

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

**AVALIAÇÃO DOS FATORES PREDITORES DE INVASÃO VASCULAR
MICROSCÓPICA NO CARCINOMA HEPATOCELULAR**

FERNANDA MARIA FARAGE OSÓRIO

BELO HORIZONTE - MG

2013

FERNANDA MARIA FARAGE OSÓRIO

**AVALIAÇÃO DOS FATORES PREDITORES DE INVASÃO VASCULAR
MICROSCÓPICA NO CARCINOMA HEPATOCELULAR**

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

Orientadora: Prof^a. Claudia Alves Couto

Coorientadoras: Prof^a. Teresa Cristina de Abreu Ferrari

Prof^a. Paula Vieira Teixeira Vidigal

BELO HORIZONTE

2013

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Reitor: Prof. Clélio Campolina Diniz

Vice-Reitora: Prof^a. Rocksane de Carvalho Norton

Pró-Reitor de Pós-Graduação: Prof. Ricardo Santiago Gómez

Pró-Reitor de Pesquisa: Prof. Renato de Lima Santos

FACULDADE DE MEDICINA DA UFMG

Diretor da Faculdade de Medicina: Prof. Francisco José Penna

Vice-Diretor da Faculdade de Medicina: Prof. Tarcizo Afonso Nunes

Coordenador do Centro de Pós-Graduação: Prof. Manoel Otávio da Costa Rocha

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS APLICADAS À SAÚDE DO ADULTO

Chefe do Departamento de Clínica Médica: Prof. Ricardo Macedo Menezes

Coordenadora do Programa: Profa. Teresa Cristina Abreu Ferrari

Subcoordenadora do Programa: Profa. Valéria Maria de Azeredo Passos

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

Prof^a. Teresa Cristina A. Ferrari

Prof^a. Valéria Maria A. Passos

Prof. Luiz Gonzaga Vaz Coelho

Prof. Francisco Eduardo Costa Cardoso

Prof. Marcus Vinícius M. de Andrade

Andréa de Lima Bastos (representante discente)

DEDICATÓRIA

Aos meus pais e Marcell.

AGRADECIMENTOS

Agradeço às minhas orientadoras que se tornaram, cada uma à sua maneira, um exemplo além da universidade. Obrigada por cada lição.

Ao acadêmico Gabriel que foi muito importante na execução deste trabalho.

Aos funcionários do SAME, pela colaboração e simpatia, especialmente à Maria Helena.

À Fernanda da anatomia patológica por seu trabalho possibilitar o meu.

Ao Fernando, estatístico da pós-graduação, por ter sido assertivo e tão compreensivo.

Ao ambulatório de fígado e seus integrantes, por ser minha escola.

À todo o grupo de transplantes hepático, ao Hospital das Clínicas e aos pacientes.

Aos meus pais, que são a inspiração e que me ensinaram que o trabalho e o estudo é que enobrecem o indivíduo.

Aos meus irmãos por alegrarem a minha vida, até mesmo em momentos difíceis.

Ao amor da minha vida, Marcell, por ser o que me faltava.

À minha prima Alice pela dedicação que me encantou.

À todos que contribuíram na execução da tese, perto ou longe, ou simplesmente me toleraram neste período.

EPÍGRAFE

“Viva como se fosse morrer amanhã.
Aprenda como se fosse viver para sempre.”

Mahatma Gandhi

RESUMO

O carcinoma hepatocelular é uma neoplasia de alta mortalidade e sua incidência vem crescendo globalmente apesar de haver métodos de prevenção e rastreamento eficientes. O tratamento de escolha em pacientes em estadios iniciais, com cirrose avançada é o transplante hepático, no entanto, a recorrência tumoral ainda é um problema. A invasão vascular microscópica é um fator determinante na recorrência do tumor e na sobrevida dos pacientes após o transplante. O presente estudo avaliou variáveis clínicas e histopatológicas como preditores de invasão vascular. Para tal, foram incluídos 107 (76 homens, 71%) pacientes submetidos ao transplante hepático entre julho de 2001 e dezembro de 2010 e avaliados retrospectivamente seus prontuários médicos para obtenção das informações clínicas (etiologia da cirrose, história de tabagismo e diabetes mellitus, escore de Child–Pugh e escore MELD) e laboratoriais (alfafetoproteína, creatinina, bilirrubina total, albumina e RNI). Foi realizada revisão histológica das lâminas coradas em hematoxilina-eosina por um único patologista especialista em histologia hepática para determinação de invasão vascular e demais variáveis histológicas (presença de fibrose, esteatose, necrose e inflamação no parênquima tumoral e classificação do grau de diferenciação histológica, índice mitótico e tipo histológico). A média de idade foi 56,8 ($\pm 8,7$) e a recorrência tumoral 12,9%. A sobrevida em um, três e cinco anos foi 75,0%, 71,4% e 67,5%, respectivamente. Na análise multivariada as variáveis independentes associadas à invasão vascular microscópica foram grau histológico ($p < 0,001$; OR 3,16; IC 1,525 a 4,156) e índice mitótico ($p = 0,046$; OR 2,56; IC 1,061 a 6,451). Este resultado ressalta a importância de se discutir a realização de biópsia hepática antes do tratamento, uma vez que grau de diferenciação histológica e índice mitótico, fatores preditores de invasão vascular microscópica, podem ser identificados pela mesma.

ABSTRACT

Background: Microvascular invasion (MVI) is a well-known risk factor for hepatocellular carcinoma (HCC) recurrence and mortality after liver transplantation (LT). The aim of this study was to determine clinicopathological predictive factors associated with MVI.

Methods: Records of all patients who underwent LT with HCC at Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais, between July 2001 and December 2010, were reviewed. Laboratory tests, clinical and demographic data were obtained. Histopathological review of the hematoxylin and eosin specimens was performed by a single liver pathologist.

Results: A total of 107 patients were included, 76 male (71%) and the mean age was 56.8 (± 8.7). Tumor recurrence rate was 12.9%. One, three and five years overall survival was 75.0, 71.4 and 67.5% respectively. Only tumor recurrence was associated with mortality ($p=0.038$; OR= 2.54; CI 1.052 to 6.106). Mitotic index, histological grade, tumor architecture, alpha-fetoprotein and tumor fibrosis were included in the multivariate model. Significant independent predictors of MVI on logistic regression analysis were histological grade and mitotic index ($p < 0.001$; OR 3.16; CI 1.525 to 4.156 and $p = 0.046$; OR 2.56; CI 1.061 to 6.451 respectively).

Discussion: Mitotic index and histological grade are good predictors of MVI. No other risk factor was identified in the logistic regression. These results highlight the importance of discussing pre transplantation liver biopsy to access prognosis and define treatment modalities in the setting of LT.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Carcinoma hepatocelular padrão trabecular.	26
Figura 2: Carcinoma hepatocelular padrão pseudoglandular.	26
Figura 3: Carcinoma hepatocelular padrão sólido	27
Figura 4: Carcinoma hepatocelular bem diferenciado.	28
Figura 5: Carcinoma hepatocelular pouco diferenciado.	28

LISTA DE SIGLAS

AASLD – *American Association for the Study of Liver Diseases*

AFP – alfafetoproteína

BCLC – *Barcelona Clinic Liver Cancer*

CHC – carcinoma hepatocelular

cm – centímetros

EASL – *European Association for the Study of Liver*

HC – Hospital das Clínicas

HE – Hematoxilina-Eosina

MELD – Model of End-Stage Disease

RNM – ressonância nuclear magnética

TC – tomografia computadorizada

TH – transplante hepático

UFMG – Universidade Federal de Minas Gerais

UNOS - *United Network for Organ Sharing*

US - ultrassonografia

VHB – vírus da hepatite B

VHC – vírus da hepatite C

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 ANTECEDENTES CIENTÍFICOS.....	13
2.1 Carcinoma hepatocelular	13
2.1.1 Incidência e prevalência	13
2.1.2 Fatores de risco	13
2.1.3 Rastreamento e vigilância.....	14
2.1.4 Diagnóstico	15
2.1.5 Estadiamento.....	15
2.1.6 Indicação e priorização ao transplante hepático em indivíduos com carcinoma hepatocelular.....	16
2.1.7 Características histológicas e prognóstico.....	17
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	19
3 OBJETIVOS	23
3.1 Objetivo geral.....	23
3.2 Objetivos específicos	23
4 MÉTODOS	24
4.1 Delineamento do estudo	24
4.2 Seleção dos casos e coleta dos dados clínicos	24
4.3 Avaliação histológica.....	25
4.4 Análise estatística	29
Figura 1: Carcinoma hepatocelular padrão trabecular.	26
Figura 2: Carcinoma hepatocelular padrão pseudoglandular.....	26
Figura 3: Carcinoma hepatocelular padrão sólido	27
Figura 4: Carcinoma hepatocelular bem diferenciado.....	28
Figura 5: Carcinoma hepatocelular pouco diferenciado.....	28
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	45
ANEXOS	46
ANEXO A – Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa - UFMG	46
ANEXO B – Ata da defesa da dissertação.....	47
ANEXO C – Folha de provação	48

APÊNDICES.....	48
APÊNDICE A - Termo de consentimento livre e esclarecido	49
APÊNDICE B - Protocolo de biópsia.....	50
APÊNDICE C – Artigo publicado em periódico	52

1 INTRODUÇÃO

Dentre as causas de neoplasia em geral, as neoplasias primárias do fígado são a sétima mais frequente em homens e a quinta nas mulheres (1). O carcinoma hepatocelular (CHC) representa 70 a 85% das neoplasias primárias do fígado e sua incidência está aumentando globalmente. Apesar de haver métodos de prevenção e rastreamento eficientes, ainda é responsável por altos índices de mortalidade.

O tratamento varia conforme o estágio da doença, e o transplante hepático (TH) é a escolha em casos selecionados, em fase inicial. Entretanto, a recidiva tumoral e a mortalidade ainda são fatores preocupantes no tratamento do CHC. Apesar de critérios restritos para a realização do TH, a recorrência do CHC chega a 18% (2). A invasão vascular microscópica é um dos determinantes dos resultados após o TH ou ressecção cirúrgica do CHC (3). Diante da importância da invasão vascular microscópica, identificada em vários estudos como principal fator prognóstico após a ressecção cirúrgica do CHC e após o TH, e da impossibilidade de detectá-la pré-tratamento, torna-se desejável o estudo de marcadores da mesma. Neste contexto, insere-se o presente estudo, no qual é feita análise histológica e clínica de fatores preditivos da invasão vascular em pacientes submetidos ao TH no Hospital das Clínicas (HC) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

2 ANTECEDENTES CIENTÍFICOS

2.1 Carcinoma hepatocelular

2.1.1 Incidência e prevalência

As neoplasias primárias do fígado são o sexto câncer mais frequente mundialmente e representam a terceira causa de mortalidade relacionada a câncer (4). O CHC constitui cerca de 70 a 90% das neoplasias primárias do fígado (5, 6).

A incidência do CHC eleva-se progressivamente com o aumento da idade; raramente ocorre antes de 40 anos, sendo observado um pico de incidência aos 70 anos aproximadamente. As taxas de câncer de fígado em homens são duas a quatro vezes maiores do que nas mulheres (7). Nos indivíduos com cirrose hepática, o CHC é a principal causa de morte (8).

2.1.2 Fatores de risco

Os fatores de risco para o CHC, em 90% dos casos, estão associados ao desenvolvimento ou progressão da cirrose hepática e incluem: infecção pelos vírus da hepatite B (VHB) ou C (VHC), hepatopatia alcoólica e esteatohepatite não-alcoólica. Causas menos comuns compreendem hemocromatose hereditária, deficiência de alfa-1-antitripsina, hepatite autoimune, algumas porfirias e doença de Wilson (7). A exposição dietética à aflatoxina B1, derivada dos fungos *Aspergillus flavus* e *A. parasiticus* é importante cofator na oncogênese do CHC em algumas partes da África e Ásia. Estudos epidemiológicos mostraram forte associação entre exposição à aflatoxina B1 e mutações no gen supressor tumoral p53 e a ocorrência de CHC, especialmente em pacientes infectados pelo VHB (6).

Diabetes melitus é fator de risco independente para o desenvolvimento de HCC (9) e o tabagismo, um importante cofator (10). Marcadores indiretos de disfunção hepática e hipertensão portal, tais como contagem de plaquetas abaixo de $75.000/\text{mm}^3$, atividade de protrombina menor que 75%, associados à idade mais avançada, ao sexo masculino e ao anti-HCV positivo são preditores do desenvolvimento do CHC em pacientes cirróticos (11).

2.1.3 Rastreamento e vigilância

A vigilância do CHC é realizada com o intuito de redução da mortalidade relacionada ao câncer e trata-se de rastreamento periódico realizado em pacientes de risco. É amplamente utilizada apesar de pouca evidência de benefício (12). O único estudo randomizado no qual se comparou o resultado da realização de vigilância por ultrassonografia (US) e dosagem sérica de alfafetoproteína (AFP), a cada seis meses, com a não realização de vigilância foi feito na China, em pacientes com marcadores de infecção pelo VHB, obtendo-se redução de 37% na mortalidade no grupo submetido à vigilância (13).

O método de imagem de escolha para o rastreamento é a US, por ser não-invasivo e amplamente disponível. A sua sensibilidade para detecção precoce do CHC em cirróticos é aproximadamente 70% (14). O uso combinado da US e dosagem de AFP se mostrou pouco eficiente, aumentando o número de casos falso-positivos e os custos da vigilância (15). Desta maneira, a *American Association for the Study of Liver Diseases* (AASLD) e a *European Association for the Study of Liver* (EASL) não recomendam a dosagem deste marcador no rastreamento do CHC (12, 16).

A recomendação atual da EASL é de que o rastreamento seja empregado em cirróticos Child-Pugh A e B, em cirróticos Child-Pugh C quando estiverem alocados em fila de TH, em portadores do VHB não-cirróticos com hepatite em atividade ou que tenham história familiar positiva para CHC e em pacientes com VHC e fibrose hepática avançada (16).

2.1.4 Diagnóstico

O diagnóstico do CHC é realizado, cada vez mais, por meio de métodos não-invasivos, tomografia computadorizada com contraste (TC) ou à ressonância nuclear magnética (RNM), seguindo-se critérios radiológicos bem definidos. Por se tratar de tumor hipervascular, suprido pela artéria hepática, o CHC contrasta-se mais em relação ao restante do parênquima hepático na fase arterial da administração de contraste. Na fase venosa tardia, o CHC contrasta-se menos por não ter suprimento portal, fenômeno denominado “*washout*” (17, 18). A presença de captação de contraste na fase arterial seguida de “*washout*” na fase portal tardia é altamente específica para o CHC.

Nódulos maiores do que um centímetro (cm), descobertos durante o rastreamento em pacientes cirróticos, e que apresentam características típicas dos critérios não-invasivos à TC ou à RNM podem ser diagnosticados como CHC (19). Desta maneira, a biópsia hepática para o diagnóstico de CHC limita-se aos indivíduos que apresentam nódulos hepáticos de tamanho igual ou superior a um cm e exames de imagem inconclusivos em relação aos critérios não-invasivos.

Em nódulos menores de um cm, a US deverá ser repetida a cada três meses até que o tumor apresente crescimento superior a esta dimensão, quando então uma TC ou RNM deverão ser realizadas para conclusão diagnóstica. Caso o nódulo mantenha-se estável por período de 18 meses, o paciente deverá retornar ao rastreamento periódico semestral (20).

2.1.5 Estadiamento

Atualmente, o sistema de classificação do CHC mais utilizado é o da *Barcelona Clinic Liver Cancer* (BCLC) segundo o qual os pacientes são subdivididos em cinco estádios (0, A, B, C e D), de acordo com variáveis prognósticas pré-estabelecidas e alocados em grupos de tratamento (16).

1-Estadio 0: presença de nódulo único menor ou iguais a dois cm de diâmetro sem evidências de invasão vascular, em paciente em boa condição de saúde e função hepática preservada (Child Pugh A). Estes pacientes podem ser submetidos à ressecção hepática do segmento acometido.

2- Estadio A: pacientes que apresentam tumores únicos maiores de dois cm e que não ultrapassem cinco ou até três nódulos de até três cm de diâmetro, em boa condição de saúde, Child Pugh A ou B. Estes indivíduos são candidatos ao TH.

3- Estadio B (intermediário): pacientes com doença multifocal, assintomáticos, sem evidências de metástases extra-hepáticas. São candidatos a quimioembolização transarterial.

4- Estadio C (avançado): pacientes com doença multifocal, com sintomas relacionados ao câncer, com evidência de invasão da veia porta ou metástases extra-hepáticas. Podem receber quimioterapia sistêmica com sorafenibe (Nexavar^R) para tratamento paliativo, desde que sejam classificados como Child-Pugh A.

5- Estadio D (terminal): pacientes que se apresentam muito debilitados pelo tumor.

2.1.6 Indicação e priorização ao transplante hepático em indivíduos com carcinoma hepatocelular

Mazzafero e col. (1996) demonstraram que pacientes com tumores solitários de tamanho menor ou igual a cinco cm ou com até três lesões menores ou iguais a três cm apresentam maior sobrevida após o transplante, sobrevida que se equipara à de pacientes transplantados por outras indicações. A partir deste estudo ficaram estabelecidos, então, critérios de seleção de candidatos com CHC para o TH, chamados “critérios de Milão”(21). Estes critérios têm sido amplamente utilizados por diversos grupos de transplante.

A *United Network for Organ Sharing* (UNOS) desenvolveu e adotou um sistema de prioridades para alocação dos candidatos ao TH baseado no escore *Model of End-Stage Liver Disease* (MELD) que, originalmente, foi criado para prever a sobrevida de pacientes submetidos a derivação intra-hepática

portossistêmica transjugular (TIPS) (22, 23). De acordo com o MELD, pacientes com CHC de até dois cm de diâmetro recebem 22 pontos e aqueles com até três nódulos de até três cm recebem 29 pontos, obtendo, assim, prioridade para o transplante.

Um modelo prognóstico chamado METROTICKET foi desenvolvido por Mazzaferro e col. (2009) na tentativa de estratificar melhor quanto à sobrevida os critérios de seleção para o TH e torna-los menos excludentes (24). O modelo leva em consideração o tamanho e o número de nódulos tumorais e estratifica os grupos de indivíduos considerando a sobrevida em três e cinco anos. Os pesquisadores identificaram um subgrupo de pacientes que excediam os critérios de Milão, mas apresentavam sobrevida em cinco anos de pelo menos 70%, semelhante àquela dos pacientes dentro deste critério.

2.1.7 Características histológicas e prognóstico

A sobrevida após a ressecção cirúrgica ou TH para o tratamento do CHC está intimamente relacionada à recorrência do tumor (25). Desta maneira, as características clínicas e histopatológicas do CHC são amplamente estudadas na tentativa de se obter melhores resultados de sobrevida.

A invasão vascular microscópica é a característica histológica com maior influência no prognóstico após a ressecção cirúrgica do CHC ou após o TH (26-28). É caracterizada pela presença de êmbolo tumoral em ramos da veia central, da veia porta ou dos vasos da pseudo-cápsula fibrosa tumoral (29). A presença de invasão vascular microscópica está associada ao tamanho do tumor, tendo sido descrita em 30% dos tumores medindo dois cm e em até 50 % de tumores com cinco cm (3). Parfitti e col. (2005) desenvolveram escore patológico de predição de recorrência do CHC após o TH baseado na análise de variáveis clínicas e histológicas do tumor. A invasão vascular microscópica foi o melhor preditor de recorrência tumoral, no entanto, o tamanho do tumor, o grau histológico, e a presença de microssatelite e células gigantes também foram preditores independentes de recorrência (30). Um estudo brasileiro que incluiu 45 pacientes transplantados por CHC demonstrou que a

invasão vascular foi melhor preditor de recorrência que tamanho e número de nódulos (31).

O grau de diferenciação histológica do tumor, classificado de I a IV, varia de bem diferenciado a indiferenciado, de acordo com a classificação sugerida por Edmondson e Steiner (32). Sabe-se que tumores de alto grau (indiferenciados) influenciam a sobrevida após a ressecção do CHC e após o TH (33, 34). Jonas e col. (2001), por exemplo, descreveram sobrevida de cinco anos, em 84% dos pacientes com CHC bem diferenciados submetidos ao TH, comparada a 41%, em pacientes com tumor pouco diferenciado (35). Apesar do número e do tamanho de nódulos tumorais, o grupo de transplante da Universidade de Toronto indica transplante para pacientes fora dos critérios de Milão quando a biópsia hepática assegura que a lesão dominante não é pouco diferenciada e obtiveram bons resultados, sem redução de sobrevida (36). Outros grupos também utilizam biópsia hepática pré-transplante tornando pacientes com tumores irresssecáveis, bem a moderadamente diferenciados, candidatos ao TH (33).

Diversas características histológicas já foram estudadas na busca de indicadores prognósticos. O alto índice mitótico, por exemplo, já foi associado a pior índice de sobrevida após a ressecção cirúrgica do CHC (37). Lauwers e col. (2002) investigaram as variáveis índice mitótico, necrose tumoral, invasão vascular microscópica, grau de diferenciação histológica, arquitetura tumoral e pleomorfismo nuclear na predição de sobrevida (38). À análise univariada, a presença de invasão vascular, alto índice mitótico e tumores de alto grau relacionaram-se com pior sobrevida. Por outro lado, à análise multivariada, apenas a invasão vascular e o grau de diferenciação histológica mantiveram-se como preditores de pior prognóstico.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Jemal A, Bray F, et al. Global cancer statistics. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. 2012;61(2):69-90.
2. Roayaie S, Schwartz JD, Sung MW, Emre SH, Miller CM, Gondolesi GE, et al. Recurrence of hepatocellular carcinoma after liver transplant: patterns and prognosis. *Liver Transpl*. 2004;10(4):534-40.
3. Esnaola NF, Lauwers GY, Mirza NQ, Nagorney DM, Doherty D, Ikai I, et al. Predictors of microvascular invasion in patients with hepatocellular carcinoma who are candidates for orthotopic liver transplantation. *J Gastrointest Surg*. 2002;6(2):224-32; discussion 32.
4. Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer*. 2010;127(12):2893-917.
5. El-Serag HB. Epidemiology of hepatocellular carcinoma. *Clin Liver Dis*. 2001;5(1):87-107, vi.
6. El-Serag HB, Rudolph KL. Hepatocellular carcinoma: epidemiology and molecular carcinogenesis. *Gastroenterology*. 2007;132(7):2557-76.
7. El-Serag HB. Hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med*. 2011;365(12):1118-27.
8. Sherman M. Hepatocellular carcinoma: epidemiology, surveillance, and diagnosis. *Semin Liver Dis*. 2010;30(1):3-16.
9. Davila JA, Morgan RO, Shaib Y, McGlynn KA, El-Serag HB. Diabetes increases the risk of hepatocellular carcinoma in the United States: a population based case control study. *Gut*. 2005;54(4):533-9.
10. Marrero JA, Fontana RJ, Fu S, Conjeevaram HS, Su GL, Lok AS. Alcohol, tobacco and obesity are synergistic risk factors for hepatocellular carcinoma. *J Hepatol*. 2005;42(2):218-24.
11. Velázquez RF, Rodríguez M, Navascués CA, Linares A, Pérez R, Sotorríos NG, et al. Prospective analysis of risk factors for hepatocellular carcinoma in patients with liver cirrhosis. *Hepatology*. 2003;37(3):520-7.
12. Bruix J, Sherman M. Management of hepatocellular carcinoma: an update. *Hepatology*. 2011;53(3):1020-2.

13. Zhang BH, Yang BH, Tang ZY. Randomized controlled trial of screening for hepatocellular carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2004;130(7):417-22.
14. Singal A, Volk ML, Waljee A, Salgia R, Higgins P, Rogers MA, et al. Meta-analysis: surveillance with ultrasound for early-stage hepatocellular carcinoma in patients with cirrhosis. *Aliment Pharmacol Ther*. 2009;30(1):37-47.
15. Zhang B, Yang B. Combined alpha fetoprotein testing and ultrasonography as a screening test for primary liver cancer. *J Med Screen*. 1999;6(2):108-10.
16. Liver EAFTSOT, Cancer EOFRATO. EASL-EORTC clinical practice guidelines: management of hepatocellular carcinoma. *J Hepatol*. 2012;56(4):908-43.
17. Yu JS, Kim KW, Kim EK, Lee JT, Yoo HS. Contrast enhancement of small hepatocellular carcinoma: usefulness of three successive early image acquisitions during multiphase dynamic MR imaging. *AJR Am J Roentgenol*. 1999;173(3):597-604.
18. Forner A, Vilana R, Ayuso C, Bianchi L, Solé M, Ayuso JR, et al. Diagnosis of hepatic nodules 20 mm or smaller in cirrhosis: Prospective validation of the noninvasive diagnostic criteria for hepatocellular carcinoma. *Hepatology*. 2008;47(1):97-104.
19. Sangiovanni A, Manini MA, Iavarone M, Romeo R, Forzenigo LV, Fraquelli M, et al. The diagnostic and economic impact of contrast imaging techniques in the diagnosis of small hepatocellular carcinoma in cirrhosis. *Gut*. 2010;59(5):638-44.
20. Forner A, Llovet JM, Bruix J. Hepatocellular carcinoma. *Lancet*. 2012;379(9822):1245-55.
21. Mazzaferro V, Regalia E, Doci R, Andreola S, Pulvirenti A, Bozzetti F, et al. Liver transplantation for the treatment of small hepatocellular carcinomas in patients with cirrhosis. *N Engl J Med*. 1996;334(11):693-9.
22. Freeman RB, Wiesner RH, Harper A, McDiarmid SV, Lake J, Edwards E, et al. The new liver allocation system: moving toward evidence-based transplantation policy. *Liver Transpl*. 2002;8(9):851-8.
23. Kamath PS, Wiesner RH, Malinchoc M, Kremers W, Therneau TM, Kosberg CL, et al. A model to predict survival in patients with end-stage liver disease. *Hepatology*. 2001;33(2):464-70.
24. Mazzaferro V, Llovet JM, Miceli R, Bhoori S, Schiavo M, Mariani L, et al. Predicting survival after liver transplantation in patients with hepatocellular carcinoma

beyond the Milan criteria: a retrospective, exploratory analysis. *Lancet Oncol.* 2009;10(1):35-43.

25. Marshall A, Alexander G. Vascular invasion leaves its mark in hepatocellular carcinoma. *J Hepatol.* 2011;55(6):1174-5.

26. Vauthey JN, Klimstra D, Franceschi D, Tao Y, Fortner J, Blumgart L, et al. Factors affecting long-term outcome after hepatic resection for hepatocellular carcinoma. *Am J Surg.* 1995;169(1):28-34; discussion -5.

27. Dudek K, Kornasiewicz O, Remiszewski P, Kobryń K, Ziarkiewicz-Wróblewska B, Górnicka B, et al. Impact of tumor characteristic on the outcome of liver transplantation in patients with hepatocellular carcinoma. *Transplant Proc.* 2009;41(8):3135-7.

28. Briceño J, Ruiz J, Ciria R, Naranjo A, Sánchez-Hidalgo J, Luque A, et al. Factors affecting survival and tumor recurrence in patients transplanted for hepatocellular carcinoma and coexistent hepatitis C virus. *Transplant Proc.* 2008;40(9):2990-3.

29. Vauthey JN, Lauwers GY, Esnaola NF, Do KA, Belghiti J, Mirza N, et al. Simplified staging for hepatocellular carcinoma. *J Clin Oncol.* 2002;20(6):1527-36.

30. Parfitt JR, Marotta P, Alghamdi M, Wall W, Khakhar A, Suskin NG, et al. Recurrent hepatocellular carcinoma after transplantation: use of a pathological score on explanted livers to predict recurrence. *Liver Transpl.* 2007;13(4):543-51.

31. Coelho GR, Vasconcelos KF, Vasconcelos JB, Barros MA, Costa PE, Borges GC, et al. Orthotopic liver transplantation for hepatocellular carcinoma: one center's experience in the Northeast of Brazil. *Transplant Proc.* 2009;41(5):1740-2.

32. Edmondson HA, Steiner PE. Primary carcinoma of the liver: a study of 100 cases among 48,900 necropsies. *Cancer.* 1954;7(3):462-503.

33. Cillo U, Vitale A, Bassanello M, Boccagni P, Brolese A, Zanusi G, et al. Liver transplantation for the treatment of moderately or well-differentiated hepatocellular carcinoma. *Ann Surg.* 2004;239(2):150-9.

34. Pawlik TM, Delman KA, Vauthey JN, Nagorney DM, Ng IO, Ikai I, et al. Tumor size predicts vascular invasion and histologic grade: Implications for selection of surgical treatment for hepatocellular carcinoma. *Liver Transpl.* 2005;11(9):1086-92.

35. Jonas S, Bechstein WO, Steinmüller T, Herrmann M, Radke C, Berg T, et al. Vascular invasion and histopathologic grading determine outcome after liver

transplantation for hepatocellular carcinoma in cirrhosis. *Hepatology*. 2001;33(5):1080-6.

36. DuBay D, Sandroussi C, Sandhu L, Cleary S, Guba M, Cattral MS, et al. Liver transplantation for advanced hepatocellular carcinoma using poor tumor differentiation on biopsy as an exclusion criterion. *Ann Surg*. 2011;253(1):166-72.

37. Ouchi K, Sugawara T, Ono H, Fujiya T, Kamiyama Y, Kakugawa Y, et al. Mitotic index is the best predictive factor for survival of patients with resected hepatocellular carcinoma. *Dig Surg*. 2000;17(1):42-8.

38. Lauwers GY, Terris B, Balis UJ, Batts KP, Regimbeau JM, Chang Y, et al. Prognostic histologic indicators of curatively resected hepatocellular carcinomas: a multi-institutional analysis of 425 patients with definition of a histologic prognostic index. *Am J Surg Pathol*. 2002;26(1):25-34.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Investigar associação entre dados clínicos e características patológicas do CHC e a ocorrência de invasão vascular microscópica e sobrevida, em pacientes submetidos ao TH no HC da UFMG.

3.2 Objetivos específicos

Investigar a associação entre dados clínico-demográficos, laboratoriais e histopatológicos do CHC e presença de invasão vascular microscópica e recorrência e sobrevida após o TH.

4 MÉTODOS

4.1 Delineamento do estudo

Trata-se de estudo de série de casos no qual foram avaliados parâmetros clínicos e histológicos de pacientes com CHC submetidos ao TH no HC da UFMG no período de julho de 2001 a dezembro de 2010.

4.2 Seleção dos casos e coleta dos dados clínicos

Foram incluídos 107 casos de CHC identificados através do prontuário eletrônico do ambulatório de TH do HC da UFMG. Neste serviço os pacientes são selecionados por meio dos critérios de Milão e são alocados em fila de acordo com o escore de MELD.

Foram revistos os prontuários médicos dos pacientes incluídos para obtenção das informações clínicas.

O diagnóstico das hepatopatias não foi revisto, portanto, a etiologia aceita foi aquela descrita pelo médico que atendeu o paciente previamente, seguindo-se o protocolo de abordagem diagnóstica utilizado pelo Grupo de Transplante de Órgãos do HC da UFMG, o qual inclui sorologias para hepatites virais, cinética do ferro e autoanticorpos.

Foi revista a história pregressa e classificados como tabagistas, aqueles que fumavam à época do transplante ou que haviam interrompido o hábito há menos de um ano. Pacientes com diagnóstico prévio de diabetes mellitus ou que estavam em uso de insulina ou hipoglicemiantes orais foram considerados diabéticos.

Foram obtidos do prontuário médico a classificação de Child-Pugh e escore MELD, assim como os seguintes exames laboratoriais: creatinina, AFP, albumina, bilirrubina total e RNI.

4.3 Avaliação histológica

A avaliação histológica foi realizada por um único patologista que reviu as lâminas coradas em hematoxilina-eosina (HE) e descrita de acordo com o protocolo desenvolvido como parte deste estudo (Apêndice B).

As variáveis fibrose e necrose foram classificadas em presente ou ausente no parênquima tumoral. A esteatose foi considerada positiva quando presente em mais de 5% das células do parênquima tumoral.

Inflamação tumoral foi considerada positiva quando havia mais de cinco células inflamatórias por campo de grande aumento, em 10 campos de grande aumento consecutivos.

Atividade mitótica foi avaliada através da exploração de 10 campos de grande aumento consecutivos e graduada em baixa, quando havia até duas figuras de mitose, ou, em alta, quando havia três ou mais figuras de mitose por campo de grande aumento.

A arquitetura tumoral foi classificada de acordo com o tipo predominante do tumor como trabecular, pseudoglandular e sólido¹. O padrão trabecular caracteriza-se por crescimento em cordões ou placas com espessura de duas ou mais células (Figura 1). O pseudoacinar (pseudoglandular) apresenta formação de espaços glanduliformes de células com aspecto de hepatócitos (Figura 2). O padrão sólido apresenta-se com crescimento compacto das células tumorais com poucos espaços vasculares reconhecíveis (Figura 3).

1 Bacchi C, Almeida P, Franco M. Manual de padronização de laudos histopatológicos. Rio de Janeiro 1999.

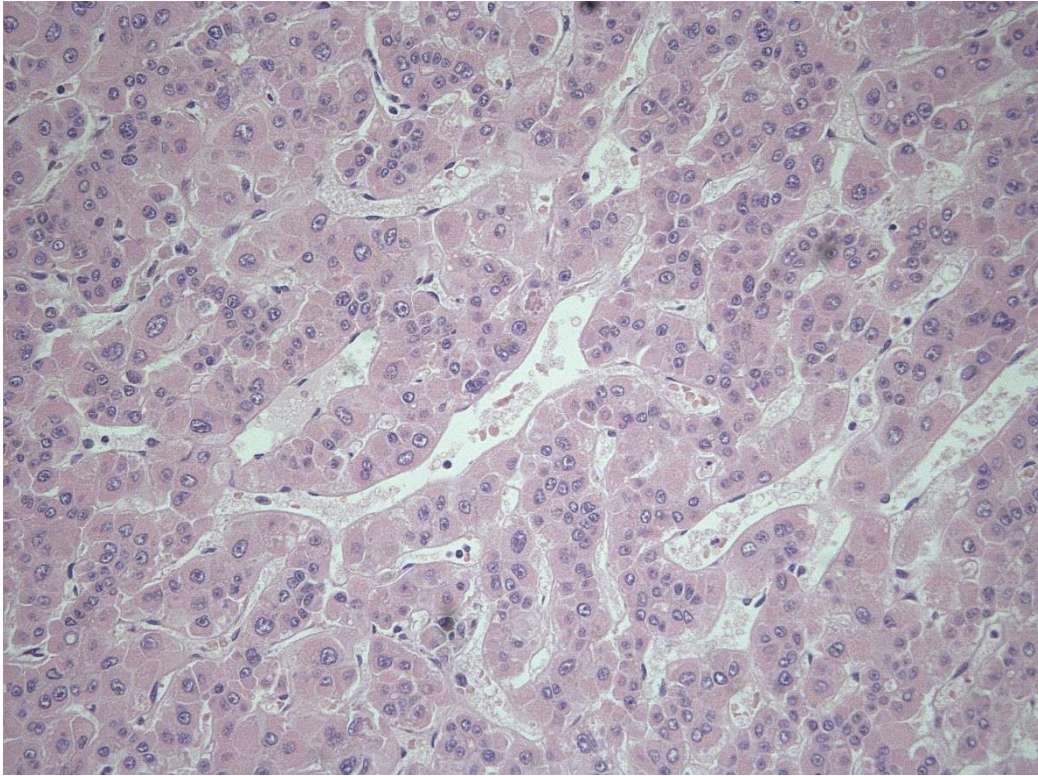


Figura 1: Carcinoma hepatocelular padrão trabecular.

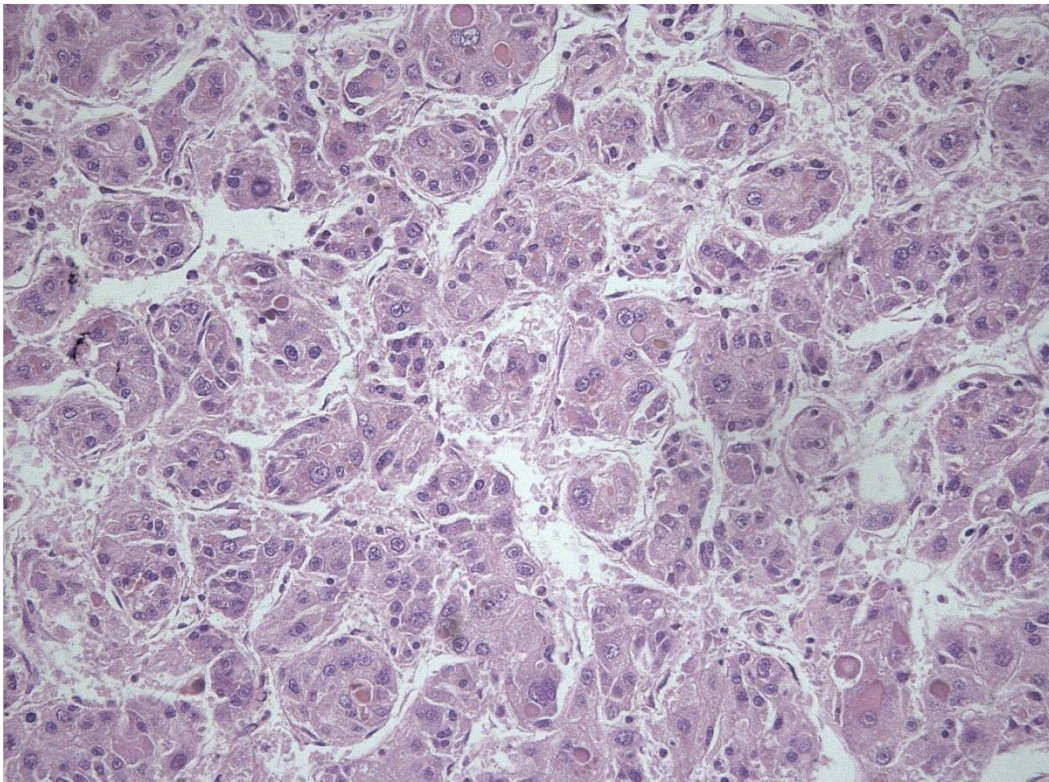


Figura 2: Carcinoma hepatocelular padrão pseudoglandular.

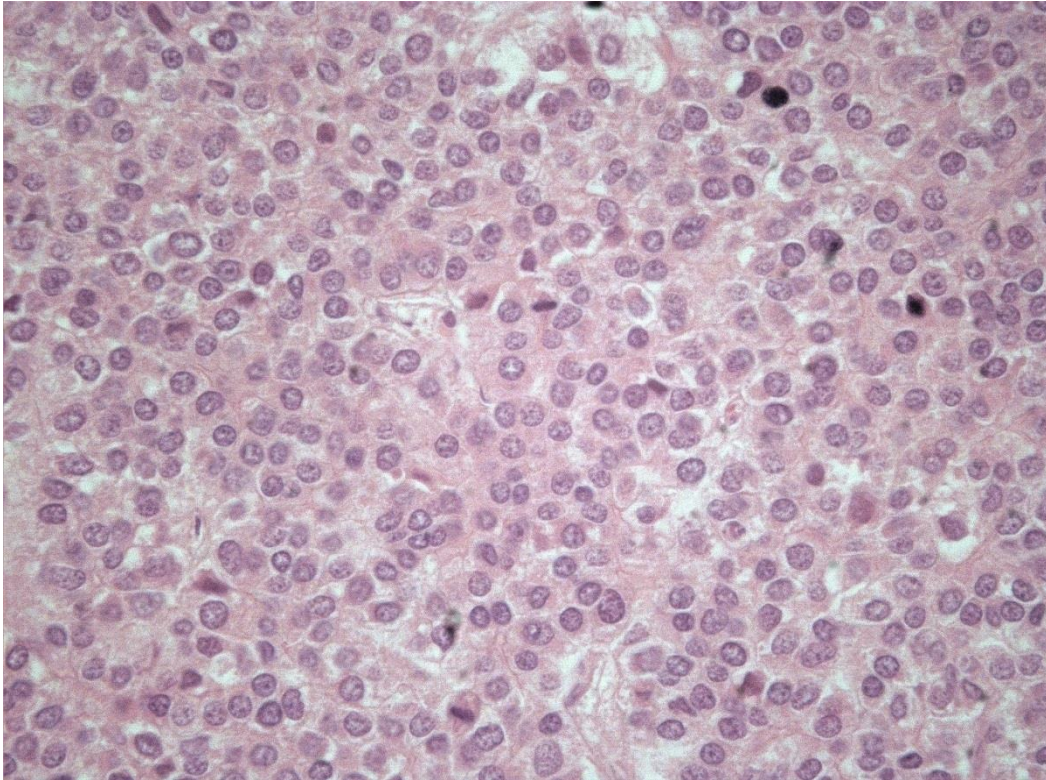


Figura 3: Carcinoma hepatocelular padrão sólido.

O grau de diferenciação histológica predominante segundo Edmondson e Steiner foi classificado de I a IV e agrupado em I e II, bem diferenciados (células tumorais semelhantes ao hepatócito, citoplasma acidófilo e núcleos de tamanho normais a levemente aumentados, semelhante ao padrão trabecular), e III e IV, pouco diferenciados, (núcleos hiper cromáticos de tamanhos variados, citoplasma menos acidófilo)² (Figuras 4 e 5, respectivamente).

² Edmondson HA, Steiner PE. Primary carcinoma of the liver: a study of 100 cases among 48,900 necropsies. *Cancer*. 1954;7(3):462-503.

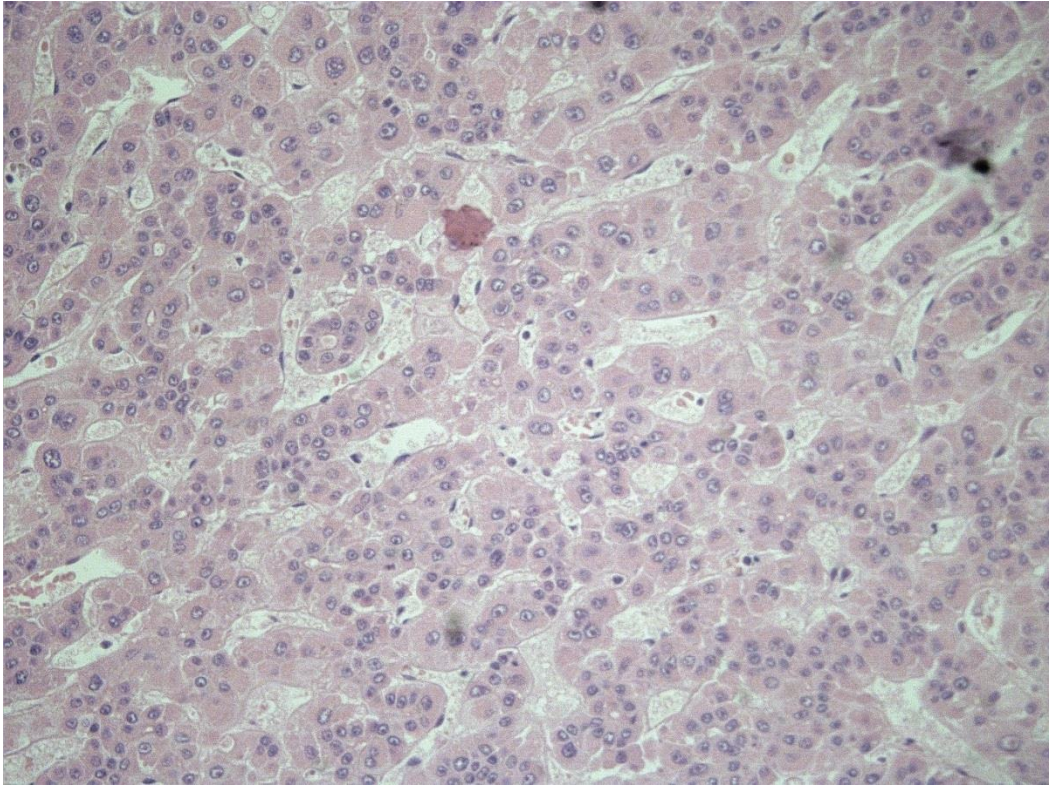


Figura 4: Carcinoma hepatocelular bem diferenciado.

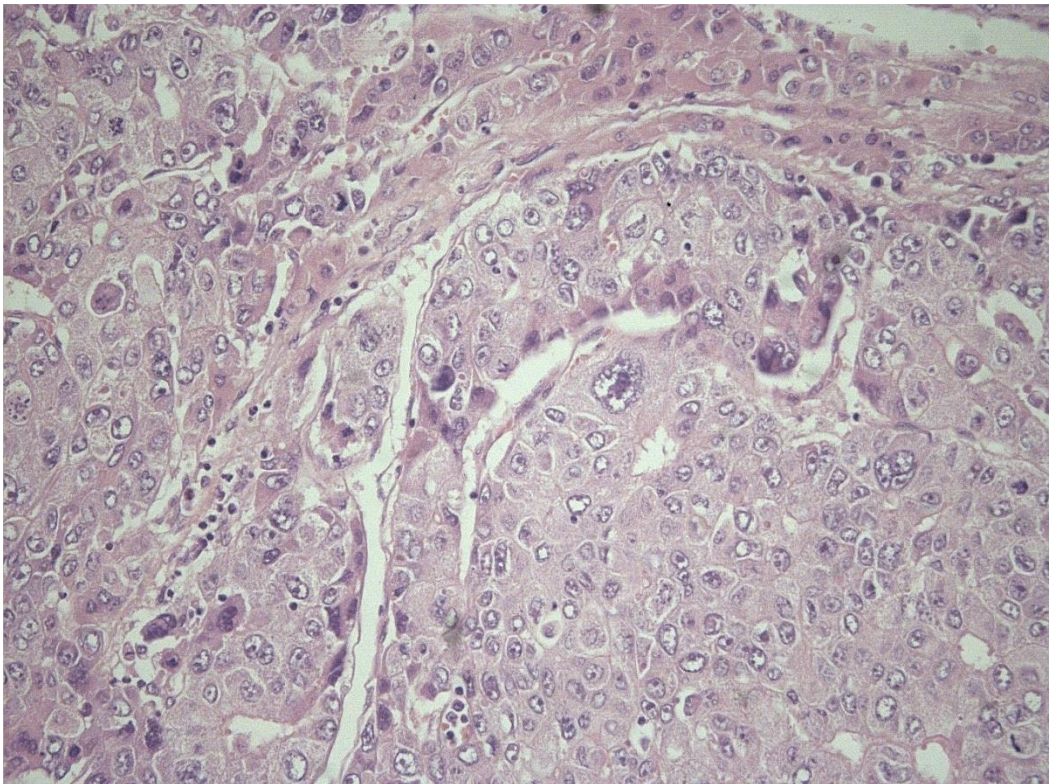


Figura 5: Carcinoma hepatocelular pouco diferenciado.

A invasão vascular microscópica foi definida pela presença de êmbolo tumoral na veia central, na veia porta ou nos vasos da pseudocápsula fibrosa tumoral e foi avaliada em cortes rotineiros corados em HE³.

4.4 Análise estatística

Os dados coletados foram digitados em banco de dados criados em Excel 14.0 (Microsoft Office 2010) e as análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o software SPSS versão 18.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

Os resultados foram descritos por meio de frequências e porcentagens para as variáveis categóricas e de medidas de tendência central (médias e medianas) e de dispersão (desvio padrão e intervalo interquartilico) para as variáveis quantitativas.

Para a análise univariada, empregou-se o teste qui-quadrado (χ^2) ou teste exato de Fisher na comparação entre variáveis dicotômicas (gênero, etiologia da cirrose, tabagismo, presença de diabetes mellitus, Child-Pugh score, índice mitótico, grau de diferenciação histológica, arquitetura tumoral, presença de fibrose, inflamação, esteatose e necrose no parênquima tumoral). O teste de Mann-Whitney foi empregado na comparação de variáveis contínuas (idade, creatinina, albumina sérica, AFP, bilirrubina total, RNI, score de MELD). A análise de sobrevida foi realizada utilizando-se o teste Kaplan-Meier.

As variáveis com $p < 0,20$ na análise univariada foram incluídas em modelo multivariado. A adequação do modelo de regressão logística foi realizada pelo teste de Hosmer Lemeshow.

3 Vauthey JN, Lauwers GY, Esnaola NF, Do KA, Belghiti J, Mirza N, et al. Simplified staging for hepatocellular carcinoma. J Clin Oncol. 2002;20(6):1527-36.

5 ARTIGO

Title: Histological grade and Mitotic index as predictors of microvascular invasion in Hepatocellular Carcinoma

Fernanda Maria Farage **OSÓRIO**¹, Paula Vieira Teixeira **VIDIGAL**⁴, Teresa Cristina Abreu **FERRARI**^{1, 2}, Agnaldo Soares **LIMA**^{2, 3}, Gabriel Martin **LAUAR**¹ and Claudia Alves **COUTO**^{1, 2}

¹ Department of Internal Medicine, Faculty of Medicine, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil; ² Alfa Gastroenterology Institute, University Hospital, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil; ³ Department of Surgery, Faculty of Medicine, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil; ⁴ Department of Pathology and Legal Medicine, Faculty of Medicine, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil.

Keywords: hepatocellular carcinoma, microvascular invasion, liver transplantation, prognostic factors, histological grade

ABSTRACT

Background: Microvascular invasion (MVI) is a well-known risk factor for hepatocellular carcinoma (HCC) recurrence and mortality after liver transplantation (LT). The aim of this study was to determine clinicopathological predictive factors associated with MVI.

Methods: Records of all patients who underwent LT due to HCC between July 2001 and December 2010 at Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais were reviewed. Laboratory tests, clinical and demographic data were obtained. Histopathological review of the hematoxylin and eosin specimens was performed by a single liver pathologist.

Results: A total of 107 patients were included, 76 male (71%) and the mean age was 56.8 (± 8.7). Tumor recurrence rate was 12.9%. One, three and five years overall survival was 75.0, 71.4 and 67.5% respectively. Only tumor recurrence was associated with mortality ($p=0.038$; OR= 2.54; CI 1.052 to 6.106). Mitotic index, histological grade, tumor architecture, alpha-fetoprotein and tumor fibrosis were included in the multivariate model. Significant independent predictors of MVI on logistic regression analysis were histological grade and mitotic index ($p < 0.001$; OR 3.16; CI 1.525 to 4.156 and $p = 0.046$; OR 2.56; CI 1.061 to 6.451 respectively).

Discussion: Mitotic index and histological grade are good predictors of MVI. No other risk factor was identified in the logistic regression. These results highlight the importance of discussing pre transplantation liver biopsy to assess prognosis and define treatment modalities in the setting of LT.

INTRODUCTION

Primary liver cancer is the sixth most common cancer worldwide and the third cause of cancer related mortality; and, hepatocellular carcinoma (HCC) accounts for 85% to 90% of primary liver cancer (1, 2).

Currently, orthotopic liver transplantation (LT) is the treatment of choice in selected patients with HCC and end-stage liver disease although cancer recurrence is still a major concern for its high incidence (3, 4). The selection criteria most widely used for indicating LT is the Milan criteria, which takes into account number and size of tumor nodules (5). Pathological data are usually not evaluated prior to HCC resection or LT although studies have shown its importance in providing information on recurrence and mortality. Microvascular invasion (MVI) is a well-recognized predictor of worse outcome and post-LT tumor recurrence (6, 7). HCC is a highly vascular tumor with a high propensity for vascular invasion, which is usually identified either macroscopically, when the invasion of the vessel is visible on gross examination, or microscopically, when the invasion is visible only on microscopy (8). Given the fact that MVI can only be confirmed as definitely present or absent when the whole tumor is available for careful histological examination after its resection or LT (9) preoperative methods of assessing the probability of MVI are needed. Our aim was to identify clinicopathological risk factors affecting MVI invasion in a group of patients who underwent LT due to HCC in a single center.

PATIENTS AND METHODS

Clinical records of all patients who underwent LT at the Hospital das Clínicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil, between January 2001 and December 2010 were reviewed after the study approval by the local Ethics Committee. Data obtained included demographic, clinical (etiology of the underlying chronic liver disease, history of tobacco use, diabetes mellitus, Child Pugh score, Model of End Stage Liver Disease [MELD] score) and laboratory values (serum

alpha-fetoprotein [AFP], creatinine, albumin, total bilirubin and international normalized ratio [INR]). Patients with previous diagnosis or those under use of insulin or oral hypoglycemic agents were assumed to have diabetes mellitus and those who were under use of tobacco or those who quit a year before were considered smokers.

In our institution LT is performed only in patients fulfilling the Milan criteria (preoperative imaging identifying either a single lesion of ≤ 5 cm or up to 3 lesions ≤ 3 cm) (5). Follow-up time was defined as the time from transplant to the last visit after LT. Per protocol, visits are conducted on an outpatient basis and all patients receive the same intra and post-operative care. Main immunosuppressant regimen is based on the administration of tacrolimus and a tapering dose of prednisone within 3 months, associated or not with mycophenolate mofetil.

HISTOPATHOLOGICAL VARIABLES

The histopathological assessment was based on the review, by a single liver pathologist, of all hematoxylin and eosin-stained sections. The histological features evaluated included: presence of fibrosis, steatosis, inflammation (more than 5 inflammatory cell/high power field [HPF] in 10 HPF) and necrosis inside the tumor parenchyma. They were reported as being either absent or present. Tumor architecture was assessed for trabecular, pseudoglandular and solid growth patterns. Predominant Edmonson and Steiner's grade was classified and grouped, I and II as well differentiated, and III and IV as poor differentiated (10). Mitotic activity was counted by reviewing 10 HPF and classified as low (up to 2 mitotic figures in a HPF) or high (3 or more mitotic figures in a HPF) index in 10 HPF.

MVI was defined as the presence of tumor emboli within the central vein, the portal vein, or large capsular vessels (Figure 1).

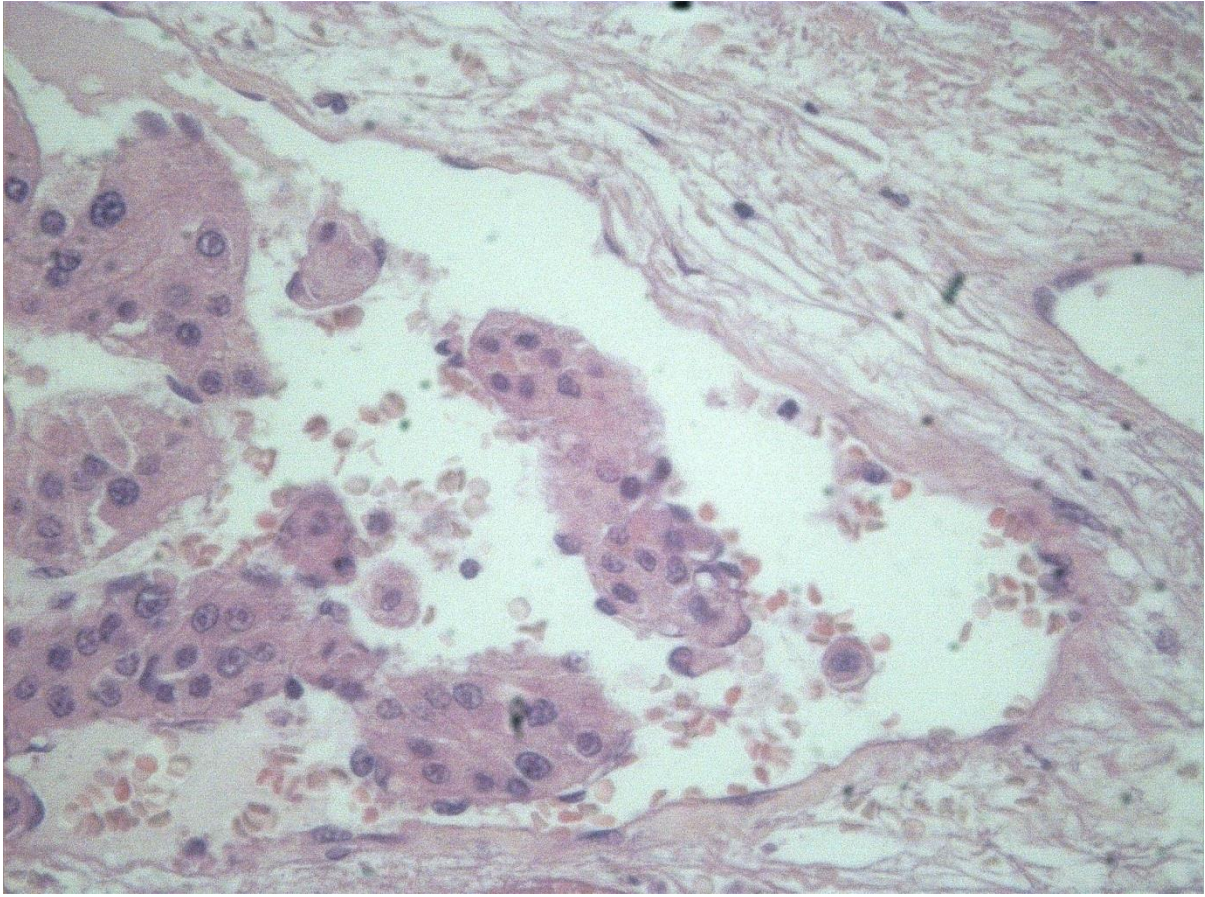


Figure 1: vascular invasion of a vessel in high power field

STATISTICAL ANALYSES

χ^2 test or exact Fisher test were used for univariate comparisons between dichotomous variables (gender, cirrhosis etiology, tobacco use, diabetes mellitus, CHILD score, histological grade, tumor architecture, mitotic index and presence of steatosis, fibrosis, inflammation and necrosis within the tumor parenchyma), whereas unpaired t test or Mann-Whitney test were used to compare continuous variables (age, creatinine, albumin levels, MELD score, INR, AFP and total bilirubin) as appropriate. The variables which p values were < 0.20 in the univariate analysis were included in the multivariate model to assess microscopic vascular invasion. The adequacy of the logistic regression model was assessed by the Hosmer Lemeshow test. Survival analysis was performed using Kaplan-Meier test.

All statistical analyses were performed using the computer software SPSS version 18.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA)

RESULTS

During the study period, 107 patients were submitted to LT due to HCC and selected for this investigation: 76 were male (71%) and 31 female (29%), and the mean age was 56.8 (± 8.7) years. It was not possible to retrieve histological samples from 5 patients; therefore, the final number was 102 individuals. The median follow-up time was 49.2 months (range 0-134 months) and the recurrence rate was 12.9% with a mean time of recurrence of 62.7 months (range 11.5-127.5 months). The results of the univariate analysis related to recurrence are shown in Table 1. Only vascular invasion was associated to HCC recurrence ($p=0.05$). One, three and five years overall survival was 75%, 71.4% and 67.5%, respectively; and a comparative analysis between the clinical and histological characteristics and survival were performed as shown in Table 2. The recurrence and survival analyses were performed excluding 14 patients due to early post-operative death, within the first month after LT.

Table 1: Comparative analysis between the clinical and histological characteristics and tumor recurrence (univariate analysis)

Characteristics	Recurrence (N/N)	No recurrence (N/N)	P value
Male sex²	10/12 (83.3%)	55/81 (67.9%)	0.336
HBV²	1/12 (8.3%)	4/81 (4.9%)	0.507
HCV¹	8/12 (66.7%)	43/81 (53.1%)	0.378
Ethanol abuse²	3/12 (25.0%)	28/81 (34.6%)	0.745
Cryptogenic²	0/12	10/81 (12.3%)	0.350
Other etiology²	1/12 (8.3%)	6/81(7.4%)	1.000
Smokers²	4/11 (36.5)	18/78 (23.1)	0.455
Child-Pugh[*]			
A	2/10 (20%)	21/74 (28.4%)	0.499
B	8/10 (80%)	35/74 (47.3%)	
C	0/10	18/74 (24.3%)	
Diabetes mellitus²	4/11 (36.4%)	15/81(18.5%)	0.229
High mitotic index²	4/12 (33.3%)	17/76 (22.4%)	0.470
Histological grade²			0.504
Low	8/12 (66.7%)	57/76 (75.0%)	
High	4/12 (33.3%)	19/76 (25.0%)	
Presence of MVI²	8/12 (66.7%)	25/76 (32.9%)	0.050
Tumor architecture²			0.447
Trabecular	5/12 (41.7%)	44/76 (57.9%)	
Pseudoglandular	6/12 (50.0%)	23/76 (30.3%)	
Solid	1/12 (8.3%)	9/76 (11.8%)	
Tumor Fibrosis²			0.449
Yes	1/12 (8.3%)	18/76 (23.7%)	
No	11/12 (91.7%)	58/76 (76.3%)	
Tumor Inflammation²			0.526
Yes	3/12 (25.0%)	28/75(37.3%)	
No	9/12 (75.0%)	47/75 (62.7%)	
Tumor Necrosis¹			0.591
Yes	5/12 (41.7%)	38/76 (50.0%)	
No	7/12 (58.3%)	38/76 (50.0%)	
Tumor Steatosis²			0.330
Yes	2/12 (16.7%)	25/76 (32.9%)	
No	10/12 (83.3%)	51/76 (67.1%)	
	Mean ± SD	Mean ± SD	P value
Albumin³	3.4 ± 0.4	3.1 ± 0.7	0.203
AFP³	90.89 ± 224.4	317.76 ± 895.6	0.658
MELD score³	13.18 ± 3.7	15.4 ± 5.6	0.409
INR³	1.47 ± 0.4	1.57 ± 0.5	0.578
Total bilirubin³	2.54 ± 1.4	2.36 ± 2.2	0.261
Age³	56.21 ± 5.2	56.63 ± 9.5	0.521

N/N: number of patients with the characteristics/number for whom the information was available; ¹ Qui-square; ²Fisher Test ; ³ Mann-Whitney; * Linear-by-Linear association; HBV: hepatitis B virus ; HCV: hepatitis C virus; AFP: alpha-fetoprotein; INR: international normalized ratio

Table 2: Comparative analysis between the clinical and histological characteristics and survival (univariate analysis)

Variables	N/N	%	P value
Sex			0.442
Male	65/93	69.9	
Female	28/93	30.1	
Ethanol Abuse	31/93	33.3	0.851
HCV	51/93	54.8	0.931
HBV	5/93	5.4	0.631
Other etiology	7/93	7.5	0.109
Smokers	22/89	24.7	0.067
Diabetes mellitus	19/92	20.7	0.142
Child-Pugh			0.905
A	23/84	27.4	
B	43/84	51.2	
C	18/84	21.4	
Tumor recurrence	12/88	13.6	0.033
Tumor architecture			0.832
Trabecular	49/88	55.7	
Pseudoglandular	29/88	33.0	
Solid	10/88	11.4	
Low mitotic index	67/88	76.0	0.427
Tumor Fibrosis	19/88	21.6	0.791
Tumor Inflammation	31/87	35.5	0.823
Tumor necrosis	43/88	48.9	0.253
Tumor Steatosis	27/88	30.7	0.954
Vascular Invasion	33/88	37.5	0.343
High grade	23/88	26.1	0.603
	Median	Mean± SD	P value
Age (years)	57.7	56.8 ± 9.0	0.568
AFP (ng/mL)	15.5	287 ± 839.4	0.422
MELD score	15	14.79 ± 5.4	0.631
INR	1.4	1.60 ± 0.6	0.201
Total Bilirubin (mg/dl)	2.0	2.39 ± 2.1	0.411
Creatinine (mg/dl)	0.9	0.96 ± 0.4	0.144
Albumin	3.0	3.16 ± 0.7	0.766

N/N: number of patients with the characteristics/number for whom the information was available; HCV: hepatitis C virus; HBV: hepatitis B virus AFP: alpha-fetoprotein; INR: international normalized ratio

The etiology of the underlying chronic liver disease was viral hepatitis C in 56.1% of the individuals, alcohol abuse in 32.7%, viral hepatitis B in 5.6%, cryptogenic cirrhosis in 12.1%, and other etiologies in 6.2% (two cases of

autoimmune hepatitis, and one case of hemochromatosis, primary biliary cirrhosis, the Budd Chiari syndrome, Caroli's disease and non-alcoholic steatohepatitis). At the time of LT, the mean values of the following variables were: MELD score 14.7 (range 6-32), AFP level 255.7 ng/ml (range, 1.2-5592 ng/ml), INR 1.59 (range, 0.99-5.6), creatinine 0.99 mg/dl (range, 0.14- 3 mg/dl), albumin 3.1 g/dl (range 1.1-4.8 g/dl), total bilirubin 2.4 mg/dl (range 0.2-12.5 mg/dl). Diabetes mellitus was present in 19.8%, and 24.3% of the patients were smokers by the time of LT. The frequencies of Child Pugh A, B and C were 25.8%, 51.5% and 22.7%, respectively.

The majority of tumors had a low mitotic index (n= 79/102; 77.5%) and low histological grade (n=75/102; 77.3%). The evaluation of tumor parenchyma showed the presence of fibrosis, inflammation, necrosis and steatosis in 23.5%, 35.6%, 44.1% and 28.4% respectively.

MVI was identified in 38.2% of reviewed samples. Analysis of clinical and histological factors associated with MVI is shown in Table 3. Mitotic index, histological grade, AFP, tumor architecture and tumor fibrosis were selected to be included in the multivariate analysis model. Histological grade (p < 0.001; OR 3.16; CI 1.525 to 4.156) and high mitotic index (p = 0.046; OR 2.56; CI 1.061 to 6.451) were independently associated with MVI on logistic regression analysis.

Table 3: Comparative analysis between the clinical and histological characteristics and microvascular invasion (univariate analysis)

Variables	MVI (N=39)	No MVI (N=63)	P value
Sex¹			0.623
Male	29 (74.4%)	44 (69.8%)	
Female	10 (25.6%)	19 (30.2%)	
Tumor architecture¹			0.184
Trabecular	19 (48.7%)	40 (63.5%)	
Pseudoglandular	16 (41.0%)	15 (23.8%)	
Solid	04 (10.3%)	08 (12.7%)	
Tumor Fibrosis¹			0.175
Yes	12 (30.8%)	12 (19.0%)	
No	27 (69.2%)	51 (81.0%)	
Tumor Inflammation¹			0.370
Yes	16 (41.0%)	20 (32.3%)	
No	23 (59.0%)	42 (67.7%)	
Tumor Necrosis¹			0.621
Yes	16 (41.0%)	29 (46.0%)	
No	23 (59.0%)	34 (54.0%)	
Tumor Steatosis¹			0.623
Yes	10 (25.6%)	19 (30.2%)	
No	29 (74.4%)	44 (69.8%)	
Tumor Mitotic index¹			0.001
High	16 (41.0%)	07 (11.1%)	
Low	23 (59.0%)	56 (88.9%)	
Tumor Histological grade¹			0.002
High	17 (43.6%)	10 (15.9%)	
Low	22 (56.4%)	53 (84.1%)	
HCV¹	23 (59.0%)	34 (54.0%)	0.621
HBV¹	01 (2.6%)	05 (07.9%)	0.403
Ethanol abuse¹	14 (35.9%)	19 (30.2%)	0.547
Cryptogenic²	05 (12.8%)	08 (12.7%)	1.000
Other etiology²	01 (2.6%)	06 (9.5%)	0.246
Smokers¹	08 (21.1%)	15 (25.0%)	0.653
Child Pugh[*]			0.905
A	04 (11.4%)	18 (31.6%)	
B	27 (77.1%)	22 (38.6%)	
C	04 (11.4%)	17 (29.8%)	
Diabetes mellitus¹	09 (23.7%)	11 (17.5%)	0.447
	Mean ± SD	Mean ± SD	P value
Age (years)³	57.3 ± 8.8	56.8 ± 8.5	0.485
AFP (ng/mL)³	267.6 ± 615.9	227.2 ± 897.3	0.066
MELD score³	14.5 ± 4.7	15.2 ± 6.0	0.780
INR³	1.5 ± 0.3	1.7 ± 0.7	0.267
Total Bilirubin(mg/dl)³	2.4 ± 1.6	2.6 ± 2.4	0.465
Creatinine (mg/dl)³	1.0 ± 0.5	1.0 ± 0.4	0.526
Albumin³	3.0 ± 0.5	3.1 ± 0.8	0.976

¹Chi-square; ² Fisher Test; ³ Mann-Whitney; * Linear-by-Linear association; MVI: microvascular invasion; HCV: hepatitis C virus; HBV: hepatitis B virus; AFP: alpha fetoprotein; INR: international normalized ratio

DISCUSSION

The selection of patients for LT using the Milan criteria is based on tumor size and number, and macroscopic vascular invasion. However, imaging methods can either understage or overstage HCC (11). The most important feature not taken into account in the current selection criteria is MVI, which has been proved to be the main prognostic factor independently associated with survival after tumor resection and LT (12-15). Since tumor MVI cannot be determined preoperatively, surrogate markers of MVI are of utmost importance and have been largely investigated. In our study, 38.2% of tumors presented MVI, similarly to what have been previously reported by others (16, 17). However, our overall survival rate was smaller which might have been influenced by the higher rates of post-operative deaths.

Two important markers of MVI were identified in multivariate analysis: tumor grade and mitotic index, and both could be recognized in a biopsy specimen prior to LT. Other pathologic variables were evaluated by the pathologist, including tumor architecture, steatosis, inflammation, fibrosis and necrosis within the tumor parenchyma, but none showed a positive association with MVI. Parfitt *et al.* (2007) have already studied tumor architecture, necrosis and inflammation and steatosis within the tumor and found no association with HCC recurrence (18).

It has been previously shown that tumor grade is a surrogate marker of MVI (19-22). Furthermore, several studies have demonstrated a direct association of tumor differentiation grade with outcome after treatment (23-25). Colechia *et al.* (2011) showed that pre-operative liver biopsy was a safe and accurate diagnostic tool for tumor grading assessment. Additionally, those authors confirmed a close relationship between tumor grade and MVI: i.e., the high grade HCCs were more than twice more likely to have MVI in relation to the low grade HCCs (26).

Mitotic index has also been associated with early tumor recurrence and worse prognosis (27-29), but it was not previously recognized as an MVI predictor, to our knowledge. Schmilovitz-Weiss *et al.* (2011) showed that mitotic activity evaluated by Ki-67 immunostaining was independently associated with mortality (30). Ouchi *et al.* (2000) found that mitotic index was the main characteristic associated with mortality

after HCC resection in the multivariate analyses; therefore, they considered this index a good predictor of poor survival (31).

The retrospective nature of the present study might be a limitation, as some clinical information was missed.

In conclusion we found tumor histological grade and mitotic index were independently associated with MVI. No other clinical features (etiology, gender, age, laboratory tests, MELD score and Child Pugh) prior to the histological assessment predicted MVI. These results are in accordance with previous studies and highlight the importance of discussing pre transplantation liver biopsy to assess prognosis and define treatment modalities in the setting of LT for HCC. As HCC is a cancer with high recurrence rate and mortality, the use of predictors of MVI may lead to changes in management and follow-up after LT or tumor resection.

REFERENCES

1. Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer*. 2010;127(12):2893-917.
2. El-Serag HB, Rudolph KL. Hepatocellular carcinoma: epidemiology and molecular carcinogenesis. *Gastroenterology*. 2007;132(7):2557-76.
3. Llovet JM, Schwartz M, Mazzaferro V. Resection and liver transplantation for hepatocellular carcinoma. *Semin Liver Dis*. 2005;25(2):181-200.
4. Marsh JW, Dvorchik I, Subotin M, Balan V, Rakela J, Popechitelev EP, et al. The prediction of risk of recurrence and time to recurrence of hepatocellular carcinoma after orthotopic liver transplantation: a pilot study. *Hepatology*. 1997;26(2):444-50.
5. Mazzaferro V, Regalia E, Doci R, Andreola S, Pulvirenti A, Bozzetti F, et al. Liver transplantation for the treatment of small hepatocellular carcinomas in patients with cirrhosis. *N Engl J Med*. 1996;334(11):693-9.

6. Shetty K, Timmins K, Brensinger C, Furth EE, Rattan S, Sun W, et al. Liver transplantation for hepatocellular carcinoma validation of present selection criteria in predicting outcome. *Liver Transpl.* 2004;10(7):911-8.
7. Jonas S, Bechstein WO, Steinmüller T, Herrmann M, Radke C, Berg T, et al. Vascular invasion and histopathologic grading determine outcome after liver transplantation for hepatocellular carcinoma in cirrhosis. *Hepatology.* 2001;33(5):1080-6.
8. Roayaie S, Blume IN, Thung SN, Guido M, Fiel MI, Hiotis S, et al. A system of classifying microvascular invasion to predict outcome after resection in patients with hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology.* 2009;137(3):850-5.
9. Marshall A, Alexander G. Vascular invasion leaves its mark in hepatocellular carcinoma. *J Hepatol.* 2011;55(6):1174-5.
10. Edmondson HA, Steiner PE. Primary carcinoma of the liver: a study of 100 cases among 48,900 necropsies. *Cancer.* 1954;7(3):462-503.
11. Wiesner RH, Freeman RB, Mulligan DC. Liver transplantation for hepatocellular cancer: the impact of the MELD allocation policy. *Gastroenterology.* 2004;127(5 Suppl 1):S261-7.
12. Vauthey JN, Klimstra D, Franceschi D, Tao Y, Fortner J, Blumgart L, et al. Factors affecting long-term outcome after hepatic resection for hepatocellular carcinoma. *Am J Surg.* 1995;169(1):28-34; discussion -5.
13. Thuluvath PJ. Vascular invasion is the most important predictor of survival in HCC, but how do we find it? *J Clin Gastroenterol.* 2009;43(2):101-2.
14. Yao FY. Expanded criteria for liver transplantation in patients with hepatocellular carcinoma. *Hepatol Res.* 2007;37 Suppl 2:S267-74.
15. Vauthey JN, Ajani JA. Liver transplantation and hepatocellular carcinoma biology: beginning of the end of the era of educated guesses. *J Clin Oncol.* 2003;21(23):4265-7.
16. Moon JI, Kwon CH, Joh JW, Choi GS, Jung GO, Kim JM, et al. Primary versus salvage living donor liver transplantation for patients with hepatocellular carcinoma: impact of microvascular invasion on survival. *Transplant Proc.* 2012;44(2):487-93.
17. McHugh PP, Gilbert J, Vera S, Koch A, Ranjan D, Gedaly R. Alpha-fetoprotein and tumour size are associated with microvascular invasion in explanted livers of

patients undergoing transplantation with hepatocellular carcinoma. *HPB (Oxford)*. 2010;12(1):56-61.

18. Parfitt JR, Marotta P, Alghamdi M, Wall W, Khakhar A, Suskin NG, et al. Recurrent hepatocellular carcinoma after transplantation: use of a pathological score on explanted livers to predict recurrence. *Liver Transpl*. 2007;13(4):543-51.

19. Pawlik TM, Delman KA, Vauthey JN, Nagorney DM, Ng IO, Ikai I, et al. Tumor size predicts vascular invasion and histologic grade: Implications for selection of surgical treatment for hepatocellular carcinoma. *Liver Transpl*. 2005;11(9):1086-92.

20. D'Amico F, Schwartz M, Vitale A, Tabrizian P, Roayaie S, Thung S, et al. Predicting recurrence after liver transplantation in patients with hepatocellular carcinoma exceeding the up-to-seven criteria. *Liver Transpl*. 2009;15(10):1278-87.

21. Mazzaferro V, Llovet JM, Miceli R, Bhoori S, Schiavo M, Mariani L, et al. Predicting survival after liver transplantation in patients with hepatocellular carcinoma beyond the Milan criteria: a retrospective, exploratory analysis. *Lancet Oncol*. 2009;10(1):35-43.

22. Klintmalm GB. Liver transplantation for hepatocellular carcinoma: a registry report of the impact of tumor characteristics on outcome. *Ann Surg*. 1998;228(4):479-90.

23. Kishi K, Shikata T, Hirohashi S, Hasegawa H, Yamazaki S, Makuuchi M. Hepatocellular carcinoma. A clinical and pathologic analysis of 57 hepatectomy cases. *Cancer*. 1983;51(3):542-8.

24. Kemeny F, Vadrot J, Wu A, Smadja C, Meakins JL, Franco D. Morphological and histological features of resected hepatocellular carcinoma in cirrhotic patients in the West. *Hepatology*. 1989;9(2):253-7.

25. Sasaki Y, Imaoka S, Ishiguro S, Nakano H, Kasugai H, Fujita M, et al. Clinical features of small hepatocellular carcinomas as assessed by histologic grades. *Surgery*. 1996;119(3):252-60.

26. Colecchia A, Scaioli E, Montrone L, Vestito A, Di Biase AR, Pieri M, et al. Pre-operative liver biopsy in cirrhotic patients with early hepatocellular carcinoma represents a safe and accurate diagnostic tool for tumour grading assessment. *J Hepatol*. 2011;54(2):300-5.

27. Guzman G, Alagiozian-Angelova V, Layden-Almer JE, Layden TJ, Testa G, Benedetti E, et al. p53, Ki-67, and serum alpha feto-protein as predictors of

hepatocellular carcinoma recurrence in liver transplant patients. *Mod Pathol.* 2005;18(11):1498-503.

28. Nakanishi K, Sakamoto M, Yamasaki S, Todo S, Hirohashi S. Akt phosphorylation is a risk factor for early disease recurrence and poor prognosis in hepatocellular carcinoma. *Cancer.* 2005;103(2):307-12.

29. Morinaga S, Ishiwa N, Noguchi Y, Yamamoto Y, Rino Y, Imada T, et al. Growth index, assessed with Ki-67 and ssDNA labeling; a significant prognosticator for patients undergoing curative resection for hepatocellular carcinoma. *J Surg Oncol.* 2005;92(4):331-6.

30. Schmilovitz-Weiss H, Tobar A, Halpern M, Levy I, Shabtai E, Ben-Ari Z. Tissue expression of squamous cellular carcinoma antigen and Ki67 in hepatocellular carcinoma-correlation with prognosis: a historical prospective study. *Diagn Pathol.* 2011;6:121.

31. Ouchi K, Sugawara T, Ono H, Fujiya T, Kamiyama Y, Kakugawa Y, et al. Mitotic index is the best predictive factor for survival of patients with resected hepatocellular carcinoma. *Dig Surg.* 2000;17(1):42-8.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O resultados do presente estudo destaca o grau de diferenciação histológica e índice mitótico, como fatores preditores da invasão vascular microscópica. Este resultado ressalta a importância de se discutir a realização de biópsia hepática antes do tratamento, uma vez que pode levar à mudança de protocolos de tratamentos em pacientes que aguardam o transplante ou a ressecção cirúrgica do tumor.

Como parte da dissertação de mestrado foi desenvolvido protocolo histopatológico para avaliação do explante hepático dos transplantes realizados no HC da UFMG. O protocolo encontra-se nos apêndices (Apêndice B) .

Outra contribuição importante da dissertação foi o levantamento dos casos de CHC que possuíam laudo histopatológico proveniente de biópsia, ressecção cirúrgica ou TH no HC, UFMG de 1998 a 2010. Destes casos, obtiveram-se informações epidemiológicas e demográficas e os resultados foram publicados no periódico Arquivos de Gastroenterologia (Arq. Gastroenterol. vol.50 no.2 São Paulo abr./jun. 2013) em estudo intitulado “Epidemiological aspects of hepatocellular carcinoma in a reference center of Minas Gerais, Brazil” (Apêndice C).

ANEXOS

ANEXO A – Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa - UFMG



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

Projeto: CAAE – 0643.0.203.000-11

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

DECISÃO

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

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


Profa. Maria Teresa Marques Amaral
Coordenadora do COEP-UFMG

ANEXO B – Ata da defesa da dissertação



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS APLICADAS À SAÚDE DO
ADULTO



ATA DA DEFESA DA DISSERTAÇÃO DA ALUNA FERNANDA MARIA FARAGE OSORIO

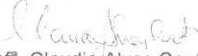
Realizou-se, no dia 24 de setembro de 2013, às 13:00 horas, Sala 526, 5º andar da Faculdade de Medicina, da Universidade Federal de Minas Gerais, a defesa de dissertação, intitulada **AVALIAÇÃO DOS FATORES PREDITORES DE MICROINVASÃO VASCULAR NO CARCINOMA HEPATOCELULAR**, apresentada por **FERNANDA MARIA FARAGE OSORIO**, número de registro 2011659633, graduada no curso de MEDICINA, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em CIÊNCIAS APLICADAS À SAÚDE DO ADULTO, à seguinte Comissão Examinadora: Profª. Claudia Alves Couto - Orientadora (UFMG), Profª. Paula Vieira Teixeira Vidigal - Coorientadora (UFMG), Profª. Luciana Costa Faria (UFMG), Profª. Mônica Maria Demas Álvares Cabral (UFMG).


A Comissão considerou a dissertação:

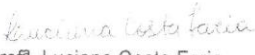
- Aprovada
 Aprovada condicionalmente, sujeita a alterações, conforme folha de modificações, anexa
 Reprovada

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

Belo Horizonte, 24 de setembro de 2013.

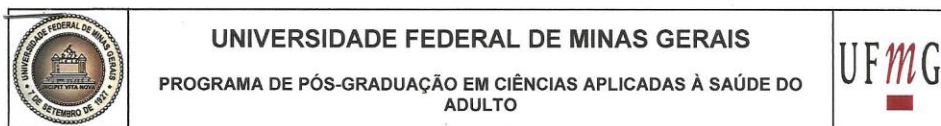

Profª. Claudia Alves Couto
Doutora - USP-SP


Profª. Paula Vieira Teixeira Vidigal
Doutora - UFMG


Profª. Luciana Costa Faria
Doutora - UFMG


Profª. Mônica Maria Demas Álvares Cabral
Doutora - UFMG

ANEXO C – Folha de provação



FOLHA DE APROVAÇÃO

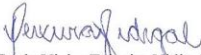
AVALIAÇÃO DOS FATORES PREDITORES DE MICROINVASÃO VASCULAR NO CARCINOMA HEPATOCELULAR


FERNANDA MARIA FARAGE OSORIO

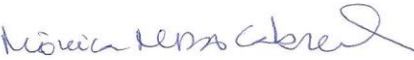
Dissertação submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS APLICADAS À SAÚDE DO ADULTO, como requisito para obtenção do grau de Mestre em CIÊNCIAS APLICADAS À SAÚDE DO ADULTO, área de concentração CIÊNCIAS APLICADAS AO APARELHO DIGESTIVO.

Aprovada em 24 de setembro de 2013, pela banca constituída pelos membros:


Prof. Claudia Alves Couto - Orientador
UFMG


Prof. Paula Vieira Teixeira Vidigal - Coorientadora
UFMG


Prof. Luciana Costa Faria
UFMG


Prof.ª Mônica Maria Demas Álvares Cabral
UFMG

Belo Horizonte, 24 de setembro de 2013.

APÊNDICES

APÊNDICE A - Termo de consentimento livre e esclarecido

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

O (A) Sr.(a) _____ está sendo convidado(a) a participar, como voluntário(a), do projeto de pesquisa **“CORRELAÇÃO ENTRE ASPECTOS HISTOLÓGICOS DO CARCINOMA HEPATOCELULAR E A SOBREVIDA APÓS O TRATAMENTO”**.

Este estudo consiste na análise da histologia do carcinoma hepatocelular em biópsias arquivadas no Serviço de Biópsia do Departamento de Anatomia Patológica e Medicina Legal da Faculdade de Medicina da UFMG e correlação dos achados com a evolução após o tratamento, seja ele transplante ou cirurgia. O objetivo é de investigar a existência de marcadores que possam fornecer informações sobre a evolução da doença.

A sua participação neste estudo consiste em consentir o uso das informações contidas em seu prontuário médico e a análise do material coletado durante o seu tratamento contra o carcinoma hepatocelular, que se encontra armazenado Serviço de Biópsia do Departamento de Anatomia Patológica. Não será necessária a realização de outros exames médicos ou coleta de outro material.

As informações obtidas são de sigilo médico, mas podem ser utilizadas para fins de publicação científica preservando a sua identidade.

Você não terá que arcar com custos de nenhum dos exames realizados para fins de pesquisa e também não receberá nenhuma forma de gratificação pela sua participação neste estudo.

Não há benefícios em termos individuais imediatos. No entanto, esperamos contribuir para o conhecimento dessa entidade, o que futuramente poderá trazer benefícios para outros pacientes.

A qualquer momento, você poderá desistir de participar do estudo, sem que isso traga prejuízo à continuidade de seu acompanhamento e tratamento clínico.

Em caso de dúvidas posso esclarecê-las em consulta médica ou contactar um dos pesquisadores. Posso telefonar para Dra. Fernanda Farage Osório, no número (31)93142456 ou para a Profa. Cláudia Alves Couto, no número (31)3409-9746. Caso ainda permaneça alguma dúvida posso entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais (COEP/UFMG) no número (31)3409-4592, situado à Av. Antônio Carlos, 6627, Campus da Pampulha, Unidade Administrativa II - segundo andar, sala 2005. CEP: 31270-901, Belo Horizonte-MG; e-mail: coep@prpq.ufmg.br.

DECLARAÇÃO DE CONSENTIMENTO:

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

Nome do paciente:

Assinatura do paciente:

Nome do investigador que prestou as informações:

Assinatura e CRM do investigador que prestou as informações:

APÊNDICE B - Protocolo de biópsia

Serviço de Biópsia Hospital das Clínicas – UFMG

Prontuário: _____ Número do exame: _____

FÍGADO

Procedimento cirúrgico:

- | | |
|---|--|
| <input type="checkbox"/> Nodulectomia | <input type="checkbox"/> Segmentectomia (Segmento _____) |
| <input type="checkbox"/> Hepatectomia E | <input type="checkbox"/> Hepatectomia D |
| <input type="checkbox"/> Hepatectomia total (transplante) | <input type="checkbox"/> Biópsia por agulha |
| <input type="checkbox"/> Biópsia em cunha | <input type="checkbox"/> Outros: _____ |

Exame macroscópico:

Peso do espécime: _____ g Dimensões do espécime: _____ x _____ x _____ cm

- Superfície externa: Lisa e brilhante Irregular com nódulos variados
 Outros: espessada, acastanhada, lobulada, com área cruenta
- Superfície de corte: Lisa de aspecto habitual Evidenciação de espaço porta
 Múltiplos nódulos de tamanhos variados
 Comprometimento maciço por formação tumoral

▪ Único nódulo:

Dimensões: _____ x _____ x _____ cm

Consistência: _____

Coloração: _____

Distância da margem cirúrgica: _____

Número de nódulos suspeitos encontrados: _____

▪ Dimensões dos nódulos:

- 1 - _____ x _____ x _____ cm localização: _____
- 2 - _____ x _____ x _____ cm localização: _____
- 3 - _____ x _____ x _____ cm localização: _____
- 4 - _____ x _____ x _____ cm localização: _____
- 5 - _____ x _____ x _____ cm localização: _____

Hilo hepático

Veia hepática: _____ Veia porta: _____

Artéria Hepática: _____

Vesícula biliar (se presente):

Medida: _____ x _____ cm Espessura da parede: _____ cm

Mucosa: _____ Relação com o tumor: _____

Presença de linfonodo: Sim Não Aspecto: _____

Parênquima hepático não tumoral:

- Macroscopicamente normal
 Evidências de hepatopatia crônica

EPIDEMIOLOGICAL ASPECTS OF HEPATOCELLULAR CARCINOMA IN A REFERRAL CENTER OF MINAS GERAIS, BRAZIL

Fernanda Maria Farage **OSÓRIO**¹, Gabriel Martin **LAUAR**¹,
Agnaldo Soares **LIMA**^{2,3}, Paula Vieira Teixeira **VIDIGAL**⁴,
Teresa Cristina Abreu **FERRARI**^{1,2} and Claudia Alves **COUTO**^{1,2}

ABSTRACT - *Context* - Studies on epidemiology of hepatocellular carcinoma and modalities of therapy used to treat this condition are scarce in Brazil. Our aim was to characterize hepatocellular carcinoma according to etiology of the underlying chronic liver disease, and treatment modalities, in a referral center in Brazil. *Methods* - All cases of hepatocellular carcinoma registered in the Department of Pathology during a 12-year period (1998-2010) were included. Demographic data, etiology of the underlying liver disease and treatment performed were collected. *Results* - This case series included 215 patients, mean age 57.3 (\pm 14.1) years, 164 (76.2%) male. Virus C and virus B infection were detected in 88 (43%) and 47 (23%) patients, respectively. Ethanol abuse alone or combined with other etiologies was identified in 64 (32%) individuals. Schistosomiasis was found in 18 (9%) patients. Liver transplantation was the treatment of choice in 112 (51%) patients. This procedure was more frequently performed in hepatitis C virus-related hepatocellular carcinoma (70%) than B virus-related hepatocellular carcinoma (17%). Tumor resection was performed in 40 (18%) individuals, ethanol injection or thermo ablation in 18 (14%), and chemoembolization in 14 (7%). In 40 (19.4%) patients no treatment was performed and this percentage remained constant over the years. *Conclusions* - Chronic hepatitis C, followed by ethanol abuse and chronic hepatitis B were the leading causes of underlying chronic liver disease associated with hepatocellular carcinoma. The results show a trend of increasing incidence of hepatocellular carcinoma; however, the proportion of untreated patients remained constant over the analyzed period.

HEADINGS - Hepatocellular carcinoma, epidemiology, Minas Gerais, Brazil.

INTRODUCTION

Primary liver cancer is the sixth most common cancer worldwide and the third cause of cancer related mortality⁽⁸⁾. Hepatocellular carcinoma (HCC) accounts for 85% to 90% of the primary liver cancers⁽⁹⁾. Despite the advances in the different modalities of HCC treatment including liver transplantation (LT), surgical resection and locoregional therapies, up to 70% of HCC patients present with advanced disease and will not benefit from these procedures⁽¹⁴⁾. At present, only one chemotherapeutic antiangiogenic drug is available for advanced disease. Overall, men are consistently more affected than women and 75% to 80% of the cases are attributed to persistent hepatitis B virus (HBV) or hepatitis C virus (HCV) infection⁽²⁾.

Although previous epidemiologic studies suggest that HCC prevalence in Brazil is low⁽³⁾, current data on its epidemiology and major treatments modalities employed are still lacking. The aim of this study was to characterize the profile of HCC patients from a single public referral center in Belo Horizonte, MG, Brazil, according to the etiology of the underlying chronic liver disease (CLD), demographic data and treatment modalities to which they were submitted.

METHODS

All (n = 4,503) liver specimens reports registered in the Department of Pathology and Legal Medicine, School of Medicine, Universidade Federal de Minas Gerais, from December 1998 to December

Declared conflict of interest of all authors: none

¹ Department of Internal Medicine, Faculty of Medicine, Federal University of Minas Gerais; ² Alfa Gastroenterology Institute, University Hospital, Federal University of Minas Gerais; ³ Department of Surgery, Faculty of Medicine, Federal University of Minas Gerais; ⁴ Department of Pathology and Legal Medicine, Faculty of Medicine, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil.

Correspondence: Dr. Cláudia Alves Couto – Faculdade de Medicina, Departamento de Medicina Interna - Av. Prof. Alfredo Balena, 190 - 30130-100 - Belo Horizonte, MG, Brazil. E-mail: cacouto@uol.com.br

2010, were reviewed. The liver samples were obtained by percutaneous needle biopsy, surgery or explanted liver. Our institution protocol follows the International Working Party recommendations for HCC diagnosis⁽¹⁰⁾. Using the following terms to select the stored reports: primary liver cancer, hepatocarcinoma, hepatocellular carcinoma and epithelial neoplasia, 240 cases were identified as possible HCC. Cases of epithelial neoplasia and inconclusive reports were submitted to immunohistochemical staining for diagnosis confirmation. Patients with definite HCC (n = 218) by histological examination or immunohistochemistry were included in the database. Three cases of the fibrolamellar type were excluded from the analyses.

Data regarding gender, age, etiology of the underlying CLD and type of HCC treatment were collected from the medical charts of each patient. No histological review of given diagnoses was performed. The diagnosis of HBV was accepted when hepatitis B surface antigen (HBsAg) or HBV-DNA was positive. In one case, isolated HBV core antibody (anti-HBc) was detected and for analysis purposes it was included in the HBV group as other etiologies were exhaustively excluded. HCV infection was considered to be the cause of CLD when HCV-DNA and/or HCV antibody (anti-HCV) were detected.

This study was approved by the local Ethics Committee. Data were summarized as the means ± standard deviation (SD) or proportions. Statistical analysis was carried out using JMP software, version 9.0 (S.A.S.).

RESULTS

Two hundred fifteen cases were included, 164 (76.2%) of them were male and 51 (23.7%), female. The mean age was 57.3 (± 14.1) years and the medians, 57.9 years and 59.8 years for males and females, respectively. We verified a progressive increase in the number of newly diagnosed cases over the last 12 years at our Institution (Figure 1).

The major causes of CLD were viral hepatitis infection. Figure 2 shows the distribution of the major CLD through the period of the study. HCV, the most common among all etiologies, was present in 88 (44%) patients, and HBV, in 47 (23.5%). Ethanol consumption, alone or combined with another cause for the liver damage, was observed in 64 (32%) cases. Interestingly, 18 (9%) patients had schistosomiasis. From those, in six cases, schistosomiasis was the unique identified liver disease. In 15 patients, evaluation for cirrhosis etiology was not completed due to loss of follow-up.

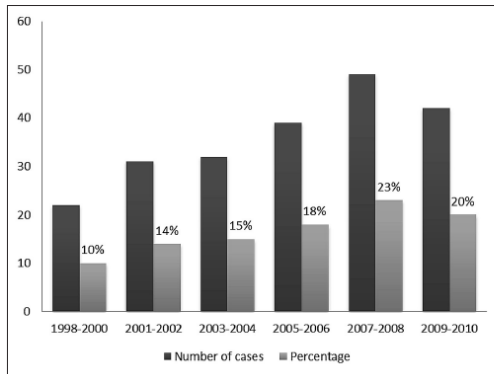


FIGURE 1. Number of new HCC diagnosed from 1998 a 2010

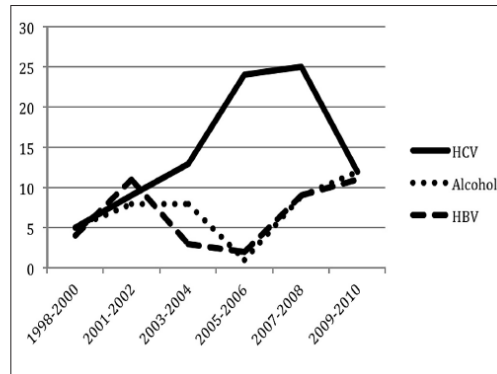


FIGURE 2. Distribution of the major CLD through the observed period

TABLE 1. Etiology of the underlying chronic liver disease of the hepatocellular carcinoma (HCC) cases and its characterization according to sex and age of the patients and HCC treatment

Etiology	Male sex n (%)	Age mean (± SD) (years)	Treated patients n (%)	Transplantation n (%)	Surgery n (%)
HCV	59 (67.1%)	57.6 (±1.4)	80 (93%)	61 (70.9%)	14 (67.1%)
Ethanol	43 (100%)	57.3 (±1.9)	25 (81.4%)	25 (58.1)	5 (11.6%)
HBV	37 (92.5%)	55.3 (±2.1)	25 (64.1%)	8 (20.5%)	11 (28.2%)
Cryptogenic/NASH	9 (60%)	60.3 (±3.3)	13 (86.7%)	10 (66.7%)	3 (20%)
Other CLD	1 (14.3%)	35.8 (±4.9)	5 (71.4%)	5 (71.4%)	0 (0.0%)
Schistosomiasis	6 (85.7%)	63.9 (±4.9)	4 (57.1%)	2 (28.6)	2 (28.6%)

HCV: hepatitis C virus; HBV: hepatitis B virus; CLD: chronic liver disease; HCC: hepatocellular carcinoma; SD: standard deviation; NASH: non-alcoholic steatohepatitis

Table 1 shows the etiology of the underlying CLD according to gender and age of the patients and treatment performed. The etiologies of the CLD were grouped as follows: 1) HCV and HCV combined with other CLD; 2) HBV and HBV combined with other CLD; 3) ethanol abuse; 4) cryptogenic cirrhosis and NASH; 5) other CLD which included two cases of autoimmune disease, one of hemochromatosis, two of the Budd Chiari syndrome, one of Caroli's disease, one of primary biliary cirrhosis and two cases of tyrosinemia; and 6) shistosomiasis. The male sex was more prevalent in all groups, except in the autoimmune and metabolic group. All individuals with cirrhosis due to ethanol abuse were men.

The majority of treated patients underwent LT (112 patients; 54.4%). Prior to LT, one individual was submitted to radiofrequency ablation (RFA) and three, to transarterial chemoembolization (TACE). Cancer resection was performed in 38 (18.4%) patients and 3 of them underwent percutaneous ethanol injection (PEI) prior to surgery. PEI was performed in a total of 14 (6.8%) patients. TACE or RFA alone or in combination with other therapy modalities were performed in a total of 14 (6.8%) and 4 (2%) individuals, respectively. Other modalities of treatment such as chemotherapy, including sorafenib, were uncommonly performed (8 patients; 3.9%). Twelve patients lost the follow-up and were excluded from the treatment analysis. A large number of individuals (40 individuals; 19.4%) did not undergo any form of treatment. Figure 3 shows frequency of treated cases and major treatment modalities performed over the years.

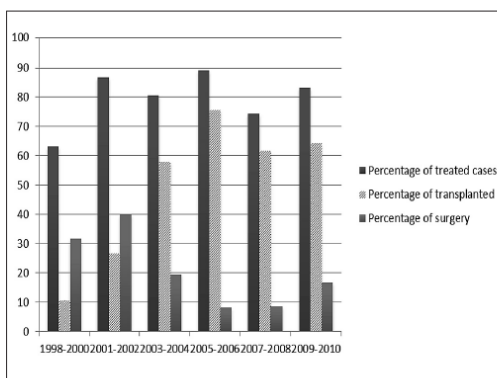


FIGURE 3. Frequency of treatment and treatment modalities over the years

DISCUSSION

Recent epidemiologic studies have highlighted that HCC incidence rates have been changed over time⁽¹⁵⁾. In the United States, for example, from 1975 to 2005 the overall age-adjusted incidence tripled⁽¹⁾. Our findings also show a tendency of increasing rates, as 60.5% of the HCC cases were diagnosed

during the last 6 years of this case series. This observation may reflect an actual increase in HCC; however, it could also be explained, at least partially, by improvements in diagnosis methods and by the impact of implementation of the Model of End-Stage Liver Disease score (MELD score), which led to higher rates of HCC-related LT. Furthermore, it is important to emphasize that the studied population comes from the pathology data-base, thus it comprised all HCC biopsy-proven cases, but tumors diagnosed only on the bases of imaging methods whose patients were not subsequently submitted to surgical procedures, including LT, were not included in this case series. This fact may have underestimated HCC numbers in our center.

In this case series, the ratio male to female was 3.2:1. Overall, HCC is more than twice as common in males than in females⁽¹¹⁾. The mean age found was 57.3 years, which is similar to the mean age observed in China, but much lower than those found in European and North American. In low-risk populations, the highest incidence of HCC is among individuals aged 75 years or older⁽⁶⁾.

The first Brazilian national survey, reported in 1997, showed a higher prevalence of HCC in the male sex, and viral hepatitis, specially due to B virus infection, as the predominant etiology of the underlying CLD⁽⁹⁾. However, from 2004 to 2009, another national survey was conducted to update those data and showed a somewhat different profile⁽⁴⁾. Our findings are in agreement with the data reported in this more recent survey, as it showed that HCV replaced HBV as the most frequent cause of liver cirrhosis and HCC.

A large number of the patients with HCC were not treated due to advanced disease at the time of diagnosis. Over the years of the study, there was no significant difference regarding the proportion of patients treated, which suggests that in spite of the improvements in imaging methods to diagnose HCC, we are still postponing its diagnosis. This finding highlights the importance of increasing surveillance in Brazilian patients at risk of developing HCC. Surveillance with abdominal ultrasound for detecting HCC in patients with liver cirrhosis increases survival of the individuals with HCC as this approach allows earlier tumor detection, enabling application of radical therapies to accurately selected patients, and efficient management of complications of the liver disease⁽¹³⁾.

According to current guidelines, LT is the first-line modality of therapy for patients with single tumors less than 5 cm or 3 or less nodules with 3 cm or less not suitable for resection⁽⁷⁾. In our study, among the individuals who were treated, LT was the most commonly therapeutic approach; and, the number of transplanted individuals was much higher than previously reported⁽⁴⁾. This could be a bias of selection, as our Institution is one of the largest LT referral center in Brazil. As expected, most LT (55.4%) were due to HCV-related HCC while HBV accounted for only 7.2%. TACE, RFA and PEI were uncommonly performed.

Although in patients with advanced HCC, sorafenib has been proved to extend survival rates⁽¹²⁾, in this case series, only

a few individuals received this medication due to restrictions to obtain the drug from the public health system.

In the group of patients described herein, the advanced stage of the disease, along with the characteristics of our institution and the specific expertise of the transplantation team, certainly, were determinants of treatment modalities. Future studies and investigations in other regions of Brazil are needed to show the trends in diagnosing and treating HCC in Brazilian patients.

CONCLUSIONS

In this 12-year case series, viral hepatitis was the main CLD associated with HCC, and liver transplantation, the major treatment modality used to treat this condition. It is noteworthy that a large proportion of patients, throughout the study period, did not receive any treatment due to late diagnosis. Further studies are required to better characterize the different features of HCC in the Brazilian population.

Osório FMF, Lauer GM, Lima AS, Vidigal PVT, Ferrari TCA, Couto CA. Aspectos epidemiológicos do carcinoma hepatocelular em centro de referência de Minas Gerais. *Arq Gastroenterol.* 2013;50(2):97-100

RESUMO - Contexto - Estudos sobre epidemiologia do carcinoma hepatocelular e terapias utilizadas em seu tratamento são escassos no Brasil. O objetivo foi caracterizar o carcinoma hepatocelular quanto à etiologia da hepatopatia crônica subjacente e modalidades terapêuticas empregadas, em um centro de referência no Brasil. **Método** - Todos os casos de carcinoma hepatocelular registrados no Departamento de Patologia em período de 12 anos (1998-2010) foram incluídos. Dados demográficos, etiologia da hepatopatia crônica e tipo de tratamento realizado foram coletados dos prontuários. **Resultado** - Esta série de casos incluiu 215 pacientes, com média de idade 57,3 (± 14,1) anos, 164 (76,2%) do sexo masculino. Infecções virais C e B foram detectadas em 88 (43%) e 47 (23%), respectivamente. Abuso de etanol isoladamente ou associado a outras causas foi identificado em 64 (32%) indivíduos. Esquistossomose foi encontrada em 18 (9%) indivíduos. Transplante hepático foi o tratamento de escolha em 112 (51%) pacientes. Esse procedimento foi mais frequentemente realizado em carcinoma hepatocelular relacionado com hepatite C (70%) do que hepatite B (17%). Ressecção cirúrgica foi realizada em 40 (18%) indivíduos, alcoolização ou termo-ablação em 18 (14%) e quimioembolização em 14 (7%). Em 40 (19,4%) pacientes nenhum tratamento foi empregado e esta porcentagem permaneceu constante ao longo dos anos do estudo. **Conclusões** - Hepatite viral C seguida de abuso de etanol e hepatite viral B foram as causas de hepatopatia crônica mais frequentemente associadas ao carcinoma hepatocelular. Os resultados mostram tendência a aumento da incidência do carcinoma hepatocelular; no entanto, a proporção de pacientes não-tratados permaneceu constante ao longo dos anos analisados.

DESCRITORES - Carcinoma hepatocelular, epidemiologia. Minas Gerais, Brasil.

REFERENCES

1. Altekruse SF, McGlynn KA, Reichman ME. Hepatocellular carcinoma incidence, mortality, and survival trends in the United States from 1975 to 2005. *J Clin Oncol.* 2009;27:1485-91.
2. Bosch FX, Ribes J, Diaz M, Cléries R. Primary liver cancer: worldwide incidence and trends. *Gastroenterology.* 2004;127(5 Suppl 1):S5-S16.
3. Bosch FX, Ribes J, Cléries R, Diaz M. Epidemiology of hepatocellular carcinoma. *Clin Liver Dis.* 2005;9:191-211.
4. Carrilho FJ, Kikuchi L, Branco F, Goncalves CS, Mattos AA. Brazilian HCC Study Group. Clinical and epidemiological aspects of hepatocellular carcinoma in Brazil. *Clinics (São Paulo).* 2010;65:1285-90.
5. El-Serag HB, Rudolph KL. Hepatocellular carcinoma: epidemiology and molecular carcinogenesis. *Gastroenterology.* 2007;132:2557-76.
6. El-Serag HB. Epidemiology of viral hepatitis and hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology.* 2012;142:1264-73.e1.
7. European Association for the Study of The Liver; European Organisation for Research and Treatment of Cancer. EASL-EORTC Clinical practice guidelines: management of hepatocellular carcinoma. *J Hepatol.* 2012;56:908-43.
8. Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer.* 2010;127:2893-917.
9. Goncalves CS, Pereira FE, Gayotto LC. Hepatocellular carcinoma in Brazil: report of a national survey. *Rev Inst Med Trop São Paulo.* 1997;39:165-70.
10. International Working Party. Terminology of nodular hepatocellular lesions. *Hepatology.* 1995;22:983-93.
11. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin.* 2011;61:69-90.
12. Llovet JM, Ricci S, Mazzaferro V, Hilgard P, Gane E, Blanc JF, de Oliveira AC, Santoro A, Raoul JL, Forner A, Schwartz M, Porta C, Zeuzem S, Bolondi L, Gretten TF, Galle PR, Seitz JF, Borbath I, Häussinger D, Giannaris T, Shan M, Moscovici M, Voliotis D, Bruix J, SHARP Investigators Study Group. Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med.* 2008;359:378-90.
13. Sangiovanni A, Del Ninno E, Fasani P, De Fazio C, Ronchi G, Romeo R, Morabito A, De Franchis R, Colombo M. Increased survival of cirrhotic patients with a hepatocellular carcinoma detected during surveillance. *Gastroenterology.* 2004;126:1005-14.
14. Thomas MB, Jaffe D, Choti MM, Belghiti J, Curley S, Fong Y, Gores G, Kerlan R, Merle P, O'Neil B, Poon R, Schwartz L, Tepper J, Yao F, Haller D, Mooney M, Venook A. Hepatocellular carcinoma: consensus recommendations of the National Cancer Institute Clinical Trials Planning Meeting. *J Clin Oncol.* 2010;28:3994-4005.
15. Venook AP, Papandreou C, Furuse J, de Guevara LL. The incidence and epidemiology of hepatocellular carcinoma: a global and regional perspective. *Oncologist.* 2010;15(Suppl 4):5-13.

Received 13/1/2013.
Accepted 15/2/2013.

