

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

FACULDADE DE MEDICINA

LEONARDO DO PRADO LIMA

**EXPRESSÃO DO BIOMARCADOR DE CÉLULAS TRONCO
(CK19) – ANÁLISE DE SOBREVIDA GERAL E LIVRE DE DOENÇA EM
PACIENTES COM CARCINOMA HEPATOCELULAR RESSECADOS**

Belo Horizonte

2022

LEONARDO DO PRADO LIMA

**EXPRESSÃO DO BIOMARCADOR DE CÉLULAS TRONCO
(CK19) – ANÁLISE DE SOBREVIDA GERAL E LIVRE DE DOENÇA EM
PACIENTES COM CARCINOMA HEPATOCELULAR RESSECADOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Cirurgia e à Oftalmologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor.

Linha de Pesquisa: Bases Moleculares de Neoplasias

Orientadora: Profa. Vivian Resende

Belo Horizonte – MG
Faculdade de Medicina da UFMG

2022

L732e Lima, Leonardo do Prado.
Expressão do Biomarcador de Células Tronco (CK19) [recursos eletrônicos]: análise de sobrevida geral e livre de doença em pacientes com Carcinoma Hepatocelular Ressecados. / Leonardo do Prado Lima. - - Belo Horizonte: 2022.
70f.: il.
Formato: PDF.
Requisitos do Sistema: Adobe Digital Editions.

Orientador (a): Vivian Resende.
Área de concentração: Bases Moleculares de Neoplasias.
Tese (doutorado): Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina.

1. Carcinoma Hepatocelular. 2. Queratinas. 3. Células-Tronco. 4. Colangiocarcinoma. 5. Imuno-Histoquímica. 6. Dissertação Acadêmica. I. Resende, Vivian. II. Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina. III. Título.

NLM: QU 325



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS APLICADAS À CIRURGIA E À OFTALMOLOGIA

FOLHA DE APROVAÇÃO

EXPRESSÃO DO BIOMARCADOR DE CÉLULAS TRONCO (CK19) - ANÁLISE DE SOBREVIDA GERAL E LIVRE DE DOENÇA EM PACIENTES COM CARCINOMA HEPATOCELULAR RESSECADOS.

LEONARDO DO PRADO LIMA

Tese de Doutorado defendida e aprovada, no dia vinte e seis de outubro de dois mil e vinte e dois, pela Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Cirurgia e à Oftalmologia da Universidade Federal de Minas Gerais constituída pelos seguintes professores:

Antônio Nocchi Kalil

Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre

Marcelo Moura Linhares

Universidade Federal de São Paulo

Luciana Costa Faria

Universidade Federal de Minas Gerais

Eduardo Paulino Junior

Universidade Federal de Minas Gerais

Vivian Resende - Orientadora

Universidade Federal de Minas Gerais

Belo Horizonte, 26 de outubro de 2022.



Documento assinado eletronicamente por **Eduardo Paulino Junior, Membro**, em 27/10/2022, às 08:56, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Vivian Resende, Coordenador(a) de curso de pós-graduação**, em 27/10/2022, às 14:51, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Luciana Costa Faria, Professora do Magistério Superior**, em 27/10/2022, às 18:56, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Marcelo Moura Linhares, Usuário Externo**, em 01/11/2022, às 13:19, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Francisco Guilherme Cancela e Penna, Professor Magistério Superior - Voluntário**, em 08/11/2022, às 10:49, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Tulio Pinho Navarro, Professor do Magistério Superior**, em 23/12/2022, às 11:34, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1808492** e o código CRC **CC97C31C**.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

FACULDADE DE MEDICINA

Reitora:

Profa. Sandra Regina Goulart Almeida

Vice-Reitor:

Prof. Alessandro Fernandes Moreira

Pró-Reitora de Pós-Graduação:

Profa. Isabela Almeida Pordeus

Pró-Reitor de Pesquisa:

Prof. Fernando Marcos dos Reis

Diretora da Faculdade de Medicina:

Profa. Alamanda Kfoury Pereira

Coordenador do Centro de Pós-Graduação:

Prof. Tarcizo Afonso Nunes

**Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Cirurgia
e à Oftalmologia:**

Profa. Vivian Resende

**Membros do Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à
Cirurgia e à Oftalmologia:**

Prof.^a Vivian Resende (Coordenadora)

Prof. Túlio Pinho Navarro (Vice-coordenador)

Prof. Daniel Vitor de Vasconcelos Santos

Prof. Márcio Bittar Nehemy

Prof. Marco Antônio Percope de Andrade

Representante Discente:

Artur William Caldeira Abreu Veloso

Ao meu pai, João Eustáquio de Lima, que me ensinou o prazer da vida acadêmica,

À minha mãe, Cristina Maria do Prado Lima, pelo amor à Medicina.

À minha esposa Raquel Sant'Ana Bonisson,

Aos meus filhos Laura Bonisson do Prado Lima e

João Bonisson do Prado Lima,

pelo amor incondicional.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Vivian Resende por todo carinho e dedicação à pesquisa e aos seus alunos.

Ao Prof. Dr. Eduardo Paulino e à Profa. Dra. Paula Vidigal do Departamento de Anatomia patológica da Faculdade de Medicina da UFMG pela ajuda com a análise imunohistoquímica dos tumores.

À Profa. Dra. Carla Jorge Machado do Departamento de Medicina Social e Preventiva da Faculdade de Medicina da UFMG, pelo auxílio na análise estatística.

À equipe multidisciplinar do Ambulatório de Nódulos Hepáticos do Hospital das Clínicas da UFMG pela excelente assistência prestada aos pacientes e pela contribuição na coleta de dados.

Ao programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Cirurgia e à Oftalmologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo amparo à essa pesquisa.

LISTA DE ABREVIATURAS

AFP - Alfafetoproteína

EpCAM - *Epithelial Cell Adhesion Molecule*

CHC - Carcinoma Hepatocelular

IHQ – Imuno-histoquímica

HBV – Vírus B

HCV – Vírus C

DNA - Ácido Desoxirribonucleico

RNA - Ácido Ribonucleico

siRNA - *Small Interfering RNA*

AJCC - *American Joint Committee on Cancer*

CSC – *Cancer Stem Cells*

TNM – Tumor (T), Linfonodos (N) e Metástase (M)

COEP - Comitê de Ética e Pesquisa

NASH – *Nonalcoholic steatohepatitis* (esteatohepatite não alcoólica)

HE – Hematoxilina e Eosina

Hep Par 1 – Antígeno Hepatócito Específico

CK19 - Citoqueratina 19

WHO - *World Health Organization*

OMS – Organização Mundial da Saúde

BCLC - *The Barcelona Clinic Liver Cancer*

DAB – Diaminobenzidina

PDGFR α - Receptor alfa do fator de crescimento derivado de plaquetas

T β R1 - Receptor tipo I do fator transformador de crescimento

TERT - Promotor da transcriptase reversa da telomerase

CYFRA 21-1 - Antígeno formado por um fragmento da citoqueratina 19

SALL4 - Proteína 4 do tipo sal

CPSI - Ciclo da ureia carbamoilfosfatosintetase

ASA - Classificação de estado físico da Sociedade Americana de Anestesiologistas

AP - Atividade de protrombina

RNI - Relação Normalizada Internacional

LG - Leucócitos globais

GGT - Gama Glutamil Transferase

AST - Aspartato aminotransferase

ALT - Alanina aminotransferase

GPC3 - Glipicano-3

RESUMO

A expressão de marcadores biomoleculares de células tronco no carcinoma hepatocelular (CHC) tem sido associada a mau prognóstico e ao comportamento biológico agressivo. Tumores que expressam citoqueratina 19 (CK19), um biomarcador de células tronco, são tidos como agressivos levando a menor sobrevida geral e livre de doença. O objetivo dessa pesquisa foi verificar a expressão de CK19, por meio de análise imuno-histoquímica, em 87 pacientes (61 homens e 26 mulheres) submetidos à ressecção de CHC com intenção curativa. Todos os pacientes incluídos no estudo tinham função hepática preservada. A expressão imuno-histoquímica de CK19 foi positiva em 12 pacientes (15%), nos quais em 9 (75%) a EpCAM foi positiva. A média dos valores de alfafetoproteína foi de 5637,77+/-30,53(min.1,68; max.199.000,00) e a mediana de 13,97 (IQ: 4,2; IIIQ: 212). Hepatite por vírus C foi a principal etiologia da cirrose nos pacientes (40,22%) seguido pelo vírus B (22,98%). O CHC esteve presente em 19 pacientes (21,84%) com fígado não cirrótico e em 13 (14,94%) a etiologia foi etanólica. A maioria dos pacientes foi submetida a hepatectomia menor e a necessidade de hemotransusão per-operatória ocorreu em 32% dos pacientes. A mortalidade per-operatória foi de 12,64%. O tempo médio de internação foi de 6,87 (min 3; max 33) dias. Os CHCs foram, na maioria, bem diferenciados. Invasão angiolinfática esteve presente em 44 (50,57%) dos tumores. Não houve associação entre a marcação positiva para CK19 e as variáveis analisadas. A sobrevida geral após ressecção do carcinoma hepatocelular foi de 83,4 % em 12 meses, 66,7% aos 36 meses e 44,3% aos 60 meses. A sobrevida livre de doença foi de 73,8% em 12 meses, 37,8% aos 36 meses e 27,7% aos 60 meses. Não houve associação positiva entre a expressão de CK19 com a sobrevida geral ou sobrevida livre de doença. O número de nódulos maior que 3 teve impacto negativo na curva de sobrevida geral e livre de doença ($p=0,033$ e $p=0,004$). Em conclusão, o maior número de nódulos teve impacto negativo na sobrevida geral e livre de doença, enquanto a positividade para CK19 não apresentou associação com a sobrevida dos pacientes.

Palavras-chave: carcinoma hepatocelular, citoqueratina 19, células tronco cancerosas, imuno-histoquímica.

SUMMARY

The expression of biomolecular stem cell markers in hepatocellular carcinoma (HCC) has been associated with poor prognosis and aggressive biological behavior. Tumors that express cytokeratin 19 (CK19), a stem cell biomarker, are considered aggressive, leading to lower overall and disease-free survival. The objective of this research was to verify the expression of CK19, through immunohistochemical analysis, in 87 patients (61 men and 26 women) who underwent resection of HCC with curative intent. All patients included in the study had preserved liver function. The immunohistochemical expression of CK19 was positive in 12 patients (15%), in which 9 (75%) EpCAM was positive. The mean alpha-fetoprotein values were 5637.77 \pm 30.53 (min.1.68; max.199,000.00) and the median was 13.97 (IQ: 4.2; IIIQ: 212). Virus C hepatitis was the main etiology of cirrhosis in patients (40.22%) followed by virus B (22.98%). HCC was present in 19 patients (21.84%) with non-cirrhotic liver and in 13 (14.94%) the etiology was ethanolic. Most patients underwent minor hepatectomy and the need for perioperative blood transfusion occurred in 32% of patients. The perioperative mortality was 12.64%. The mean length of hospital stay was 6.87 (min 3; max 33) days. Most CHCs were well differentiated. Angiolymphatic invasion was present in 44 (50.57%) of the tumors. There was no association between positive CK19 expression and the variables analyzed. Overall survival after resection of hepatocellular carcinoma was 83.4% in 12 months, 66.7% at 36 months and 44.3% at 60 months. Disease-free survival was 73.8% in 12 months, 37.8% at 36 months and 27.7% at 60 months. There was no positive association between CK19 expression and overall survival or disease-free survival. The number of nodules greater than 3 had a negative impact on the overall and disease-free survival curve ($p=0.033$ and $p=0.004$). In conclusion, the greater number of nodules had a negative impact on overall and disease-free survival, while CK19 positivity was not associated with patient survival.

Keywords: hepatocellular carcinoma, cytokeratin 19, cancer stem cells, immunohistochemistry.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** EpCAM e sua variedade de funções⁴².....24
- Figura 2.** Desenho esquemático da rede reguladora do CK19 ⁴⁴.....26
- Figura 3.** Corte histológico de CHC que apresenta os dois imunofenótipos (CHC-colangiocarcinoma combinado clássico). As figuras A, D e G mostram a área tumoral corada em HE. As células com marcação positiva para CK19 (componente de colangiocarcinoma): A (seta), E (seta) e H (marcação difusa em castanho) são negativas para Hep Par 1 como pode ser identificado nas figuras C (seta), F (seta) e I. Observa-se que as células com fenótipo de CHC mostram-se coradas em castanho pelo Hep Par 1. 40
- Figura 4.** Cortes histológicos de CHC com dois imunofenótipos (CHC-colangiocarcinoma combinado de células intermediárias) com marcação simultânea pela CK19 e Hep Par 1. As figuras A e D mostram os cortes histológicos de CHC corados pela HE. As figuras B e E evidenciam células esparsas com marcação membranar positiva para CK 19 coradas em castanho. Nas figuras C e F nota-se a marcação citoplasmática difusa do CHC pelo Hep Par 1 coradas em castanho.41
- Figura 5.** Corte histológico de CHC. A. área do tumor corada pela HE. B. Tumor com marcação negativa para Hep Par 1. C e D. A mesma região tumoral apresenta marcação positiva para CK19 e EpCAM, respectivamente. As setas apontam ducto biliar que foi o controle interno positivo para CK19 e EpCAM.42
- Figura 6.** Cortes histológicos de CHC com dois imunofenótipos (CHC-colangiocarcinoma combinado de células intermediárias). A. área do tumor corada pela HE. B. Tumor com marcação positiva (citoplasmática) para Hep Par 1. C e D. A mesma região tumoral apresenta marcação membranar positiva para CK19 e EpCAM, respectivamente.42
- Figura 7.** Cortes histológicos de CHC com dois imunofenótipos (CHC-colangiocarcinoma combinado de células intermediárias). A. área do tumor corada pela HE. B. Tumor com marcação positiva (citoplasmática) para Hep Par 1. C e D. A mesma região tumoral apresenta marcação membranar positiva para CK19 e EpCAM, respectivamente.43
- Figura 8.** Correlação entre o número de nódulos e a curva de sobrevida geral pelo método de Kaplan-Meier, em pacientes com CHC ressecados.....47
- Figura 9.** Curva de sobrevida geral pelo método de Kaplan-Meier, em pacientes com CHC ressecados.48

Figura 10. Correlação da positividade para CK19 com curva de sobrevida geral pelo método de Kaplan-Meier, em pacientes com CHC ressecados.	48
Figura 11. Curva de sobrevida livre de doença pelo método de Kaplan-Meier em pacientes com CHC ressecados.	49
Figura 12. Correlação da positividade para CK19 com curva de sobrevida livre de doença pelo método de Kaplan-Meier em pacientes com CHC ressecados.	50
Figura 13. Correlação entre o número de nódulos e a curva de sobrevida livre de doença pelo método de Kaplan-Meier, em pacientes com CHC ressecados.	51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Características dos anticorpos primários Anti CK19, Hep Par 1 e EpCAM.	32
Tabela 2. Dados clínico-demográficos de pacientes com carcinoma hepatocelular.	35
Tabela 3. Dados de exames laboratoriais pré-operatórios em pacientes com carcinoma hepatocelular.	36
Tabela 4. Características relacionadas ao ato cirúrgico em pacientes com carcinoma hepatocelular.	37
Tabela 5. Frequências absolutas e relativas referentes às características morfológicas, anatomopatológicas e imuno-histoquímicas dos carcinomas hepatocelulares.	38
Tabela 6. Descrição da expressão de biomarcadores moleculares de CK19, EpCAM, Hep Par 1 e o nível sérico de AFP nos 12 casos com de CHC CK19 positivos.	39
Tabela 7. Associação entre as variáveis clínico-patológicas e a expressão de CK19 no carcinoma hepatocelular.	45
Tabela 8. Análise univariada das características clínico-demográficas na sobrevida geral dos pacientes com CHC submetidos a ressecção com intenção curativa.	46
Tabela 9. Análise univariada das características clínico-demográficas na sobrevida livre de doença dos pacientes com CHC submetidos a ressecção com intenção curativa.	51

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	REVISÃO DA LITERATURA	18
3	OBJETIVOS	29
3.1	Geral	29
3.2	Específicos	29
4	MÉTODO	30
4.1	Pacientes	30
4.2	Aspectos éticos	30
4.3	Dados clínico-cirúrgicos, anatomopatológicos e de sobrevida	30
4.4	Amostras	31
4.5	Imuno-histoquímica	32
4.6	Análises estatísticas	33
5	RESULTADOS	35
5.1	Análise descritiva da amostra	35
5.2	Imuno-histoquímica	38
5.3	Análise univariada para a expressão de Citoqueratina 19	44
5.4	Análise Multivariada para expressão positiva de Citoqueratina 19	46
5.5	Análise de sobrevivência	46
6	DISCUSSÃO	53
7	CONCLUSÃO	58
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59
9	ANEXOS	66
9.1	ANEXO 1 - Classificação TNM do Hepatocarcinoma - AJCC 8ª edição	66
9.2	ANEXO 2 - Protocolo para análise imuno-histoquímica	67
9.3	ANEXO 3 - Aprovação pelo comitê de ética	69
9.4	ANEXO 4 – Termo de Consentimento Livre Esclarecido	70

1 INTRODUÇÃO

O carcinoma hepatocelular é uma doença de apresentação clínica e patológica heterogênea, com mecanismos de carcinogênese ainda por serem elucidados. Entende-se que a doença teria amplo espectro de apresentações, desde tumores indolentes, de melhor prognóstico, com possibilidade de tratamentos curativos, a tumores muito agressivos, que recidivam precocemente sem possibilidade curativa. Identificar e entender a biologia molecular de cada um desses tumores, além do perfil de evolução de cada paciente é de fundamental importância para o tratamento oncológico adequado.

Postula-se que tumores que expressam marcadores biomoleculares de células tronco sejam considerados de pior prognóstico, com comportamento biológico agressivo, maior invasividade, com menor grau de diferenciação e presença de invasão angiolímfática mais frequente. A CK19 tem se mostrado marcador relevante de células progenitoras biliares/hepáticas em tumores hepáticos primários. Determinar a expressão imuno-histoquímica desse marcador permitiria classificar os tumores quanto às características histológicas e estratificar em grupos prognósticos específicos, de acordo com sua biologia molecular. Seria possível, também, identificar potenciais alvos para ação de quimioterápicos, migrando de uma abordagem geral baseada em dados populacionais para uma abordagem personalizada do estadiamento do CHC, o que os sistemas atuais ainda não podem determinar.

A CK19, assim como outros biomarcadores tumorais, tem se mostrado alvo promissor para ação direta de quimioterápicos ou a partir da inativação dos seus mecanismos moleculares regulatórios^{1; 2}. Alguns estudos mostram o benefício de uso de inibidores do receptor alfa do fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGFR α) como os inibidores de tirosinaquinase (imatinibe, regorafenibe e lenvatinibe), exercendo efeito específico em CHCs positivos para CK19, e que já foram aprovados como primeira linha ou segunda linha em casos de CHC³. Outros medicamentos de ação específica como o Galunisertib (LY2157299), um potente inibidor do receptor tipo I do fator transformador de crescimento (T β RI), tem se mostrado promissor na inibição da ativação da sinalização TGF β /Smad em células CK19 positivas, podendo suprimir a sua agressividade³.

Em trabalho prévio o autor desta Tese estudou a expressão do marcador de células tronco EpCAM e a sua correlação com a expressão de alfafetoproteína no CHC. Com o

intuito de verificar os possíveis fenótipos de CHC com expressão de marcadores de células tronco, deu-se continuidade à pesquisa realizando-se o presente estudo, no qual ampliou-se o painel de marcadores com análise da expressão de CK19. Acrescentou-se o estudo de sobrevida livre de doença e sobrevida global nos pacientes submetidos ao tratamento cirúrgico com intenção curativa do CHC que expressaram estes biomarcadores.

2 REVISÃO DA LITERATURA

O carcinoma hepatocelular (CHC) é a sexto tipo de câncer mais comum e quarta causa de mortalidade por câncer em todo o mundo^{4; 5; 6; 7}. Corresponde a 90% dos tumores primários do fígado^{8; 9}, sendo mais comum no sexo masculino do que no feminino na proporção de 3:1, com idade média de início superior à sexta década na América do Norte e na Europa e entre a terceira e a sexta décadas na Ásia e na África^{4; 10}. A incidência mundial varia, sendo o continente Asiático o que apresenta a maior incidência (72,5%), seguido pela Europa (9,8%), África (7,7%), América do Norte (5%), América Latina e Caribe (4,6%) e Oceania (0,4%)⁴. O principal fator de risco é a doença hepática crônica levando à cirrose^{9; 11}. A hepatite viral crônica é a principal causa de carcinoma hepatocelular em todo o mundo segundo dados do *The Global Cancer Observatory* de dezembro de 2020⁴.

Cerca de 80% dos casos o CHC se desenvolve em fígados cirróticos¹². Entende-se que o microambiente inflamatório criado pela agressão celular aos hepatócitos, seja por etiologia viral, metabólica (NASH, hemocromatose, deficiência de alfa-1 antitripsina, hipercitrulinemia, frutosemia), exposição à agentes nocivos ao fígado (álcool, aflatoxinas, esteroides anabolizantes) ou por doenças genéticas/hereditárias (colangite biliar primária, doença de Wilson, Síndrome de Alagille, Ataxia telangiectasia, Tirosinemia tipo I, etc), desencadeiam danos no tecido hepático, levando a cirrose associada à regeneração hepática e subsequente CHC^{11; 12; 13}.

O processo de formação do CHC é gradual, evoluindo de um nódulo displásico de baixo grau para um nódulo displásico de alto grau, seguido de carcinoma hepatocelular inicial até chegar ao carcinoma hepatocelular avançado¹⁴. Esse processo é acompanhado de acúmulo de alterações moleculares como encurtamento dos telômeros, ativação do promotor da transcriptase reversa da telomerase (TERT), inativação do inibidor do *checkpoint* do ciclo celular, sendo a mutação do promotor TERT um evento importante para a progressão do carcinoma hepatocelular¹⁴. Na evolução dos nódulos displásicos para o carcinoma inicial ocorre a indução de suprimento sanguíneo arterial, podendo ser encontradas artérias não pareadas com aumento da capilarização sinusoidal além da vizinhança dos tratos portais. As células neoplásicas crescem e substituem os cordões hepáticos não neoplásicos ao redor de tratos portais preexistentes e/ou invadem os tratos portais (invasão estromal)¹⁴, sendo vistas como lesão hipervasculares aos métodos de imagem contrastados.

De acordo com Classificação de Tumores do Sistema Digestivo da Organização Mundial da Saúde (OMS)¹⁵ os CHCs podem ser classificados histologicamente em diversos subtipos: fibrolamelar, cirrótico, tipo de célula clara, esteato-hepático, macrotrabecular, cromóforo, rico em neutrófilos e rico em linfócitos. O carcinoma fibrolamelar é um subtipo distinto de CHC que difere dos demais subtipos em relação aos parâmetros clínicos, histológicos e moleculares. Além disso, existem também outros subtipos histológicos menos comuns, como os subtipos de células fusiformes/sarcomatoides, células gigantes, indiferenciadas e pequenas células.

Macroscopicamente, os CHCs podem se apresentar como um grande nódulo solitário circunscrito, com ou sem nódulos satélites menores adjacentes, de coloração amarelo acastanhado a verde (a depender da proporção de gordura e de bile), de consistência macia, podendo apresentar áreas de necrose e hemorragia¹³. Raramente, o carcinoma hepatocelular pode ter crescimento exofítico^{16; 17}.

Além dos subtipos, o CHC também é caracterizado pelo grau de diferenciação histológico em bem, moderadamente, pouco diferenciado e indiferenciado, padrão de crescimento estrutural (trabecular, pseudoglandular, sólido e macrotrabecular - em ordem decrescente de frequência) ou pelo tipo de célula (célula clara, pequena célula, célula fusiforme ou célula gigante). Outras características úteis para o diagnóstico incluem falta de tríade portal no tumor, redução da estrutura de reticulina normal, expansão das placas de hepatócitos e aumento da arterialização, com artérias ou arteríolas não pareadas. Em 50% dos CHCs ressecados observam-se padrões/subtipos mistos, geralmente, trabeculares com um ou dois outros subtipos, sendo o padrão macrotrabecular associado a pior prognóstico⁸.

As células do CHC se assemelham aos hepatócitos em função, características citológicas e padrões de crescimento. O grau de diferenciação reflete a semelhança das células tumorais com os hepatócitos normais. Quanto mais indiferenciado o tumor, mais as células neoplásicas perdem seus traços/características de hepatócitos normais. O sistema de classificação proposto pela OMS é apresentado a seguir:

-Bem diferenciado: as células tumorais se assemelham a hepatócitos maduros com atipia nuclear mínima a leve. São tumores, geralmente, pequenos compostos por células de aspecto tipicamente poligonais, com citoplasma granular e eosinofílico, dispostas em um padrão trabecular fino, com raras estruturas pseudoglandulares. Crescem em padrão trabecular, com cordões de células separados por sinusoides revestidos por células endoteliais, mimetizando as placas celulares e sinusoides do fígado normal. O estroma do tecido conjuntivo é escasso e as fibras de reticulina são significativamente reduzidas ou ausentes;

-Moderadamente diferenciado: as células tumorais tem características malignas na coloração pela hematoxilina e eosina (HE) e a morfologia sugere diferenciação hepatocelular com atipia nuclear moderada. São tumores geralmente maiores, compostos por células tumorais poligonais em padrão trabecular espesso e, frequentemente, com padrão pseudoglandular.

-Pouco diferenciados: as células tumorais parecem malignas em HE e muitas vezes não podem ser distintas de outras neoplasias pouco diferenciadas. Há atipia nuclear intensa. São compostos de células tumorais pleomórficas em um padrão de crescimento sólido ou compacto.

Segundo a classificação de Edmondson-Steiner modificada, os CHCs são assim subdivididos:

Grau I: as células tumorais são difíceis de serem diferenciadas das células hepáticas hiperplásicas; células com arranjos em trabéculas finas – geralmente vistos em focos em tumores grau II;

Grau II: as células tumorais assemelham-se a hepatócitos maduros, com núcleos ligeiramente maiores e hipercromáticos; citoplasma amplo e eosinofílico; formação frequente de ácinos; associado ao padrão trabecular;

Grau III: as células tumorais são maiores e possuem núcleos mais hipercromáticos que o grau II, ocupando grande proporção da célula com citoplasma menos acidófilo, formação de bile e estruturas acinares menos frequentes; distorção trabecular; numerosas células gigantes tumorais;

Grau IV: as células tumorais são intensamente hipercromáticas, com citoplasma mais escasso e pouco granular; arranjo medular, trabéculas são difíceis de se encontrar; as células tumorais parecem menos coesas e podem parecer gigantes, fusiformes; padrão de crescimento medular com perda de trabeculação; ácinos extremamente raros, assim como bile.

O carcinoma hepatocelular também pode ser classificado em dois tipos baseado em suas características moleculares e imunológicas em subtipos proliferativo e não-proliferativo. O subtipo proliferativo é caracterizado por tumores mais agressivos, grau histológico indiferenciado, com maior invasão vascular e níveis séricos elevados de AFP. Está comumente associado a infecção por vírus B e tem pior prognóstico. O subtipo proliferativo é ainda subdividido em duas subclasses: S1 ou iCluster 3, caracterizado pela ativação de Wnt–TGF β , que conduz a um fenótipo imunexausto, e S2 ou iCluster 1, caracterizado por um fenótipo semelhante ao progenitor, com a expressão de marcadores de células-tronco (CK19, EpCAM) e vias de sinalização IGF2 e EpCAM ativadas. O subtipo não-proliferativo é

caracterizado por tumores menos agressivos, grau histológico diferenciado, níveis séricos baixos de AFP e invasão vascular menos frequente. Está comumente associado a infecção por vírus C, NASH e esteato-hepatite alcoólica. O subtipo não-proliferativo é ainda subdividido em duas subclasses: a subclasse WNT- β -catenina CTNNB1 caracterizado por uma sinalização Wnt canônica dominante associada a mutações no CTNNB, que conduz um fenótipo imunoexcluído e microambiente tumoral de baixa inflamação, e a subclasse Interferon caracterizado pela ativação da sinalização de IFN α 5 e via de sinalização IL6-JAK-STAT altamente ativada, com um microambiente tumoral mais inflamatório. Esta classe apresenta estabilidade cromossômica com frequentes mutações do promotor TERT^{18;19}.

O estudo com painel imuno-histoquímico pode auxiliar no diagnóstico e classificação dos carcinomas hepatocelulares, assim como no diagnóstico diferencial com outros tumores hepáticos de linhagens progenitoras semelhantes. Os CHCs podem apresentar marcação para antígeno hepatocitário específico 1 (Hep Par 1), arginase-1, glipicano-3 (GPC3) e alfafetoproteína (AFP)¹³. A AFP (com marcação citoplasmática) é altamente específica, mas tem pouca sensibilidade, sendo frequentemente negativa em tumores bem diferenciados. A arginase-1 (com padrão de marcação citoplasmática ou nuclear) é o marcador mais sensível e específico para todos os graus de diferenciações do CHC, enquanto o glipicano-3 (com padrão de marcação citoplasmática) é altamente sensível para tumores pouco diferenciados, mas tem baixa sensibilidade no carcinoma hepatocelular bem diferenciado^{7;20}. O uso combinado de arginase-1 e glipicano-3 permite a identificação de quase todos os casos de CHC pouco diferenciado. A arginase-1 é relatada como marcador mais sensível do que Hep Par 1, no entanto, sua expressão pode ser identificada em outros tumores não hepáticos.

O Hep Par 1 (com padrão de marcação citoplasmática granular difusa devido à ligação mitocondrial) tem alta sensibilidade para tumores bem a moderadamente diferenciados, mas em até 50% dos carcinomas hepatocelulares pouco diferenciados podem perder a sua expressão^{21;22}. Muitas vezes é utilizado na diferenciação de carcinomas hepatocelulares com características adenoides de adenocarcinomas, tanto primários do fígado quanto lesões metastáticas de outros sítios para o fígado (como carcinoma de células renais, tumores adrenocorticais, carcinoide, melanoma maligno e adenocarcinomas pouco diferenciados). O Hep Par 1 é um anticorpo monoclonal murino cujo alvo não é bem conhecido, mas acredita-se que esteja localizado nas mitocôndrias. Um estudo recente mostrou que o antígeno para o anticorpo Hep Par 1 é a enzima do ciclo da ureia carbamoilfosfatosintetase (CPSI). A CPSI é uma enzima limitante da taxa no ciclo da uréia intramitocondrial, relativamente específica do fígado. Dados mostram que CPSI não é expressa em linhagens celulares de câncer de fígado

humano em cultura, levantando a questão se a supressão da expressão de CPS1 tem relevância para a carcinogênese hepática. Ainda faltam dados para determinar qual papel a expressão de CPS1 desempenha na carcinogênese hepática²².

A ressecção cirúrgica encontra-se entre as modalidades terapêuticas curativas, segundo os critérios de *Barcelona Clinic Liver Cancer (BCLC)* ²³. Porém, menos de 20% dos pacientes diagnosticados são passíveis de tratamento, além de haver frequente recorrência pós-operatória ^{8;24}. Mesmo tratados em estágios iniciais, o índice de sobrevida em cinco anos é de apenas 55%, chegando a índices ainda menores em estadios mais avançados ²⁵.

Várias características patológicas ou cirúrgicas têm sido estabelecidas como preditores de risco ao pior prognóstico. Esses incluem o tamanho do tumor, o número de nódulos, a presença de invasão angiolinfática, trombose tumoral da veia porta, presença de nódulos satélites, grau de diferenciação das células tumorais e invasão da cápsula ⁸.

O tamanho do tumor (usualmente maior que 5cm de diâmetro), múltiplos nódulos, margem de ressecção menor que um centímetro, estágio do tumor (incluindo invasão angiolinfática) são considerados fatores independentes, associados com recorrência precoce (em dois anos) após ressecção cirúrgica. Além disso, recorrência tardia (maior que 2 anos) é significativamente associada com a atividade inflamatória, função hepática e dosagem sanguínea de alfafetoproteína (AFP) aumentada ^{17; 26; 27; 28}.

A alfafetoproteína é uma glicoproteína produzida normalmente durante o desenvolvimento fetal e neonatal pelo fígado, saco gestacional e, em pequenas concentrações, pelo trato gastrointestinal. Ela é expressa em fígado fetal, mas não, sob circunstâncias normais, em tecidos adultos saudáveis. A sua dosagem sanguínea é frequentemente utilizada como biomarcador para os tumores de células germinativas e carcinoma hepatocelular. Nos estágios iniciais da hepatocarcinogênese, o gene da AFP é reativado nas células do fígado e, por meio de mecanismos intracelulares citoplasmáticos, promove a proliferação de células malignas ²⁹. A ativação extracelular também pode ser responsável por acelerar o crescimento de células de CHC metastático ³⁰.

Estudos moleculares têm por objetivo a realização do diagnóstico precoce do CHC, por meio de um programa de triagem para indivíduos com alto risco, selecionados entre aqueles com hepatopatias crônicas ³¹. Esses estudos procuram identificar vias moleculares associadas com o mecanismo de carcinogênese e agressividade dos diferentes tipos de tumores. Uma das vias mais envolvidas na carcinogênese do CHC demonstrada é a via da Wnt/ β -catenina ^{32; 33; 34}. A sinalização aberrante, principalmente, devido a mutações no gene β -catenina, é encontrada em 30% a 40% dos CHCs humanos ³³. Outras mutações e alterações

cromossômicas frequentes incluem o promotor da transcriptase reversa da telomerase (TERT), TP53, axis inibidor-1 (AXIN1), AT- proteína contendo domínio de interação rico 1A (ARID1A), fator nuclear eritroide 2-like 2 (NFE2L2), ARID2, esclerose tuberosa 1 (TSC1), TSC2 e proteína ribossômica-S6-quinase 90-kD 3 (RPS6KA3). As mutações CTNNB1 e TP53 são mutuamente exclusivas. Embora as características histológicas e moleculares dos CHCs sejam muito heterogêneas, existem vários subtipos histológicos que são conhecidos por abrigar alterações genéticas específicas e podem ter potencial para uma classificação molecular do CHC.

Tem sido demonstrado que a presença de pequena subpopulação distinta de células exibindo propriedades consistentes com células tronco, tais como, autorenovação, proliferação celular e diferenciação dentro do CHC. As células tronco cancerosas (do inglês *Cancer Stem Cells* - CSC) seriam responsáveis por iniciar a formação dos tumores, assim como seus padrões de comportamento biológico, incluindo a invasão angiolímfática, metástases, recidiva e a resistência à quimioterapia e terapia de radiação³⁵. Muitas proteínas de superfície têm sido sugeridas como marcadores biomoleculares de CSC no CHC, dentre elas a citoqueratina 19 (CK19) e a molécula de adesão da célula epitelial (do inglês, *Epithelial Cell Adhesion Molecule* - EpCAM). Os carcinomas hepatocelulares que expressam marcadores biomoleculares de células tronco são considerados tumores de piores prognóstico, com comportamento biológico agressivo e invasivo, com grau histológico menos diferenciado e presença de invasão angiolímfática mais frequente^{35; 36; 37; 38; 39; 40}.

A EpCAM é uma glicoproteína transmembrana do tipo I, conhecida como o antígeno câncer específico 17-1 A, que atua como uma molécula de adesão celular homofílica independente de cálcio (**figura 1**). A hiperexpressão desta molécula tem sido descrita em várias neoplasias malignas epiteliais e no CHC está expressa em 15,9% a 48,7% dos tumores²⁵. A EpCAM é clivada por proteólise no ligante extracelular e no domínio intracelular na superfície de células cancerosas. O domínio intracelular da EpCAM funciona diretamente como fator de transcrição que ativa a c-myc, ciclina A e ciclina E na promoção do ciclo e proliferação celular^{28; 41}.

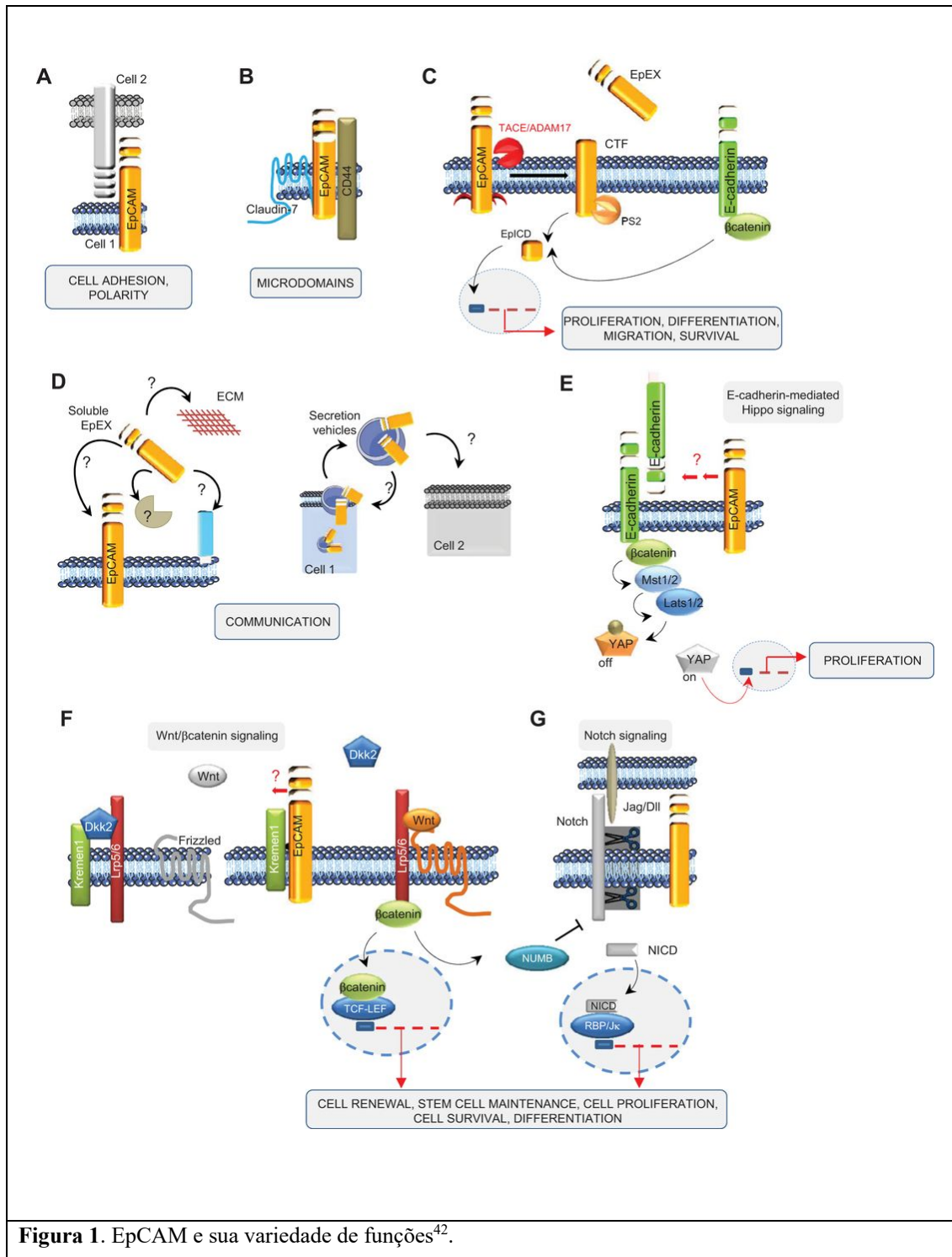
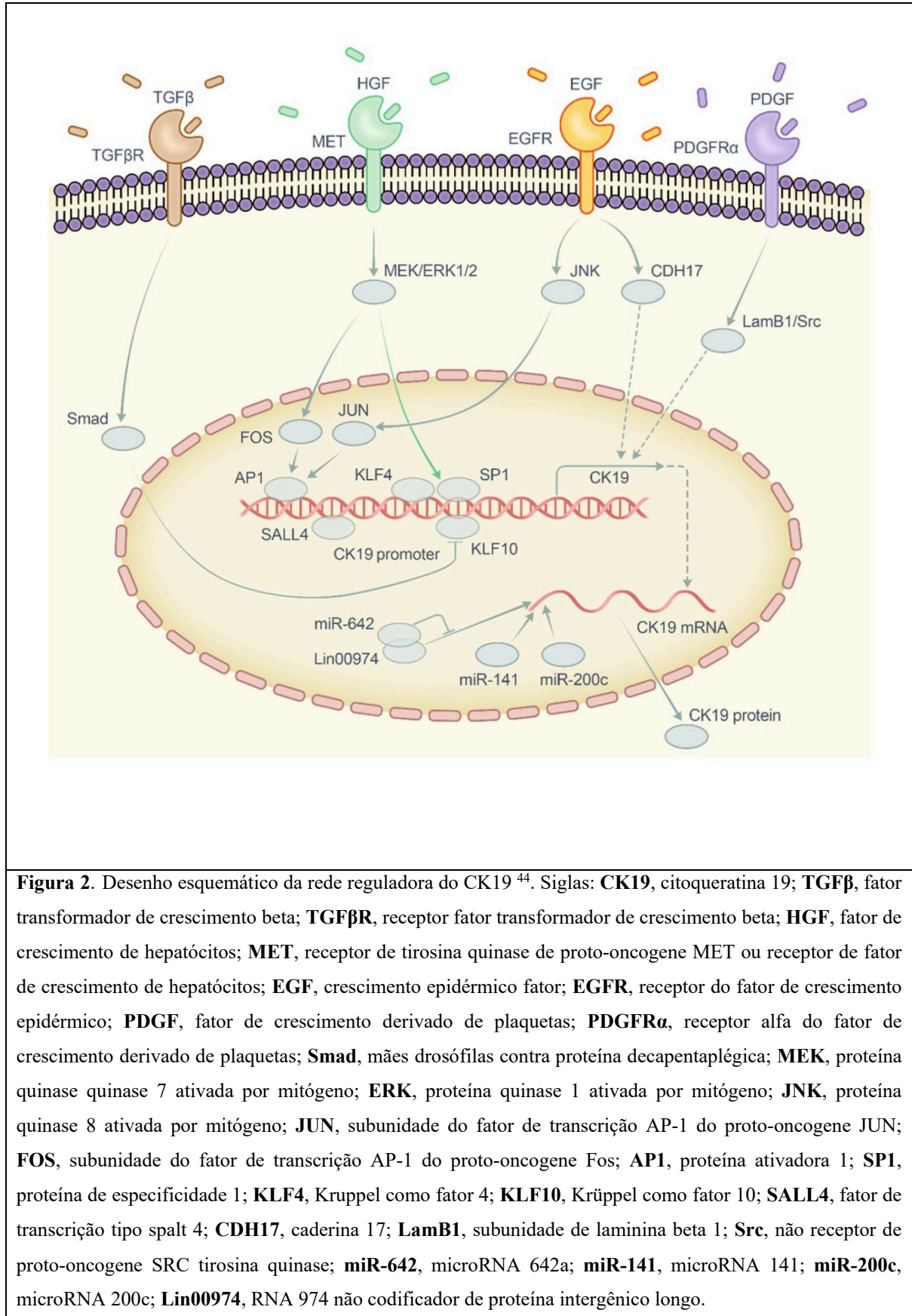


Figura 1. EpCAM e sua variedade de funções⁴².

A CK19 pertence à família dos filamentos intermediários, que criam um citoesqueleto em quase todas as células, correspondendo a citoqueratina de baixo peso molecular (cerca de 40 kDa). Em contraste com outros filamentos intermediários, as citoqueratinas (CKs) são formadas por uma família de multigenes altamente complexa de polipeptídeos com massas moleculares variando entre 40 e 68 kDa. É expressa tipicamente nos epitélios simples, nas células basais, intermediárias e superficiais do epitélio transicional, bem como das células mioepiteliais basais e luminais em alguns epitélios complexos. Durante o desenvolvimento embrionário, entre 4 e 10 semanas de gestação, a CK19 está presente em células progenitoras hepáticas primitivas. Junto com o desenvolvimento do fígado fetal, essas células progenitoras bipotenciais diferenciam-se em hepatócitos ou células epiteliais biliares. No entanto, a expressão de CK19 desaparece em hepatócitos maduros do fígado enquanto está constantemente presente nas células epiteliais biliares^{1; 36; 43}.

De acordo com a literatura, a expressão de CK19 está presente em aproximadamente 10-30% dos CHCs. A CK19 tem sido considerada como um marcador de células-tronco e progenitoras, além de importante marcador prognóstico^{39; 44}. Estudos mostraram que a CK19 potencializou as propriedades tumorais no câncer de mama, câncer de cólon e carcinoma hepatocelular. Sendo assim, a CK19 poderá ter papel importante na carcinogênese. No entanto, a origem dos CHCs CK19-positivos, bem como a regulação molecular da expressão de CK19 ainda não é completamente elucidada. A **figura 2** sintetiza as principais vias envolvidas na regulação da expressão de CK19, que incluem os fatores de crescimento cancerígenos e receptores correspondentes, vias de ativação MAPK/JNK e MEK/ERK1/2, fatores de transcrição e RNAs não codificantes⁴⁴.



Quando se tem uma agressão direta ao hepatócito, supõe-se que dois mecanismos de desenvolvimento do carcinoma hepatocelular podem ocorrer. As células progenitoras/tronco quiescentes são ativadas ou os hepatócitos maduros se desdiferenciam em células progenitoras expressando novamente CK19. Estas células progenitoras irão potencialmente diferenciar-se em células tumorais positivas para CK19. Em condições normais os hepatócitos, preferencialmente, desenvolvem-se em células tumorais negativas para CK19. Estímulos como hipóxia, no entanto, podem induzir à transformação das células CHC CK19 negativas em células CHC CK19 positivas⁴⁴.

A positividade de CK19 no CHC indica ativação da via de sinalização do fator de crescimento epidérmico, que se correlaciona com comportamento mais agressivo, maior índice de invasão microvascular, menor formação de cápsula tumoral, menor grau de diferenciação, maior nível sérico de AFP, presença de linfonodomegalia e metástase extra-hepática^{1; 37}. Células CK19 positivas exibem alta capacidade de proliferação e são mais resistentes à quimioterapia, como por exemplo a doxorrubicina e 5-fluorouracil⁴⁴. Pacientes com CHC CK19 positivos apresentam pior prognóstico em comparação com os CK19 negativos, sendo associada a maior recorrência do tumor e pior sobrevida geral após ressecção cirúrgica ou transplante hepático^{45; 46}.

Carcinomas hepatocelulares com expressão CK19 positivo são um tipo misto com características patológicas do carcinoma hepatocelular e colangiocarcinoma associadas⁴⁴. Ou seja, dentro de um mesmo tumor encontram-se focos heterogêneos de células tumorais distribuídos difusamente, refletindo a hepatocarcinogênese de natureza progenitora a partir de uma mesma linhagem celular que se prolifera e diferencia nos 2 tipos tumorais simultaneamente. Ainda, a mesma célula tumoral pode expressar ambos os biomarcadores moleculares Hep Par 1 e CK19, concomitantemente. A última classificação da OMS de 2019 define o carcinoma hepatocelular-colangiocarcinoma combinado como um carcinoma primário do fígado com a presença inequívoca de diferenciação hepatocítica e colangiocítica dentro do mesmo tumor na coloração pela HE. A marcação imuno-histoquímica pode ser usada como uma ferramenta diagnóstica suplementar para ajudar na identificação dos subtipos clássico e o carcinoma de células intermediárias^{44; 47}.

O carcinoma hepatocelular-colangiocarcinoma combinado clássico apresenta áreas típicas de carcinoma hepatocelular e colangiocarcinoma intra-hepático dentro do mesmo tumor. Os tumores podem estar presentes de forma difusa ou situados em regiões delimitadas separadas. Áreas focais de fusão são frequentemente discernidas. Não há quantidades mínimas de cada componente para se confirmar o diagnóstico. O tipo carcinoma de células

intermediárias é composto por um tumor monomórfico com características intermediária entre um hepatócito e um colangiócito. Os marcadores moleculares para CHC e colangiocarcinoma estão expressos na mesma célula tumoral^{48; 49}.

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Verificar a expressão do biomarcador molecular CK19 no carcinoma hepatocelular, por meio de imuno-histoquímica e a correlação com a sobrevida geral e livre de doença em pacientes submetidos à ressecção hepática com intenção curativa.

3.2 Específicos

Verificar os seguintes parâmetros em pacientes com CHCs submetidos à ressecção hepática com intenção curativa:

- Marcação imuno-histoquímica de CK19 nos CHCs;
- Expressão de EpCAM nos CHCs com expressão positiva de CK19;
- Associação entre as características clinico-demográficas, anatomopatológicas e dosagem sérica de AFP com a expressão imuno-histoquímica de CK19;
- Impacto da expressão de CK19 na sobrevida geral e livre de doença.
- Impacto das características clinico-demográficas e anatomopatológicas na sobrevida geral e livre de doença.

4 MÉTODO

4.1 Pacientes

Fizeram parte desse estudo 87 pacientes (61 homens e 26 mulheres) com diagnóstico de carcinoma hepatocelular, os quais foram submetidos à ressecção cirúrgica entre janeiro de 2005 a dezembro de 2021, no Grupo de Cirurgia do Fígado, Vias biliares, Pâncreas e Baço, do Instituto Alfa de Gastroenterologia (IAG) do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais (HC-UFGM). Foram incluídos somente pacientes que não haviam sido submetidos a tratamentos prévios para o CHC e o procedimento cirúrgico foi indicado com intenção curativa. Foram submetidos à ressecção apenas pacientes com função hepática preservada. Nenhum paciente apresentava sinais de doença metastática extra-hepática aos exames de estadiamento (cintilografia óssea e tomografia de tórax) pré-operatórios.

4.2 Aspectos éticos

Essa pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética e Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais (COEP - UFGM). O número de referência do projeto é: CAAE – 25010114.5.0000.5149 (Anexo 3).

4.3 Dados clínico-cirúrgicos, anatomopatológicos e de sobrevida

Foi realizada coleta prospectiva dos seguintes dados dos prontuários dos pacientes: gênero, idade, comorbidades (classificação de estado físico ASA), histórico de etilismo e tabagismo, etiologia da doença hepática, níveis séricos de alfafetoproteína no pré-operatório, dados laboratoriais pré-operatórios (hemoglobina, plaquetas, atividade de protrombina, RNI, global de leucócitos, linfócitos, bilirrubina total, bilirrubina direta, GGT, fosfatase alcalina, AST, ALT, albumina), tipo de ressecção hepática (menor, equivalendo a dois ou menos segmentos hepáticos ressecados; ou maior, equivalendo a três ou mais segmentos ressecados), necessidade de hemotransfusão per-operatória, grau de complicação pós-operatória de acordo com a classificação Clavien-Dindo, mortalidade per-operatória, tempo de internação pós-

operatório, número de nódulos (único, menor ou igual 3 ou maior que 3), maior diâmetro do tumor (menor ou igual a 3 centímetros, de 3 a 5 centímetros ou maior que 5 centímetros), tipo e grau histológico (bem, moderado ou pouco diferenciado segundo a OMS), presença de invasão angiolinfática, estadiamento TNM, tempo de sobrevida livre de doença e sobrevida geral dos pacientes após o tratamento.

O diagnóstico pré-operatório de carcinoma hepatocelular foi baseado na história clínica, dosagem sérica de alfa-fetoproteína, exames de imagem (Ultrassonografia, Tomografia Computadorizada e/ou Ressonância Magnética) ou biópsia quando necessário. O estadiamento seguiu os padrões preconizados pela OMS¹⁵. A classificação TNM detalhada encontra-se no Anexo 1.

Os dados referentes à sobrevida foram obtidos pela consulta nos prontuários ou por contato telefônico com os familiares, quando as consultas foram interrompidas sem notificação do óbito. Os pacientes nos quais o óbito ocorreu nos 30 primeiros dias do pós-operatório foram excluídos da análise de sobrevida.

Para cálculo do tempo de sobrevida livre de doença, foi considerada a data de confirmação da recidiva tumoral (hepática ou metastática) em um exame de imagem (Ultrassonografia, Tomografia Computadorizada e/ou Ressonância Magnética) ou a data de realização de biópsia confirmatória. Todos os pacientes foram acompanhados por equipe multidisciplinar no ambulatório do Grupo de Cirurgia do Fígado, Vias biliares, Pâncreas e Baço, do Instituto Alfa de Gastroenterologia (IAG) do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais (HC-UFGM).

4.4 Amostras

Amostras representativas do tumor foram obtidas de peças de ressecção cirúrgica do carcinoma hepatocelular, que foram analisadas no Serviço de Anatomia Patológica do HC-UFGM. Todas as amostras foram fixadas em formaldeído a 10% (formol tamponado) por 24 horas, processadas conforme as técnicas histológicas de rotina até a inclusão em blocos de parafina. Logo após, foram realizados cortes histológicos seriados com 4 micrômetros de espessura e coradas em Hematoxilina e Eosina. Os cortes destinados à imuno-histoquímica foram depositados em lâminas carregadas por meio de silanização.

Por apresentarem material insuficiente no bloco de parafina, 7 pacientes foram excluídos da análise imuno-histoquímica, restando 80, nos quais foram realizadas a reação

para CK19 e Hep Par 1. A seguir, nas amostras que tiveram marcação positiva para CK19 (12 pacientes) foram realizadas análise imuno-histoquímica para EpCAM.

4.5 Imuno-histoquímica

4.5.1 Desparafinização e Recuperação antigênica

As lâminas foram, inicialmente, deixadas numa estufa a 60°C durante 12h. Em seguida, foram desparafinizadas em dois banhos de xilol e reidratadas em banhos sucessivos de álcool. A recuperação antigênica foi realizada com citrato de sódio a 98°C, utilizando-se um aparelho *Steamer* por 30 minutos. Após essa etapa, fez-se o bloqueio da peroxidase endógena e de proteínas, sendo então realizada a incubação com o anticorpo primário diluído (**Tabela 1**) por 16 a 18 horas (incubação *overnight*).

Tabela 1. Características dos anticorpos primários Anti CK19, Hep Par 1 e EpCAM.

Anticorpo monoclonal	Clone	Marca	Diluição
Anti CK19 (Camundongo)	BSB-34	MyBioSource	1:200
Anti-Antígeno Específico de Hepatócitos Hep Par 1 (Camundongo)	OCH1E5	Abcam	1:200
Anti EpCAM (Camundongo)	B302 (323/A3)	Abcam	1:100

Em seguida, foi retirado o anticorpo, colocado o complemento e aplicado o conjugado HRP (*Advance HRP Polymer*) e as lâminas foram incubadas em câmara úmida por 30 minutos à temperatura ambiente. Feita a retirada do polímero, prosseguiu-se com a adição do cromógeno DAB, que foi retirado após ocorrida a reação. Essa reação ocorre no sítio do antígeno, deixando-o com coloração marrom.

Todas as reações de imuno-histoquímica tiveram controle positivo e negativo. Para a expressão de Hep Par 1 utilizou-se o controle intralâmina, com parênquima hepático normal

ou a própria marcação no tumor. Para a expressão de CK19 e EpCAM utilizou-se o controle interno pela positividade no epitélio dos ductos biliares.

Maiores detalhes sobre a realização da imuno-histoquímica podem ser vistos no protocolo que se encontra no Anexo 2.

4.5.2 Análise imuno-histoquímica

Todas as lâminas foram avaliadas por um patologista com experiência em análise imuno-histoquímica, sem conhecimento prévio das informações clínicas e patológicas dos pacientes.

A expressão de CK19, Hep Par 1 e EpCAM foi avaliada de forma binária, considerando-se marcação positiva quando mais de 5% das células tumorais expressou os marcadores de forma moderada ou acentuada. As amostras foram consideradas negativas quando não houve marcação ou quando menos de 5% do tumor expressou as proteínas^{2; 22; 35}.

A seguir, todas as lâminas em que houve marcação positiva para CK19 foram escaneadas usando o PANNORAMIC Midi® system (3DHISTECH Ltda, Hungary). As imagens foram avaliadas por meio de pareamento da região com tumor identificadas na coloração pela HE e áreas correspondentes (sobrepostas) de marcação dos anticorpos anti CK19, Hep Par 1 e EpCAM. Esses tumores foram então identificados baseando-se na classificação preconizada da OMS para tumores digestivos de 2019 que definiu os critérios morfológicos e imuno-histoquímicos para diagnóstico do CHC-colangiocarcinomas combinados e sua subclassificação em tipo clássico e carcinoma de células intermediárias^{49; 50}.

4.6 Análises estatísticas

A análise descritiva dos dados foi feita por meio de medidas de tendência central, dispersão e amplitude para variáveis contínuas, quais sejam: média e desvio padrão; mediana (percentil 50) e intervalo interquartil (percentis 25 e 75); valores mínimo e máximo. A análise descritiva para as variáveis categóricas foi feita por meio de distribuição das frequências absolutas e relativas em cada categoria.

Ainda, na análise descritiva, com a finalidade de testar a homogeneidade nas categorias de cada variável estudada, foi efetuado teste de qui-quadrado ou teste exato de

Fisher, considerando a existência de igualdade nas contagens das categorias das variáveis como hipótese nula (H_0). Para variáveis com duas categorias, a hipótese nula considerada foi que haveria proporção igual a 50% em cada categoria ($H_0: p=0,5$); para três categorias, $H_0: p=0,33$; para quatro categorias, $H_0: p=0,25$. Cabe observar que a opção pelo teste de Fisher ocorre quando os valores esperados nas categorias avaliadas das variáveis revelaram-se inferior a cinco.

O teste do Qui-quadrado ou teste de Fisher foi aplicado para verificar a associação da variável CK19 com as variáveis relacionadas às características morfológicas, anatomopatológicas e imuno-histoquímicas dos carcinomas hepatocelulares (etiologia, número de nódulos, maior diâmetro, estadiamento T, invasão angiolinfática e grau de diferenciação histológica). Com base nos resultados dessa análise univariada, foram selecionadas aquelas variáveis cujos valores de p foram inferiores a 0,20 ($p < 0,20$) como candidatas a composição de modelos multivariados finais. A análise de regressão realizada para este fim foi a regressão logística exata, recomendada para situações onde há poucos elementos na amostra, não sendo razoável pressupor propriedades assintóticas dos estimadores obtidos por máxima verossimilhança. Para obtenção dos modelos finais, foi feita deleção sequencial das variáveis que apresentassem valor de p superior a 0,20 ($p > 0,20$) – iniciando sempre da menor significância para a maior significância – e permaneceram no modelo final aquelas com valor de p inferior a 0,20 ($p < 0,20$) pelo teste de Wald.

A análise de sobrevida teve como variável dependente o tempo até a ocorrência de óbito ou recidiva. O tempo foi mensurado em meses e foram excluídos os casos de óbitos de pacientes ocorridos em até 30 dias do pós-operatório. Constituíram-se curvas de sobrevida para as variáveis pelo método de Kaplan-Meier; na comparação entre grupos para cada variável, utilizou-se o teste Logrank. Foram obtidos o percentual de sobreviventes aos 12, 36 e 60 meses. A regressão de Cox foi utilizada na análise multivariada de sobrevida.

Em todas as análises, o nível de significância considerado foi igual 5% ($p < 0,05$).

5 RESULTADOS

5.1 Análise descritiva da amostra

Os dados clinico-demográficos dos pacientes com carcinoma hepatocelular podem ser observados na **Tabela 2**. Entre os 87 pacientes com CHC incluídos no estudo, houve um predomínio de homens (70,11 %) em relação às mulheres (29,89%), com uma média de idade igual a 60 anos, variando de 25 a 82 anos. A etiologia viral foi a mais frequente, com predomínio da hepatite C (40,22%) seguida pela hepatite B (22,98%). A cirrose etanólica foi a menos frequente (14,94%) e, em 19 pacientes (21,84%), o CHC incidiu em fígados não cirrótico.

Tabela 2. Dados clinico-demográficos de pacientes com carcinoma hepatocelular.

Variáveis	Estatísticas Descritivas (%)	Valor de p
Gênero		
Feminino	26 (29,89)	0,002
Masculino	61 (70,11)	
Idade		NA
Média (Desvio Padrão)	60,38 (10,95)	
Mediana (IIQ)	62 (54;67)	
Mínimo; Máximo	25; 82	
Etilismo		
Sim	34(39)	0,042
Não	53 (61)	
Etiologia		
Vírus B	20 (22,98)	0,665
Vírus C	35 (40,22)	0,001
Etanólica	13 (14,94)	0,030
Não cirrótico	19 (21,84)	0,496
Tabagismo		
Sim	38 (43,68)	0,238
Não	49 (56,32)	

Nota: foi realizado teste de homogeneidade entre as categorias, NA: não aplica

A **Tabela 3** mostra os dados dos parâmetros laboratoriais analisados. Todos os pacientes operados tinham função hepática preservada. A média dos valores de alfafetoproteína foi de $5637,77 \pm 30.531$ (min.1,68; max.199.000,00) e a mediana de 13,97 (IQ4,2-IIIQ212). Os demais parâmetros não mostraram alterações.

Tabela 3. Dados de exames laboratoriais pré-operatórios em pacientes com carcinoma hepatocelular.

Variáveis	Média \pm DV (min- max)	Mediana (IQ, IIIQ)
Alfafetoproteína (ng/mL)	$5637,77 \pm 30.531$ (1,68-199x10 ³)	13,97 (4,2-212)
Hemoglobina	$13,54 \pm 1,88$ (7-19)	13,8 (12,3-14,9)
Plaquetas	$166,44 \pm 80,31$ (36-389)	149 (114-189)
AP	$82,5 \pm 16,17$ (30-100)	82 (71,35-100)
RNI	$1,16 \pm 0,21$ (0,9-2,12)	1,13 (1-1,22)
LG	$6,4 \pm 2,5$ (1,79-12,270)	5,91 (4,55-8,1)
Linfócitos	$1,72 \pm 0,81$ (0,34-3,84)	1,51 (1,11-2,25)
Bilirrubina Total	$0,87 \pm 0,43$ (0,2-2,29)	0,77 (0,55-1,09)
Bilirrubina Direta	$0,38 \pm 0,24$ (0,05-1,57)	0,37 (0,2-0,5)
GGT	$162,5 \pm 211$ (14-1384)	93,4 (49-183)
Fosfatase Alcalina	$128,06 \pm 170,3$ (44-1477)	94 (74-131,75)
AST	$75,14 \pm 91,18$ (17-671)	43 (13-420)
ALT	$62,29 \pm 59,08$ (13-420)	42,5 (30,25-79,25)
Albumina	$3,83 \pm 0,65$ (1,2-4,9)	3,95 (3,5-4,3)

(AP: atividade de protrombina; RNI: Relação Normalizada Internacional; LG: leucócitos globais; GGT: Gama Glutamil Transferase; AST: aspartato aminotransferase e ALT: alanina aminotransferase)

A **Tabela 4** mostra as características relacionadas ao ato cirúrgico nos pacientes com CHC. A maioria dos pacientes foi submetida a hepatectomia menor e a necessidade de hemotransfusão per-operatória ocorreu em 32% dos pacientes. A mortalidade per-operatória foi de 12,64%. O tempo médio de internação foi de $6,86 \pm 5,4$ (min3; max33) dias.

Tabela 4. Características relacionadas ao ato cirúrgico em pacientes com carcinoma hepatocelular.

Variáveis	N (%)	Valor de p
ASA		
I	26 (29,89)	0,499
II	56 (64,37)	<0,001
III	5 (5,75)	<0,001
Tipo de hepatectomia		
Maior	28 (32,18)	<0,001
Menor	59 (67,82)	
Transfusão sanguínea		
Sim	28 (32,18)	<0,001
Não	59 (67,82)	
Óbito pós-operatório		
Sim	11 (12,64)	<0,001
Não	76 (87,36)	
Clavien- Dindo		
sem complicações	65 (74,71)	<0,001
I + II	6 (6,9)	
III + IV	5 (5,75)	
V	11 (12,64)	
Tempo de internação (dias)		NA
Média ±DV (min- max)	6,86±5,4 (3, 33)	
Mediana ((IQ, IIIQ))	6 (3-7)	

Na **Tabela 5** encontram-se as características morfológicas anatomopatológicas e imuno-histoquímicas dos carcinomas hepatocelulares. Os tumores foram em sua maioria bem diferenciados (49,46%). A invasão angiolinfática esteve presente em 44 (50,57%) dos tumores. Os carcinomas hepatocelulares operados, estiveram predominantemente nos estágios iniciais I (39,08%) e II (35,635%). A marcação imuno-histoquímica de CK19 foi positiva em 12 pacientes (15%) e a de Hep Par 1 foi positiva em 79 (98,75%).

Tabela 5. Frequências absolutas e relativas referentes às características morfológicas, anatomopatológicas e imuno-histoquímicas dos carcinomas hepatocelulares.

Variáveis	N (%)	Valor de p
Número de nódulos		
Único	63 (72,4)	<0,001
≤3	17 (19,5)	0,007
>3	7 (8,1)	<0,001
Maior diâmetro (cm)		
≤3	27 (31,0)	0,654
>3≤5	28 (32,2)	0,825
>5	32 (36,8)	0,491
Estadiamento TNM		
1	35 (40,23)	0,222
2	31 (35,63)	0,589
3	21 (24,14)	0,081
Grau de diferenciação histológica		
Bem	43 (49,46)	0,001
Moderadamente	34 (39,08)	0,220
Pouco	9 (10,34)	<0,001
Invasão angiolinfática		
Sim	44 (50,57)	0,915
Não	43 (49,43)	
Citoqueratina 19		
Positivo	12 (15)	0,001
Negativo	68 (85)	
Hep Par 1		
Positivo	79 (98,75)	<0,001
Negativo	01 (1,25)	

Nota: foi realizado teste de homogeneidade entre as categorias

5.2 Imuno-histoquímica

A expressão imuno-histoquímica de CK19 foi positiva em 12 pacientes (15%) e a de Hep Par 1 foi positiva em 79 (98,75%). Dos pacientes CK19 positivos, 11 pacientes eram Hep Par 1 positivos e apenas um negativo. Dos 12 pacientes CK19 positivos, 5 eram CHC-colangiocarcinoma combinado clássico, 6 eram CHC-colangiocarcinoma combinado de células intermediárias e 1 era colangiocarcinoma intra-hepático, segundo a classificação da OMS para tumores digestivos de 2019. A **tabela 6** descreve a relação da expressão de biomarcadores moleculares de CK 19, EpCAM, HEP Par 1 e nível sérico de AFP nos 12 casos de CHC CK 19 positivos.

Tabela 6. Descrição da expressão de biomarcadores moleculares de CK19, EpCAM, Hep Par 1 e o nível sérico de AFP nos 12 casos com de CHC CK19 positivos.

Casos	AFP (ng/mL)	EpCAM	CK19	Hep Par 1	Fenótipo
1	2,24	+	+	+	CHC-colangiocarcinoma combinado de células intermediárias
2	12,50	-	+	+	CHC-colangiocarcinoma combinado de células intermediárias
3	1800,00	-	+	+	CHC-colangiocarcinoma combinado clássico
4	8,56	+	+	-	Colangiocarcinoma intra-hepático
5	500,00	+	+	+	CHC-colangiocarcinoma combinado de células intermediárias
6	61,50	+	+	+	CHC-colangiocarcinoma combinado clássico
7	5.040,00	+	+	+	CHC-colangiocarcinoma combinado de células intermediárias
8	61,20	+	+	+	CHC-colangiocarcinoma combinado clássico
9	334,00	+	+	+	CHC-colangiocarcinoma combinado clássico
10	>199.000	+	+	+	CHC-colangiocarcinoma combinado de células intermediárias
11	68,00	+	+	+	CHC-colangiocarcinoma combinado clássico
12	34,50	-	+	+	CHC-colangiocarcinoma combinado de células intermediárias

Na **figura 3** mostram-se cortes histológicos de CHC que apresentam os dois componentes hepatocitário (Hep Par 1 positivo) e colangiocítico (CK19 positivo) no mesmo tumor caracterizando o tipo CHC-colangiocarcinoma combinado clássico. Na **figura 4** mostram-se cortes histológicos de CHC expressando marcação simultânea para CK19 e Hep Par 1 na mesma célula tumoral caracterizando o tipo CHC-colangiocarcinoma combinado de células intermediárias. Na **figura 5**, evidencia-se região do CHC que não marcou para o Hep Par 1, sendo que esta mesma área foi positiva para CK19 e EpCAM compatível com região de colangiocarcinoma intra-hepático.

Dos 12 pacientes com CK19 positivo, 9 (75%) foram positivos para EpCAM e 3 foram negativos (25%). Nas **figuras 6 e 7** evidenciam-se células CK19 positiva com marcação positiva para EpCAM.

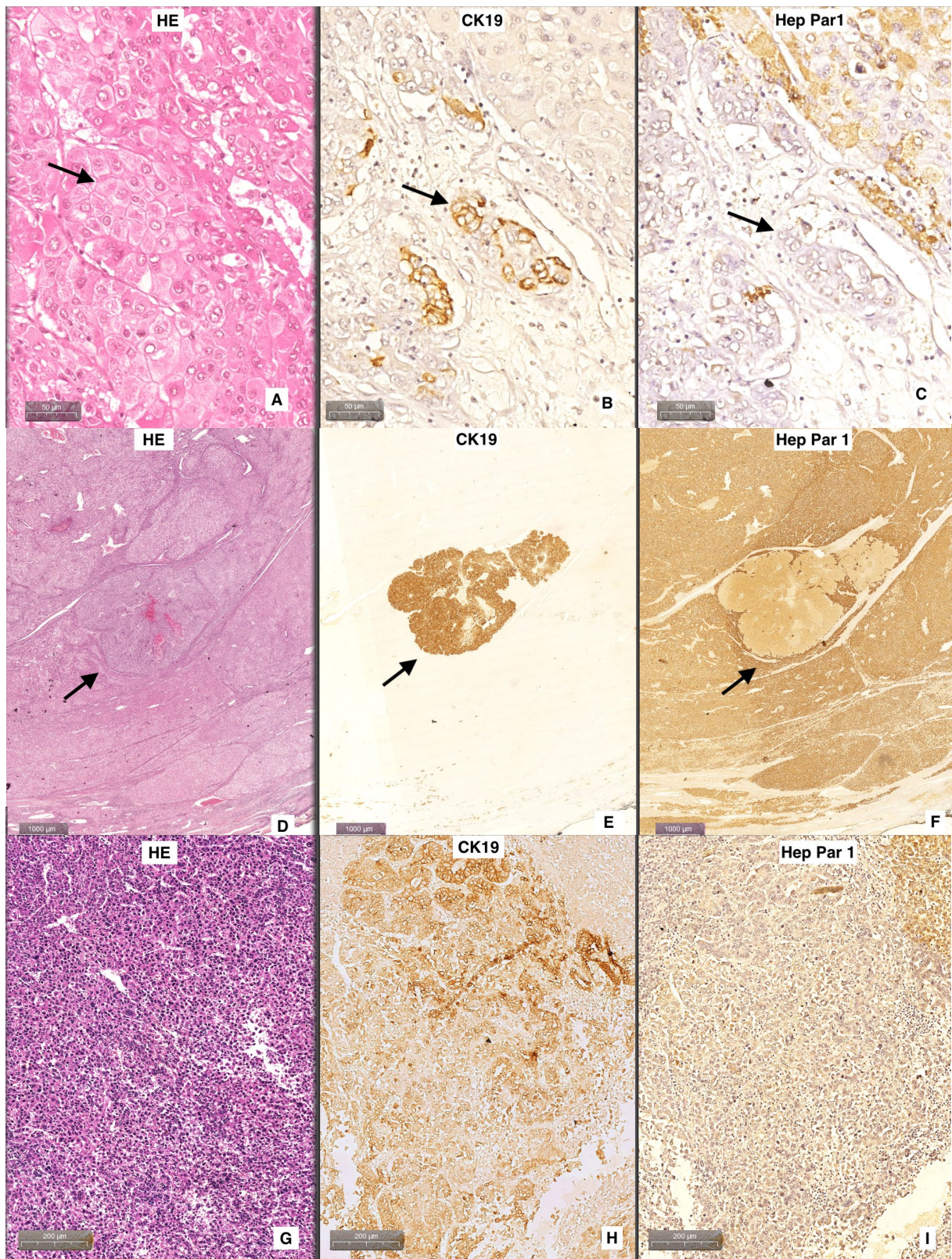


Figura 3. Corte histológico de CHC que apresenta os dois imunofenótipos (CHC-colangiocarcinoma combinado clássico). As figuras A, D e G mostram a área tumoral corada em HE. As células com marcação positiva para CK19 (componente de colangiocarcinoma): A (seta), E (seta) e H (marcação difusa em castanho) são negativas para Hep Par 1 como pode ser identificado nas figuras C (seta), F (seta) e I. Observa-se que as células com fenótipo de CHC mostram-se coradas em castanho pelo Hep Par 1.

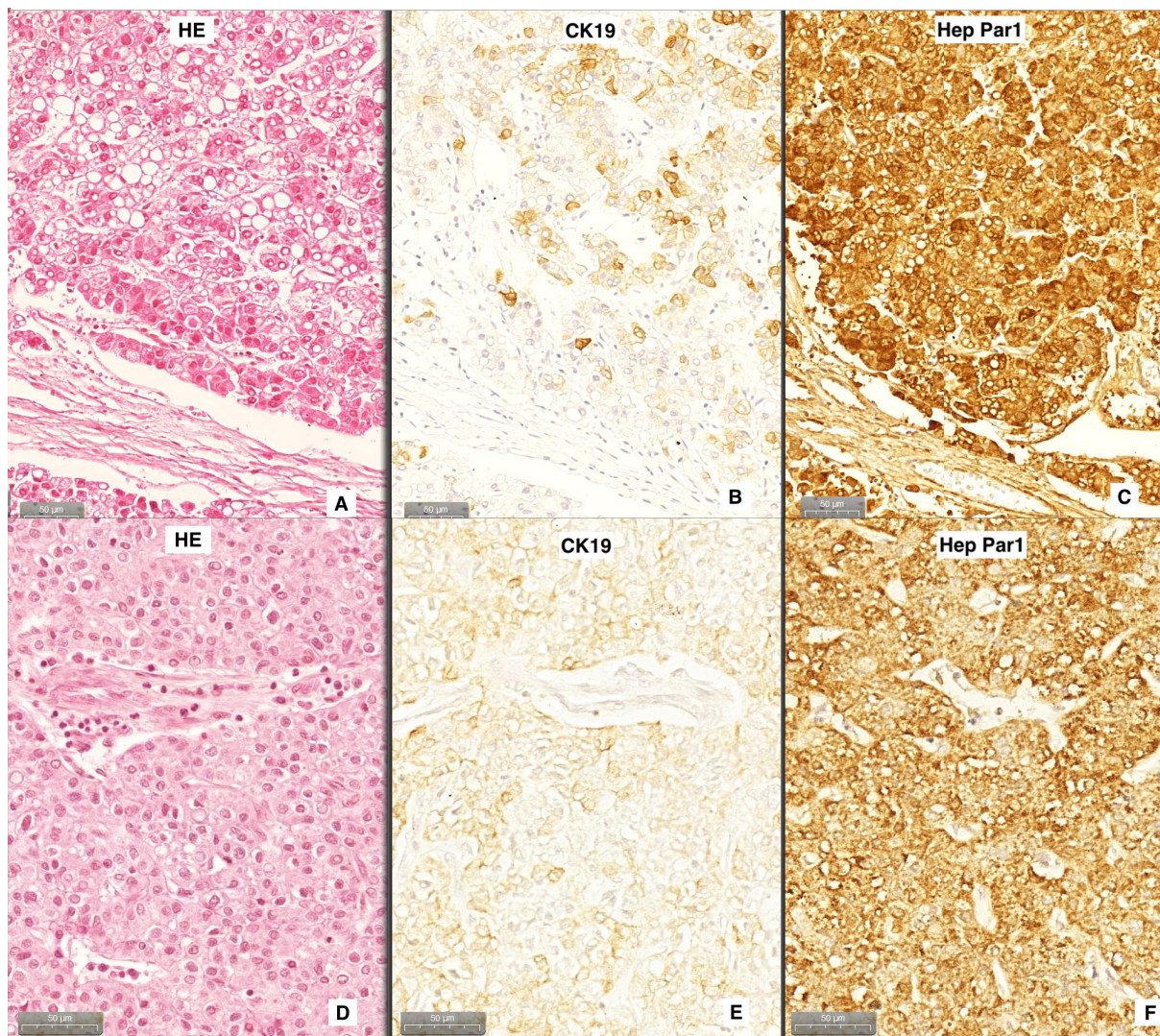


Figura 4. Cortes histológicos de CHC com dois imunofenótipos (CHC-colangiocarcinoma combinado de células intermediárias) com marcação simultânea pela CK19 e Hep Par 1. As figuras A e D mostram os cortes histológicos de CHC corados pela HE. As figuras B e E evidenciam células esparsas com marcação membranar positiva para CK 19 coradas em castanho. Nas figuras C e F nota-se a marcação citoplasmática difusa do CHC pelo Hep Par 1 coradas em castanho.

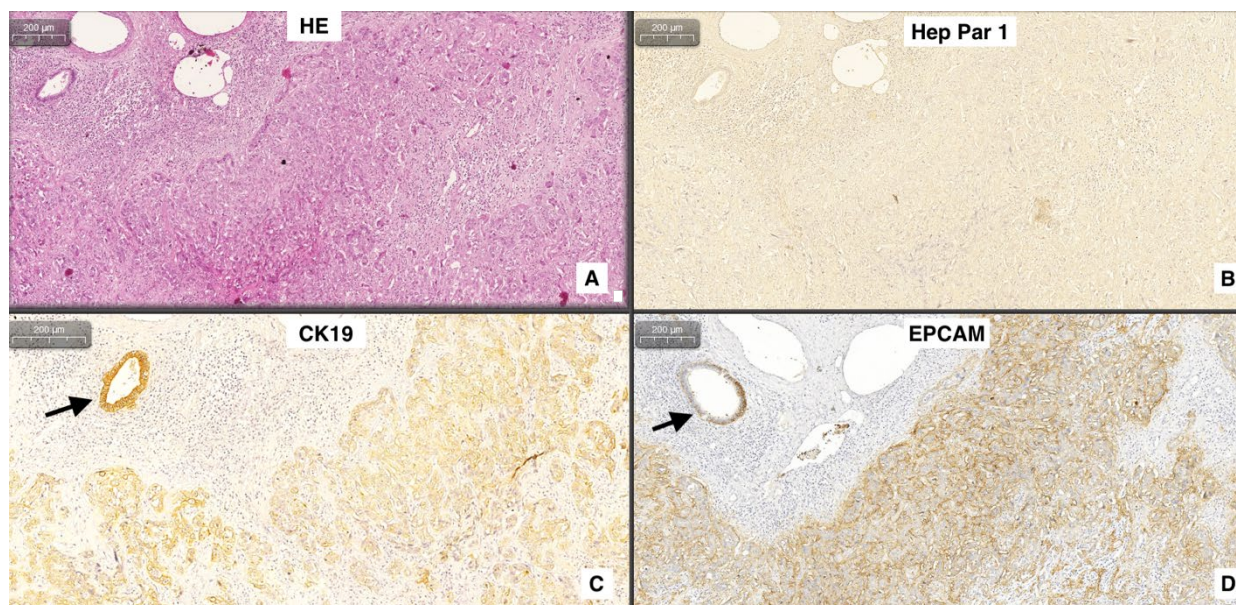


Figura 5. Corte histológico de CHC. A. área do tumor corada pela HE. B. Tumor com marcação negativa para Hep Par 1. C e D. A mesma região tumoral apresenta marcação positiva para CK19 e EpCAM, respectivamente. As setas apontam ducto biliar que foi o controle interno positivo para CK19 e EpCAM.

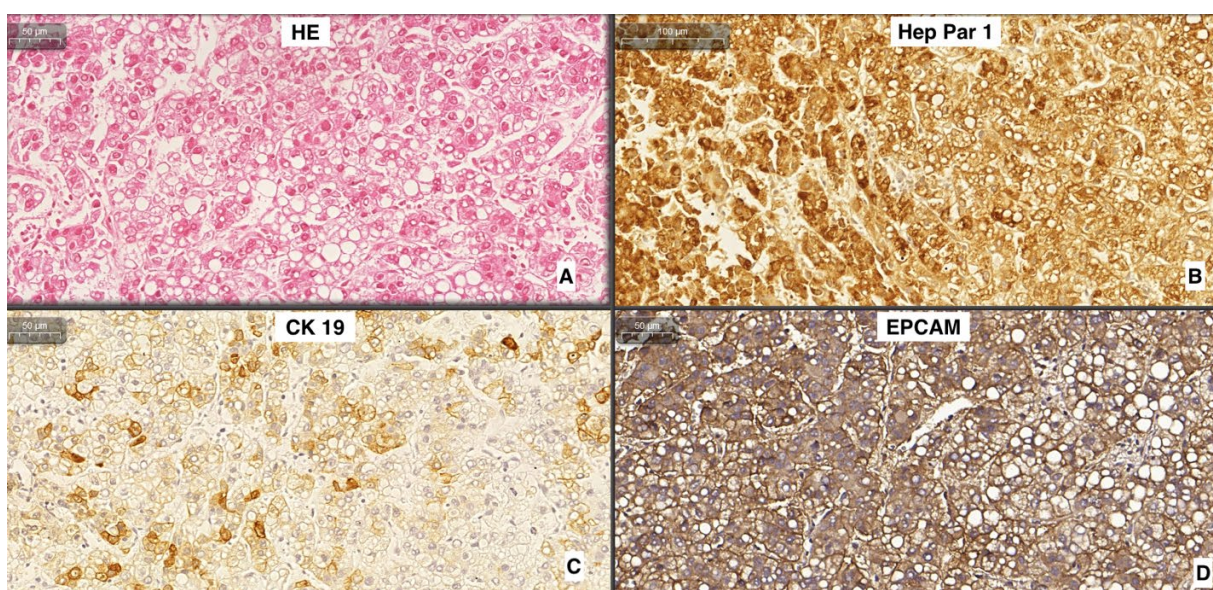


Figura 6. Cortes histológicos de CHC com dois imunofenótipos (CHC-colangiocarcinoma combinado de células intermediárias). A. área do tumor corada pela HE. B. Tumor com marcação positiva (citoplasmática) para Hep Par 1. C e D. A mesma região tumoral apresenta marcação membranar positiva para CK19 e EpCAM, respectivamente.

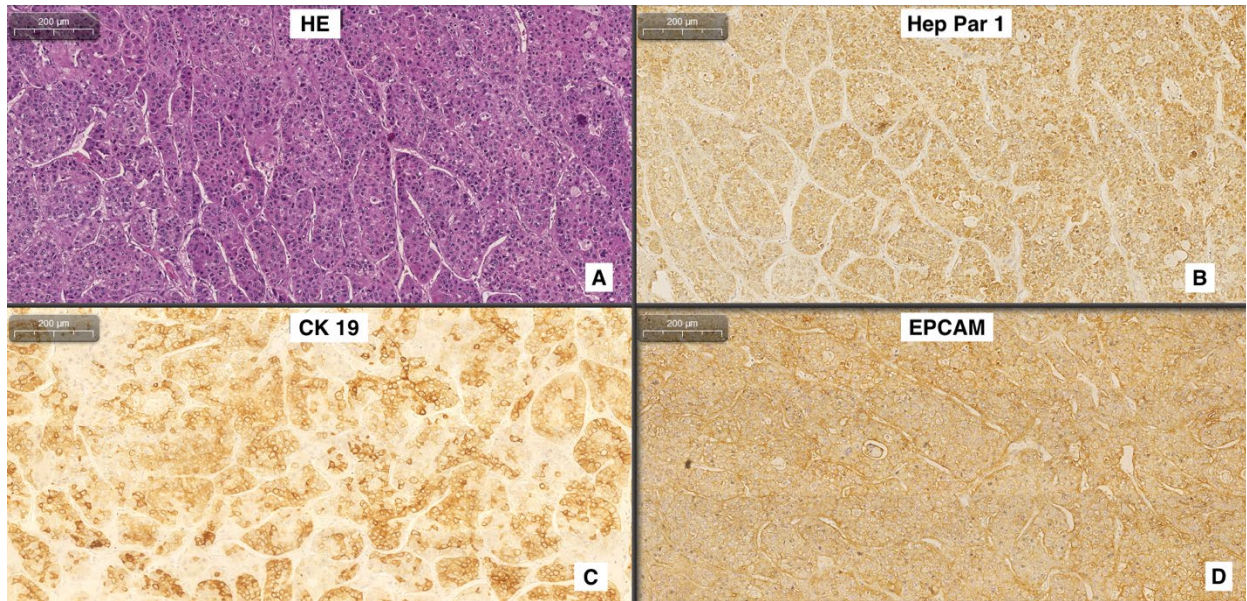


Figura 7. Cortes histológicos de CHC com dois imunofenótipos (CHC-colangiocarcinoma combinado de células intermediárias). A. área do tumor corada pela HE. B. Tumor com marcação positiva (citoplasmática) para Hep Par 1. C e D. A mesma região tumoral apresenta marcação membranar positiva para CK19 e EpCAM, respectivamente.

5.3 Análise univariada para a expressão de Citoqueratina 19

A **Tabela 7** mostra a análise univariada da associação entre as variáveis clínico-patológicas e a expressão imuno-histoquímica de CK19. Nenhuma das variáveis analisadas teve associação com a expressão positiva de CK19.

Tabela 7. Associação entre as variáveis clínico-patológicas e a expressão de CK19 no carcinoma hepatocelular.

Variáveis	CK19 no CHC		Total	Valor de p
	Negativo (n=68)	Positivo (n=12)		
Gênero				
Masculino	21 (30,9%)	4 (33,3%)	25 (100,0%)	1,000
Feminino	47 (69,1%)	8 (66,7%)	55 (100,0%)	
Etilismo				
Não	41 (30,9%)	8 (66,7%)	49 (100,0%)	0,758
Sim	27 (69,1%)	4 (33,3%)	31 (100,0%)	
Tabagismo				
Não	41 (30,9%)	5 (41,7%)	46 (100,0%)	0,229
Sim	27 (69,1%)	7 (58,3%)	34 (100,0%)	
ASA				
I	19 (27,9%)	5 (41,7%)	24 (100,0%)	0,425
II	45 (66,2%)	6 (50,0%)	51 (100,0%)	
III	4 (5,9%)	1 (8,3%)	5 (100,0%)	
Etiologia				
Não cirrótico	15 (22,1%)	1 (8,3%)	16 (100,0%)	0,061
Etanólica	10 (14,7%)	1 (8,3%)	11 (100,0%)	
Vírus B	13 (19,1%)	7 (58,3%)	20 (100,0%)	
Vírus C	30 (44,1%)	3 (25%)	33 (100,0%)	
Número de nódulos				
Único	49 (72,1%)	9 (75%)	58 (100,0%)	0,587
1 a ≤ 3	12 (17,6%)	3 (25%)	15 (100,0%)	
> 3	7 (10,3%)	0	7 (100,0%)	
Transfusão sanguínea				
Não	47 (77%)	8 (80%)	56 (100,0%)	1,000
Sim	14 (23%)	2 (20%)	17 (100,0%)	
Dosagem de AFP >200 ng/mL				
Não	53 (77,9%)	7 (58,3%)	60 (100,0%)	0,163
Sim	15 (22,1%)	5 (41,7%)	20 (100,0%)	
Tipo de Hepatectomia				
Maior	20 (29,4%)	5 (41,7%)	25 (100,0%)	0,502
Menor	48 (70,6%)	7 (58,3%)	55 (100,0%)	
Maior diâmetro (cm)				
≤ 3 cm	20 (29,4%)	5 (41,7%)	25 (100,0%)	0,425
> 3 < 5cm	25 (36,8%)	2 (16,7%)	27 (100,0%)	
> 5 cm	23 (33,8%)	5 (41,6%)	28 (100,0%)	
Estadiamento TNM				
I	28 (41,18%)	5 (16,67%)	33 (100,0%)	1,000
II	25 (36,76%)	5 (35,29%)	30 (100,0%)	
III	15 (22,06%)	2 (50,00%)	17 (100,0%)	
Invasão angiolinfática				
Não	37 (54,4%)	5 (41,7%)	42 (100,0%)	0,415
Sim	31 (45,6%)	7 (58,3%)	38 (100,0%)	
Grau de diferenciação histológico				
Bem	35 (51,47%)	4 (33,3%)	39 (100,0%)	0,229
Moderadamente	27 (39,70%)	5 (41,7%)	32 (100,0%)	
Pouco	6 (8,83%)	3 (25,00%)	9 (100,0%)	
Óbitos				
Não	41 (60,3%)	7 (58,3%)	48 (100,0%)	0,478
Sim	27 (39,7%)	5 (41,7%)	32 (100,0%)	

5.4 Análise Multivariada para expressão positiva de Citoqueratina 19

Para realização da análise multivariada, foram inseridas no modelo todas as variáveis que apresentaram um $p < 0,20$ na etapa de análise univariada, ou seja, etiologia ($p = 0,061$) e AFP > 200 ng/mL ($p = 0,163$).

Na análise multivariada, nenhuma variável se manteve no modelo final como explicativa do desfecho CK19 positivo.

5.5 Análise de sobrevivência

5.5.1 Sobrevida geral

A **Tabela 8** mostra a análise univariada das características clinico-demográficas na sobrevida geral dos pacientes com CHC submetidos a ressecção com intenção curativa. A presença de recidiva tumoral ($p = 0,008$), assim como o número de nódulos maior que 3 ($p = 0,033$) tiveram impacto negativo na curva de sobrevida (**figura 8**).

Tabela 8. Análise univariada das características clinico-demográficas na sobrevida geral dos pacientes com CHC submetidos a ressecção com intenção curativa.

Variáveis	Valor de P
Idade	0,926
Gênero	0,997
Etilismo	0,136**
Tabagismo	0,689
ASA	0,996
Etiologia	0,301
Tipo de Hepatectomia	0,097**
Transfusão sanguínea	0,162**
Clavien-dindo	0,174**
Recidiva tumoral	0,008*
Número de nódulos	0,033*
Maior diâmetro	0,515
Invasão angiolinfática	0,341
Estadiamento TNM	0,658
Grau de diferenciação	0,771
Alfafeto > 200 ng/mL	0,450
CK19 positivo	0,479

*Valores significativos para $p < 0,05$

** $p < 0,20$

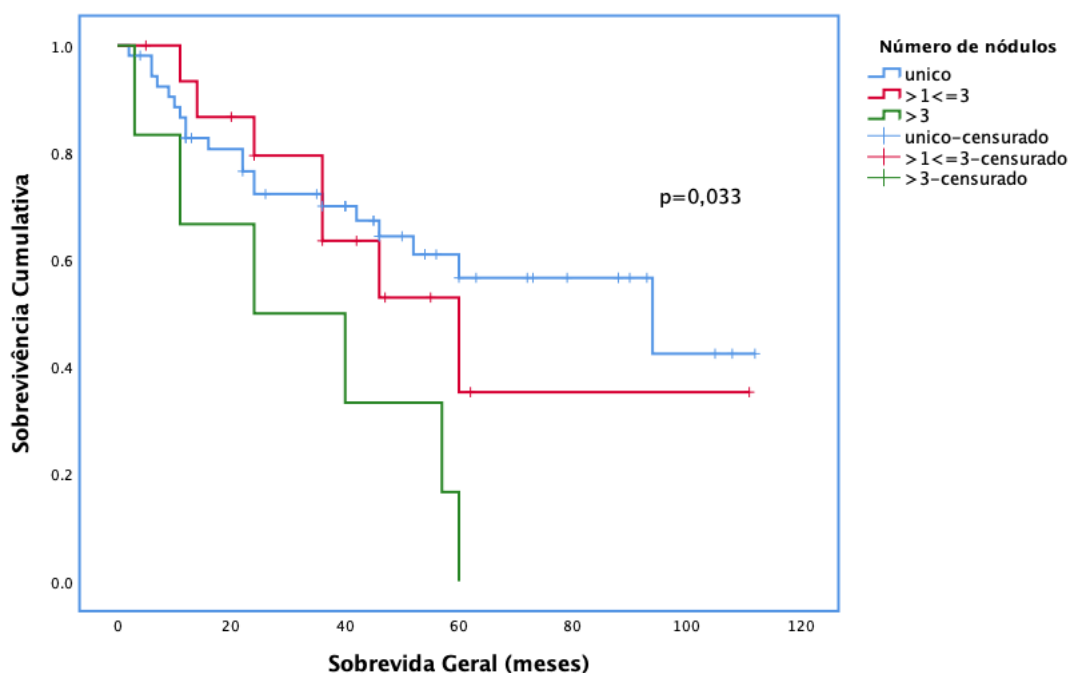


Figura 8. Correlação entre o número de nódulos e a curva de sobrevida geral pelo método de Kaplan-Meier, em pacientes com CHC ressecados.

Para realização da análise multivariada da sobrevida geral, inserimos no modelo todas as variáveis que apresentaram um $p < 0,20$ na etapa de análise univariada, ou seja, etilismo ($p=0,136$), tipo de hepatectomia ($p=0,097$), transfusão sanguínea ($p=0,162$), Clavien-Dindo ($p=0,174$), recidiva tumoral ($p=0,008$) e número de nódulos ($p=0,033$).

No modelo final obtido na análise multivariada, apenas o número de nódulos e a recidiva tumoral apresentaram associação positiva.

A sobrevida geral após ressecção do carcinoma hepatocelular foi de 83,4 % no primeiro ano, 66,7% aos 36 meses e 44,3% aos 60 meses (**Figura 9**). Não houve diferença significativa na sobrevida entre os pacientes que tiveram CHC com expressão de CK19 e aqueles que não tiveram (**Figura 10**).

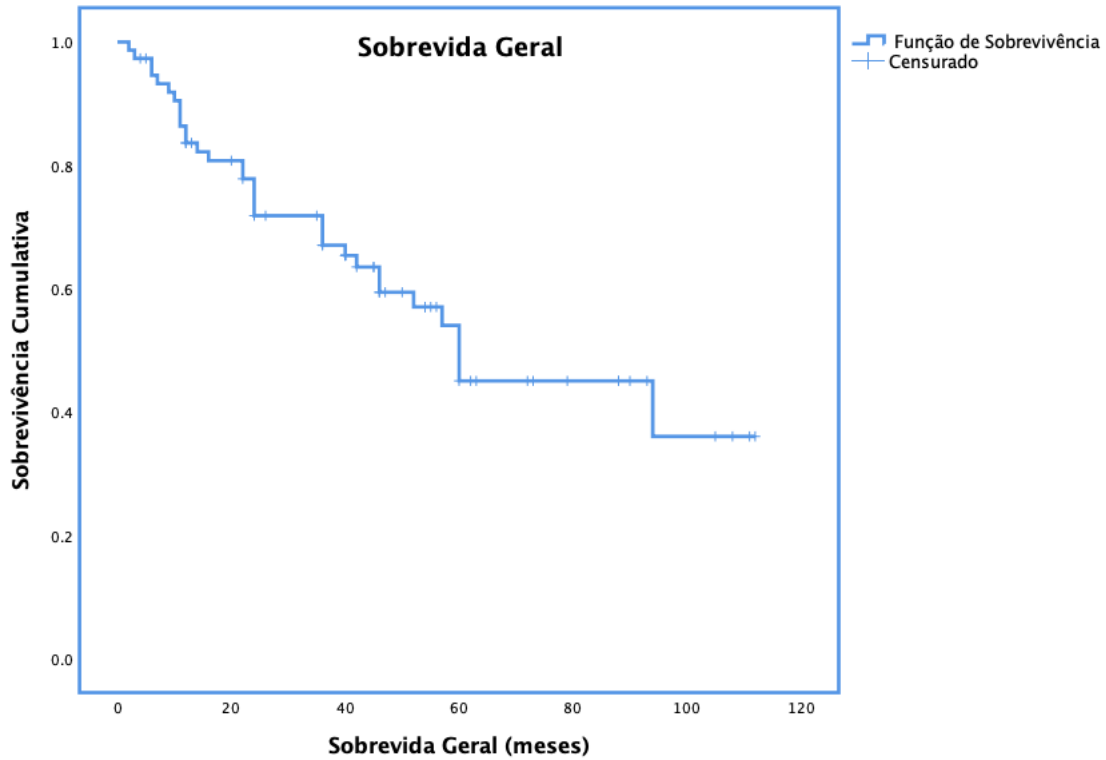


Figura 9. Curva de sobrevida geral pelo método de Kaplan-Meier, em pacientes com CHC ressecados.

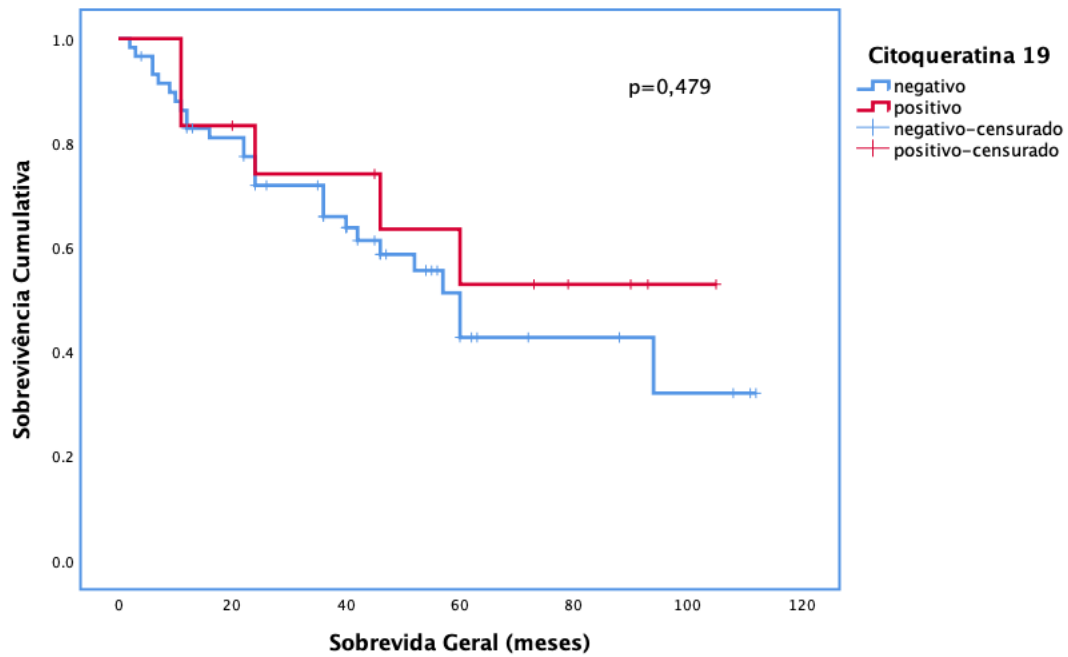


Figura 10. Correlação da positividade para CK19 com curva de sobrevida geral pelo método de Kaplan-Meier, em pacientes com CHC ressecados.

5.5.2 Sobrevida livre de doença

Aos 12 meses 26,2% dos pacientes tiveram recidiva, sendo esse percentual de 62,2% após 36 meses e de 72,3% aos 60 meses, ou seja, a sobrevida livre de doença foi de 73,8% no primeiro ano, 37,8% aos 36 meses e 27,7% aos 60 meses (**Figura 11**). Não houve diferença significativa entre a sobrevida livre de doença para os pacientes que tiveram CHC com e sem a expressão de CK19 (**Figura 12**).

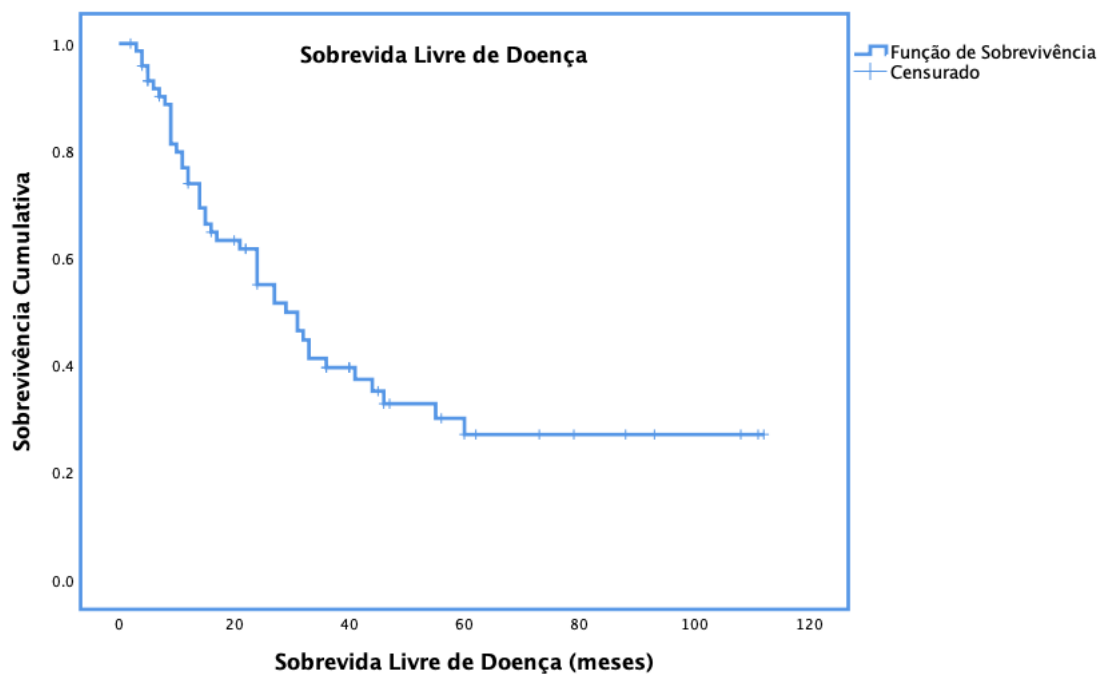


Figura 11. Curva de sobrevida livre de doença pelo método de Kaplan-Meier em pacientes com CHC ressecados.

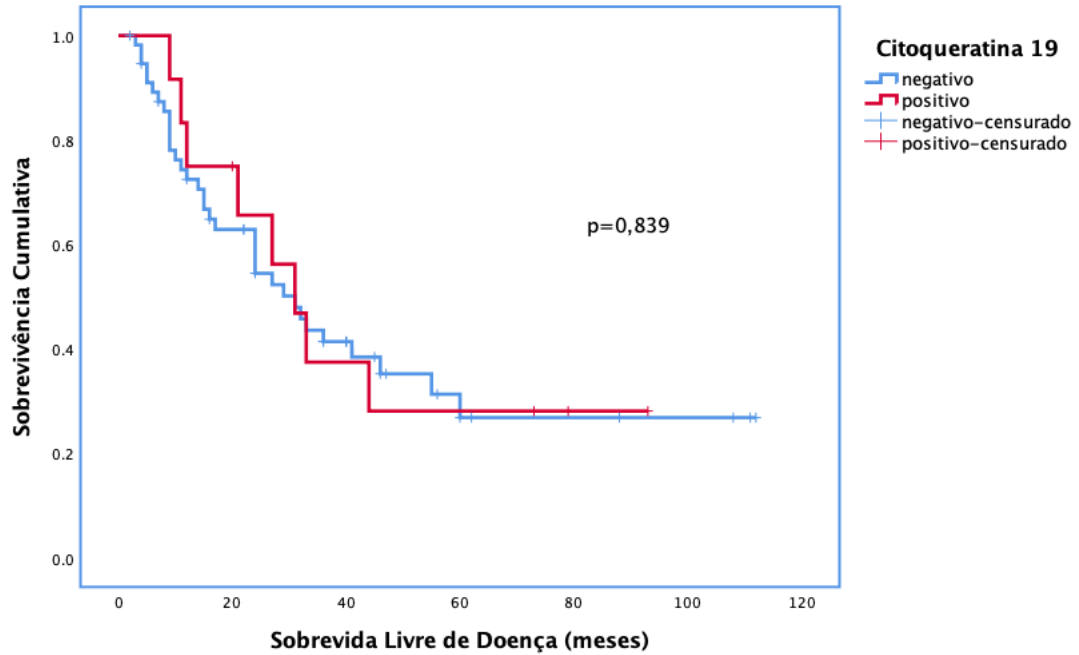


Figura 12. Correlação da positividade para CK19 com curva de sobrevida livre de doença pelo método de Kaplan-Meier em pacientes com CHC ressecados.

A **Tabela 9** mostra as características clínico-demográficas relacionadas à sobrevida livre de doença. O número de nódulos maior que 3 teve impacto negativo na curva de sobrevida livre de doença ($p=0,004$) (**figura 13**).

Tabela 9. Análise univariada das características clínico-demográficas na sobrevida livre de doença dos pacientes com CHC submetidos a ressecção com intenção curativa.

Variáveis	Valor de P
Idade	0,335
Gênero	0,072**
Etilismo	0,166**
Tabagismo	0,369
ASA	0,321
Etiologia	0,433
Tipo de Hepatectomia	0,764
Transfusão sanguínea	0,411
Clavien-dindo	0,590
Número de nódulos	0,004*
Maior diâmetro	0,551
Invasão angiolinfática	0,280
Estadio	0,440
Grau de diferenciação	0,800
Alfafeto > 200 ng/mL	0,475
Ck19 positivo	0,693

*Valores significativos para $p < 0,05$

** $p < 0,20$

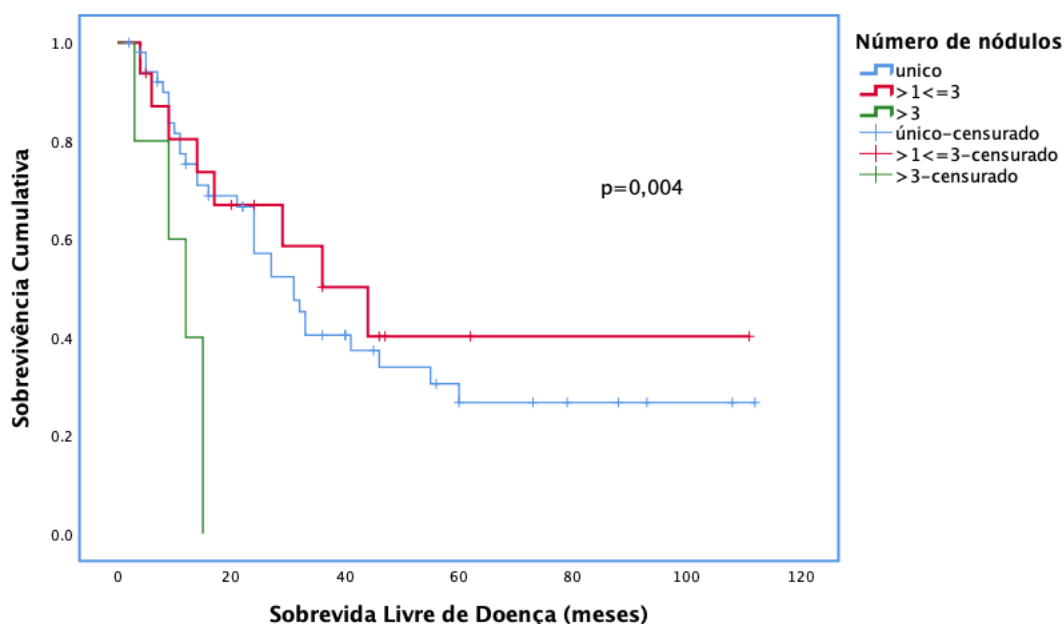


Figura 13. Correlação entre o número de nódulos e a curva de sobrevida livre de doença pelo método de Kaplan-Meier, em pacientes com CHC ressecados.

Para realização da análise multivariada da sobrevida livre de doença, inserimos no modelo todas as variáveis que apresentaram um $p < 0,20$ na etapa de análise univariada, ou seja, gênero ($p=0,072$), número de nódulos ($p=0,004$) e etilismo ($p=0,166$). No modelo final obtido na análise multivariada, apenas a variável número de nódulos maior que 3 teve significância estatística ($p=0,004$) quando comparada com a categoria de referência (nódulo único). A categoria número de nódulo ≤ 3 não se difere significativamente ($p=0,564$) da categórica de referência (único).

6 DISCUSSÃO

O carcinoma hepatocelular é o tumor primário do fígado mais comum e sua incidência tem aumentado nos países ocidentais^{6; 8; 28}. A infecção pelos vírus das hepatites B e C, e também o abuso de álcool contabilizaram 78,14% dos tumores analisados, o que retrata as causas mais frequentes de hepatopatias crônicas na população dos países ocidentais. O predomínio de homens (70,11%) e a média de idade (60,38 anos) de manifestação foram semelhantes aos relatados na população geral ocidental.

Na amostra da pesquisa, todos os pacientes submetidos à ressecção cirúrgica tinham função hepática preservada, como demonstrado na análise laboratorial - bilirrubina total de 0,77 (0,55-1,09), albumina 3,95 (3,5-4,3) e RNI de 1,13 (1-1,22). A maioria foi operada em estádios iniciais I e II, com predomínio de nódulos únicos e submetidos a hepatectomias menores. A mortalidade per-operatória (até 30 dias) foi de 12,64% (11 pacientes, a maioria por insuficiência hepática pós ressecção), acima da mortalidade geral para hepatectomias de 5,8%, de acordo com N. Filmann, D. Walter, E. Schadde, C. Bruns, T. Keck, H. Lang et al⁵¹. Considerando-se que a maioria dos óbitos foi de pacientes submetidos a hepatectomias maiores (7 dos 11 pacientes, 63,63%) e com tumores grandes (com diâmetros de até 26 cm), este valor é análogo ao observado na literatura de 10,4%. O índice de complicações graves Clavien-Dindo >III foi de 18,39%, próximo aos 14,7% relatados por Herman et. al., assim como a mediana de tempo de internação igual a 6 dias⁵².

A CK19 tem sido considerada marcador de células-tronco e progenitoras, além de importante marcador prognóstico. Estudos mostraram que a CK19 potencializou as propriedades tumorais no câncer de mama, câncer de cólon e carcinoma hepatocelular¹. O que sugere que a CK19 teria um papel importante na carcinogênese, sobretudo aumentando o caráter infiltrativo das células tumorais^{1; 2}. Em fígados normais, a expressão de CK19 é descrita no epitélio dos ductos biliares intra-hepáticos⁵³, mas não está expressa em hepatócitos maduros, servindo como controle interno das reações imuno-histoquímicas para CK19 no presente estudo.

A expressão imuno-histoquímica positiva para CK19 tem sido encontrada em 10 a 30 % dos carcinomas hepatocelulares^{1; 2; 43; 54}. Em nosso estudo, 15% dos tumores foram positivos para CK19, o que está de acordo com a literatura. Tumores CK19 positivos são raros e muitas vezes não diagnosticados, pois a realização de painel imuno-histoquímico não é uma rotina na avaliação do CHC. Como a maioria dos estudos é feita a partir de peças de

ressecção cirúrgica, a real incidência desses tumores pode estar subestimada. Os CHC CK19 positivo são classificados como uma entidade específica, com características patológicas do carcinoma hepatocelular e colangiocarcinoma intra-hepático associadas^{44; 55; 56}. Sua correta identificação é de fundamental importância para determinar o adequado tratamento.

Entre os 12 pacientes CK19 positivos encontrados na presente amostra cinco foram classificados como CHC-colangiocarcinoma combinado clássico, seis como CHC-colangiocarcinoma combinado de células intermediárias e um como colangiocarcinoma intra-hepático. A imuno-histoquímica teve importância na classificação dos CHCs de acordo com a OMS e foi possível somente após análise pareada dos cortes histológicos na mesma região tumoral. Acredita-se que estes tumores que foram abordados como CHCs tiveram também componentes fenotípicos de células ductais. Entretanto, no presente estudo, estes achados não tiveram impacto significativo na sobrevida dos pacientes.

Postula-se que a expressão de CK19 seria maior em tumores originados em fígados com algum tipo de injúria celular inflamatória, por exemplo, nas cirroses por hepatites virais^{2; 57}. Esses CHCs seriam formados a partir da proliferação de células progenitoras cancerosas hepáticas ou a partir da desdiferenciação do hepatócito maduro agredido^{2; 58}. Em fígados sem agressão celular aparente (fígados não cirróticos) os CHCs originariam de hepatócitos maduros sem o processo de desdiferenciação e, portanto, com ausência de expressão da CK19. Em nosso trabalho não houve associação positiva entre a CK19 positivo e as diferentes etiologias, apesar de um valor p muito próximo de 0,05. Podemos inferir que não tenha alcançado significância, talvez, pelo número pequeno da nossa amostra. Apesar de estatisticamente não significativa, observamos que 91,67% dos casos com expressão positiva de CK19 eram pacientes com algum grau de microambiente inflamatório, principalmente, por hepatites virais.

Outro mecanismo descrito para a expressão de CK19 no CHC é pelo ambiente deficiente de oxigênio no tumor e/ou estado hipóxico causado por tratamentos locais, como a quimioembolização intra-arterial e a ablação por radiofrequência^{55; 59; 60}. Células do CHC inicialmente CK19 negativas são induzidas a se transformarem em células CHC positivas para CK19. Diversos estudos têm demonstrado o aumento da expressão de CK19 após a quimioembolização. Em nosso estudo, pacientes submetidos a tratamentos prévios não foram incluídos na análise. Esses dados sugerem que o aumento da expressão ocorre pelas células tumorais remanescentes derivadas de células tronco cancerosas e estariam relacionados com o aumento da quimioresistência⁶⁰.

Elevados níveis séricos de alfafetoproteína são utilizados como critérios diagnósticos de carcinoma hepatocelular (na ausência de tumor testicular) e como preditores de prognóstico. Porém, cerca de 20% a 80% dos pacientes com CHC não possuem AFP sérica elevada^{5; 49; 61; 62; 63}. Em acordo com a literatura, 75% dos pacientes a AFP foi menor que 200 ng/mL e nossa amostra teve uma mediana de 13,97 ng/mL. Apesar de ser descrito a associação entre expressão de CK19 e níveis séricos elevados de AFP, apenas 5 desses pacientes apresentaram dosagem acima de 200 ng/mL e dosagem de alfafetoproteína não teve correlação na análise univariada ou multivariada. Também não houve relação da dosagem de AFP com a sobrevida geral ou sobrevida livre de doença.

Diferentemente do descrito na literatura a associação entre a expressão de CK19 e os graus histológicos menos diferenciados não atingiu significância estatística ($p=0,229$). Assim como a presença de invasão angiolinfática ($p=0,415$). Esses achados histopatológicos estão frequentemente associados à agressividade do tumor^{64; 65}. Essa significância não foi demonstrada, provavelmente, devido ao viés de seleção dos pacientes da amostra utilizada. Só foram considerados para o estudo pacientes em condições de ressecção cirúrgica favoráveis. Os pacientes possuíam, em sua maioria, tumores únicos, com diâmetros menores que 5 cm e submetidos a hepatectomias menores.

A expressão de CK19 tem sido associada a menor sobrevida e pior prognóstico^{36; 43; 44}. A sobrevida geral dos pacientes CK19 positivos após ressecção do carcinoma hepatocelular foi de 91,67 % no primeiro ano, 66,67% aos 36 meses e 50% aos 60 meses. Ao contrário dos trabalhos publicados observamos uma inversão na curva de sobrevida desses, sendo os CK19 positivos foram até levemente acima do que os negativos. Essa diferença não foi significativa estatisticamente.

As curvas de sobrevida livre de doença foram semelhantes para CHC CK19 positivos e negativos. Tumores CHC CK19 demonstram comportamentos agressivos com maior presença de fatores preditivos de maior recorrência tumoral precoce após hepatectomia ou transplante hepático, como invasão angiolinfática, número de nódulos maior que 3, diâmetro maior que 5 cm e tipos histológicos mais indiferenciados. Como não houve nenhuma relação da expressão do CK19 com as demais variáveis tidas como de pior prognóstico, era de se esperar que não houvesse impacto também na sobrevida livre de doença. O número de nódulos maior que três foi a única variável correlacionada à recidiva tumoral tanto na análise univariada quanto na multivariada ($p=0,004$). Em nossa casuística apenas 7 pacientes tinham mais que três nódulos e nenhum desses tumores foi positivo para CK19.

A expressão imuno-histoquímica de Hep Par 1 foi utilizada como reforço diagnóstico do carcinoma hepatocelular. Em sua maioria os carcinomas hepatocelulares apresentaram Hep Par 1 positivo (98,75%). Apenas 1 paciente foi Hep Par 1 negativo, sendo que era também CK19 positivo, EpCAM positivo e com AFP sérica baixa. O Hep Par 1 tem alta sensibilidade para tumores bem a moderadamente diferenciados, mas em até 50% dos carcinomas hepatocelulares pouco diferenciados podem perder a sua expressão^{21; 22}. O uso combinado de outros anticorpos como de arginase-1 e glipicano-3 permitiria a melhor avaliação de um CHC pouco diferenciado, porém esses marcadores não foram utilizados no presente estudo. Após análise morfológica e imuno-histoquímica esse tumor foi definido como colangiocarcinoma intra-hepático e não do tipo CHC-Colangiocarcinoma combinado, pela ausência do componente hepatocitário. De fato, esse paciente apresentou baixa sobrevida e menor tempo de sobrevida livre de doença compatível com pior prognóstico observado em colangiocarcinomas quando comparados com o CHC.

Dos 12 pacientes com CK19 positivo, 9 (75%) foram positivos para EpCAM e 3 foram negativos (25%). Assim como o CK19 o EpCAM é um marcador células progenitoras cancerosas hepáticas e tem sido utilizado em associação com outros marcadores biomoleculares para identificação de características das células-tronco na classificação morfológica e imuno-histoquímica do CHC-colangiocarcinoma combinados.

A identificação de uma subclasse de CHC CK19 positivos que apresenta características de células tronco cancerosas tem um importante significado clínico, uma vez que essas células podem ser mais um alvo terapêutico. Acredita-se que os níveis séricos de AFP associados à imuno-histoquímica possam servir como guia na seleção dos pacientes candidatos a tratamentos adjuvantes com medicamentos alvo para a CK19, assim como, contribuir na identificação de pacientes com diferentes prognósticos, adicionando-se mais um critério ao sistema de estadiamento TNM, já preconizado pela AJCC⁶⁶.

Os atuais métodos de detecção de CK19 ainda dependem da avaliação imuno-histoquímica de peças de ressecções cirúrgicas e carecem de métodos menos invasivos passíveis de serem utilizados na maioria dos pacientes com CHC. O uso de biopsia líquida sanguínea através da dosagem sérica de CYFRA 21-1 tem sido um marcador promissor para identificar células tumorais circulantes e prever recorrência⁵⁴. O CYFRA 21-1 é um fragmento solúvel de CK19 na circulação periférica. O CYFRA 21-1 já foi detectado em várias outras doenças malignas, incluindo câncer de pulmão de células não pequenas, câncer de esôfago, câncer de mama e câncer de pâncreas. Portanto, a dosagem sérica de CYFRA 21-1 pode ser considerado um biomarcador útil para indicar a expressão de CK19 no CHC⁵⁴.

Outros métodos diagnósticos menos invasivos têm sido utilizados para identificar paciente com CHC CK19 positivos em ressonância magnética pré-operatória. A partir do padrão de realce de contraste algumas características radiológicas como margem tumoral irregular, hiper-realce na fase arterial, menor relação de intensidade de sinal tumor-fígado na fase hepatobiliar e menor coeficiente de difusão aparente tumor-fígado, são potencialmente relacionadas à expressão de CK19⁶⁷. Outros modelos baseados na análise radiômica utilizando algoritmos de inteligência artificial a partir de imagens de ressonância magnética com contraste ácido gadoxético foram capazes de diferenciar radiologicamente CHCs CK19 positivos e negativos.⁶⁸

Uma limitação desse estudo foi o número de pacientes da amostra. Apesar do CHC ser uma neoplasia maligna comum em pacientes com doença hepática crônica, mesmo com rastreio de rotina por exames de imagem e dosagem de marcadores tumorais nos grupos de maior risco, grande parte dos doentes com CHC ainda é diagnosticada em estádios avançados e, apenas, cerca de 20% são passíveis de tratamento cirúrgico curativo⁶⁹. Como somente os casos passíveis de ressecção curativa foram incluídos no estudo, provavelmente, selecionamos doentes com melhor prognóstico dentro de uma amostragem global desses tumores, não contemplando doenças com disseminação mais agressiva e metastática. A pequena casuística pode ter sido responsável por não termos demonstrado significância estatística para algumas variáveis do estudo, conforme já publicado na literatura.

Os resultados dessa pesquisa levam a questões que podem ser respondidas em pesquisas futuras. Acredita-se que os mecanismos biomoleculares possam ser mais explorados em relação ao papel das células-tronco e da expressão não só da CK19 e EpCAM na carcinogênese, mas também outros biomarcadores envolvidos nesse processo. SALL4, CD31 e CD44 são, frequentemente, usados em combinação com CK19 e EpCAM na investigação do componente da célula progenitora ou o chamado recurso "stemness" do CHC^{40; 42; 65; 70}. O esclarecimento desses mecanismos é necessário para que tenham valor na prática clínica e possam determinar novas linhas de tratamentos a esses pacientes.

7 CONCLUSÃO

Em conclusão, entre CHCs ressecados com intenção curativos, 15% foram positivos para CK19 e não houve associação positiva entre a expressão imuno-histoquímica deste biomarcador molecular com a sobrevida geral e a livre de doença. A expressão de CK19 não teve associação positiva com nenhuma das variáveis analisadas. Na presente amostra, apenas o número de nódulos maior do que 3 teve impacto negativo na sobrevida geral e livre de doença dos pacientes.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 KAWAI, T. et al. Keratin 19, a Cancer Stem Cell Marker in Human Hepatocellular Carcinoma. **Clin Cancer Res**, v. 21, n. 13, p. 3081-91, Jul 01 2015. ISSN 1557-3265. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25820415> >.
- 2 ZHUO, J. Y. et al. CK19-positive Hepatocellular Carcinoma is a Characteristic Subtype. **J Cancer**, v. 11, n. 17, p. 5069-5077, 2020. ISSN 1837-9664. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32742454> >.
- 3 GOVAERE, O. et al. The PDGFR α -laminin B1-keratin 19 cascade drives tumor progression at the invasive front of human hepatocellular carcinoma. **Oncogene**, v. 36, n. 47, p. 6605-6616, 11 23 2017. ISSN 1476-5594. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28783171> >.
- 4 **Global Cancer Observatory: Liver Fact Sheet.**
- 5 FERENCI, P. et al. World Gastroenterology Organisation Guideline. Hepatocellular carcinoma (HCC): a global perspective. **J Gastrointestin Liver Dis**, v. 19, n. 3, p. 311-7, Sep 2010. ISSN 1842-1121. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20922197> >.
- 6 FERLAY, J. et al. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. **Int J Cancer**, v. 127, n. 12, p. 2893-917, Dec 2010. ISSN 1097-0215. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21351269> >.
- 7 YAN, B. C. et al. Arginase-1: a new immunohistochemical marker of hepatocytes and hepatocellular neoplasms. **Am J Surg Pathol**, v. 34, n. 8, p. 1147-54, Aug 2010. ISSN 1532-0979. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20661013> >.
- 8 PAWLIK, T. M. et al. Critical appraisal of the clinical and pathologic predictors of survival after resection of large hepatocellular carcinoma. **Arch Surg**, v. 140, n. 5, p. 450-7; discussion 457-8, May 2005. ISSN 0004-0010. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15897440> >.
- 9 LIVER, E. A. F. T. S. O. T.; CANCER, E. O. F. R. A. T. O. EASL-EORTC clinical practice guidelines: management of hepatocellular carcinoma. **J Hepatol**, v. 56, n. 4, p. 908-43, Apr 2012. ISSN 1600-0641. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22424438> >.
- 10 YANG, J. D. et al. A global view of hepatocellular carcinoma: trends, risk, prevention and management. **Nat Rev Gastroenterol Hepatol**, v. 16, n. 10, p. 589-604, 10 2019. ISSN 1759-5053. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31439937> >.

- 11 EASLOFFICE@EASLOFFICE.EU, E. A. F. T. S. O. T. L. E. A.; LIVER, E. A. F. T. S. O. T. EASL Clinical Practice Guidelines: Management of hepatocellular carcinoma. **J Hepatol**, v. 69, n. 1, p. 182-236, 07 2018. ISSN 1600-0641. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29628281> >.
- 12 MARRERO, J. A. et al. Diagnosis, Staging, and Management of Hepatocellular Carcinoma: 2018 Practice Guidance by the American Association for the Study of Liver Diseases. **Hepatology**, v. 68, n. 2, p. 723-750, 08 2018. ISSN 1527-3350. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29624699> >.
- 13 CHEN IY, A.-V. D. **Hepatocellular carcinoma overview. PathologyOutlines.com website.** <https://www.pathologyoutlines.com/topic/livertumorHCC.html>.
- 14 NAULT, J. C. et al. Telomerase reverse transcriptase promoter mutation is an early somatic genetic alteration in the transformation of premalignant nodules in hepatocellular carcinoma on cirrhosis. **Hepatology**, v. 60, n. 6, p. 1983-92, Dec 2014. ISSN 1527-3350. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25123086> >.
- 15 TORBENSON MS, N. I., PARK YN, ET AL.. **Hepatocellular carcinoma. In: WHO Classification of Tumours: Digestive System Tumours, 5th ed, WHO Classification of Tumours Editorial Board (Ed), International Agency for Research on Cancer 2019.**
- 16 YEH, C. N. et al. Pedunculated hepatocellular carcinoma: clinicopathologic study of 18 surgically resected cases. **World J Surg**, v. 26, n. 9, p. 1133-8, Sep 2002. ISSN 0364-2313. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12209243> >.
- 17 KANAI, T. et al. Pathology of small hepatocellular carcinoma. A proposal for a new gross classification. **Cancer**, v. 60, n. 4, p. 810-9, Aug 1987. ISSN 0008-543X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2439190> >.
- 18 LLOVET, J. M. et al. Hepatocellular carcinoma. **Nat Rev Dis Primers**, v. 7, n. 1, p. 6, 01 21 2021. ISSN 2056-676X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33479224> >.
- 19 GIRAUD, J. et al. Hepatocellular Carcinoma Immune Landscape and the Potential of Immunotherapies. **Front Immunol**, v. 12, p. 655697, 2021. ISSN 1664-3224. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33815418> >.
- 20 ANG, C. et al. Comprehensive multiplatform biomarker analysis of 350 hepatocellular carcinomas identifies potential novel therapeutic options. **J Surg Oncol**, v. 113, n. 1, p. 55-61, Jan 2016. ISSN 1096-9098. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26661118> >.
- 21 KAKAR, S. et al. Immunoreactivity of Hep Par 1 in hepatic and extrahepatic tumors and its correlation with albumin in situ hybridization in hepatocellular

- carcinoma. **Am J Clin Pathol**, v. 119, n. 3, p. 361-6, Mar 2003. ISSN 0002-9173. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12645337> >.
- 22 BUTLER, S. L. et al. The antigen for Hep Par 1 antibody is the urea cycle enzyme carbamoyl phosphate synthetase 1. **Lab Invest**, v. 88, n. 1, p. 78-88, Jan 2008. ISSN 1530-0307. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18026163> >.
- 23 LLOVET, J. M. et al. The Barcelona approach: diagnosis, staging, and treatment of hepatocellular carcinoma. **Liver Transpl**, v. 10, n. 2 Suppl 1, p. S115-20, Feb 2004. ISSN 1527-6465. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14762851> >.
- 24 ABDALLA, E. K. et al. Treatment of large and advanced hepatocellular carcinoma. **Ann Surg Oncol**, v. 15, n. 4, p. 979-85, Apr 2008. ISSN 1534-4681. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18236115> >.
- 25 CHAN, A. W. et al. Expression of stemness markers (CD133 and EpCAM) in prognostication of hepatocellular carcinoma. **Histopathology**, v. 64, n. 7, p. 935-50, Jun 2014. ISSN 1365-2559. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24506513> >.
- 26 MURAKATA, A. et al. Gene expression signature of the gross morphology in hepatocellular carcinoma. **Ann Surg**, v. 253, n. 1, p. 94-100, Jan 2011. ISSN 1528-1140. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21233610> >.
- 27 CHOI, G. H. et al. Outcome after curative resection for a huge (>or=10 cm) hepatocellular carcinoma and prognostic significance of gross tumor classification. **Am J Surg**, v. 198, n. 5, p. 693-701, Nov 2009. ISSN 1879-1883. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19268907> >.
- 28 KIMURA, O. et al. Characterization of the epithelial cell adhesion molecule (EpCAM)+ cell population in hepatocellular carcinoma cell lines. **Cancer Sci**, v. 101, n. 10, p. 2145-55, Oct 2010. ISSN 1349-7006. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20707805> >.
- 29 LI, M. et al. Cytoplasmic alpha-fetoprotein functions as a co-repressor in RA-RAR signaling to promote the growth of human hepatoma Bel 7402 cells. **Cancer Lett**, v. 285, n. 2, p. 190-9, Nov 2009. ISSN 1872-7980. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19501957> >.
- 30 LU, Y. et al. Alpha fetoprotein plays a critical role in promoting metastasis of hepatocellular carcinoma cells. **J Cell Mol Med**, v. 20, n. 3, p. 549-58, Mar 2016. ISSN 1582-4934. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26756858> >.
- 31 FUNG, J.; LAI, C. L.; YUEN, M. F. Hepatitis B and C virus-related carcinogenesis. **Clin Microbiol Infect**, v. 15, n. 11, p. 964-70, Nov 2009. ISSN 1469-0691. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19874379> >.

- 32 NODA, T. et al. Activation of Wnt/beta-catenin signalling pathway induces chemoresistance to interferon-alpha/5-fluorouracil combination therapy for hepatocellular carcinoma. **Br J Cancer**, v. 100, n. 10, p. 1647-58, May 2009. ISSN 1532-1827. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19401692> >.
- 33 JI, J.; YAMASHITA, T.; WANG, X. W. Wnt/beta-catenin signaling activates microRNA-181 expression in hepatocellular carcinoma. **Cell Biosci**, v. 1, n. 1, p. 4, 2011. ISSN 2045-3701. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21711587> >.
- 34 ANSON, M. et al. Oncogenic β -catenin triggers an inflammatory response that determines the aggressiveness of hepatocellular carcinoma in mice. **J Clin Invest**, v. 122, n. 2, p. 586-99, Feb 2012. ISSN 1558-8238. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22251704> >.
- 35 GUO, Z. et al. Cancer stem cell markers correlate with early recurrence and survival in hepatocellular carcinoma. **World J Gastroenterol**, v. 20, n. 8, p. 2098-106, Feb 2014. ISSN 2219-2840. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24616575> >.
- 36 DURNEZ, A. et al. The clinicopathological and prognostic relevance of cytokeratin 7 and 19 expression in hepatocellular carcinoma. A possible progenitor cell origin. **Histopathology**, v. 49, n. 2, p. 138-51, Aug 2006. ISSN 0309-0167. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16879391> >.
- 37 KIM, H. et al. Human hepatocellular carcinomas with "Stemness"-related marker expression: keratin 19 expression and a poor prognosis. **Hepatology**, v. 54, n. 5, p. 1707-17, Nov 2011. ISSN 1527-3350. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22045674> >.
- 38 LIU, Y. C.; YEH, C. T.; LIN, K. H. Cancer Stem Cell Functions in Hepatocellular Carcinoma and Comprehensive Therapeutic Strategies. **Cells**, v. 9, n. 6, 05 26 2020. ISSN 2073-4409. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32466488> >.
- 39 SANG, X. et al. Human Hepatic Cancer Stem Cells (HCSCs) Markers Correlated With Immune Infiltrates Reveal Prognostic Significance of Hepatocellular Carcinoma. **Front Genet**, v. 11, p. 112, 2020. ISSN 1664-8021. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32184801> >.
- 40 CAETANO OLIVEIRA, R. et al. Morphophenotypic Classification of Hepatocellular Carcinoma: the Biliary/Stem Cell Subgroup and Worst Outcome-Implications on Patient Selection. **J Gastrointest Surg**, v. 25, n. 3, p. 698-707, 03 2021. ISSN 1873-4626. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32410177> >.
- 41 YAMASHITA, T. et al. EpCAM-positive hepatocellular carcinoma cells are tumor-initiating cells with stem/progenitor cell features. **Gastroenterology**, v. 136, n. 3,

- p. 1012-24, Mar 2009. ISSN 1528-0012. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19150350> >.
- 42 DOLLÉ, L. et al. EpCAM and the biology of hepatic stem/progenitor cells. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**, v. 308, n. 4, p. G233-50, Feb 2015. ISSN 1522-1547. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25477371> >.
- 43 UENISHI, T. et al. Cytokeratin 19 expression in hepatocellular carcinoma predicts early postoperative recurrence. **Cancer Sci**, v. 94, n. 10, p. 851-7, Oct 2003. ISSN 1347-9032. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14556657> >.
- 44 ZHAO, Q. et al. Combined hepatocellular and cholangiocarcinoma originating from the same clone: a pathomolecular evidence-based study. **Chin J Cancer**, v. 35, n. 1, p. 82, 08 24 2016. ISSN 1944-446X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27552844> >.
- 45 BALZAR, M. et al. Epidermal growth factor-like repeats mediate lateral and reciprocal interactions of Ep-CAM molecules in homophilic adhesions. **Mol Cell Biol**, v. 21, n. 7, p. 2570-80, Apr 2001. ISSN 0270-7306. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11259604> >.
- 46 YONEDA, N. et al. Epidermal growth factor induces cytokeratin 19 expression accompanied by increased growth abilities in human hepatocellular carcinoma. **Lab Invest**, v. 91, n. 2, p. 262-72, Feb 2011. ISSN 1530-0307. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20856226> >.
- 47 WANG, Y. et al. Integrated Genomic and Transcriptomic Analysis reveals key genes for predicting dual-phenotype Hepatocellular Carcinoma Prognosis. **J Cancer**, v. 12, n. 10, p. 2993-3010, 2021. ISSN 1837-9664. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33854600> >.
- 48 GUEDJ N, B. A. **Combined hepatocellular carcinoma-cholangiocarcinoma. PathologyOutlines.com website.** <https://www.pathologyoutlines.com/topic/livertumorcombinedHCCcholangio.html> . .
- 49 BRUIX, J.; SHERMAN, M.; DISEASES, A. A. F. T. S. O. L. Management of hepatocellular carcinoma: an update. **Hepatology**, v. 53, n. 3, p. 1020-2, Mar 2011. ISSN 1527-3350. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21374666> >.
- 50 BEAUFRÈRE, A.; CALDERARO, J.; PARADIS, V. Combined hepatocellular-cholangiocarcinoma: An update. **J Hepatol**, v. 74, n. 5, p. 1212-1224, 05 2021. ISSN 1600-0641. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33545267> >.
- 51 FILMANN, N. et al. Mortality after liver surgery in Germany. **Br J Surg**, v. 106, n. 11, p. 1523-1529, 10 2019. ISSN 1365-2168. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31339558> >.

- 52 HERMAN, P. et al. Two decades of liver resection with a multidisciplinary approach in a single institution: What has changed? Analysis of 1409 cases. **Clinics (Sao Paulo)**, v. 77, p. 100088, Jul 25 2022. ISSN 1980-5322. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/35901605> >.
- 53 PEREIRA, T. E. A. et al. Viral factors induce Hedgehog pathway activation in humans with viral hepatitis, cirrhosis, and hepatocellular carcinoma. **Lab Invest**, v. 90, n. 12, p. 1690-703, Dec 2010. ISSN 1530-0307. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20697376> >.
- 54 KAWAI, T. et al. Identification of keratin 19-positive cancer stem cells associating human hepatocellular carcinoma using CYFRA 21-1. **Cancer Med**, v. 6, n. 11, p. 2531-2540, Nov 2017. ISSN 2045-7634. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28965351> >.
- 55 ZEN, C. et al. Mixed phenotype hepatocellular carcinoma after transarterial chemoembolization and liver transplantation. **Liver Transpl**, v. 17, n. 8, p. 943-54, Aug 2011. ISSN 1527-6473. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21491582> >.
- 56 LEONI, S. et al. Treatment of Combined Hepatocellular and Cholangiocarcinoma. **Cancers (Basel)**, v. 12, n. 4, Mar 26 2020. ISSN 2072-6694. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32224916> >.
- 57 SHUYAO, W. et al. CK19 Predicts Recurrence and Prognosis of HBV Positive HCC. **J Gastrointest Surg**, v. 26, n. 2, p. 341-351, 02 2022. ISSN 1873-4626. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/34506016> >.
- 58 SU, H. et al. Molecular mechanism of CK19 involved in the regulation of postoperative recurrence of HBV-associated primary hepatocellular carcinoma in Guangxi. **Ann Transl Med**, v. 9, n. 24, p. 1780, Dec 2021. ISSN 2305-5839. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/35071474> >.
- 59 LAI, J. P. et al. Hypoxia after transarterial chemoembolization may trigger a progenitor cell phenotype in hepatocellular carcinoma. **Histopathology**, v. 67, n. 4, p. 442-50, Oct 2015. ISSN 1365-2559. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25425262> >.
- 60 RHEE, H. et al. Poor outcome of hepatocellular carcinoma with stemness marker under hypoxia: resistance to transarterial chemoembolization. **Mod Pathol**, v. 29, n. 9, p. 1038-49, 09 2016. ISSN 1530-0285. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27312064> >.
- 61 SHERMAN, M. et al. Screening for hepatocellular carcinoma: the rationale for the American Association for the Study of Liver Diseases recommendations. **Hepatology**, v. 56, n. 3, p. 793-6, Sep 2012. ISSN 1527-3350. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22689409> >.

- 62 SHERMAN, M. Staging for hepatocellular carcinoma: complex and confusing. **Gastroenterology**, v. 146, n. 7, p. 1599-602, Jun 2014. ISSN 1528-0012. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24780213> >.
- 63 BRUIX, J.; REIG, M.; SHERMAN, M. Evidence-Based Diagnosis, Staging, and Treatment of Patients With Hepatocellular Carcinoma. **Gastroenterology**, v. 150, n. 4, p. 835-53, Apr 2016. ISSN 1528-0012. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26795574> >.
- 64 SHAN, Y. F. et al. Angiogenesis and clinicopathologic characteristics in different hepatocellular carcinoma subtypes defined by EpCAM and α -fetoprotein expression status. **Med Oncol**, v. 28, n. 4, p. 1012-6, Dec 2011. ISSN 1559-131X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20571936> >.
- 65 YANG, X. R. et al. High expression levels of putative hepatic stem/progenitor cell biomarkers related to tumour angiogenesis and poor prognosis of hepatocellular carcinoma. **Gut**, v. 59, n. 7, p. 953-62, Jul 2010. ISSN 1468-3288. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20442200> >.
- 66 MAHUL B. AMIN, S. B. E., FREDERICK L. GREENE, DAVID R. BYRD, ROBERT K. BROOKLAND, MARY KAY WASHINGTON, JEFFREY E. GERSHENWALD, CAROLYN C. COMPTON, KENNETH R. HESS, DANIEL C. SULLIVAN, J. MILBURN JESSUP, JAMES D. BRIERLEY, LAURI E. GASPAR, RICHARD L. SCHILSKY, CHARLES M. BALCH, DAVID P. WINCHESTER, ELLIOT A. ASARE, MARTIN MADERA, DONNA M. GRESS, LAURA R. MEYER. **AJCC Cancer Staging Manual**: Springer Cham 2017.
- 67 HU, X. X. et al. MR features based on LI-RADS identify cytokeratin 19 status of hepatocellular carcinomas. **Eur J Radiol**, v. 113, p. 7-14, Apr 2019. ISSN 1872-7727. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30927962> >.
- 68 YANG, F. et al. MRI-Radiomics Prediction for Cytokeratin 19-Positive Hepatocellular Carcinoma: A Multicenter Study. **Front Oncol**, v. 11, p. 672126, 2021. ISSN 2234-943X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/34476208> >.
- 69 SCHULZE, K. et al. Presence of EpCAM-positive circulating tumor cells as biomarker for systemic disease strongly correlates to survival in patients with hepatocellular carcinoma. **Int J Cancer**, v. 133, n. 9, p. 2165-71, Nov 2013. ISSN 1097-0215. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23616258> >.
- 70 OISHI, N.; YAMASHITA, T.; KANEKO, S. Molecular biology of liver cancer stem cells. **Liver Cancer**, v. 3, n. 2, p. 71-84, May 2014. ISSN 2235-1795. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24944998> >.

9 ANEXOS

9.1 ANEXO 1 - Classificação TNM do Hepatocarcinoma - AJCC 8ª edição

T - O tumor primário

Tx - O tumor primário não pode ser avaliado

T0 - Não há evidência de tumor primário

T1a - Tumor único \leq 2cm com ou sem invasão vascular

T2b - Tumor único $>$ 2cm sem invasão vascular

T2 - Tumor único $>$ 2cm com invasão vascular ou múltiplos tumores, mas nenhum $>$ 5 cm em sua maior dimensão

T3 - Múltiplos tumores com pelo menos um tumor $>$ 5 cm

T4 - Tumor único ou múltiplos tumores de qualquer diâmetro envolvendo um ramo principal da veia porta ou veia hepática (s) ou com invasão direta de órgãos adjacentes, exceto a vesícula biliar, ou com perfuração do peritônio visceral.

N - Linfonodos Regionais

NX - Linfonodos regionais não podem ser avaliados

N0 – Ausência de metástases em linfonodos regionais

N1 – Presença de metástases em linfonodos regionais

M - Metástase à distância

M0 - Ausência de metástases à distância

M1 – Presença de metástases à distância

Agrupamento de estágio TNM

Estádio IA T1a NO MO

Estádio IB T1b NO MO

Estádio II T2 NO MO

Estádio IIIA T3 NO MO

Estádio IIIB T4 NO MO

Estádio IIIC T4 NO MO

Estádio IVA Qualquer T N1 MO

Estádio IVB Qualquer T Qualquer N M1

9.2 ANEXO 2 - Protocolo para análise imuno-histoquímica

1. Desparafinizar as lâminas em 02 banhos de xilol - 5 minutos cada
2. Reidratar em 02 banhos de álcool absoluto - 3 minutos cada; 02 banhos de álcool 70% - 3 minutos cada, 02 banhos de álcool 50% - 3 minutos cada e lavar em água destilada.
3. Realizar a recuperação antigênica conforme recomendações do fabricante do anticorpo primário com tampão alto ou baixo, em banho-maria a 97°C, de 20 a 30 minutos. Deixar esfriar por 20 minutos.
4. Lavar com tampão de lavagem (Tris ou PBS, durante 5 minutos em temperatura ambiente (de 20-25°C).
5. Incubar as lâminas por 15 minutos na Solução de Peróxido de Hidrogênio
6. Lavar com Tampão de lavagem por 5 minutos, em temperatura ambiente. Repetir a operação por mais três vezes e secar ao redor do corte.
7. Aplicar o bloqueio de proteína ultra V em quantidade suficiente para cobrir o corte e incubar as lâminas por 10 minutos em câmara úmida, em temperatura ambiente. NÃO lavar, apenas escorrer o excesso do reagente.
8. Aplicar o anticorpo primário diluído em quantidade suficiente para cobrir o corte e incubar as lâminas de 30 a 60 minutos, ou conforme a recomendação do fabricante.
9. Lavar as lâminas com tampão de lavagem por 5 minutos, em temperatura ambiente. Repetir a operação mais duas vezes. Secar ao redor do corte.
10. Aplicar o complemento em quantidade suficiente para cobrir o corte e incubar as lâminas por 10 minutos, em câmara úmida, temperatura ambiente. NÃO lavar, apenas escorra o excesso do reagente.
11. Aplicar o conjugado HRP em quantidade suficiente para cobrir o corte e incubar as lâminas por 10 minutos, em câmara úmida, temperatura ambiente.

12. Lavar as lâminas com tampão de lavagem por 5 minutos. Repetir a operação mais três vezes. Secar ao redor do corte.

13. Aplicar o substrato cromógeno DAB Plus diluído 1/50 em tampão diluente de DAB em quantidade suficiente para cobrir o corte. Incubar as lâminas de 5 a 10 minutos, em câmara úmida, temperatura ambiente.

14. Lavar em água destilada por 5 minutos. Repetir a operação mais duas vezes.

15. Contra-corar com Hematoxilina, desidratar e montar com meio permanente.

9.3 ANEXO 3 - Aprovação pelo comitê de ética



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

Projeto: CAAE - 25010114.5.0000.5149

Interessado(a): Profa. Vivian Resende
Departamento de Cirurgia
Faculdade de Medicina

DECISÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP aprovou, no dia 11 de março de 2014, o projeto de pesquisa intitulado "**Expressão de biomarcadores moleculares no 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.


Prof. Maria Teresa Marques Amaral
Coordenadora do COEP-UFMG

9.4 ANEXO 4 – Termo de Consentimento Livre Esclarecido

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Nº Registro COEP: _____

O senhor (a) está sendo convidado (a) a participar, como voluntário, em uma pesquisa de título: EXPRESSÃO DE BIOMARCADORES MOLECULARES NO CARCINOMA HEPATOCELULAR. O documento abaixo contém todas as informações necessárias sobre a pesquisa que está sendo realizada. Sua colaboração neste estudo é muito importante, mas a decisão de participar deve ser sua. Para tanto, leia com cuidado as informações abaixo e não se apresse em decidir. Se não concordar em participar ou quiser desistir em qualquer momento, isso não lhe causará nenhum prejuízo. Se o senhor (a) concordar em participar basta preencher os seus dados e assinar a declaração concordando com a pesquisa. Se o senhor (a) tiver alguma dúvida pode esclarecê-la com o responsável da pesquisa. Obrigado (a).

Objetivo do estudo

Este projeto está sendo proposto porque há poucos estudos no Brasil sobre as bases moleculares do carcinoma hepatocelular e sua relação com fatores presentes no dia a dia, ao longo da vida. O objetivo desse trabalho é o de estudar o papel de algumas proteínas relacionados a estes cânceres e, assim, tentar descobrir novos tratamentos que possam propiciar um melhor controle da doença.

Procedimentos

Todos os indivíduos que assinarem o termo de consentimento livre e esclarecido têm neoplasia já diagnosticada. Não serão administrados aos pacientes quaisquer medicamentos ou testes diagnósticos. O único inconveniente aos quais os pacientes serão submetidos será a coleta de sangue total (10 ml). O desconforto associado à coleta de sangue é o habitual de um exame de sangue de rotina. A coleta será realizada com material estéril, descartável e por pessoas treinadas.

Será coletado também fragmento do tumor retirado durante a cirurgia realizada pela equipe médica do Grupo de Fígado, Vias biliares, Pâncreas e Baço e

do Grupo de Transplante Hepático do Instituto Alfa de Gastroenterologia da Universidade Federal de Minas Gerais.

O material colhido será devidamente etiquetado e utilizado somente para os propósitos dessa pesquisa. As informações obtidas serão objeto de estrita confidencialidade e não envolvem custos ou pagamento de qualquer espécie.

Confidencialidade

Todos os dados dessa pesquisa serão mantidos em sigilo e apenas a equipe de pesquisadores terá acesso a eles. Cada participante receberá um código garantindo confidencialidade de sua identidade. Caso o (a) senhor (a) queira, terá acesso aos resultados individuais.

Benefícios e riscos

Esta pesquisa não oferece riscos adicionais ao participante, porém existe o desconforto inerente à própria coleta de sangue como, por exemplo, dor e formação de pequeno hematoma no local da punção. Além disso, terá o desconforto de ler e conceder ou não sua permissão para participar desta pesquisa, que é sem benefício individual direto, mas as informações obtidas nos auxiliarão a melhor compreender os mecanismos envolvidos no desenvolvimento de tumores no fígado.

Não haverá qualquer tipo de despesa ao paciente, no que tange a materiais ou testes. Ao assinar esse termo de consentimento o senhor (a) não está abrindo mão de seus direitos legais.

Através deste documento fica assegurado o direito ao Sr. (a) que terá todos os esclarecimentos relativos à pesquisa, garantidos, incluindo os métodos utilizados. A partir do momento que o participante da pesquisa não desejar mais fazer parte da pesquisa, reservamos-lhe o direito de retirar o seu consentimento, livre de sofrer qualquer penalidade ou dano, quaisquer que sejam. Se no transcorrer da pesquisa tiver alguma dúvida, ou por qualquer outro motivo necessitar de orientações, poderá procurar um dos pesquisadores, Dra. Vivian Resende tel. 92637000 (UFMG), ou se houver dúvidas em relação aos aspectos éticos, o Comitê de Ética (COEP) poderá ser contatado no seguinte endereço e telefone: Av. Antônio Carlos, 6627 – Unidade administrativa II, 2º andar/ Campus Pampulha- UFMG Tel.: (31)34094592/ E-mail: coep@prpq.ufmg.br

Eu, _____, paciente voluntário, dou consentimento livre e esclarecido, para que se façam os testes necessários a esta pesquisa e posterior uso e publicação dos dados nos relatórios finais e conclusivos, a fim de que estes sirvam para beneficiar a ciência e a humanidade.

Declaro que recebi cópia do presente Termo de Consentimento.

Belo Horizonte, ____ de _____ de 20__

Assinatura do participante

Assinatura de testemunha
