entre dois grupos – viral e não viral) ou Kruskal Wallis (comparações entre três grupos etiológicos – HCV, etanólica e criptogênica). Os gráficos foram realizados no Software Prism (GraphPad 5.0, San Diego, CA).

4- ARTIGOS

4.1 ARTIGO 1

Title: Prediction of long-term outcome according to the etiology of underlying chronic liver disease in patients who underwent liver transplantation for hepatocellular carcinoma treatment

Authors: Paulo H. C. Diniz¹, Serena D. C. Silva¹, Paula V. T. Vidigal², Teresa C. A. Ferrari³

Affiliations and addresses:

¹Hospital das Clínicas, Serviço de Oncologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brasil.

²Departamento de Anatomia Patológica e Medicina Legal, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brasil.

³Departamento de Clínica Médica, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brasil.

Corresponding author: Dr. Paulo Henrique C. Diniz

Email: phdiniz@gmail.com

Phone: +55 31 34099746

Orcid

Teresa Cristina A. Ferrari - <https://orcid.org/0000-0001-9459-2294>

Paulo Henrique C. Diniz - <https://orcid.org/0000-0003-2016-5593>

Abstract

Purpose: Different etiologies of chronic liver disease (CLD) potentially lead to hepatocellular carcinoma (HCC) by multiple mechanisms that can be translated into clinical and prognostic features, including predictors of response to treatment modalities, such as liver transplantation (LT). Thus, we analysed clinical, laboratory and outcome parameters of patients with HCC related to different etiologies of CLD.

Methods: Demographic and clinical data from a cohort of 134 patients who underwent LT for HCC treatment at a referral center in Brazil were retrospectively selected and compared according to the etiological group of the underlying CLD. Event, defined as or tumor recurrence or death from any cause, and event-free survival (EFS) were analyzed.

Results: HCC etiology were hepatitis C virus infection (59, 61.5%), alcohol abuse (37, 27.6%), cryptogenic disorder (18, 13.4%), and hepatitis B virus infection (10, 7.5%). Model of End-Stage Liver Disease score was low (<22) in most patients (70.6%), and clinical and laboratory parameters were similar among the etiologic groups. Although LT was performed outside Milan Criteria in 33.3% of the subjects, recurrence was identified only in 10 (7.9%). Event occurred in 37 patients (28.5%), and median EFS were 75 months (range, 24-116 months). No demographic or laboratory parameters were independently associated with outcome.

Conclusion: Differences regarding clinical outcome among etiologic groups of CLD in HCC patients who underwent LT were not demonstrated and no predictor was identified.

Keywords: Hepatocellular carcinoma, liver transplantation, etiology, predictors

Introduction

Hepatocellular carcinoma (HCC), the fourth leading cause of cancer mortality in the world, is a complex and poorly understood disease [1,2]. It arises in the context of progressive underlying chronic liver disease (CLD) due to etiologies very common worldwide, as hepatitis B (HBV) and C virus (HCV) infection, excessive alcohol consumption, autoimmune hepatitis, nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD), inherited metabolic disorders and other non-identified etiologies, called cryptogenic [3].

Only 30-40% of all HCC are diagnosed at an early stage of the disease, for which there are potential curative treatment options, as liver transplantation (LT) [4]. In Europe and in the United States, nearly 25-35% of all LT are performed to treat HCC [5]. In Brazil, where the HCC incidence among patients under surveillance program is about 2.8% each year [6], there is a report stating a similar proportion – around 33% of LT [7].

After a period of unrestricted LT indications for treating HCC, the Milan criteria (MC) were introduced in 1996, and currently are a well-established predictor of HCC recurrence [8]. These criteria rely on imaging findings, and set restrictive limits based on size and number of tumors to select candidates for LT. Patients whose tumor burden is within the MC have a 4-year recurrence rate after transplantation of less than 10%, whereas it is about 41% for those with a tumor burden outside the MC [8].

However, the MC have some limitations, because the tumor biology, another important determinant of the risk of tumor recurrence after LT, is not taken into account [9]. Thus, it is necessary to identify other prognostic and predictive parameters of HCC recurrence. Some studies suggest that pre-LT serum levels of alpha-fetoprotein (AFP), a biomarker used for HCC surveillance and diagnosis, have prognostic utility in monitoring HCC patients treated with LT; however, the cutoff values have not yet been established [9]. Moreover, attempts have been made to determine other pathological features and relevant clinical data associated with HCC recurrence, but the results have not yet been validated [10,11].

As HCC is a heterogeneous disorder, with multiple etiologic factors [12], it is possible to suggest that there may be differences among the characteristics of the HCC patients as well as long-term outcomes. Therefore, this study aimed to investigate pre-LT clinical and laboratory parameters in patients with HCC related to different etiologies of CLD in a Brazilian population; correlate these findings with the risk of HCC recurrence; and

investigate if there is any clinical or laboratory marker that may improve the performance of the MC in predicting HCC recurrence after LT.

Methods

Cohort

Patients with HCC who underwent LT at Hospital das Clínicas, Universidade Federal de Minas Gerais, a Brazilian referral center, from 1998 to 2015, were identified (n=156). The protocol of this institution follows the International Working Party recommendations for HCC diagnosis [13]. All patients had archived formalin-fixed, paraffin-embedded tissue of the explanted liver. No histological review was specifically performed for this study, and patients without a definitive diagnosis of HCC (n=3) by histological examination or immunohistochemistry were not included in the database.

Demographic and clinical pre-LT data of each patient were retrospectively collected from the medical records. We searched for data regarding gender, age, etiology of the underlying CLD, as well as MELD (Model For End-Stage Liver Disease) and CHILD-Pugh scores – prognostic models that estimate the severity of underlying liver condition [14,15] – , number of nodules, size of the greatest nodules, MC determined according to pathologic examination of the explanted liver, diabetes, AFP levels, hemoglobin, international normalized ratio (INR), serum albumin, bilirubin, liver enzymes (aspartate aminotransferase [AST], alanine aminotransferase [ALT], gamma-glutamyltransferase [GGT], alkaline phosphatase [AF]) and lactate dehydrogenase (LDH). As there were only a few cases (n=6) of CLD caused by autoimmune and metabolic disorders, they were not included in the study.

In this study, event was considered as tumor recurrence or death from any cause. If the patient presented both occurrences, only the first event was counted. Event-free survival (EFS) was defined as the time interval between the LT date and the occurrence of the event or ending of the follow-up period. Information was also obtained from the medical records or, if necessary, the patient or his/her family was assessed by phone. The end date of the follow-up was December 20, 2017. Patients with very incomplete data (n=13) were excluded (Fig. 1).

This study was approved by the Ethics Committee of the Universidade Federal de Minas Gerais (CAAE – 44573615.7.0000.5149), and written informed consent was obtained from the patients or their relatives.

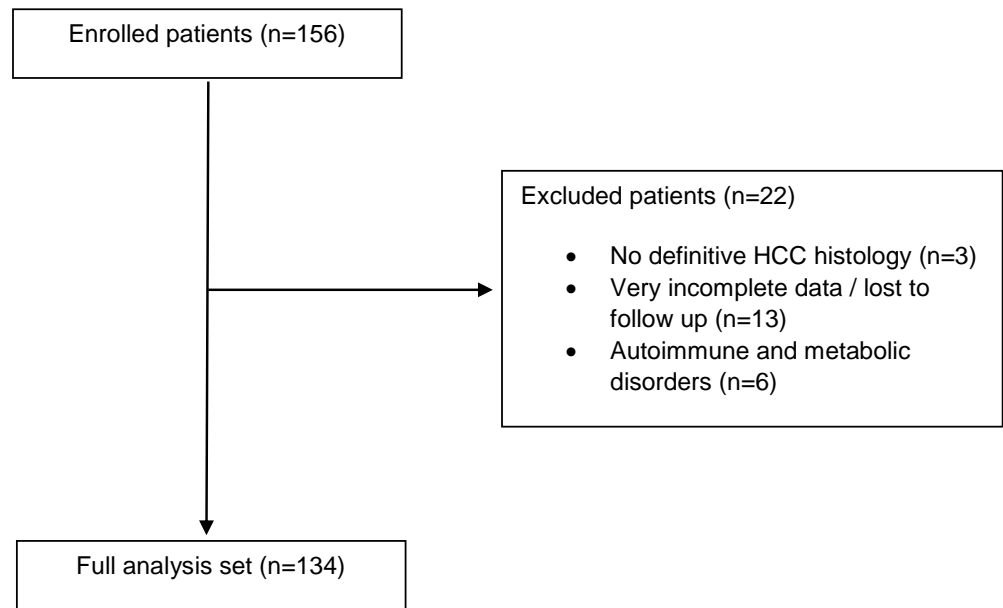


Fig. 1 Study diagram flow. Abbreviation: HCC hepatocellular carcinoma

Statistical analysis

Descriptive statistics were used to summarize the data. A normality test (Shapiro-Wilk) was performed for each continuous variable. Categorical data are presented as numbers and percentages, and continuous data are expressed as medians and interquartile range (IQR). Categorical variables were compared between groups of the four most common etiologies of underlying CLD (ethanolic, B or C viral hepatitis, or cryptogenic), using the chi-square test or the Fisher's exact test, as appropriate. For the comparison of the continuous data, we used the Mann Whitney test or the Kruskal-Wallis test, as appropriate. In multiple comparisons, Bonferroni correction was applied when necessary.

Kaplan-Meier curves were constructed to estimate the probability of surviving considering the four etiological groups and the two main categories (viral and non-viral groups). The Log-Rank test was used to compare the curves. Cox regression model was performed to determine the characteristics that were independently associated with EFS. Demographic and clinical variables that were significantly associated with the events in univariate analysis ($p < 0.20$) were included in the multivariate model. Statistical significance was assumed at $p < 0.05$. Statistical analysis was carried out using SPSS software, version 20 (SPSS, Chicago, IL).

Results

Patients' demographic and laboratory characteristics according to the CLD etiology are summarized in Table 1. Among the 134 patients analyzed, HCC was related to HCV infection in 59 (61.5%), alcohol abuse in 37 (27.6%), cryptogenic disorder in 18 (13.4%), and in 10 (7.5%) to HBV infection. The median follow-up period was 53 months (range 1-97 months).

Even though the MC were used to select LT candidates to treat HCC, in 41 of the 123 (33.3%) patients for whom this information was available, the procedure was performed outside these criteria. A total of 26/126 (20.6%) patients underwent LT despite having four or more nodules. The median size of the biggest liver nodule was 2.7 cm (range, 2-4 cm). The great majority (70.6%) of the patients underwent LT with a MELD score below 22, and only in 15 of 113 individuals (13.3%), the cirrhosis was CHILD-Pugh C. Median AFP serum levels were 12 ng/mL (range, 4.9-58.6 ng/mL). No significant difference concerning AFP levels was found between the four etiologic groups in which the patients were categorized.

Comparing the demographic and laboratory parameters between these groups, the variables were well balanced, apart from gender ($p=0.02$), and hemoglobin ($p=0.004$), AST ($p=0.001$) and ALT ($p<0.001$) levels, as shown in Table 1. HCC due to alcoholic liver disease were more common in men (97.3% of all cases assigned to this etiology), while in women, the main etiology was HCV infection (30.4%). Hemoglobin levels were lower in the patients with alcoholic liver disease (12.1 g/dL) than in those of the HCV (13.5 g/dL, $p=0.001$) and HBV groups (14.7 g/dL, $p=0.018$), but severe anemia was not found. Both AST and ALT serum concentrations were lower in the alcohol group (respectively, 52 U/L and 32.5 U/L) than in the HCV group (91.5 U/L, $p<0.001$ and 75 U/L, $p<0.001$). Also, in the cryptogenic group, ALT was lower (39.5 U/L) than in the HCV group (75 U/L, $p<0.01$).

In the HBV group, none of patients analyzed had diabetes, but, despite of that, there was no significant difference between the etiologic groups ($p=0.192$) concerning the presence of this condition. Considering all the etiologic groups, diabetes was present in 37 (31.9%) of the patients.

Table 1 Demographic and laboratorial characteristics according to CLD etiology

Variables		All etiologies	HCV	HBV	Alcohol	Cryptogenic	<i>p</i> -value
N (%)		134 (100.0)	59 (61.5)	10 (7.5)	37 (27.6)	18 (13.4)	
Age (years)		57.7 (52.0-63.0)	57.0 (51.5-61.5)	56.5 (40.5-63.5)	57.0 (51.5-63.5)	62.5 (47.5-66.2)	0.066
Gender	F	27 (20.1)	21 (35.5) ^a	1.0 (10.0)	1 (2.7)	4.0 (22.2)	0.020
	M	107 (79.9)	38 (64.5)	9 (90.0)	36 (97.3) ^a	14.0 (77.8)	
MELD	≤22	84/119 (70.6)	42 (71.2)	5/9 (55.6)	24/33(72.7)	13 (76.4)	0.682
	23-29	33/119 (27.7)	16 (27.1)	4/9 (44.4)	9/33 (27.3)	4 (23.5)	
	> 29	2/119 (1,7)	1 (1,7)	0/9 (0)	0/33 (0)	1 (5,6)	
CHILD	A	49/113 (43.4)	27/53 (50.9)	6/9 (66.7)	11/34 (32.4)	5/17 (29.4)	0.202
	B	49/113 (43.4)	22/53 (41.5)	2/9 (22.2)	17/34 (50.0)	8/17 (47.1)	
	C	15/113 (13.3)	4/53 (7.5)	1/9 (11.1)	6/34 (17.6)	4/17 (23.5)	
AFP (ng/ml)		12.1 (4.9-58.6)	17.0 (6.7-72.4)	19.4 (3.2-694.0)	6.1 (4.1-43.7)	8.5 (4.6-79.6)	0.421
Number of nodules	1	63/126 (50.0)	25/58 (43.1)	6 (60.0)	21 (56.8)	8 (44.4)	0.571
	2	28/126 (22.2)	15/58 (25.9)	2 (20.0)	5 (13.5)	6 (33.3)	
	3	9/126 (7.1)	6/58 (10.3)	0 (0.0)	3 (8.1)	0 (0.0)	
	4	12/126 (9.5)	5/58 (8.6)	0 (0.0)	6 (16.2)	1 (5.6)	
	5	14/126 (11.1)	7/58 (12.1)	2 (20.0)	2 (5.4)	3 (16.7)	
Size biggest nodule (cm)		2.7 (2.0-4.0)	3.0 (2.05-3.85)	2.8 (1.75-4.25)	2.5 (1.5-3.3)	3.2 (1.0-5.0)	0.411
MC	Yes	82/123 (66.7)	38/58 (65.6)	7 (70.0)	26 (70.3)	11 (61.1)	0.890
	No	41/123 (33.3)	20/58 (34.4)	3 (30.0)	11 (29.7)	7 (38.9)	
Hb (g/dL)		13.0 (11.9-14.4)	13.5 (12.7-14.6)	14.7 (12.8-15.7)	12.1 ^a (11.3-13.2)	12.4 (10.7-14.4)	0.004
Platelets (x10 ³)		82.0 (61.0-109.0)	73.0 (54.2-100.0)	102.5 (57.5-107.5)	82.5 (55.5-110.2)	99.5 (66.7-128.0)	0.325
INR	<1,8	100/117 (85.4)	50/56 (89.3)	9/9 (100.0)	26/34 (76.4)	15 (83.3)	0.428
	1,8-2,3	11/117 (9.4)	5/56 (8.9)	0/9 (0.0)	4/34(11.8)	2 (11.1)	
	>2,3	5/117 (4.2)	1/56 (1.8)	0/9 (0.0)	4/34 (11.8)	1 (5.6)	

Bilirrubin (mg/dL)	<2 (%)	61/113 (54.0)	31/53 (58.5)	6/9 (66.7)	15/33 (45.5)	9 (50.0)	0.766
	2-3	32/113 (28.3)	14/53 (26.4)	2/9 (22.2)	12/33 (36.4)	4 (22.2)	
	(%)	20/113 (17.7)	8/53 (15.1)	1/9(11.1)	6/33 (18.6)	5 (27.8)	
	>3 (%)						
Albumin (g/dL)	<2.8	29/115 (25.2)	11/54 (20.4)	2/9 (22.2)	11/34 (32.4)	5 (27.8)	0.694
	2.8-3.5	46/115 (40.0)	23/54 (42.6)	2/9 (22.2)	14/34 (46.2)	7 (38.9)	
	>3.5	40/115 (34.8)	20/54(37.0)	5/9 (55.6)	9/34 (26.5)	6 (33.3)	
AST (U/L)		71.0 (45.0-104.0)	91.5 (58.5-138.2)	50.0 (41.0-80.5)	52.0 ^a (33.5-78.8)	54.5 (41.8-91.8)	0.001
ALT (U/L)		55.0 (32.7-82.7)	75.0 (54.0-102.5)	51.0 (42.0-70.5)	32.5 ^a (24.0-55.0)	39.5 ^a (29.8-61.3)	<0.001
Alkaline phosphatase (U/L)		152.5 (104.0- 234.0)	140.0 (101.5- 213.5)	174.0 (77.0-283.0)	153.0 (106.2- 253.7)	206.5 (129.2-283.5)	0.247
GGT (U/L)		121.0 (83 -211)	126.0 (89.5-209.5)	132.0 (78.5-245.5)	104.5 (60.5- 130.75)	146.5 (88.7-377.0)	0.057
LDH (U/L)		436.0 (324.0-586.0)	441.5 (327.7- 618.2)	410.0 (316.0-736.0)	426.0 (300.0- 566.0)	495.0 (35.05-660.0)	0.803
Diabetes	Não	79/116 (68.1)	39 (66.1)	7/7 (100.0)	20/33 (60.6)	13/17 (76.5)	0.192
	Sim	37/116 (31.9)	20 (33.9)	0/7 (0.0)	13/33 (39.4)	4/17 (23.5)	

Data are expressed as absolute numbers (percentage), or median (interquartile range). Number of patients with the characteristic/number for whom the information was available. HBV hepatitis B virus; HCV hepatitis C virus; F Female; M Male; MELD Model for End-Stage Liver Disease; CHILD CHILD-Pugh score; MC Milan criteria; Hb Hemoglobin; AFP alpha-fetoprotein; AST aspartate aminotransferase; ALT alanine aminotransferase; GGT gamma-glutamyltransferase; LDH lactate dehydrogenase. ^aRefers to statistically significant difference.

Globally, as displayed in Table 2, disease recurrence was identified in 10 (7.9%) of 127 patients, although it may also have occurred in patients who died, without being recognized. Clinically evident recurrence followed by death was observed in six patients. The event rate was 28.5% (37 recurrence or death for any cause of 130 patients analyzed).

Four patients lost to follow up. Events seemed to be more frequent in the HCV group, in which 20 (54%) of all recurrences or deaths were observed. Nevertheless, there was no significant difference between the etiologic groups ($p=0.690$).

Table 2 Clinical outcomes according to CLD etiology

Variables	All etiologies	HCV	HBV	Alcoholic	Cryptogenic	<i>P</i> -value
Recurrence	10/127 (7.9%)	8/63 (12.7%)	1/10 (10.0%)	1/36 (2.8%)	0/18 (0.0%)	0.173
Event	37/130 (28.5%)	20/65 (30.8%)	4/10 (40.0%)	9/37 (24.3%)	4/18 (22.2%)	0.690
EFS (months)	75 (24.0-116.0)	87.5 (35.5-122.8)	60.5 (6.0-99.0)	69 (26.2-96.2)	76 (1.5-113.5)	0.228

Data are expressed as absolute numbers (percentage) and median (interquartile range). Number of patients with analyzed outcome/number for whom the information was available. HBV hepatitis B virus; HCV hepatitis C virus; EFS event-free survival.

On survival analysis, the median EFS was 75 months (range, 24-116 months). The overall rate of EFS at 12 and 24 months was 83.1% and 82.2%, respectively. Analyzing the four etiologic groups, the Kaplan-Meier curve (Fig. 2) showed overlap of the curves ($p=0.665$). The same was seen when the patients were classified in viral and non-viral etiologic groups, as showed in Fig. 3.

No demographic or laboratory variables, including the MC, were found to be related to the risk of event, as demonstrated in both univariate and multivariate analysis (Table 3).

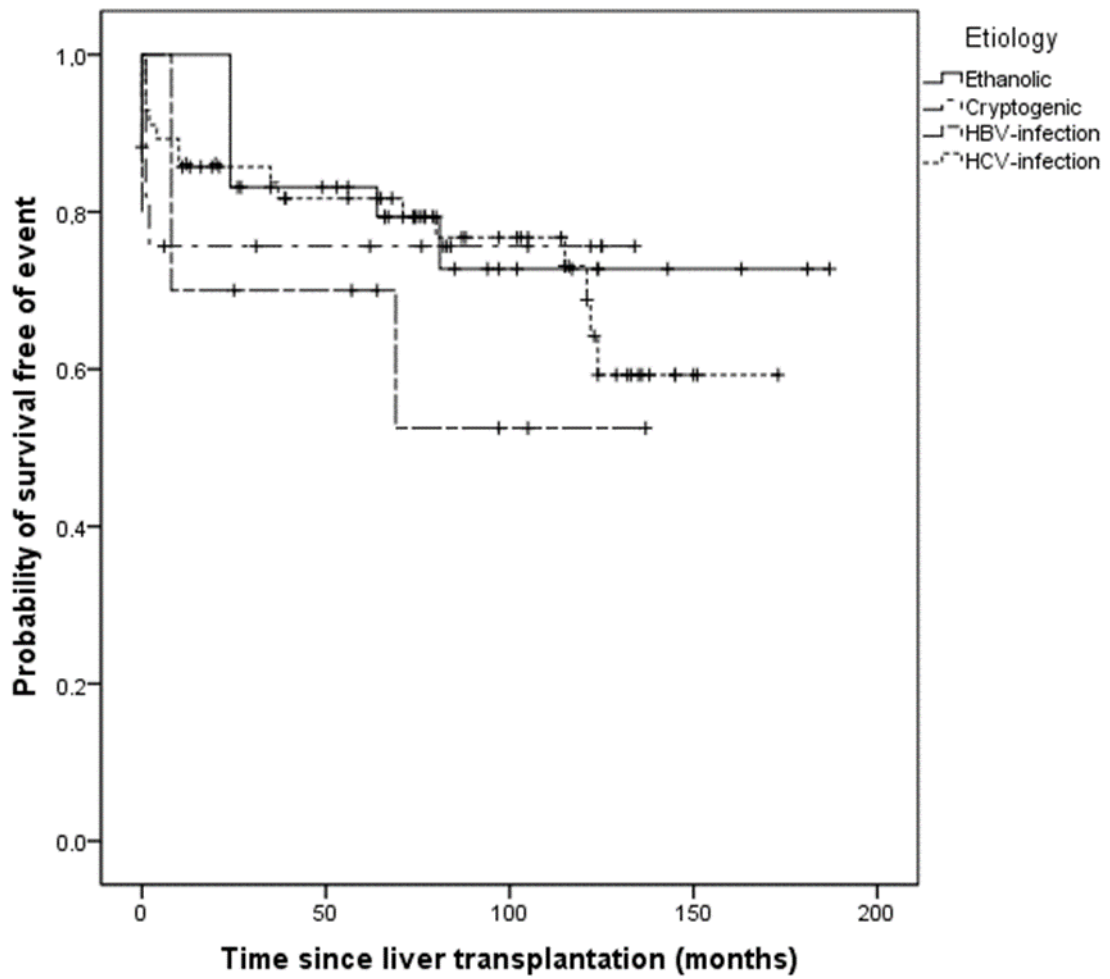


Fig. 2 Comparison of Kaplan-Meier curves among four etiologic groups of hepatocellular carcinoma underlying chronic liver disease

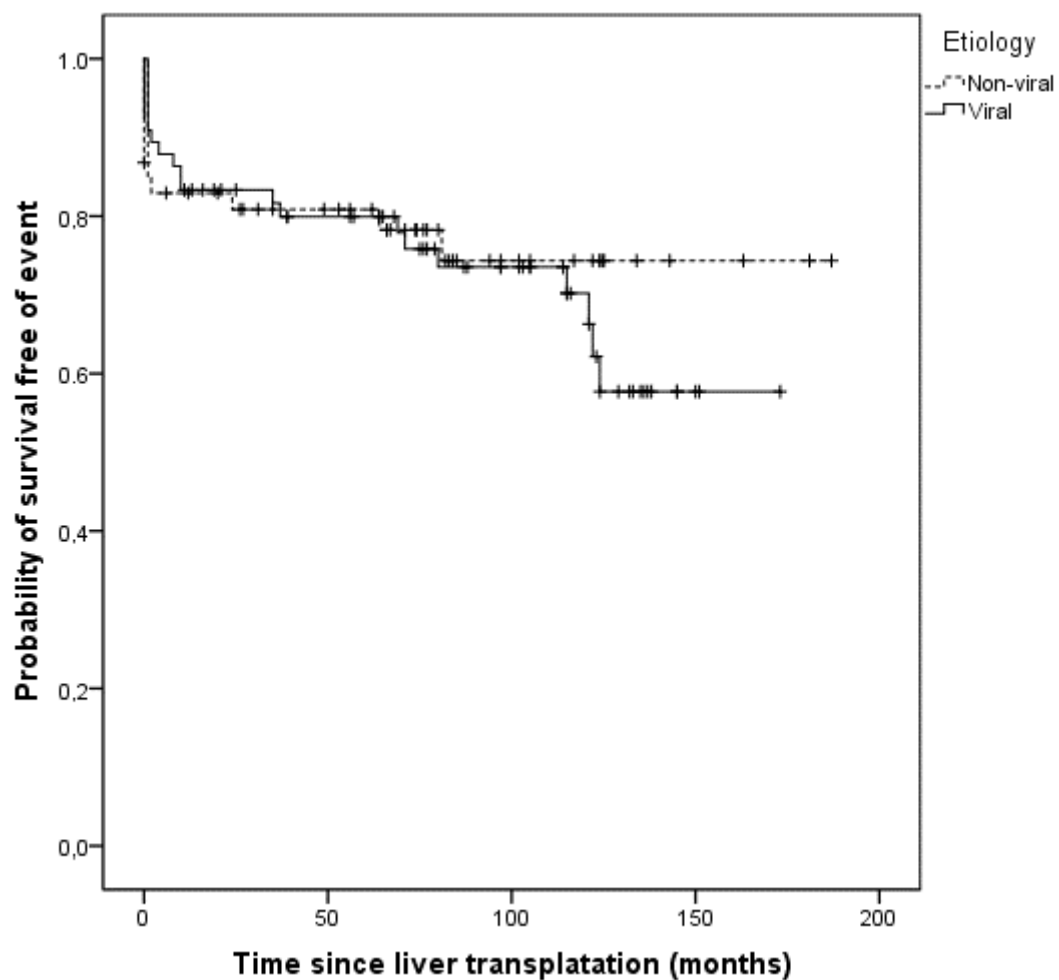


Fig. 3 Comparison of Kaplan-Meier curves between viral and non-viral etiologic-groups of hepatocellular carcinoma underlying chronic liver disease

Table 3 Correlation between clinicolaboratorial parameters and EFS survival

Variable	Univariate analysis		Multivariate analysis	
	HR (95% CI)	p-value	HR (95% CI)	p-value
Hb	0.97 (0.93-1.01)	0.241		
LDH	1.00 (0.99-1.01)	0.090	1.00 (0.99-1.01)	0.168
AST	1.00 (0.99-1.03)	0.124	1.00 (1.00-1.03)	0.180
GGT	1.00 (0.99-1.00)	0.467		
MELD	0.94 (0.77-1.15)	0.593		
CHILD	1.10 (0.85-1.41)	0.455		
MC	1.17 (0.95-1.44)	0.124	1.23 (0.97-1.55)	0.070
Etiology	0.91 (0.76-1.08)	0.278		

HR hazard ratio; CI confidence interval; Hb haemoglobin; MELD Model for End-Stage Liver Disease; CHILD CHILD-Pugh score; AFP alpha-fetoprotein; AST aspartate aminotransferase; ALT alanine aminotransferase; GGT gamma-glutamyltransferase; LDH lactate dehydrogenase; MC Milan criteria

Discussion

In this study, we found no significant differences in HCC recurrence or mortality profile among patients who underwent LT for treating HCC in the comparison of the four major etiologic groups of underlying CLD. Moreover, similarities on demographic, clinical and laboratory pre-LT parameters were observed among these four etiologic groups. These similarities, especially the comparable severity of the underlying liver condition among the groups, could be responsible, at least partially, for failing to identify any predictor of recurrence.

Despite refined selection criteria and advances in preoperative staging, recurrence of HCC after LT is yet an unsolved issue. There are several studies showing different rates of recurrence (range 6.4-18.3%) [16-23]. One explanation for this difference could be the time spent on transplant waiting list. In regions where this time is short, the LT may be performed in candidates with aggressive tumor biology, for whom high recurrence rates are expected [11]. In contrast, in regions where the waiting time is longer, tumor with aggressive biology could progress beyond the MC, and, thus, LT is not performed [11]. Our findings showed at

least 7.5% of disease recurrence, which is comparable to the findings of the United Network for Organ Sharing database [23]. It is important to highlight that the median follow-up period in our study was about 53 months.

As recurrence may also have occurred in patients who died without being counted, we defined tumor recurrence or death as events. We found no difference regarding EFS among the etiologic groups. On the other hand, when EFS at 12 and at 24 months were compared, we demonstrated that most events occurred within the first year of LT, and after that, a plateau tended to be reached. Therefore, it is possible to conclude that many deaths could not be ascribed to HCC-recurrence, but to non-cancer related causes, such as LT complications, which are expected to occur within the first months of the procedure.

The MC is the most useful tool to select HCC patients for LT, and recurrence is more frequent in those outside these criteria. Although at our institution LT is indicated only for patients fulfilling the MC (preoperative imaging with a single lesion <5 cm or up to three lesions ≤ 3 cm), our study showed that 33.3% of the patient who underwent LT for HCC treatment were, indeed, outside the MC. One possible explanation for this finding is the long time in the waiting list for cadaveric organ donation, when oligoprogression of the disease could occur. Despite of that, the MC was not associated with any differences in EFS in our investigation. It is worthy to highlight that MC is based on imaging methods, and, in the present study, the lesions were counted and measured by pathologic examination of the explanted liver. Thus, our patients were classified according to MC considering the pathological information. It is known that the sensitivity for identifying HCC preoperatively by computed tomography and magnetic resonance imaging has limitations, especially for lesions smaller than 1 cm in diameter [24,25]. Therefore, some lesions may have been missed by these imaging methods or variation in their diameter could have occurred. These possibilities must have influenced our results, because MC was validated based on imaging parameters [25].

The MC is considered a good predictor of tumor response to therapy, but have limitations, and attempts have been made to identify clinical variables that may distinguish patients at higher risk of recurrent disease after LT [9-11]. Some studies showed a higher recurrence risk in patients with AFP >200 ng/mL, even inside the MC [9,26]. In addition to this well recognized predictor, we analyzed other demographic and laboratory parameters such as age, hemoglobin levels, INR, liver enzymes, and presence of diabetes, and found no predictor of HCC recurrence. Despite women were more likely to have HCV etiology and excessive alcohol intake were the most common etiology in men, hemoglobin levels were a

bit lower in the alcohol group, and some small differences between the groups were observed regarding aminotransferases concentrations, these factors did not translate into clinical significance.

HCC is a heterogeneous disease and the multiple etiologic factors involved can lead to the cancer development by different mechanisms [27]. Thus, it may have distinctions in biologic behavior which can translate into clinical outcomes. Retrospective analysis of sorafenib phase III studies in advanced HCC demonstrated that HCV-positive patients had greater benefits from the treatment, comparing to other etiologies [28,29]. The phase II study EVOLVE-1 did not demonstrate any benefit from the mTOR inhibitor everolimus on the treatment of advanced HCC, and the tumor heterogeneity was pointed as a possible explanation for the poor performance of target therapies [30]. However, concerning the etiology of the underlying CLD, our study showed no difference in EFS. Furthermore, despite 54% of all events have occurred in the HCV-group, the comparison of the event frequency among the groups was not statistically significant, even when grouped as viral and non-viral groups.

It is necessary to highlight that our study was conducted in patients who were candidates for LT, which means that the disease was not as advanced as in the above-mentioned studies. Therefore, it is possible to speculate that different biologic behavior could not translate into clinical outcomes in early disease stage. In 2007, a study conducted in patients with a similar profile showed that cryptogenic cirrhosis was more common in those with recurrent HCC, but this finding was limited because of the small sample size [10].

An important and well-recognized aspect of HCC needs to be mentioned. Liver cirrhosis causes a significant impact on functional liver reserve and is a determinant of the morbidity and mortality associated with HCC [31]. Thus, we assessed the severity of the underlying CLD by the CHILD Pugh score [15], and more than 80% of our patients had scores A or B, indicating that the cirrhosis was not so severe. No significant differences between the etiologic groups were seen. This can contribute to explain the EFS relatively long. Moreover, the MELD score [14], a score used to allocate patients in the waiting listing for a cadaveric organ according to the severity of cirrhosis, was also analyzed. The great majority of the patients had scores ≤ 22 and no differences between the groups were noted. In the HBV-group, only five (55.6%) of nine patients had scores below this level suggesting more severe liver dysfunction in this group; however, it included a limited number of patients and the comparison with the other etiologic groups did not reach statistical significance. In

Brazil, candidates for LT for HCC treatment receive a special MELD score [7]; thus, this is not a good criterion to assess the severity of the underlying CLD.

Despite of being a single center and a retrospective study that may harbor selection and information bias, this is an important cohort in which long-term outcomes of LT for treatment of HCC in a poor-income country were evaluated. As geographic variation in biologic and molecular behaviors of HCC as well as in etiology of the underlying CLD may exist, studies like this bring important contribution to elucidate the complexity of the disease. Considering patients who underwent LT, future studies correlating clinical and laboratory parameters with molecular features are possible because in these patients the tumor specimens are available, unlike most HCC-patients in which the diagnosis was based on non-histologic criteria.

Other limitation of our investigation is the reduced number of patients in the HBV-group. Since the implementation of HBV-vaccination by the Brazilian public health system as well as the improved access to antiretroviral treatment, HBV infection has decreased in our country [32]. Finally, HCC due to NAFLD was not considered as a separated group, but probably is included in cryptogenic group. This condition was only recognized as an etiology of HCC more recently and the exact prevalence of HCC in cirrhotic NAFLD remains unknown [33].

Although the multiples etiologies of CLD and HCC heterogeneity may be determinant factors of response to LT for HCC treatment, our results did not demonstrate any difference regarding the etiology of the CLD and EFS in HCC patients treated with LT. More studies are needed to identify biomarkers with predictive value to overcome the limitations of MC in predicting outcome and to contribute to appropriate selection of HCC patients for this modality of treatment.

Compliance with ethical standards

Conflict of interest: All authors declare that there are no financial conflicts associated with this study.

References

- 1- Global Burden of Disease Liver Cancer Collaboration, Akinyemiju T, Abera S, Alam N et al (2017) The Burden of Primary Liver Cancer and Underlying Etiologies from 1990 to 2015 at the Global, Regional, and National Level: Results from the Global Burden of Disease Study. *JAMA Oncol* 3:1683-1691. <http://dx.doi.org/10.1001/jamaoncol.2017.3055>
- 2- Abou-Alfa GK (2013) Enhancing Clinical Outcomes in Hepatocellular Carcinoma. *Semin Liver Dis* 33(S1):S1-S2. <http://dx.doi.org/10.1055/s-0033-1333630>
- 3- Yang JD, Harmsen WS, Slettedahl SW, Chaiteerakij R, Enders FT, Therneau TM, Orsini L, Kim WR, Roberts LR (2011) Factors that affect risk for hepatocellular carcinoma and effects of surveillance. *Clin Gastroenterol Hepatol* 9:617-623. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cgh.2011.03.027>
- 4- Heimbach JK, Kulik LM, Finn RS, Sirlin CB, Abecassis MM, Roberts LR, Zhu AX, Murad MH, Marrero JA (2018) AASLD Guidelines for the Treatment of Hepatocellular Carcinoma. *Hepatology* 67:358-380. <http://dx.doi.org/10.1002/hep.29086>
- 5- Ioannou, GN, Perkins JD, Carithers, RL et al (2008) Liver transplantation for hepatocellular carcinoma: impact of the MELD allocation system and predictors of survival. *Gastroenterology* 134:342-135. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2008.02.013>
- 6- Paranaguá-Veloso DC, Onu SK, Alvarado-Mora MV, Alvarado-Mora MV, Farias AQ, Cunha-Silva M, França JI, Alves VA, Sherman M, Carrilho FJ. (2014) Epidemiology of HCC in Brazil: incidence and risk factors in a ten-year cohort. *Ann Hepatol* 13(4):386-93.
- 7- Sá GP, Vicentine D, Salzedas-Netto FP, Salzedas-Netto AA, Matos CA, Romero LR, Tejada DF, Massarollo PC, Lopes-Filho GJ, Gonzalez AM et al (2016) Liver transplantation for carcinoma hepatocellular in Sao Paulo: 414 cases by the Milan/Brazil Criteria. *ABCD, Arq. Bras. Cir. Dig* 29:240-245. <http://dx.doi.org/10.1590/0102-6720201600020010>
- 8- Mazzaferro V, Regalia E, Doci R, Andreola S, Pulvirenti A, Bozzetti F, Montalto F, Ammatuna M, Morabito A, Gennari L. (1996) Liver transplantation for the treatment of small hepatocellular carcinomas in patients with cirrhosis. *N Engl J Med* 334:693-699. <http://dx.doi.org/10.1056/NEJM199603143341104>

- 9- Clavien PA, Lesurtel M, Bossuyt PM, Gores GJ, Langer B, Perrier A; OLT for HCC Consensus Group (2012). Recommendations for OLT for HCC Consensus Group. Recommendations for liver transplantation for hepatocellular carcinoma: an international consensus conference report. *Lancet Oncol* 13:e11-e22. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(11\)70175-9](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(11)70175-9)
- 10- Partiff JR, Marotta P, AlGhamdi M, Wall W, Khakhar A, Suskin NG, Quan D, McAllister V, Ghent C, Levstik M, McLean C, Chakrabarti S, Garcia B, Driman DK (2007) Recurrent Hepatocellular Carcinoma after Transplantation: Use of a Pathological Score on Explanted Livers to Predict Recurrence. *Liver Transpl* 13:543-551. <https://doi.org/10.1002/lt.21078>
- 11- Sharma P, Welch K, Hussain H, Pelletier SJ, Fontana RJ, Marrero J, Merion RM (2012) Incidence and risk factors of hepatocellular carcinoma recurrence after liver transplantation in the MELD era. *Dig Dis Sci* 57:806-812. <https://doi.org/10.1007/s10620-011-1910-9>
- 12- Colombino M, Sperlongano P, Izzo F, Tatangelo F, Botti G, Lombardi A, Accardo M, Tarantino L, Sordelli I, Agresti M, Abbruzzese A, Caraglia M, Palmieri G (2012) BRAF and PIK3CA genes are somatically mutated in hepatocellular carcinoma among patients from South Italy. *Cell Death Dis* 19:e259. <https://doi.org/10.1038/cddis.2011.136>
- 13- International Working Party (2009) Pathologic diagnosis of early hepatocellular carcinoma: a report of the international consensus group for hepatocellular neoplasia. *Hepatology* 49:658–664. <https://doi.org/10.1002/hep.22709>
- 14- Kamath PS, Wiesner RH, Malinchoc M, Kremers W, Therneau TM, Kosberg CL, D'Amico G, Dickson ER, Kim WR (2001). A model to predict survival in patients with end-stage liver disease. *Hepatology* 33:464. <https://doi.org/10.1053/jhep.2001.22172>
- 15- Pugh RN, Murray-Lyon IM, Dawson JL, Pietroni MC, Williams R (1973) Transection of the oesophagus for bleeding oesophageal varices. *Br J Surg* 60:646.
- 16- Regalia E, Fassati LR, Valente U, Pulvirenti A, Damilano I, Dardano G, Montalto F, Coppa J, Mazzaferro V (1998) Pattern and management of recurrent hepatocellular carcinoma after liver transplantation. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 5:29-34.
- 17- Roayaie S, Schwartz JD, Sung MW, Emre SH, Miller CM, Gondolesi GE, Krieger NR, Schwartz ME (2004). Recurrence of hepatocellular carcinoma after liver

- transplant: patterns and prognosis. *Liver Transpl* 10:534-540. <https://doi.org/10.1002/lt.20128>
- 18- Shimoda M, Ghobrial RM, Carmody IC, Anselmo DM, Farmer DG, Yersiz H, Chen P, Dawson S, Durazo F, Han S, Goldstein LI, Saab S, Hiatt J, Busuttil RW (2004). Predictors of survival after liver transplantation for hepatocellular carcinoma associated with hepatitis C. *Liver Transpl* 10:1478-1486. <https://doi.org/10.1002/lt.20303>
 - 19- Hemming AW, Cattral MS, Reed AI, Van Der Werf WJ, Greig PD, Howard RJ (2001) Liver transplantation for hepatocellular carcinoma. *Ann Surg* 233(5): 652-659.
 - 20- Leung JY, Zhu AX, Gordon FD, Pratt DS, Mithoefer A, Garrigan K, Terella A, Hertl M, Cosimi AB, Chung RT (2004) Liver transplantation outcomes for early stage hepatocellular carcinoma: results of a multicenter study. *Liver Transpl* 10:1343-1354. <https://doi.org/10.1002/lt.20311>
 - 21- Margarit C, Charco R, Hidalgo, Allende H, Castells L, Bilbao I (2002) Liver transplantation for malignant diseases: selection and pattern of recurrence. *World J Surg* 26:257-263. <https://doi.org/10.1007/s00268-001-0214-1>
 - 22- Zavaglia C, De Carlis L, Alberti AB, Minola E, Belli LS, Slim AO, Airolidi A, Giacomoni A, Rondinara G, Tinelli C, Forti D, Pinzello G (2005) Predictors of long-term survival after liver transplantation for hepatocellular carcinoma. *Am J Gastroenterol* 100:2708-16. <https://doi.org/10.1111/j.1572-0241.2005.00289.x>
 - 23- Yoo HY, Patt CH, Geschwind JF, Thuluvath PJ (2003) The outcome of liver transplantation in patients with hepatocellular carcinoma in the United States between 1988 and 2001: 5-year survival has improved significantly with time. *J Clin Oncol* 21:4329-35. <https://doi.org/10.1200/JCO.2003.11.137>
 - 24- Libbrecht L, Bielen D, Verslype C, Vanbeckevoort D, Pirenne J, Nevens F, Desmet V, Roskams T (2002). Focal lesions in cirrhotic explant livers: pathological evaluation and accuracy of pretransplantation imaging examinations. *Liver Transpl* 8:749-761. <https://doi.org/10.1053/jlts.2002.34922>
 - 25- Sotiropoulos GC, Malago M, Molmenti E, Paul A, Nadalin S, Brokalaki E, Kühl H, Dirsch O, Lang H, Broelsch CE (2005). Liver transplantation for hepatocellular carcinoma in cirrhosis: is clinical tumour classification before transplantation realistic? *Transplantation* 79:483-487.

- 26- Chaiteerakij R, Zhang X, Addissie BD, Mohamed EA, Harmsen WS, Theobald PJ, Peters BE, Balsanek JG, Ward MM, Giama NH, Moser CD, Oseini AM, Umeda N, Venkatesh S, Harnois DM, et al (2015) Combinations of Biomarkers and Milan Criteria for Predicting Hepatocellular Carcinoma Recurrence After Liver Transplantation. *Liver Transpl* 21: 599–606. <https://doi.org/10.1002/lt.24117>
- 27- Ghouri YA, Mian I, Rowe JH (2017) Review of hepatocellular carcinoma: Epidemiology, etiology, and carcinogenesis. *J Carcinog* 16:1. <https://doi.org/10.4103/jcar>.
- 28- Jackson R, Psarelli EE, Berhane S, Khan H, Johnson P (2017) Impact of Viral Status on Survival in Patients Receiving Sorafenib for Advanced Hepatocellular Cancer: A Meta-Analysis of Randomized Phase III Trials. *J Clin Oncol* 35:622-628. <https://doi.org/10.1200/JCO.2016.69.5197>
- 29- Bruix J, Raoul JL, Sherman M, Mazzaferro V, Bolondi L, Craxi A, Galle PR, Santoro A, Beaugrand M, Sangiovanni A, Porta C, Gerken G, Marrero JA, Nadel A, Shan M, et al (2012). Efficacy and safety of sorafenib in patients with advanced hepatocellular carcinoma: subanalyses of a phase III trial. *J Hepatol* 57:821-829. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2012.06.014>
- 30- Zhu AX, Kudo M, Assenat, E, Cattani S, Kang YK, Lim HY, Poon RT, Blanc JF, Vogel A, Chen CL, Dorval E, Peck-Radosavljevic M, Santoro A, Daniele B, Furuse J, et al (2014). Effect of everolimus on survival in advanced hepatocellular carcinoma after failure of sorafenib: the EVOLVE-1 randomized clinical trial. *JAMA* 312(1):57-67. <https://doi.org/10.1001/jama.2014.7189>
- 31- Shiani A, Narayanan S, Pena L, Friedman M (2017) The Role of Diagnosis and Treatment of Underlying Liver Disease for the Prognosis of Primary Liver Cancer. *Cancer Control* 24(3). <https://doi.org/10.1177/1073274817729240>
- 32- Dutra SFJ (2016) Distribution of hepatitis B infection in Brazil: the epidemiological situation at the beginning of the 21st century. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 49(1): 11-23. <http://dx.doi.org/10.1590/0037-8682-0176-2015>
- 33- Baffy G, Brunt EM, Caldwell, SH (2012) Hepatocellular carcinoma in non-alcoholic fatty liver disease: An emerging menace. *J Hepatol* 56(6):1384-91. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhep.2011.10.027>

4.2 ARTIGO 2

Title: MAPK and PI3K/AKT/mTOR pathway proteins expression and correlation with clinicopathological indices and long-term outcomes according to the etiology of chronic liver disease in hepatocellular carcinoma

Authors: Paulo H. C. Diniz¹, Serena D. C. Silva¹, Paula V. T. Vidigal², Marcelo A. P. Xavier², Cristiano X. Lima³, Teresa C. A. Ferrari⁴

Affiliations and addresses:

¹Hospital das Clínicas, Serviço de Oncologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brasil.

²Departamento de Anatomia Patológica e Medicina Legal, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brasil.

³Departamento de Cirurgia, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brasil

⁴Departamento de Clínica Médica, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brasil.

Corresponding author: Dr. Paulo Henrique C. Diniz

Email: phdiniz@gmail.com

Phone: +55 31 34099746

Orcid

Teresa Cristina A. Ferrari - <https://orcid.org/0000-0001-9459-2294>

Paulo Henrique C. Diniz - <https://orcid.org/0000-0003-2016-5593>

Abstract

Background: Different etiologies of chronic liver disease (CLD) potentially lead to hepatocellular carcinoma (HCC) by multiple mechanisms that can be translated into clinicopathological and prognostic differences. We evaluated the expression of proteins of the MAPK and PI3K/Akt/mTOR pathways, important signalling cascades in HCC, and investigated their association with clinical and histopathological parameters, as well as long-term outcome, according to the etiology of the CLD.

Methods: Clinical, laboratory and histological data from 80 patients who underwent liver transplantation (LT) for HCC treatment at a Brazilian referral center were compared according to the CLD etiological group. Event (tumor recurrence or death from any cause) occurrence and event-free survival (EFS) were analyzed. Expression of proteins in tumor and adjacent cirrhosis were evaluated by immunohistochemistry (IHQ), and RT-PCR was performed in tumoral tissue to quantify gene expression.

Results: Pathway proteins were often expressed in tumors. Strong expression (SE) of KRAS was more frequent in tumor arising from hepatopathy of the viral (26.8%) than non-viral (NV) group (7.7%, $p=0.024$) or cirrhosis (0%, $p=0.004$). SE of PI3K, in both etiological groups, was more frequent in tumor than in cirrhosis ($p=0.048$ and $p<0.01$), but its occurrence was similar among tumors from the different etiological groups ($p=0.111$). mRNA of ERK 1 and 2, PI3K and BRAF were expressed in tumors, without difference among the etiologic groups neither association with IHQ findings. Greater age and presence of microvascular invasion (MIV) were independently associated with event occurrence. MIV was also associated with shorter EFS. There was association between number of nodules and KRAS expression, but no protein expression was associated with event or EFS.

Conclusion: Our data suggest that HBV and HCV can lead to HCC by different mechanisms comparing to NV etiology. Moreover, KRAS and PI3K could have a role in carcinogenesis, given their stronger expression in tumor than in cirrhosis. As there were no differences in clinical outcomes, prognostic and therapeutic implications need to be established.

1- Introduction

Hepatocellular carcinoma (HCC), whose incidence has risen over the last 20 years in many countries, has still a dismal prognosis and nowadays ranks the fourth as the leading cause of cancer death worldwide.¹ This complex and heterogeneous malignancy is caused by chronic liver disease (CLD) of different etiologies, which show a huge geographic variation: hepatitis B virus (HBV), hepatitis C virus (HCV), excessive alcohol consumption, autoimmune disorders, nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD), inherited metabolic disorders and other non-identified etiologies, called cryptogenic.²

Hepatocarcinogenesis is poorly understood, but it is recognized as a multistep process in which several pathways can cooperate.³ Among them, regulators of cell proliferation and survival – represented by growth and angiogenic factors and their receptors, and several oncogenes and intracellular signaling pathways – stand out.⁴ Interestingly, different causes of the underlying CLD may induce diverse oncogenic mechanisms and some of these pathways can be related to specific etiologies.^{5,6}

The mitogen-activated protein kinase (MAPK) cascade and the PI3K/Akt/m-TOR are the best characterized and more frequently activated intracellular pathways in HCC, suggesting a possible role in carcinogenesis.^{4,7} The first one has been shown to be activated in up to 51% of HCC, and data points toward its universal activation in advanced stages.⁶ Concerning mTOR pathway activation, it has been shown to range from 15 to 41% in HCC,⁹⁻¹² and is associated with aggressive tumor behaviour and decreased survival.¹³

Downstream signalling can be transduced by a sequence of phosphorylation events in the MAPK (RAS/RAF/MEK/ERK) and PI3K/Akt/m-TOR pathways, which ends in activation of transcription factors that translocate to the nucleus.¹⁴ These factors modify the expression of proteins involved in important cellular processes, including proliferation, differentiation, apoptosis, cell cycle progression, cell death, tumorigenesis, tumor growth and angiogenesis.¹⁵ Originally modelled as linear signalling conduits activated by different stimuli, these important pathways might intersect to regulate each other and co-regulate other functions.¹⁶

Despite the frequent involvement of these intracellular pathways in HCC, mutations related to the activation of these proteins are rare – may be identified in <2% in some cases – and additional mechanisms of this activation remain to be identified.³ Moreover, variations associated with the etiology of the underlying CLD and among different regions of the world have been described.¹⁷ Considering evidence available to date, the increased activity of these

pathways seems to result especially from mechanisms that intensify their interaction with growth factor receptors, such as epidermal growth factor receptor (EGFR), c-Met, and fibroblast growth factor receptors (FGFR).¹⁸

Different etiologies of the underlying CLD potentially lead to HCC by diverse mechanisms. Recognizing how it occurs and how it can be translated into clinicopathological and prognostic differences could contribute to improve patient care. In this study, we evaluated the expression MAPK pathway and PI3K/Akt/mTOR proteins in HCC, and investigated their association with clinical and histopathological parameters, and long-term outcome, according to the etiology of the CLD.

2- Methods

Cohort

From 1998 to 2015, 156 patients underwent orthotopic liver transplantation (OLT) for HCC-treatment at Hospital das Clínicas, Universidade Federal de Minas Gerais, a referral center in Brazil. Of these, 80 were aleatory selected according to the most frequent CLD etiology: 41 viral (10 HBV, 31 HCV infections), 39 non-viral (20 alcohol abuse and 19 cryptogenic). All patients had archived formalin-fixed, paraffin-embedded (FFPE) tissue of the explanted liver.

Demographic and clinical pre-OLT data of each patient as well as histopathologic parameters of the explanted liver were retrospectively collected from the medical records. We searched for data regarding gender, age, etiology of the underlying CLD, as well as MELD (Model For End-Stage Liver Disease) and CHILD-Pugh scores (CHILD) – prognostic models that estimate the severity of underlying liver condition^{19,20} –, pre-OLT serum levels of alpha-fetoprotein (AFP), number of nodules, size of the greatest nodules, microvascular invasion (MIV) and histologic grade as outlined by Edmondson and Steiner.²¹

Regarding clinical outcome, event was considered as death from any cause or tumor recurrence since OLT, what happened first. Event-free survival (EFS) was defined as the time interval between the OLT date and the occurrence of the event or ending of the follow-up period (December 20, 2017). If necessary, the patient or his family was assessed by phone.

This study was approved by the local Ethics Committee (CAAE – 44573615.7.0000.5149), and written informed consent was obtained from the patients or their relatives.

Immunohistochemistry

Tissue microarrays, a worldwide well accept technique in which different samples are ordered in the same paraffin blocks, were constructed as previously described.²² A representative 0.6mm core of FFPE tumor samples were taken from each of the 80 HCC-patients selected, with adjacent cirrhotic liver tissue whenever it was possible, and placed in blocks according to the etiologic group of CLD.

Four-micrometer paraffin sections were dried overnight at 56°C and then deparaffinized in xylene for 20 minutes, followed by rehydration through graded alcohols. For antigen retrieval, sections were immersed in 10.0mM citrate pH 6.0 (for mTOR, PI3K, MEK) or EDTA 1.0mM pH 8.0 (for the other antibodies) and heated to 96°C in vaporizer steamer for 30 min. The next steps were proceeded using a Novolink Polymer Detection Systems kit (Leica Biosystems, United Kingdom), according to manufacturer's recommendations.

Briefly, the endogen peroxidase were blocked using 400µL of hidrogen peroxide 3% solution, then rinsed in TRIS-HCl buffered saline (TRIS) (0.05M, pH 10.0). Nonspecific protein binding was blocked with 400µL protein block (casein 0,4% diluted in phosphate buffered saline [PBS]). Then, the sections were incubated with the appropriate primary antibody (KRAS, BRAF, MEK-1, ERK1/2, PI3K, AKT or m-TOR), according to the manual instructions (see Table S1 for specifications). After washing in Tris-HCl buffer, the sections were incubated at room temperature with biotinylated secondary antibody and Poly-HRP (horseadish peroxidase) conjugated to anti-rabbit-IgG, both steps for 30 min. The reactions were revealed by applying 3,3'-diaminobenzidine in chromogenic solution (DAB), and, finally, the sections were counterstained with hematoxylin (Fisher Scientific, USA), dehydrated in alcohols in progressive concentrations, and mounted. Negative controls, in which primary antibodies were omitted, showed no specific staining. The positive control was assessed as indicated in the user manual of each primary antibody.

Evaluation of tissue array slides on optical microscope was performed by two experienced pathologists, who were blinded regarding patient details, and the results were determined based on their agreement. The used scoring system, integrating intensity and extent of staining for every sample and every antibody, was adapted from previously publication.²³ Intensity of staining was scored as 0 (negative), 1-2 (weak), or 3-4 (strong). The extent of staining was scored according to the amount of positive tumour cells: 0 (negative), 1 (1-

25%), 2 (26-50%), 3 (51-75%), and 4 (76-100%). The final score of each sample and each antibody, separately for tumour and adjacent cirrhosis, was assessed by summarizing the result of intensity and extent of staining. Thereafter, each case was finally categorized in weak expression (score 0-8) and strong expression (score 9-16). Sections are exemplified in Figures S1 and S2.

Real time PCR

Total cellular RNA was extracted from six-micrometer paraffin sections of tumoral region of PPFE blocks using RNeasy FFPE Kit (QIAGEN, 73504, Germany), according to manufacturer's recommendations. The relation A260/A280, measured in a NanoDrop ND-1000 spectrophotometer (NanoDrop Technologies, USA), between 1.8 to 2.0 was considered as purity criteria. cDNAs were generated by reverse transcribing from 1.5µg RNA using the Superscript Vilo cDNA synthesis Master Mix kit (Invitrogen, 11766-050, USA), following the instructions of the user manual. Quantitative real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) were conducted with SYBR Green PCR Supermix (Bio-Rad) using PCR primers (Ludwig Biotechnologia, Brazil) on a Fast Real-Time PCR system (Applied Biosystems, USA). Melting curve analyses were performed to evaluate the primer specificities. The results – expressed in cycle threshold (Ct), defined as the number of cycles required for the fluorescent signal to cross the threshold (i.e. exceeds background level) - were normalized to the level of *Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)* and there were three technical replicates per sample (see supplementary information, Figure S3). Relative mRNA expression was determined by the comparative Ct method using Bio-Rad software (Bio-Rad). The sequences of the primers used in the study are on Table S2.

Statistical analysis

Descriptive statistics were used to summarize the data, which are expressed as numbers and percentages (categorical), and as medians and interquartile range (IQR) (continuous). A normality test (Shapiro-Wilk) was performed for each continuous variable. For comparison between the etiological groups, we used the Z test or the Fisher's exact test, as appropriate, if categorical variables, and the Mann Whitney test or the *Kruskal-Wallis* test, as appropriate, if continuous data. In multiple comparisons, Bonferroni correction was applied as necessary.

Using Minitab 17 Statistical Software (Minitab, Pennsylvania, USA), we estimated by Z test that the study would require 36 patients in each etiologic group (viral vs. non-viral etiology) to have 80% power to detect at least 25% of difference in high expression of KRAS in immunohistochemistry (IHC) staining, assuming a significance level of 0.05.

Multivariate Poisson regression model with covariance structure was performed to determine the characteristics that were independently associated with event; and COX regression model for EFS. Variables significantly associated with the endpoint in univariate analysis ($p < 0.20$) were included in the multivariate model. Statistical significance was assumed at $p < 0.05$. Statistical analysis was carried out using SPSS software, version 20 (SPSS, Chicago, IL).

RT-PCR data presented here, represent at least three independent experiments and are expressed median (interquartile range), as the samples were independent and did not have normal distribution. Statistical analysis was also performed with the Mann-Whitney test (for comparison between two groups) and the Kruskal-Wallis test (for comparison among three etiologic groups – cryptogenic, ethanolic and HVC), using Prism software (GraphPad 5.0, San Diego, CA). Comparisons were also performed between viral and non-viral group, but data was not showed.

3- Results

Clinicopathological indices and clinical outcomes according to CLD etiology

Patients' demographic, clinical, laboratory and histopathological characteristics according to the CLD etiology are summarized in Table 1. The groups were well balanced, except for alcohol abuse, predominant etiology in men, and HCV infection, main etiology in women. Patients in the HCC cryptogenic-related group were slightly older (median 63 years, range 57-67).

The great majority of the patients were CHILD-Pugh score A (43.2%) or B (28.4%) and the median MELD score was 20 (range 16-24). Median AFP was 14.7ng/ml, but with a considerable variation among the patients (range 5.9-72.4). In the explanted liver, more than three nodules were identified in 17 (21.3%) patients; the histologic grade was high in 21 of 73 patients (28.7%); and microvascular invasion was present in 26 of 71 patients (31.3%). Considering these variables, which point to poor prognosis, differences among the etiologic groups were not found.

Regarding clinical outcomes, as shown in Table 2, no differences among etiologic groups were demonstrated. The event rate was 38% (27 recurrences or deaths for any cause among 71 patients analysed). Analysing only HCC-recurrence, it was found in five of 71 individuals (7%), although it may also have occurred in patients who died. The median EFS was 75.4 months (range, 8.5-105.2), without difference among etiologic group, even when analysis was performed considering viral and non-viral etiologic group (data not shown).

Table 1: Demographic, clinical and histopathological characteristics of HCC patients according to CLD etiology

Characteristics		All etiologies	Viral group (n= 41)		Non-Viral group (n=39)		p-value
			HBV	HCV	Alcohol	Cryptogenic	
N (%)		80 (100.0)	10 (12.5)	31 (38.8)	20 (25.5)	19 (23.7)	NA
Age[€]		58.0 (52.0-64.0)	56.0 (38.8-60.4)	56.0 (51.0-62.0)	58.5 (52.0-63.7)	63.0* (57.0-66.8)	0.023
Gender[£]	F	20 (25.0)	1 (10.0)	12 (38.7)*	1 (5.0)	6 (31.6)	0.021
	M	60 (75.5)	9 (90.0)	19 (61.3)	19 (95.0)*	13 (68.4)	
MELD[€]		20.0 (16-24)	21 (20-28)	20 (14-26)	20 (17-23)	20 (17-22)	0.760
CHILD[£]	A	29/67 (43.2)	6/8 (75.0)	13/25 (52.0)	5/19 (26.3)	5/15 (33.3)	0.205
	B	19/67 (28.4)	1/8 (12.5)	8/25 (32.0)	6/19 (31.6)	4/15 (26.7)	
	C	19/67 (28.4)	1/8 (12.5)	4/25 (16.0)	8/19 (42.1)	6/15 (40.0)	
AFP (ng/ml)[€]		14.7 (5.87-72.4)	14.1 (3,17-585.2)	25.1 (8.2-73.6)	14.2 (5.3-64.3)	7.4 (4.4-94.3)	0.421
N° of nodules[£]	≤3	58/75 (77.3)	8/9 (88.9)	23/30 (76.7)	16 (80)	11/16 (68,8)	0.751
	>3	17/75 (22.7)	1/9 (11.1)	7/30 (23.3)	4 (20)	5/16 (31.3)	
Size of biggest nodule (cm)[€]		2.8 (2.0-3.5)	2.8 (1.7-5.2)	2.5 (2.1-3.5)	2.6 (2.0-3.4)	3,25 (2.5-5.0)	0.411
Histologic grade[£]	Low	52/73 (71.2)	8 (80.0)	17/28 (60.6)	12/18 (66.7)	15/17 (88.2)	0.221
	High	21/73 (28.7)	2 (20.0)	11/28 (39.3)	6/18 (33.3)	2/17 (11.8)	
MIV[£]	No	45/71 (63.3)	9 (90)	14/27 (51.9)	11/17 (64.7)	11/17 (64.7)	0.166
	Yes	26/71 (36.7)	1 (10)	13/27 (48.1)	6/17 (35.3)	6/17 (35.3)	

Data are expressed as absolute numbers (percentage) and median (interquartile range). Number of patients with the characteristic/number for whom the information was available. Abbreviations: NA not applicable, HCC hepatocellular carcinoma, CLD chronic liver disease, HBV hepatitis B virus, HCV hepatitis C virus, F female, M male, MELD Model For End-Stage Liver Disease, CHILD Child-Pugh classification, AFP alpha-fetoprotein, MIV microvascular invasion. * refers to statistically significant difference, £ Exact Fischer test € Kruskal Wallis test

Table 2: Clinical outcome in HCC patients according to CLD etiology

Criteria	All etiologies	Viral group		Non-Viral group		p-value
		HBV	HCV	Alcohol	Cryptogenic	
Recurrence (%)	5/71 (7.0)	1/10 (10.0)	3/27 (11.1)	1/20 (5.0)	0/14 (0)	0.635
Event (%)	27/71 (38.0)	4/10 (40.0)	11/27 (40.7)	5/20 (25.0)	7/14 (50.0)	0.509
Median EFS (months) (range)	74.5 (8.5-105.2)	41.0 (2.5-99.0)	87.0 (39.0-120.2)	75.5 (38.5-100.7)	34.0 (0.0-109.2)	0.470

Data are expressed as absolute numbers (percentage) and median (interquartile range). Number of patients with the characteristic/number for whom the information was available. Abbreviations: HCC Hepatocellular carcinoma, CLD Chronic liver disease, HBV Hepatitis B virus, HCV Hepatitis C virus, EFS Event-free survival. Event was defined as recurrence or death from any cause since liver transplantation. No statistically significant difference was found. Exact Fisher test was used.

Expression of MAPK and PI3K/AKT/m-TOR pathway proteins according to CLD etiology

The strong expression (SE) of the analysed pathway proteins according to the etiologic group, both in tumor and in adjacent cirrhosis, is described in Table 3 and 4, and summarized in Figures 1 and 2. In the viral group, 11 of 41 patients (26.8%) had SE of K-RAS in tumor, comparing to 0/33 (0%) in underlying cirrhosis ($p=0.008$) and 3/39 (7.7%) in non-viral group HCC ($p=0.024$). There was no difference between K-RAS SE in tumor and cirrhosis in the non-viral group ($p=1.000$). Regarding SE of PI3K, there was difference between tumor and adjacent cirrhosis: 14/39 (35.9%) vs. 3/27 (11.1%) in the viral etiologic group ($p=0.048$), and 21/30 (53.8%) vs. 8/33 (24.2%) in the non-viral group ($p<0.001$); but no difference was observed when comparing only the tumor of both etiologic groups ($p=0.111$).

SE of the other proteins was often present, but differences regarding the expression profile, considering tumor and adjacent cirrhosis as well as the etiologic groups, were not demonstrated.

In order to analyze quantitatively the mRNA expression of pathways proteins, RT-PCR was performed in tumoral tissue and data were shown in Figure 3. Expression of mRNA of *BRAF*, *PI3K*, *ERK1* and *ERK 2* was demonstrated, but differences among the etiologic groups were not found, even when the etiologies were categorized in non-viral and viral

groups (data not shown). Protein could not be extracted from FFPE tumor samples of HBV etiology and analyses were not performed. Only in a few numbers of samples, there were specific mRNA amplification (n=number of samples with specific expression/number of samples analyzed). The samples were also tested for AKT and m-TOR primers, but no specific amplification could be demonstrated. Therefore, analyses were not performed.

Table 3: Strong expression of MAPK pathway proteins in HCC patients both in tumor and adjacent cirrhosis according to CLD etiology

Etiology	K-RAS			B-RAF		
	Tumor n (%)	Cirrhosis n (%)	p-value	Tumor n (%)	Cirrhosis n (%)	p-value
Viral	11/41(26.8)	0/33 (0.0)	0.004*	7/40 (17.5)	3/32 (9.4)	0.755
N-viral	3/39 (7.7)	2/34 (5.9)	1.000	11/39 (28.2)	8/30 (26.6)	1.000
p-value	0.024*	0.049*		0.257	0.075	

Etiology	MEK			ERK-1/2		
	Tumor n (%)	Cirrhosis n (%)	p-value	Tumor n (%)	Cirrhosis n (%)	p-value
Viral	2/41 (4.9)	1/32 (3.1)	1.000	7/32 (21.9)	2/32 (6.3)	0.150
N-viral	2/39 (5.1)	0/32 (0.0%)	0.563	6/32 (18.8)	0/30 (0.0)	0.390
p-value	1.000	1.000		0.756	0.492	

Data are expressed as absolute numbers/total of samples analyzed (percentage). Abbreviations: N-viral non-viral, MAPK Mitogen Activated Protein Kinases, HCC hepatocellular carcinoma, CLD chronic liver disease. * refers to statistically significant difference. Exact Fisher test was used.

Table 4: Strong expression of PI3K/AKT/m-TOR pathway proteins in HCC patients both in tumor and adjacent cirrhosis according to CLD etiology

Etiology	PI3K			AKT			m-TOR		
	Tumor n (%)	Cirrhosis n (%)	p-value	Tumor n (%)	Cirrhosis n (%)	p-value	Tumor n (%)	Cirrhosis n (%)	p-value
Viral	14/39 (35.9)	3/27 (11.1)	0.048*	16/41 (39.0)	14/35 (40.0)	1.000	10/41 (24.4)	6/32 (18.8)	0.769
Non-Viral	21/30 (53.8)	8/33 (24.2%)	<0.001*	15/39 (38.5)	15/29 (51.7)	0.399	6/39 (15.4)	4/32 (12.5)	1.000
p-value	0.111	0.315		0.959	0.348		0.314	0.491	

Data are expressed as absolute numbers/total of samples analyzed (percentage). Abbreviations: HCC Hepatocellular carcinoma, CLD Chronic liver disease * refers to statistically significant difference, by exact Fisher test.

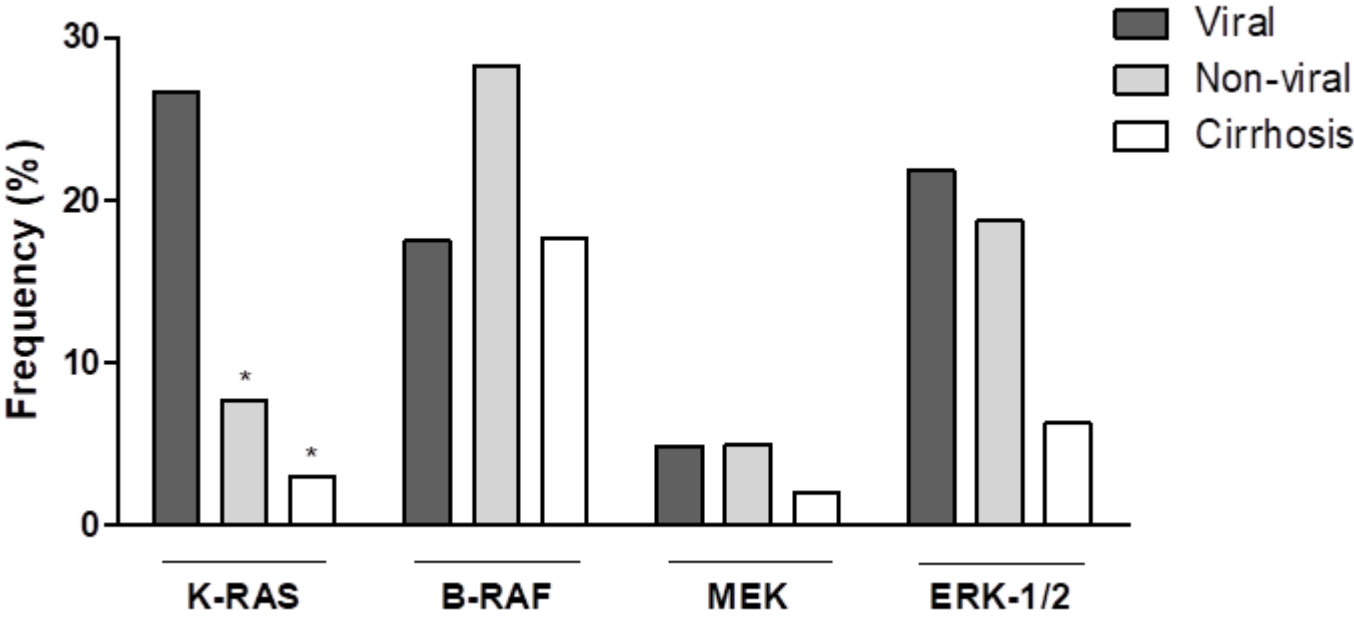


Figure 2: Frequency of strong expression of MAPK pathway proteins in HCC patients according to the etiology (viral and non-viral) of the underlying CLD in tumor and adjacent cirrhosis. * refers to statistically significant difference, by exact Fisher test. HCC hepatocellular carcinoma; CLD chronic liver disease.

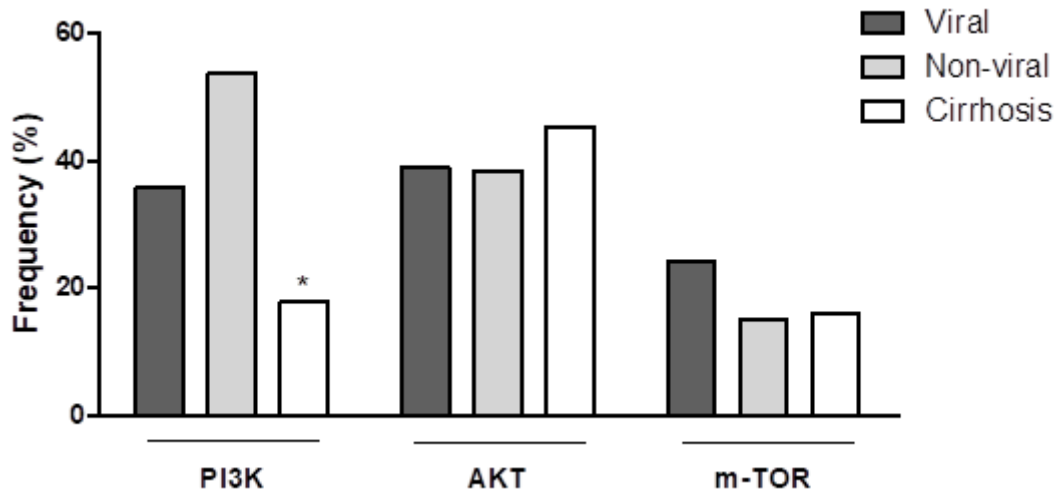


Figure 2: Frequency of strong expression of PI3K/AKT/mTOR pathway proteins by IHQ in HCC patients according to the etiology (viral and non-viral) of the underlying CLD in tumor and adjacent cirrhosis. * refers to statistically significant difference, by exact Fisher test. IHQ immunohistochemistry HCC hepatocellular carcinoma; CLD chronic liver disease.

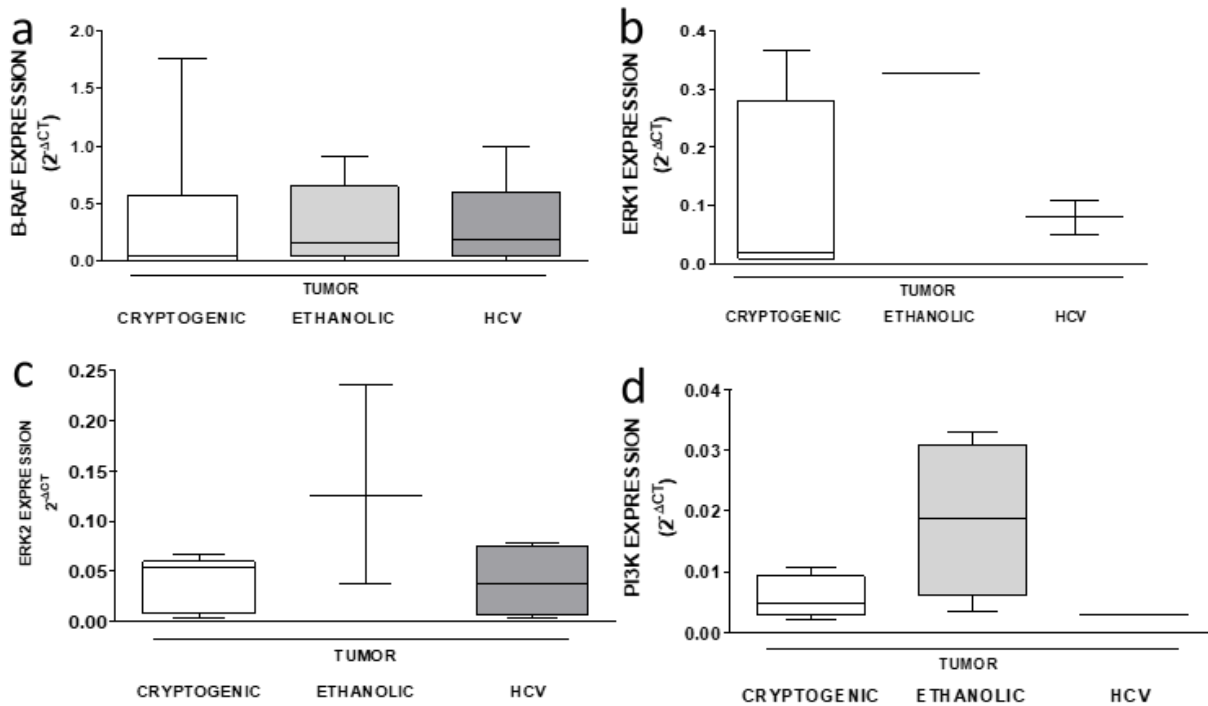


Figure 3. Relative RNA expression of some pathway proteins in tumoral tissue according to the etiology of the underlying CLD. The data are normalized for the level of GAPDH and expressed as $2^{-\Delta Ct}$. ΔCt refers to difference between Ct of *GAPDH* and Ct of primer analysed per sample. The results are expressed as median (interquartile range), three technical replicate per sample. a) *B-Raf* (0.423 (0.003-0.573) n=8/8; 0.222 (0.052-0.722) n=7/8; 0.183 (0.043-0.604) n=8/10 p=0.25). b) *ERK1* (0.182 (0.008-0.281) n=4/8; median NA n=3/8; 1.041 (0.064-18.480) n=4/10; p=0.08). c) *ERK2* (0.033 (0.006-0.633) n=4/8; 0.125 (0.037-NA) n=3/8; 0.375 (0.006-0.744) n=4/10; p=0.258). d) *PI3K* (0.007 (0.002-0.383) n=4/8; 0.188 (0.006-0.308) n=4/8; median NA n=2/10, p=0.480). All data refer to cryptogenic, ethanollic and HCV etiologic groups, respectively. Comparison were performed among the three groups (Kruskal-Wallis test), or between two groups (Mann-Whitney test), and no difference were detected. RNA was unable to be extracted from the hepatitis B virus etiology and data are not shown. *AKT* and *m-TOR* were also tested, but the relative RNA expression was not specifically labelled, and the data could not be shown. Abbreviations GAPDH glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase; HCV hepatitis C virus, Ct cycle threshold; CLD chronic liver disease; NA not available

Relationship of MAPK and PI3K/AKT/mTOR pathway proteins and clinicopathological indices

The association of each pathway proteins expressions to each other and clinicopathological indices were evaluated using multivariate Poisson regression model (Table 5). The variables age, number of nodules and, sometimes, AFP were selected to be included in the multivariate models. Gender, Child-Pugh classification, MELD (Model of End Stage Disease), microvascular invasion and histologic grade were also analysed in the regression model, but also were not significant. However, only number of nodules (≤ 3 versus >3 nodules) remained independently associated with KRAS (OR 1.32 95% CI 1.15-1.52, $p < 0.01$), but not with the other proteins, in the multivariate analysis. It means that when a patient had up to three tumor nodules, its chance of presenting KRAS strong expression in IHQ staining was 1.32 times greater. The same analysis was performed for expression of each studied protein but were not significant.

Table 5: Clinicopathological features associated with KRAS expression by immunohistochemistry in HCC tumors (multivariate Poisson regression model)

Variable	Univariate analysis		Multivariate analysis	
	OR (95% CI)	p-value	OR (95% CI)	p-value
Age	0.98 (0.97-1.02)	0.087	--	--
# of nodules	1.32 (1.15-1.52)	<0.001	1.32 (1.15-1.52)	<0.01

Abbreviations: HCC Hepatocellular carcinoma, # of nodules Number of tumoral nodules in explanted liver.

Influence of pathway proteins expression and clinicopathological indices in event occurrence and EFS

Finally, analysis was performed to evaluate the influence of pathway proteins and clinicopathological indices on event occurrence or EFS. Using multivariate Poisson regression model, only MIV (OR 13.46 95% CI 3.56-50.9, $p < 0.01$) and greater age (OR 1.09 95%IC 1.01-1.20, $p = 0.04$) were independently associated with event occurrence (Table 6). It means that considering a given age, tumors harbouring MIV have 13.46 times the chance of event occurrence. The MAPK or PI3K/AKT/mTOR protein expressions were not related to event occurrence (Table 6). Regarding EFS, MIV presence was the only feature independently associated with this variable (HR 4.09 95%CI 1.78-3.41, $p < 0.01$), as showed by COX regression model (Table 7), which indicates a risk 4.09 times greater of recurrence or death in the follow up period. The expression of any pathway proteins analyzed was also not correlated with this outcome. Gender, Child-Pugh classification, number of nodules and histologic grade were also analysed in the regression model, but also were not significant.

Table 6: Clinicopathological features associated with event (recurrence or death) in HCC patients (multivariate Poisson regression model)

Variable	Univariate analysis		Multivariate analysis	
	OR (95% CI)	p-value	OR (95% CI)	p-value
Etiology		0.495		
Age	1.06 (0.99-1.14)	0.104	1.09 (1.01-1.20)	0.04
MELD		0.460		
MIV	10.88 (3.2-37.00)	<0.01	13.46 (3.56-50.9)	<0.01
K-RAS		0.678		
B-RAF		0.974		
MEK		0.533		
ERK		1.00		
PI3K		0.575		
AKT		0.840		
mTOR		0.678		

Abbreviations: HCC hepatocellular carcinoma, MELD Model For End-Stage Liver Disease, MIV Microvascular invasion. Etiology refers to the cause of chronic liver disease (HBV, HCV, alcohol and cryptogenic). Event was defined as recurrence or death from any cause since liver transplantation.

Table 7: Clinicopathological features associated with event-free survival in HCC patients (multivariate Cox regression model)

Variable	Univariate analysis		Multivariate analysis	
	HR (95% CI)	p-value	HR (95% CI)	p-value
Etiology		0.506		
Age	1.05 (0.99-1.12)	0.089	1.05 (0.99-1.11)	0.089
MELD		0.390		
MIV	3.98 (1.78-8.99)	0.01	4.09 (1.78-3.41)	<0.01
K-RAS		0.401		
B-RAF		0.661		
MEK		0.620		
ERK		0.501		
PI3K		0.923		
AKT		0.724		
mTOR		0.883		

Abbreviations: HCC hepatocellular carcinoma, MELD Model For End-Stage Liver Disease, MIV Microvascular invasion. Etiology refers to the cause of chronic liver disease (HBV, HCV, alcohol and cryptogenic). Event was defined as recurrence or death from any cause since liver transplantation.

4- Discussion

In this study, SE of MAPK and PI3K/AKT/mTOR proteins were frequently found in HCC samples of patients who underwent OLT as HCC- treatment, indicating activation of these signaling pathways in our population. Moreover, differences in expression profile could be identified. The KRAS expression was stronger in tumors that arose from CLD caused by hepatitis B or C viruses than in those related to CLD of non-viral etiology or in cirrhotic hepatic parenchyma without tumor. PI3K was strongly expressed in tumor of both etiologic groups, but not in cirrhosis.

HCC is a complex disease, and in spite of the many advances in understanding its biology in the last years, multiple barriers have been identified in hepatocarcinogenesis knowledge.²⁴ The cancer heterogeneity is particularly challenging. Not only there are differences among

patients, but between tumor nodules in the same patient, and even within a single tumor nodule.²⁵ Thus, single analysis performed in a small region of tumor, could not reflect the entire molecular profile of the HCC, and failure in identifying molecular biomarkers may occur.

Many genetic and molecular alterations may be present in early stages of the disease, while others appear in late stages.²⁶ For instance, *TERT* promoter mutation, which encodes the telomerase reverse transcriptase, is required at an early step of transformation to bypass the replicative senescence of cirrhotic hepatocytes.²⁷ By contrast, acquisition of genomic diversity appears to be a late event in liver carcinogenesis, when *FGF3*, *FGF4*, *FGF19/CCND1* amplification, as well as *TP53* and *CDKN2A* alterations, could be identified.²⁸

HCC molecular profile may also vary according to the etiology of the underlying CLD and patients' genetic background, which could be translated in geographic differences.¹⁷ For instance, a study showed that alcohol-related HCC were significantly enriched in genetic alterations in *CTNNB1*, *TERT*, *CDKN2A*, *SMARCA2* and *HGF*. HBV-related HCC were frequently mutated for *TP53*, whereas *IL6ST* mutations occurred exclusively in HCC with no known etiology.²⁸ Based on genomic studies, which demonstrated molecular variations among etiologic groups of HCC, a molecular classification has been proposed – proliferative and non-proliferative HCC –, but it needs further studies and validation in other populations.²⁹

Therefore, studies evaluating molecular differences among HCC-related etiologies, are very important in this scenario, and have never been conducted in our setting. Correlation of molecular characteristics with clinical and pathologic features, as well as relevant clinic outcomes, such as recurrence and survival, might contribute to the better understanding of the complexity of HCC, improve the selection of patients that would most derive benefit from some treatment modality, as OLT, and state basis for development of new therapeutic strategies. Other benefit of these studies is to contribute to the interpretation of the molecular findings, given that there are driver mutations important in the biology of the cancer and passenger mutations which are unimportant; and, distinguishing between the two situations is not easy.¹⁷

It is important to mention that our study included only patient who underwent OLT. As HCC-diagnosis can be established by imaging criteria and a formal pathological proof is not mandatory, albeit progressively more encouraged by specialists,³ much of tumor material available comes from surgical resection and, therefore, reflects only a small subset of patients.²⁵ Although this is a limitation, selecting patient undergoing OLT guarantees that a tumor specimen is available for analysis as biopsy is not routinely performed in our and several other centers.

Furthermore, as candidates for OLT are those with limited disease, the HCC-stage of the studied population is supposed to be early and may not represent the molecular findings present in late stages of the tumor. Since 1996, OLT indications for treating HCC are based primarily in the MC, which state that the candidate should have only one tumoral nodule less than five centimeters or up to three nodules less than three centimeters.³⁰ However, 22.7% of our patients harbored more than three nodules in the explanted liver, suggesting that in a considerably number of cases, the tumor was indeed more advanced than expected. Probably, these nodules were not identified in pre-operative setting, due to technical limitations of imaging methods employed or due to progression of the disease while the patient was on the waiting list for a cadaveric organ donator.³¹

Despite being widely used, the MC do not take into account the tumor biology, another important determinant of the risk of tumor recurrence after OLT. Thus, many attempts have been done to identify others prognostic and predictive parameters of HCC recurrence.³² Evidence suggests that alpha-fetoprotein (AFP), a biomarker for HCC surveillance and diagnosis, may also have prognostic utility in HCC patients treated with transplantation. However, the pre-OLT AFP cutoff associated with increased risk of recurrence after transplantation has not yet established.³³ In the present study, the median AFP was low (14.7 ng/ml), without differences among etiologic groups, and no correlation with clinical outcome was demonstrated.

The severity of underling CLD, a determinant of the morbidity and mortality associated with HCC,³⁴ was also evaluated in our study. Using well validated scores - Child-Pugh and MELD –, we did not demonstrate any association of them with clinical outcome. However, the majority of our patients did not have poor scores (only 28.4% of patient were Child C, and median MELD score was 20), and the groups were homogenous regarding these parameters. We decided to use both scores in accessing the functional liver reserve to overcome their

limitations: Child is very dynamic, with huge variations according to the time, and in Brazil, as candidates to OLT for HCC treatment receive a special MELD score, this is not a good scenario to access the severity of CLD.³⁵

As a major prognostic feature in solid tumors from virtually every organ, histologic grading is also expected to reflect the tumor's biological behavior in HCC.³⁶ Despite being published more than 60 years ago, the original Edmondson and Steiner classification is still recommended by the College of American Pathologists and was evaluated in this study. Furthermore, we also accessed the explanted liver regarding MIV – defined as tumor embolus within a vascular space, not detectable by radiological techniques – which is considered a reliable predictor of tumor recurrence.³⁷ We found high histologic grade (grade III and IV) in 28.7% of the patients and MIV in 36.7%, which indicate an aggressive histology in a significant proportion of our study population.

In fact, many factors related to the patient (like obesity, viral etiology, HCV treatment) or to the tumor (like stage and differentiation's grade) have been associated to increased risk of tumor recurrence after OLT for HCC-treatment,³⁸ which was not demonstrated in our study considering the parameters evaluated. Age as an independent risk factor is controversial. Despite being pointed as a poor prognostic predictor in some series, it could have been attributed to confounding factors as shorter life expectancy and higher prevalence of comorbidities.^{39,40}

According to available reports, MIV was shown to increase in three-fold the risk of HCC-recurrence.³⁸ Our data is in agreement with these findings, although we found higher values as in our study: the presence of MIV increased by 13.46 times the chance of death or recurrence, and decreased by 4.09 times the EFS, which means the risk of event occurrence in the follow-up period.

Other important data demonstrated in our study is the more frequent expression of proteins of the intracellular pathways MAPK and PI3K/AKT/mTOR in tumor than in adjacent cirrhosis, suggesting a critical role in HCC-development. Dysregulation of these pathways leads to inappropriate cellular activities, including enhanced cell growth, differentiation, and survival, and ultimately to cancer.⁴¹ Although available evidence demonstrates frequent activation of these pathways in HCC, mainly in advanced stages, mutations that activate proteins themselves are rarely identified.²⁴ Although additional mechanisms of pathway

activation remain to be characterized, the increased activity can occur due to aberrant upstream signals, such as EGFR and IGF1R (insulin-like growth factor receptor), and induction by hepatitis viral proteins, such as protein X of HBV and core protein of HCV.^{24,42-44} Moreover, activation of PI3K/AKT/mTOR can be a result of reduced activity of PTEN, that regulate negatively this pathway activity, and EGF upregulation.⁴⁵

Evidence has demonstrated that the m-TOR pathway is more significantly activated in poorly differentiated tumors, presence of vascular invasion and tumors with poor prognostic features.⁴⁶ Furthermore, there is evidence associating MAPK pathway activation with worse prognosis.⁴⁷ These characteristics were also analysed in our study, but no association was found, neither regarding clinic, pathologic or long-term outcome. The only association demonstrated in multivariate analyses was between the number of nodules (three or less) and KRAS expression, but the relevance of this finding is not clear.

Despite of having demonstrated activation of both pathways more frequently in HCC than in cirrhosis, our results showed that the frequency of protein expression is heterogeneous and not sequential. It leads us to think that up and downstream proteins of the pathways were not necessarily expressed following a linear activation sequence, as modelled originally for the pathways. For example, the frequency of expression of MEK-1 was less than ERK-1/2, its downstream protein, and less than BRAF, its upstream protein. It highlights the complexity of pathways. In addition to their independent signaling programs that provide compensatory mechanisms, the pathways cross-talk extensively and regulate each other both positively and negatively.¹⁶ Furthermore, other effectors with potential clinical relevance have been identified. For instance, PI3K can trigger a downstream sequence of activation not dependent of AKT.⁴⁸

The lack of correspondence between up and downstream proteins in this study, was also demonstrated in previous publications,¹¹ suggesting a role for additional inputs in each pathway, what can influence the expression patterns of MAPK and PI3K/AKT/m-TOR pathways proteins.

Because of the limited ability of IHQ in measuring protein expression – bias in favoring the selection of “representative” tumor areas, even when the score used integrates intensity and extent of staining –, we performed a RT-PCR, technique that reflects the average mRNA expression of the whole sample.⁴⁹ In addition of its utility in identifying punctual mutations,

RT-PCR can be used as an innovation method for quantitation of relative gene expression.⁵⁰ In the present study, we showed expression of mRNA of some protein (BRAF, ERK1, ERK2, PI3K), but with no differences between etiologic groups. Others (AKT, mTOR) did not show specific amplifications, but probably it was related to RNA preservation or issues related to the primers used.

Gene expression analyses on RNA isolated from FFPE tissues are challenging due to chemical modifications of RNA, cross-links of RNA with other molecules, degradation of RNA, and the limited amounts of sample usually available.⁵¹ Particularly, the FFPE blocks used in our study have been stored for a long period and have been extensively used in other studies. Thus, despite of being explanted livers, in many cases, the sample available was very limited. Thus, mRNA expression of other pathways proteins, like KRAS and MEK-1, were not assessed.

Notably, in our study, there was not correspondence between the levels of mRNA, measured by RT-PCR, and the levels of protein expression, evaluated by IHQ. It may reflect post translational modifications or may be related to the increased dynamic range of RT-qPCR as compared to IHC.⁴⁹ There are many complicated and varied post-transcriptional mechanisms involved in turning mRNA into protein that are not yet sufficiently well-defined to be able to compute protein concentrations from mRNA; proteins may differ substantially in their in vivo half-lives; and/or there is significant amount of errors in experiments that limits the conclusions.⁵² In other words, besides experiment errors, an expressed mRNA with no correlation with proteins expression can be explained by mechanisms that occur after the transcription or due to a high protein turnover. Otherwise, when the protein is detected by IHQ and no correlation with RNA expression can be established, it can reflect a very small expression of RNA, not detectable by RT-PCR, which may lead to the production of a low protein turnover.

As other limitations, our study was retrospective, which can harbor information bias, and it was performed in a single center, which can not reflect the geographic and molecular diversity of our population. However, this is an important cohort in which molecular, clinical, pathological and long-term outcomes in a poor-income country were evaluated. The reduced representability of the HBV-group is also an important issue, given that this infection itself can be a poor prognostic factor,⁵³ and HBV-related HCC represents the main etiology of proliferative molecular group.^{3,29} Fortunately, since HBV-vaccination by the

Brazilian public health system as well as the improved access to antiretroviral treatment, HBV infection has decreased in our country.⁵⁴ Finally, NAFLD was not considered as a separated group, but probably it is included in cryptogenic group. This condition was only recognized as an etiology of CLD related of HCC more recently and the exact prevalence of HCC in cirrhotic NAFLD remains unknown.⁵⁵

In summary, our study showed increased expression of MAPK and PI3K/ATK/mTOR pathways protein and mRNA in patients who underwent OLT for HCC treatment. The strong expression of K-RAS, but not of BRAF, MEK and ERK, was more frequent in viral-related HCC than in cirrhosis and tumors of the non-viral group. The expression of PI3K, but not AKT or m-TOR, was more frequently stronger in tumor of both viral and non-viral etiologic group than cirrhosis. This finding suggests that HBV and HCV can lead to HCC by different mechanisms comparing to non-viral etiology, and KRAS and PI3K could have a role on carcinogenesis. As there were no differences in clinical outcomes, and no other factor was associated to expression of these proteins (apart from the association between KRAS expression and up to three nodules in explant liver), further studies are needed to establish the prognostic and therapeutic implications of these findings.

4- Compliance with ethical standards

Conflict of interest: All authors declare that there are no financial conflicts associated with this study.

5- References

- 1- Global Burden of Disease Liver Cancer C, Akinyemiju T, Abera S, Ahmed M, Alam N, Alemayohu MA, et al. The burden of primary liver cancer and underlying etiologies from 1990 to 2015 at the global, regional, and national level: results from the global burden of disease study 2015. *JAMA Oncol* 2017;3(12):1683-91.
- 2- Yang JD, Harmsen WS, Slettedahl SW, et al. Factors that affect risk for hepatocellular carcinoma and effects of surveillance. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2011;9:617
- 3- Llovet JM, Zucman-Rossi J, Pikarsky E, et al. Hepatocellular carcinoma. *Nat Rev Dis Primers* 2016;2:16018.
- 4- Alves RC, Alves D, Guz B, et al. Advanced hepatocellular carcinoma. Review of targeted molecular drugs. *Ann. Hepatol* 2011;10(1):21-7

- 5- Lu LC, Hsu CH, Hsu C, Cheng AL. Tumor Heterogeneity in Hepatocellular Carcinoma: Facing the Challenges. *Liver Cancer* 2016;5:128-38.
- 6- Ho DW, Lo RC, Chan LK, Ng IO. Molecular Pathogenesis of Hepatocellular Carcinoma. *Liver Cancer* 2016;5(4):290-302.
- 7- Finn RS. Emerging Targeted Strategies in Advanced Hepatocellular Carcinoma. *Semin Liver Dis* 2013;33(S1):S11-9
- 8- Calvisi DF, Ladu S, Gorden A et al. Ubiquitous activation of Ras and Jak/Stat pathways in human HCC. *Gastroenterology* 2006;130:1117-28
- 9- Sahin F, Kannangai R, Adegbola O, et al. mTOR and P70 S6 kinase expression in primary liver neoplasms. *Clin Cancer Res* 2004;10:8421-25.
- 10- Schumacher G, Oidtmann M, Rueggeberg A, et al. Sirolimus inhibits growth of human hepatoma cells alone or combined with tacrolimus, while tacrolimus promotes cell growth. *World J Gastroenterol* 2005;11:1420-25.
- 11- Sieghart W, Fuereder T, Schmid K, et al. Mammalian target of rapamycin pathway activity in hepatocellular carcinomas of patients undergoing liver transplantation. *Transplantation* 2007;83:425-32.
- 12- Semela D, Piguet AC, Kolev M, et al. Vascular remodeling and antitumoral effects of mTOR inhibition in a rat model of hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 2007;46:840-48.
- 13- Schmitz KJ, Wohlschlaeger J, Lang H, et al. Activation of the ERK and AKT signalling pathway predicts poor prognosis in hepatocellular carcinoma and ERK activation in cancer tissue is associated with hepatitis C virus infection. *J Hepatol* 2008;48(1):83-90.
- 14- Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000;100:57-70.
- 15- Lachenmayera A, Alsinet C, Changa CY, Llovet JM. Molecular approaches to treatment of hepatocellular carcinoma. *Dig Liver Dis* 2010; 42S:S264-72
- 16- Mendoza MC, Er EE, Blenis J. The Ras-ERK and PI3K-mTOR pathways: cross-talk and compensation. *Trends Biochem Sci* 2011;36(6):320-8.
- 17- Bruix J, Gores GJ, Mazzaferro V. Hepatocellular carcinoma: clinical frontiers and perspectives. *Gut* 2014;63:844-55.
- 18- Whittaker S, Marais R, Zhu AX. The role of signaling pathways in the development and treatment of hepatocellular carcinoma. *Oncogene* 2010; 29:4989-5005.
- 19- Kamath, P.S., Wiesner R.H., Malinchoc M., et al. A model to predict survival in patients with end-stage liver disease. *Hepatology* 2001; 33(2):464-70

- 20- Pugh, R.N., Murray-Lyon, I.M., Dawson, J.L., Pietroni, M.C., Williams, R. Transection of the oesophagus for bleeding oesophageal varices. *Br J Surg* 1973;60(8):646-9.
- 21- Edmondson HA, Steiner PE. Primary carcinoma of the liver: a study of 100 cases among 48,900 necropsies. *Cancer* 1954;7:462-503.
- 22- Andrade VP, Cunha IW, Silva EM et al. Tissue microarrays: high throughput and low cost available for pathologists. *J Bras Patol Med Lab* 2007;43:55-60.
- 23- Xu G, Zhang W, Bertram P, Zheng XF, McLeod H. Pharmacogenomic profiling of the PI3K/PTEN-AKT-mTOR pathway in common human tumors. *Int J Oncol* 2004;24:893-900.
- 24- Chen C, Wang G. Mechanisms of hepatocellular carcinoma and challenges and opportunities for molecular targeted therapy. *World J Hepatol* 2015;7(15):1964-70.
- 25- Lu LC, Hsu CH, Hsu C, Cheng AL. Tumor Heterogeneity in Hepatocellular Carcinoma: Facing the Challenges. *Liver Cancer* 2016;5(2):128-38.
- 26- Zucman-Rossi J, Villanueva A, Nault JC, Llovet JM. Genetic Landscape and Biomarkers of Hepatocellular Carcinoma. *Gastroenterology* 2015;149(5):1226-39
- 27- Nault JC, et al. High frequency of telomerase reverse-transcriptase promoter somatic mutations in hepatocellular carcinoma and preneoplastic lesions. *Nat Commun* 2013;4:2218.
- 28- Schulze K, Imbeaud S, Letouzé E, et al. Exome sequencing of hepatocellular carcinomas identifies new mutational signatures and potential therapeutic targets. *Nat Genet* 2015;47(5):505–511.
- 29- Hoshida Y, Nijman SM, Kobayashi M, Chan JA, Brunet JP, Chiang DY et al. Integrative transcriptome analysis reveals common molecular subclasses of human hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* 2009;69:7385-92.
- 30- Mazzaferro V, Regalia E, Doci R, Andreola S, Pulvirenti A, Bozzetti F et al. Liver transplantation for the treatment of small hepatocellular carcinomas in patients with cirrhosis. *N Engl J Med* 1996;334:693-9.
- 31- Sotiropoulos GC, Malago M, Molmenti E, Paul A, Nadalin S, Brokalaki E, et al. Liver transplantation for hepatocellular carcinoma in cirrhosis: is clinical tumour classification before transplantation realistic? *Transplantation* 2005;79:483-7.
- 32- Amado V, Rodríguez-Perálvarez M, Ferrín G, De la Mata M. Selecting patients with hepatocellular carcinoma for liver transplantation: incorporating tumor biology criteria. *J Hepatocell Carcinoma*. 2018;6:1-10.

- 33- Chaiteerakij R, Zhang X, Addissie BD, Mohamed EA, Harmsen WS, Theobald PJ, et al. Combinations of Biomarkers and Milan Criteria for Predicting Hepatocellular Carcinoma Recurrence After Liver Transplantation. *Liver Transpl* 2015; 21: 599-606.
- 34- Shiani A, Narayanan S, Pena L, Friedman M (2017) The Role of Diagnosis and Treatment of Underlying Liver Disease for the Prognosis of Primary Liver Cancer. *Cancer Control* 24(3). <https://doi.org/10.1177/1073274817729240>
- 35- Sá GP, Vicentine D, Salzedas-Netto FP, Salzedas-Netto AA, Matos CA, Romero LR, Tejada DF, Massarollo PC, Lopes-Filho GJ, Gonzalez AMet al (2016) Liver transplantation for carcinoma hepatocellular in Sao Paulo: 414 cases by the Milan/Brazil Criteria. *ABCD, Arq. Bras. Cir. Dig* 29:240-245. <http://dx.doi.org/10.1590/0102-6720201600020010>
- 36- Martins-Filho SN, Paiva C, Azevedo RS, Alves VAF. Histological grading of hepatocellular carcinoma-a systematic review of literature. *Front Med* 2017;4:193. <http://dx.doi.org/10.3389/fmed.2017.00193>
- 37- Rodríguez-Perálvarez M, Luong TV, Andreana L, Meyer T, Dhillon AP, Burroughs AK. A systematic review of microvascular invasion in hepatocellular carcinoma: diagnostic and prognostic variability. *Ann Surg Oncol* 2013;20(1):325-39.
- 38- Agopian VG, Harlander-Locke M, Zarrinpar A, Kaldas FM, Farmer DG, Yersiz H, et al. A novel prognostic nomogram accurately predicts hepatocellular carcinoma recurrence after liver transplantation: analysis of 865 consecutive liver transplant recipients. *J Am Coll Surg* 2015; 220: 416-27.
- 39- Pignata S, Gallo C, Daniele B, Elba S, Giorgio A, Capuano G, et al. Characteristics at presentation and outcome of hepatocellular carcinoma (HCC) in the elderly. A study of the Cancer of the Liver Italian Program (CLIP). *Crit. Rev. Oncol Hematol.* 2006; 59: 243-9.
- 40- Trevisani F, Cantarini MC, Wands JR, Bernardi M. Recent advances in the natural history of hepatocellular carcinoma. *Carcinogenesis.* 2008; 29(7):1299-305.
- 41- Galuppo R, Ramaiah D, Ponte OM, Gedaly R. Molecular therapies in hepatocellular carcinoma: what can we target? *Dig Dis Sci* 2014; 59: 1688-97.
- 42- Galuppo R, Maynard E, Shah M, Daily MF, Chen C, Spear BT, Gedaly R. Synergistic inhibition of HCC and liver cancer stem cell proliferation by targeting RAS/RAF/MAPK and WNT/ β -catenin pathways. *Anticancer Res* 2014; 34: 1709-13.
- 43- Zhang, X, Zhang, H, Ye, L. Effects of hepatitis B virus X protein on the development of liver cancer. *J Lab Clin Med* 2006; 147: 58-66

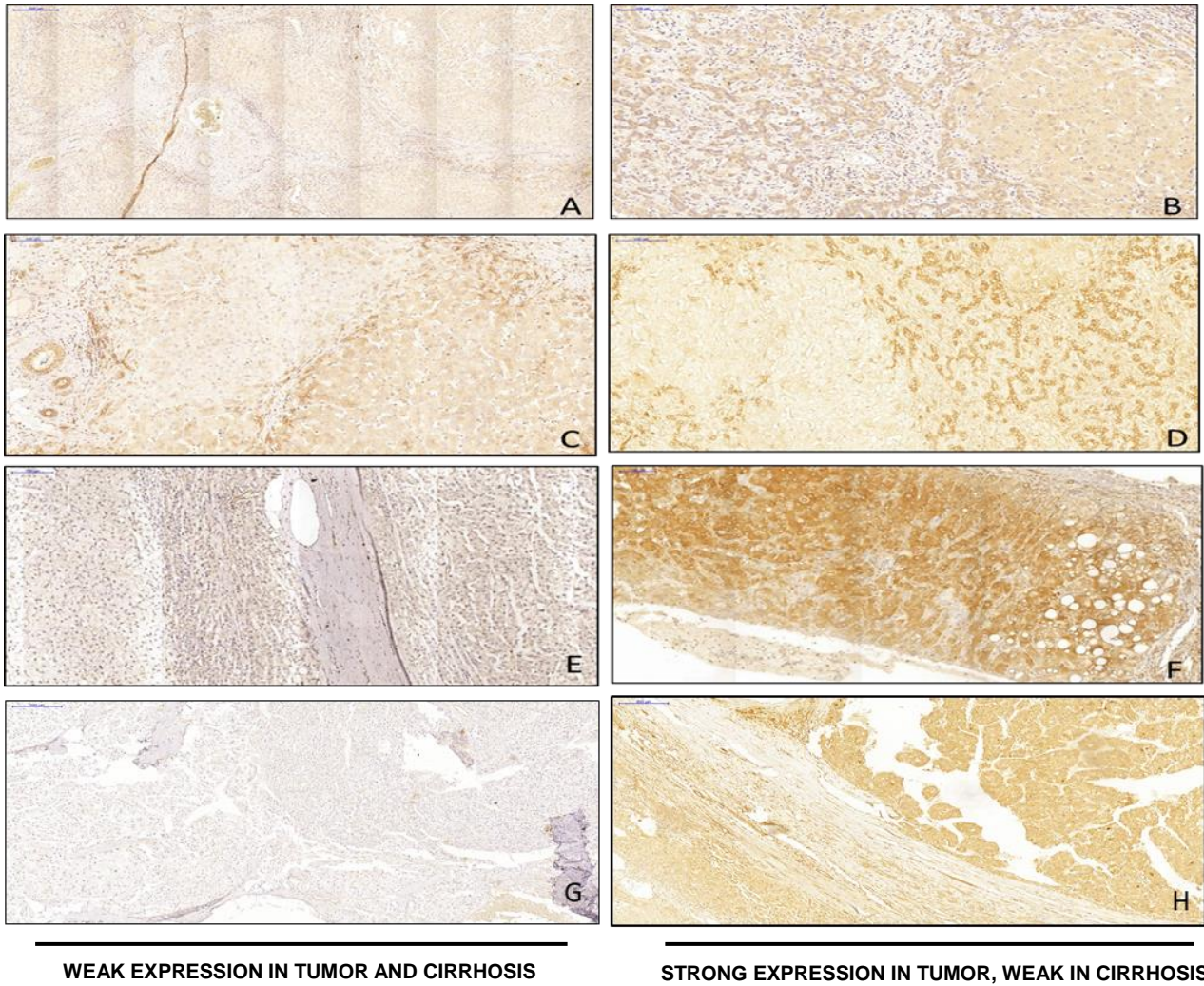
- 44- Nakamura, H, Aoki, H, Hino, O, Moriyama, M. HCV core protein promotes heparin binding EGF-like growth factor expression and activates Akt. *Hepatol Res* 2011; 41:455-62.
- 45- Villanueva A, Chiang DY, Newell P, Peix J, Thung S, Alsinet C, et al. Pivotal role of mTOR signaling in hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 2008;135(6):1972-83.
- 46- Zhou L, Huang Y, Li J, Wang Z. The mTOR pathway is associated with the poor prognosis of human hepatocellular carcinoma. *Med Oncol* 2010;27(2):255-61.
- 47- Delire B, Stärkel P. The Ras/MAPK pathway and hepatocarcinoma: pathogenesis and therapeutic implications. *Eur J Clin Invest.* 2015;45(6):609-23.
- 48- Efeyan A, Sabatini DM. mTOR and cancer: many loops in one pathway. *Curr Opin Cell Biol* 2009;22(2):169-76.
- 49- Sinn HP, Schneeweiss A, Keller M, Schlombs K, Laible M, Seitz J. Comparison of immunohistochemistry with PCR for assessment of ER, PR, and Ki-67 and prediction of pathological complete response in breast cancer. *BMC Cancer* 2017;17(1):124. <http://dx.doi.org/10.1186/s12885-017-3111-1>
- 50- Overbergh L, Giulietti A, Valckx D, Decallonne R, Bouillon R, Mathieu C. The use of real-time reverse transcriptase PCR for the quantification of cytokine gene expression. *J Biomol Tech* 2003;14(1):33-43.
- 51- Hamatani K, Eguchi H, Takahashi K, Koyama K, Mukai M, Ito R. Improved RT-PCR amplification for molecular analyses with long-term preserved formalin-fixed, paraffin-embedded tissue specimens. *J Histochem Cytochem* 2006;54(7):773-80.
- 52- Greenbaum D, Colangelo C, Williams K, Gerstein M. Comparing protein abundance and mRNA expression levels on a genomic scale. *Genome Biol* 2003;4(9):117. <http://dx.doi.org/10.1186/gb-2003-4-9-117>
- 53- Cantarini MC1, Trevisani F, Morselli-Labate AM, et al. Effect of the etiology of viral cirrhosis on the survival of patients with hepatocellular carcinoma. *Am. J. Gastroenterol* 2006;101: 91–98.
- 54- Dutra SFJ. Distribution of hepatitis B infection in Brazil: the epidemiological situation at the beginning of the 21st century. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop* 2016;49(1):11-23. <http://dx.doi.org/10.1590/0037-8682-0176-2015>
- 55- Baffy G, Brunt EM, Caldwell, SH. Hepatocellular carcinoma in non-alcoholic fatty liver disease: An emerging menace. *J Hepatol* 2012;56(6):1384-91.

6- Support information

Table S1: List of primary antibodies, dilutions, buffer and incubation times used in IHC

Primary Ac	Specifications	Dilution	Incubation time
KRAS	ABCAM, ab180772, United Kingdom	1:100	Overnight
BRAF	Santa Cruz Biotechnology, sc-900, USA	1:200	Overnight
MEK-1	ABCAM, ab32091, United Kingdom	1:100	2 hours
ERK1/2	Santa Cruz Biotechnology, sc-135900, USA	1:250	2 hours
PI3K	ABCAM, ab86714, United Kingdom	1:200	2 hours
AKT	ABCAM, ab8805, United Kingdom	1:500	30 min
mTOR	ABCAM, ab32028, United Kingdom	1:100	2 hours

Abbreviations Ac antibody, IHQ Immunohistochemistry. The dilution was in phosphate-buffered saline (PBS).



WEAK EXPRESSION IN TUMOR AND CIRRHOSIS

STRONG EXPRESSION IN TUMOR, WEAK IN CIRRHOSIS

Figure S1 (A-H): Representative staining patterns. IHC is expressed as a final score summarizing the result of intensity and extent of staining in tumor and adjacent cirrhosis. Left columns: weak expression in tumor and adjacent cirrhosis; right columns: strong expression in tumor, weak expression in adjacent cirrhosis. A, B: KRAS; C, D: B-RAF; E, F: MEK-1; G, H: ERK 1/2

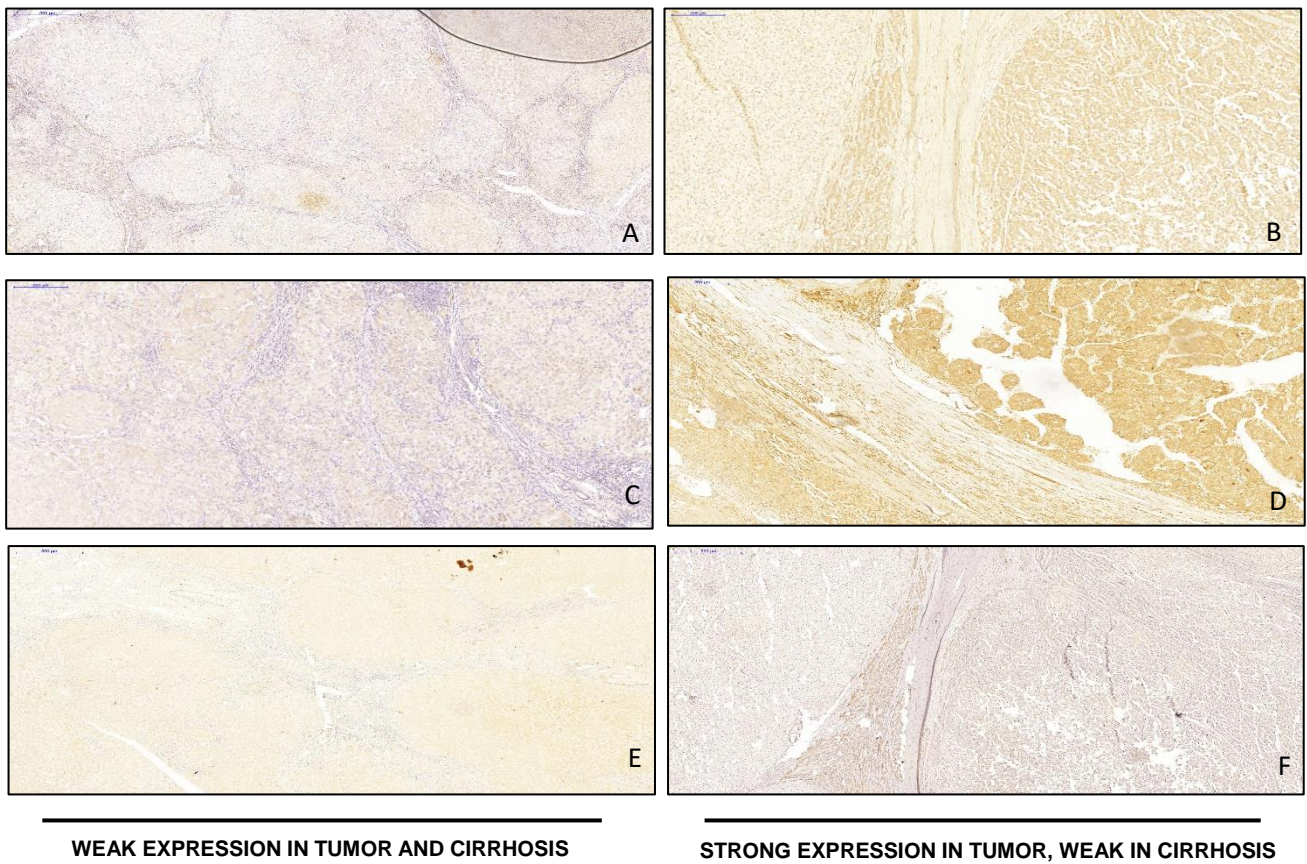


Figure S2 (A-F): Representative staining patterns. IHC is expressed as a final score summarizing the result of intensity and extent of staining in tumor and adjacent cirrhosis. Left columns: weak expression in tumor and adjacent cirrhosis; right columns: strong expression in tumor, weak expression in adjacent cirrhosis. A, B: PI3K; C, D: p-AKT; E, F: mTOR

Table S2: Sequences of primers used in the study

Identification	Sequence
β -actin	5'-CATGTACGTTGCTATCCAGGC-3' (forward) 5'-CTCCTTAATGTCACGCACGAT-3' (reverse)
GAPDH	5'-TTGCCATCAATGACCCCTTCA-3' (forward) 5'-CGCCCCACTTGATTTTGGGA-3' (reverse)
BRAF	5'-AAAATAGGTGATTTTGGTCTAGCTACAGA-3' (forward) 5'-GACAACTGTTCAAACCTGATGG-3' (reverse)
ERK-1	5'-CGCTTCCGCCATGAGAATGTC-3' (forward) 5'-CAGGTCAGTCTCCATCAGGTCCTG-3' (reverse)
ERK2	5'-CGTGTTGCAGATCCAGACCATGAT-3 (forward) 5'-TGGACTTGGTGTAGCCCTTGGAA-3' (reverse)
PI3K	5'-ATGGGGATGATTTACGGCAAGATA-3' (forward) 5'-TTTCGCACCACCTCAATAAGTC-3' (reverse)
AKT	5'-CCCCCGAGGTGCTGGAGGACAAT-3' (forward) 5'-AAGGGCAGGCGACCGCACATCAT-3' (reverse)
m-TOR	5'-GCTTGATTTGGTTCCCAGGACAGT-3' (forward) 5'-GTGCTGAGTTTGCTGTACCCATGT-3' (reverse)

Primers from Ludwig Biotechnologia, Brazil. Abbreviations GAPDH Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase

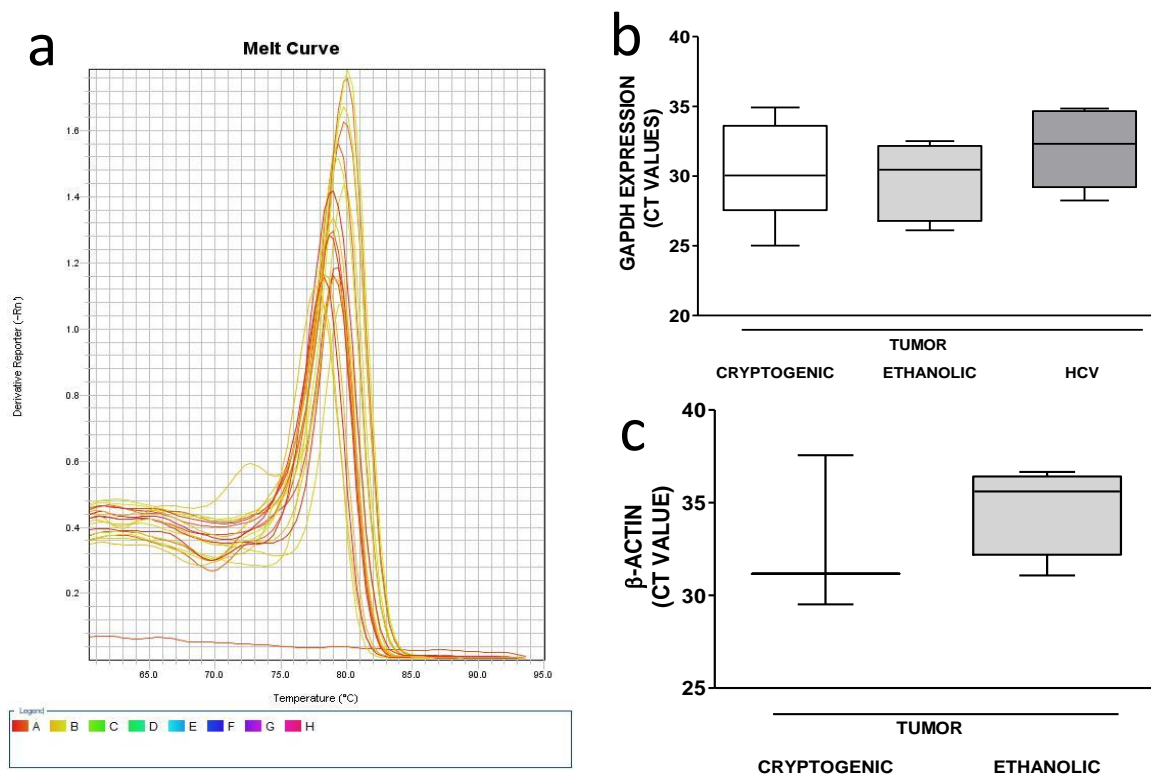


Fig S3: GAPDH Melting curve and mRNA expression of GAPDH and β -actin in HCC patients according to etiology of CLD. a) GAPDH Meting curve to exemplify the analyses performed for each primer. Using Bio-Rad software (Bio-Rad), the CT (cycle threshold), defined as the number of cycles required for the fluorescent signal to cross the threshold (ie exceeds background level), was determined. b) GAPDH expression (30.03 (27.55-33.60) n=8/10; 30.45 (26.78-32.16) n=8/9; 32.31 (29.20-34.65) n=10/11, p=0.24). c) β -actin expression (31.16 (29.51-) n=3/10; 35.60 (32.19-36.41) n=4/9, p=0.46). Data are expressed as median (interquartile range), three technical replicates for sample, respectively for cryptogenic, ethanolic and HCV etiology. n=number of samples with specific expression/number of samples analysed. β -actin in HCV group is not represented because no specific amplification was detected. In next experiments, relative mRNA expression was determined by comparative method normalized to the level of GAPDH. Abbreviations GAPDH Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, HCV Hepatitis C virus, Ct cycle threshold.

5 – CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo contribui para o entendimento do complexo mecanismo de carcinogênese do CHC, com foco no impacto da etiologia da hepatopatia crônica subjacente como um dos determinantes da expressão clínica tão heterogênea desta neoplasia, o que reforça a necessidade de individualização na abordagem desses tumores.

Até então, em poucos estudos foram avaliados, de forma comparativa entre grupos etiológicos, aspectos moleculares, histopatológicos, clínicos e laboratoriais associados a essa neoplasia. Apesar de não terem sido identificadas características que impactaram em diferenças em relação aos desfechos clínicos, nossos achados sugerem a possibilidade de diferentes mecanismos de carcinogênese entre os grupos, e abre novas oportunidades para exploração de dados que acrescentarão conhecimento nesse cenário.

Dessa forma, ao longo desse projeto, foram surgindo novas ideias, que já vem sendo exploradas por outros pesquisadores do nosso grupo, como é o caso da avaliação do papel IGFR-1 e cMET no desenvolvimento desses tumores. No exame de qualificação para o doutorado, em que esse projeto e principais resultados foram apresentados, foi sugerido complementar nosso estudo, em um outro momento, com a avaliação genômica com a técnica de sequenciamento. Isto porque, apesar de os estudos até então não mostrarem frequência considerável de mutações diretamente dos genes que codificam as proteínas das vias, variações entre diferentes populações podem ocorrer e, certamente, esse campo ainda merece maior investigação. Dessa forma, já iniciamos procedimentos para captação de recursos para os materiais necessários aos experimentos e em breve iniciaremos sua execução, possivelmente até em parceria com um importante laboratório de oncologia de precisão da rede privada de Belo Horizonte.

Importante também explorar os dados em outras populações de pacientes e em outros estádios de doença. Apesar de o TH constituir uma importante fonte de material histológico tumoral, visto que a biópsia ainda não é uma exigência para o diagnóstico desta neoplasia, estudos em pacientes nos estádios mais avançados da doença podem evidenciar outro cenário de alterações moleculares, trazendo, então, informações importantes sobre esse perfil na medida em que o tumor vai avançando. Além disso, avaliações comparativas com cirrose adjacente e entre nódulos do mesmo paciente podem contribuir para o melhor esclarecimento da heterogeneidade tumoral, tão debatida atualmente.

Enfim, ainda temos muito a avançar. Mas um ponto importante é que nosso estudo já está colaborando com mudanças de algumas condutas no nosso serviço. Isso porque, ao

depararmos com tantas amostras em mal estado de conservação, e muitas vezes, escassez de material armazenado apesar de se tratar de um fígado explantado, reforçamos a importância de se modificar os processos de coleta e armazenamento do material proveniente do TH, e uma nova prática já começou a ser adotada no departamento de Anatomia Patológica, o que inclui maior cuidado na fixação do espécime em formol e confecção de blocos de parafinas a partir de maior representação tecidual.

Esse estudo, também, representou um importante banco de dados sobre os pacientes submetidos à TH como tratamento do CHC na nossa Instituição, e certamente servirá de comparação com dados futuros para avaliarmos a evolução da nossa linha de cuidados prestados a esses pacientes.

Particularmente, o desenvolvimento desse projeto foi muito enriquecedor na minha carreira. Marcou meu retorno aos experimentos de bancada e maior dedicação à construção científica, especialmente no campo da medicina translacional, após um bom período me dedicando exclusivamente às demandas da assistência em oncologia. Reconheço que nos tornamos médicos muito melhores quando conseguimos ter uma visão mais integral das doenças, e isso exige, dentre outros, uma busca constante de conhecimento em relação aos aspectos moleculares do câncer.

Também cabe destacar tantos bons momentos e experiências novas nesses anos rumo ao doutoramento. Dados iniciais dos nossos resultados foram apresentados no VII Simpósio Internacional de Atualização em Doenças do Fígado e VII Simpósio de Hepatites Virais realizado na Faculdade de Medicina da UFMG em outubro de 2018, e ficou em primeiro lugar entre os estudos de área básica. Em janeiro/2019, parte dos nossos dados foi selecionado para apresentação na forma de pôster no *2019 ASCO GI Symposium*, importante simpósio de tumores gastrointestinais promovido pela Sociedade Americana de Oncologia Clínica, que ocorreu em São Francisco (EUA). Além disso, nosso projeto rendeu também a elaboração de dois artigos científicos, o primeiro já submetido para publicação.

Portanto, considero esse momento um importante marco rumo a uma trajetória cheia de boas perspectivas no campo científico, com impacto na melhoria da qualidade da assistência aos pacientes oncológicos, com quem caminho diariamente.

APÊNDICES

APÊNDICE A - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Projeto: Associação do IGF1R (*insulin-like growth factor-1 receptor*) e de proteínas das vias MAPK e PI3K/AKT/mTOR aos diferentes tipos etiológicos de carcinoma hepatocelular

O (A) Sr.(a) _____ está sendo convidado(a) a participar, como voluntário(a), de um estudo científico com o objetivo comparar a presença da proteína mTOR em câncer de fígado (carcinoma hepatocelular) de diferentes causas. O estudo será realizado em pacientes portadores desse tipo de câncer, acompanhados no Hospital das Clínicas da UFMG. O câncer de fígado representa importante problema de saúde em todo o mundo e apesar dos avanços do conhecimento nos últimos anos, a sua origem não está totalmente esclarecida. Este estudo poderá contribuir para o esclarecimento de mecanismos que participam do desenvolvimento do câncer de fígado.

Caso o(a) Sr.(a) concorde em participar da pesquisa, serão coletados dados clínicos constantes no seu prontuário e será feita a pesquisa das proteínas nas amostras desses tumores obtidas durante cirurgia que o(a) Sr.(a) já realizou.

Os pesquisadores manterão em sigilo a identidade dos participantes, inclusive em qualquer publicação resultante do estudo, garantindo-se total anonimato e confidencialidade.

O (A) Sr.(a) poderá recusar-se a participar da pesquisa, ou mesmo desistir de participar da mesma a qualquer momento, sem que isso traga qualquer prejuízo à sua assistência no Hospital das Clínicas. Antes de assinar esse termo, o(a) Sr.(a) deve informar-se plenamente a respeito do estudo, não tendo medo ou timidez ao fazer perguntas sobre qualquer assunto que queira esclarecer.

É importante ter conhecimento das seguintes informações sobre o estudo:

Objetivo do estudo: investigar o padrão de expressão das proteínas de vias de sinalização em câncer de fígado de diferentes causas.

Procedimentos a serem realizados: se o(a) Sr.(a) for participar do nosso estudo, um pesquisador coletará os dados clínicos e resultados dos exames complementares do seu prontuário e preencherá um protocolo. Serão realizados exames para pesquisa das proteínas PI3K, AKT, mTOR, KRAS, BRAF, MEK1 e ERK1/2 no material retirado durante a cirurgia que você realizou e que se encontra armazenado no Departamento de Anatomia Patológica e Medicina Legal da Faculdade de Medicina da UFMG. Você não receberá nenhuma outra intervenção por causa da pesquisa.

Riscos potenciais: não há riscos significativos envolvidos em participar deste estudo, pois só utilizaremos dados já colhidos e pequena parte do material retirado durante a cirurgia que você já realizou como parte do seu acompanhamento médico.

Benefícios: não há benefícios em termos individuais imediatos. No entanto, esperamos contribuir para um maior entendimento do câncer de fígado.

O que devo fazer se tiver dúvidas ou perguntas: se você tiver qualquer pergunta, pode fazê-la na consulta a seu médico ou telefonar para nós. Você pode telefonar para

Dra. Teresa Cristina de Abreu Ferrari, no número (31)99984-6725, ou para o Dr. Paulo Henrique Diniz, no número (31)99659-1414. Caso tenha alguma dúvida sobre os seus direitos como paciente da pesquisa, você deverá ligar para o Presidente do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais (COEP/UFMG), no número (31)3409-4592, situado à Av. Antônio Carlos, 6627, Campus da Pampulha, Unidade Administrativa II - segundo andar, sala 2005. CEP: 31270-901, Belo Horizonte-MG; e-mail: coep@prpq.ufmg.br.

DECLARAÇÃO DE CONSENTIMENTO

Eu li este formulário de consentimento (ou alguém o explicou para mim), todas as minhas perguntas foram respondidas e concordo em participar deste estudo. Estou ciente de que eu posso desistir do estudo a qualquer momento, sem perder o direito de receber cuidados médicos. Não receberei remuneração financeira para participar dessa pesquisa.

Nome do paciente: _____

Assinatura do paciente: _____

Nome do investigador que prestou as informações: _____

Assinatura e CRM do investigador que prestou as informações: _____

Data: ____/____/____

APÊNDICE B – Protocolo de abordagem de pacientes a serem incluídos no estudo

Protocolo de abordagem de pacientes a serem incluídos na investigação do estudo “Associação do IGF1R (*insulin-like growth factor-1 receptor*) e de proteínas das vias MAPK e PI3K/AKT/mTOR aos diferentes tipos etiológicos de carcinoma hepatocelular”

1. IDENTIFICAÇÃO DO PACIENTE

1.1 Nome: _____
1.2 Registro: _____ 1.3 Idade: _____ DN: _____
1.4 Sexo: (M) (F) 1.5 Cor: (1) Branca (2) Parda (3) Negra
1.6 Estado Civil: _____ (1) Casado (2) Solteiro (3) Viúvo (4) Outro
1.7 Ocupação: _____ 1.8 Procedência: _____
1.9 Naturalidade: _____
1.10 Endereço: _____
1.11 Telefone: _____

2. Dados clínicos

2.1 História da moléstia atual (idade ao início dos sintomas e ao diagnóstico de cirrose):

2.2 Cirrose (1) Sim (2) Não Etiologia _____ CHILD-PUG (A) (B) (C)
2.3 Antecedentes Pessoais
2.3.1 Etilismo (1) Sim (2) Não (3) N/I 2.3.1.1 Hábito (1) Atual (2) Progresso (9) N/I Se
progresso, interrompeu há quanto tempo? _____
2.3.1.2 Quantidade _____ (g/dia) 2.3.1.3 Duração _____ (meses) 2.3.1.4
Ingestão diária de álcool durante pelo menos 1 ano (1) Sim (2) Não (9) N/I 2.3.2
Toxicomania (1) Sim (2) Não
2.3.2.1 Tipo de droga (1) Parenteral (2) Não parenteral (3) Intranasal
2.3.2.2 Hábito (1) Atual (2) Progresso (9) N/I 2.3.2.3 Duração _____ (meses)
2.3.3 Transfusão de sangue/hemoderivados (1) Sim (2) Não (9) N/I
Se sim, há quanto tempo? _____
2.3.4 Vida sexual ativa (1) Sim (2) Não (9) N/I Número de parceiros/ano _____ média
2.3.4.1 Heterossexualidade (1) Sim (2) Não (9) N/I
2.3.4.2 Homo/bissexualidade (1) Sim (2) Não (9) N/I
2.3.5 Hepatite prévia (1) Sim (2) Não (9) N/I
2.3.6 Contato com portadores de hepatite viral (1) Sim (2) Não (9) N/I
2.3.7 Tatuagens, piercings (1) Sim (2) Não (9) N/I 2.3.8
Antecedentes cirúrgicos (1) Sim (2) Não (9) N/I
Data: _____ Cirurgia: _____
2.3.9 Contato com águas naturais (1) Sim (2) Não (9) N/I 2.3.10
Exposição ambiental a solventes ou outras hepatotoxinas (1) Sim (2) Não (9) N/I 2.3.11
Outras doenças associadas: (1) Sim (2) Não (9) N/I
Qual(is) _____
2.3.12 Medicamentos em uso (ou uso progresso relevante) _____

2.4 Antecedentes familiares (1) ausente (2) irmão (3) pais (4) filho (5) outros (9) N/I

Qual (is): _____

3. EXAMES COMPLEMENTARES

SOROLOGIA - HEPATITE B

Data		
HBsAg		
Anti HBc IgM		
Anti HBc IgG		
HBeAg		
Anti HBs		
Anti HBe		
HBV DNA		

SOROLOGIA - HEPATITE C

DATA		
Anti HVC		
Genótipo		
RNA(PCR)(quantitativo)		
RNA(PCR)(qualitativo)		

Marcadores doença autoimune

Data		
FAN (título)		
FAN (padrão)		
Fator reumatóide		
Antimúsculo liso		
Anti-LKM1		
Anti-SLA		
Outros _____		

Data		
Bilirrubinas (T/D/I)		
Albumina		
RNI		
TGO / TGP		
FA / GGT		
LDH		
Alfafetoproteína		
Outros _____		

EXAMES DE IMAGEM

US abdominal (__/__/__) _____

TC abdominal (__/__/__) _____

RM abdominal (__/__/__) _____

ANATOMIA PATOLÓGICA

Exame nº _____ Data ____/____/____

Tamanho do maior nódulo neoplásico: _____

Número de nódulos neoplásicos: _____

APÊNDICE C – Protocolo para análise histológica

Exame microscópico

Tipo histológico

Número de nódulos neoplásicos: _____ Maior medida _____

Distribuição dos nódulos neoplásicos: unilobar _____ bilobar _____

Padrão histológico: _____ Padrão trabecular _____ Pseudo-acinar _____
Sólido _____ Fibrolamelar _____

Fibrose: _____

Inflamação tumoral (> 5 células inflamatórias/HPF ou agregados cels infl):

_____ sim _____ não

Necrose: _____ sim _____ não

Padrão citológico: _____ hepatocítico _____ células claras
_____ oncocítico _____ células fusiformes

_____ células gigantes _____ pleomórfico

Mitoses: HE _____ KI67 _____

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)

Extensão da neoplasia:

Cápsula: _____ livre _____ invadida focalmente

_____ invadida difusamente _____ pseudocápsula

Presença de embolização venosa ou linfática em HE: _____ Não _____ Sim

Presença de embolização venosa ou linfática em IMUNO: _____ CD34
_____ Não _____ Sim DII40 _____ Não _____ Sim

Presença de invasão de elementos hílares: _____ Não _____ Sim

Presença de metástase em linfonodos: ___ sim ___ não

Número de linfonodos: _____

Margens de ressecção: ___ livres ___ comprometidas ___ incerta

Diagnóstico incidental ___ Não ___ Sim

Parênquima hepático não tumoral:

___ Histologicamente dentro dos limites da normalidade

___ Alterações secundárias a processo expansivo intraparenquimatoso

___ Presença de hepatopatias crônicas não cirróticas

___ Cirrose:

- Grau de atividade inflamatória _____
- Marcadores etiológicos _____
- Nódulos displásicos _____

ANEXO I

Carta de aprovação do Comitê de Ética



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

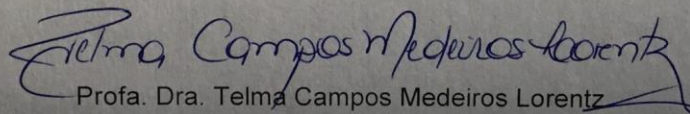
Projeto: CAAE – 44573615.7.0000.5149

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

DECISÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP aprovou, no dia 28 de julho de 2015, o projeto de pesquisa intitulado "**Associação do IGF1R (Insulin-Like Growth Factor-1 Receptor) e de proteínas das vias MAPK e PI3K/AKT/MTOR aos diferentes tipos etiológicos de carcinoma hepatocelular**" 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.


Prof. Dra. Telma Campos Medeiros Lorentz
Coordenadora do COEP-UFMG

ANEXO II

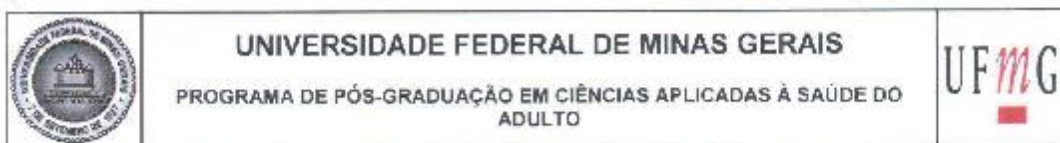
Submissão do artigo I ao periódico *Experimental and Clinical Transplantation*

Número de submissão: ECT-AO-06-19-0209

Experimental and Clinical Transplantation	
	
Prediction of long-term outcome according to the etiology of underlying chronic liver disease in patients who underwent liver transplantation for hepatocellular carcinoma treatment	
Journal:	<i>Experimental and Clinical Transplantation</i>
Manuscript ID:	ECT-OA-06-19-0209
Manuscript Type:	Original Article
Keywords:	liver cancer, treatment modalities, etiologic groups

ANEXO III

Folha de Aprovação da Defesa de Tese



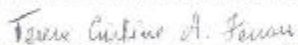
FOLHA DE APROVAÇÃO

Expressão de proteínas das vias de sinalização intracelular mitogen activated protein kinases (MAPK) e PI3K/AKT/mTOR e sua associação com parâmetros clínico-patológicos e desfechos clínicos em portadores de carcinoma hepatocelular de acordo com a etiologia da hepatopatia crônica subjacente


PAULO HENRIQUE COSTA DINIZ


Tese submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS APLICADAS À SAÚDE DO ADULTO, como requisito para obtenção do grau de Doutor em CIÊNCIAS APLICADAS À SAÚDE DO ADULTO, área de concentração CIÊNCIAS APLICADAS À SAÚDE DO ADULTO.

Aprovada em 09 de agosto de 2019, pela banca constituída pelos membros:

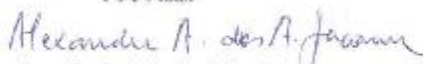

Prof. Teresa Cristina de Abreu Ferrari - Orientadora
UFMG


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


Prof. André Márcio Murad
UFMG


Prof. Mônica Maria Demas Álvares Cabral
UFMG


Prof. Camila França Campos
PUC Minas


Dr. Alexandre Andrade dos Anjos Jácome
MD Anderson Cancer Center

Belo Horizonte, 09 de agosto de 2019.