

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE MEDICINA

LEONARDO DO PRADO LIMA

**EXPRESSÃO DOS BIOMARCADORES MOLECULARES EPCAM E
ALFAFETOPROTEÍNA NO CARCINOMA HEPATOCELULAR**

Belo Horizonte

2016

LEONARDO DO PRADO LIMA

**EXPRESSÃO DOS BIOMARCADORES MOLECULARES EPCAM E
ALFAFETOPROTEÍNA NO CARCINOMA HEPATOCELULAR**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências aplicadas à Cirurgia e Oftalmologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Medicina.

Área de Concentração: Anatomofisiopatologia Cirúrgica

Linha de Pesquisa: Bases Moleculares das Neoplasias

Orientadora: Profa. Dra. Vivian Resende

Coorientadora: Profa. Dra. Paula Teixeira Vieira Vidigal

Belo Horizonte

2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

REITOR

Prof. Dr. Jaime Arturo Ramírez

PRÓ-REITOR DE PÓS-GRADUAÇÃO

Profa. Dra. Denise Maria Trombert de Oliveira

PRÓ-REITOR DE PESQUISA

Profa. Dra. Adelina Martha dos Reis

DIRETOR DA FACULDADE DE MEDICINA

Prof. Dr. Tarcízo Afonso Nunes

COORDENADOR DO CENTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO

Prof. Dr. Luiz Armando Cunha de Marco

CHEFE DO DEPARTAMENTO DE CIRURGIA DA FACULDADE DE MEDICINA

Prof. Dr. Renato Santiago Gomez

**CHEFE DO DEPARTAMENTO DE OFTALMOLOGIA E
OTORRINOLARINGOLOGIA**

Profa. Dra. Ana Rosa Pimentel de Figueiredo

**COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
APLICADAS À CIRURGIA E OFTALMOLOGIA**

Prof. Dr. Edson Samesima Tatsuo

**COLEGIADO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
APLICADAS À CIRURGIA E OFTALMOLOGIA**

Prof. Dr. Edson Samesima Tatsuo (Coordenador)

Prof. Dr. Túlio Pinho Navarro (Sub-coordenador)

Prof. Dr. Agnaldo Soares Lima

Prof. Dr. Marcelo Dias Sanches

Prof. Dr. Márcio Bittar Nehemy

Prof. Dr. Marco Aurélio Lana Peixoto

Prof. Dr. Renato Santiago Gomez

REPRESENTANTE DISCENTE

Taise Mirian Cruz Mosso Ramos

Ao meu pai, João Eustáquio, que me ensinou o prazer da vida acadêmica,
À minha mãe, Cristina, pelo amor à medicina.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Vivian Resende por toda assistência e dedicação. Foi ela quem tornou essa dissertação possível com seu apoio incondicional.

À Profa. Dra. Paula Vidigal do Departamento de Anatomia patológica da Faculdade de Medicina da UFMG pela ajuda com a imuno-histoquímica 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.

Ao Dimitri Bassani Santos Neves, Designer do Centro de Informática em Saúde da Faculdade de Medicina da UFMG, pelo auxílio na formatação das ilustrações.

Ao Grupo de Fígado e Vias Biliares do IAG-UFMG pela excelente assistência prestada aos pacientes e pela contribuição na coleta de dados.

Aos colegas Dr. João Paulo Lemos e Dr. Rodrigo Vieira Gomes pela caminhada conjunta no Mestrado.

A todos os meus amigos pelo apoio contínuo. Ao João Paulo Vasconcelos, Jairo Teixeira e Rafael Costa pela contribuição no debate de ideias.

À Raquel Bonisson pelo incentivo constante.

À toda minha família, dos quais muitas vezes me fiz ausente.

LISTA DE ABREVIATURAS

AFP - Alfafetoproteína

EpCAM - *Epithelial Cell Adhesion Molecule*

CHC - Carcinoma Hepatocelular

IHQ – Imuno-histoquímica

HBV – Hepatite B

HCV – Hepatite 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

WHO - *World Health Organization*

BCLC - *The Barcelona Clinic Liver Cancer*

DAB - Diaminobenzidina

RESUMO

A expressão de marcadores biomoleculares de células tronco no carcinoma hepatocelular (CHC) tem sido associada a mau prognóstico e ao comportamento biológico agressivo. Um sistema de classificação baseado na expressão de EpCAM e alfafetoproteína (AFP) foi proposto para definir diferentes fenótipos e subtipos de CHC. O objetivo dessa pesquisa foi verificar a expressão de EpCAM e AFP, por meio de imuno-histoquímica em 43 pacientes (30 homens e 13 mulheres), submetidos a ressecção de CHC. A etiologia viral foi a mais frequente, com predomínio da hepatite C (41,46%) seguida pela hepatite B (29,26%). A cirrose etanólica foi a menos frequente (12,19%) e, em sete pacientes (17,07%), o CHC incidiu em fígado com doença de etiologia desconhecida. Os nódulos únicos (78,6%) foram predominantes em relação aos múltiplos (21,4%). A maioria dos CHCs foi operada nos estágios iniciais I e II (45,2% e 40,55%, respectivamente). A invasão angiolinfática esteve presente em 41,5 % dos pacientes. Houve predomínio de tumores bem e moderadamente diferenciados (46,3% e 43,9%, respectivamente). A expressão imuno-histoquímica dos biomarcadores foi positiva em 12 (29,3%) e negativa em 29 (70,7%) dos tumores estudados. O fenótipo EpCAM+AFP+ foi observado em 8 (66,7%) tumores, EpCAM+AFP- em 4 (33,3%), EpCAM-AFP- em 25 (86,2%), EpCAM-AFP+ em 4 (13,8%). Houve diferença significativa na relação da proporção de expressão de EPCAM e AFP entre os diferentes fenótipos ($p=0,002$). A chance de ocorrer invasão angiolinfática quando AFP sérica esteve entre 100ng/mL e 400ng/mL foi de 12,4 vezes a chance de ocorrer invasão angiolinfática quando AFP sérica esteve abaixo de 100 ng/mL ($OR=12,4$; $p=0,028$). A chance de expressão de EpCAM positiva em tumores menores ou iguais a 5 cm foi significativa ($OR=8,7$; $p=0,022$). O índice de sobrevida global foi 74,9%, 69,4%, 69,4% e 53,5% aos 12, 24, 36 e 48 meses, respectivamente. Concluiu-se que existe associação positiva entre a expressão de EpCAM e AFP, entre si, e com os níveis séricos de AFP. O diâmetro menor ou igual a cinco centímetros foi a variável que se associou à expressão de EpCAM e a invasão angiolinfática à expressão de AFP. Não houve associação entre as variáveis estudadas e a sobrevida dos pacientes.

Palavras-chave: carcinoma hepatocelular, alfafetoproteína, EPCAM, imuno-histoquímica, sobrevida.

ABSTRACT

Stem cells markers in hepatocellular carcinoma (HCC) have been associated with poor prognosis and aggressive biological behavior. A classification system based on expression of EpCAM and alpha-fetoprotein (AFP) has been proposed to set different phenotypes and subtypes of HCC. The aim of this study was to investigate the expression of EpCAM and AFP, by immunohistochemistry in 43 patients (30 men and 13 women) who underwent resection of HCC. Viral etiology was the most common, with a prevalence of hepatitis C (41.46%) followed by hepatitis B (29.26%). Ethanol cirrhosis was less frequent (12.19%) and seven (17.07%) included patients of unknown etiology. The single nodules (78.6%) were predominant in relation to multiple (21.4%). Most HCCs were operated in the initial stage I (45.2%) and II (40.55%). Angiolymphatic invasion was present in 41.5% of patients. There was a predominance of well and moderate differentiated tumors (46.3% and 43.9%, respectively). Immunohistochemical expression of AFP and EpCAM was positive in 12 (29.3%) and negative in 29 (70.7%) HCCs. The EpCAM+AFP+ phenotype was observed in 8 (66.7%) tumors, EpCAM+AFP- in 4 (33.3%), EpCAM+ AFP- in 25 (86.2%) and EpCAM-AFP+ in 4 (13.8%). There was a significant difference in the proportion of EpCAM and AFP expression among different phenotypes ($p = 0.002$). AFP between 100ng/mL and 400ng/mL had a significant chance of angiolymphatic invasion (OR = 12.4; $p = 0.028$). The chance of EpCAM positive expression in tumors ≤ 5 cm was significant (OR = 8.7, $p = 0.022$). The overall survival rate was 74.9%, 69.4%, 69.4% and 53.5% at 12, 24, 36 and 48 months, respectively. It was concluded that there is a positive association between expression of EpCAM and AFP between themselves and with serum AFP levels. The smaller diameter or equal to five centimeters was the variable associated with the expression of EpCAM and angiolymphatic invasion to AFP expression. There was no association between variables and survival.

Keywords: hepatocellular carcinoma, alpha-fetoprotein, EpCAM, immunohistochemistry, survival.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** EpCAM e sua variedade de funções. 15
- Figura 2.** CHC em paciente com cirrose pós-viral C, nódulo único, maior diâmetro medindo 1,7 cm, bem diferenciado. Nas colunas observam-se fotomicrografias do CHC em pequeno a grande aumento, corado pela HE (a,d,g), imuno-histoquímica positiva para EpCAM (b,e,h) e AFP (c,f,i). Em "e" observa-se a expressão de EpCAM no ducto biliar (seta). As barras azuis mostram o aumento em micrômetros..... 28
- Figura 3.** CHC em paciente com cirrose pós-viral B, nódulo único, maior diâmetro medindo 3 cm, bem diferenciado. Nas colunas observam-se fotomicrografias do CHC em pequeno a grande aumento, corado pela HE (a,d,g), imuno-histoquímica positiva para EpCAM (b,e,h) e AFP (c,f,i). As barras azuis mostram o aumento em micrômetros..... 29
- Figura 4.** CHC em paciente com cirrose etanólica. Coloração HE, nódulo único, maior diâmetro medindo 3,5 cm, bem diferenciado (a,b); Imuno-histoquímica (c): EpCAM negativa (*), observar a expressão positiva de EpCAM no ducto biliar (seta) e na periferia do nódulo cirrótico (dupla seta). Expressão positiva de EpCAM na periferia do nódulo cirrótico em diferentes aumentos (d,e,f).30
- Figura 5.** Curva de sobrevida global pelo método de Kaplan-Meir, em pacientes com CHC ressecados. 38

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Características dos anticorpos primários utilizados, Anti EpCAM e Anti alfa 1 fetoproteína 22
- Tabela 2.** Frequências absolutas e relativas referentes às características demográficas, clínicas e laboratoriais em pacientes com carcinoma hepatocelular. 26
- Tabela 3.** Frequências absolutas e relativas referentes às características morfológicas, anatomopatológicas e imuno-histoquímicas dos carcinomas hepatocelulares..... 27
- Tabela 4.** Associação entre a expressão imuno-histoquímica de EpCAM e AFP no carcinoma hepatocelular. 31
- Tabela 5.** Associação entre os níveis séricos de AFP e a expressão imuno-histoquímica de AFP no carcinoma hepatocelular..... 32
- Tabela 6.** Relação entre os níveis séricos de AFP e a expressão imuno-histoquímica de EpCAM no carcinoma hepatocelular. 33
- Tabela 7.** Associação entre as variáveis clinico-patológicas e a expressão de alfafetoproteína no carcinoma hepatocelular. 33
- Tabela 8.** Associação entre as variáveis clinico-patológicas e a expressão de EpCAM no carcinoma hepatocelular. 34
- Tabela 9.** Associação entre as variáveis clinico-patológicas e a dosagem sérica de alfafetoproteína em pacientes com carcinoma hepatocelular.. 35
- Tabela 10.** Análises multivariadas de regressão logística exata para a associação entre as variáveis de interesse em relação à expressão de AFP, EpCAM e o níveis séricos de AFP em pacientes com CHC ressecados..... 36
- Tabela 11.** Análise de sobrevivência em pacientes com CHC ressecados (n=41), de acordo com as variáveis clinico-patológicas, utilizando-se os testes de Log-Rank, Tarone-Ware e Wilcoxon. 37

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	RELEVÂNCIA	18
3	OBJETIVOS	19
3.1	Geral	19
3.2	Específicos	19
4	MÉTODO	20
4.1	Pacientes	20
4.2	Aspectos éticos	20
4.3	Dados clínico-cirúrgicos, anatomopatológicos e de sobrevida	20
4.4	Amostras	21
4.5	Imuno-histoquímica	21
4.6	Análises estatísticas	23
5	RESULTADOS	25
5.1	Análise descritiva da amostra	25
5.2	Imuno-histoquímica	27
5.3	Análise Univariada	31
5.4	Análise Multivariada (Regressão logística exata)	35
5.5	Análise de sobrevivência	37
6	DISCUSSÃO	39
7	CONCLUSÃO	44
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	45
9	ANEXOS	51
9.1	ANEXO 1 - Classificação TNM do Carcinoma Hepatocelular	51
9.2	ANEXO 2 - Protocolo para Imuno-histoquímica: EpCAM e AFP	52
9.3	ANEXO 3 - Aprovação pelo comitê de ética	54
9.4	ANEXO 4 – Folha de aprovação	55
9.5	ANEXO 5 – Ata de defesa da dissertação	56

1 INTRODUÇÃO

O carcinoma hepatocelular (CHC) é uma das neoplasias malignas mais frequentes sendo o quinto câncer mais prevalente no mundo e o terceiro em mortalidade relacionada ao câncer ¹. A ressecção cirúrgica encontra-se entre as modalidades terapêuticas curativas, segundo os critérios de *The Barcelona Clinic Liver Cancer (BCLC)* ², porém, menos de 20% dos pacientes diagnosticados são passíveis de tratamento, além de frequente recorrência pós-operatória ^{1; 3}. Mesmo tratados em estágios iniciais, o índice de sobrevida em cinco anos é de apenas 55%, chegando a índices ainda menores em estágios mais avançados ⁴.

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 ¹.

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 ^{5; 6; 7; 8}.

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 expressada em fígado fetal, mas não está presente, 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 ⁹. A ativação extracelular também pode ser responsável por acelerar o crescimento de células de CHC metastáticas ¹⁰.

Estudos moleculares tem 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 ¹¹. 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 ^{12; 13; 14}. A sinalização aberrante, principalmente, devido às mutações no gene β catenina, é encontrada em 30% a 40% dos CHCs humanos ¹³.

Têm se demonstrado que a presença de uma pequena subpopulação distinta de células exibindo propriedades consistentes com células tronco, tais como, auto-renovação, a proliferação celular e diferenciação, dentro do CHC - as chamadas 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, a recidiva e a resistência à quimioterapia e terapia de radiação ¹⁵. Muitas proteínas de superfície têm sido sugeridas como marcadores biomoleculares de CSC no CHC, incluindo CD90, CD133 e molécula de adesão da célula epitelial (do inglês, *Epithelial Cell Adhesion Molecule* - EpCAM) ^{4; 15}. Os carcinomas hepatocelulares que expressam marcadores biomoleculares de células tronco são considerados tumores de piores prognósticos com comportamento biológico mais agressivo, invasivos, com graus histológicos menos diferenciados e presença de invasão angiolímfática mais frequente ¹⁵.

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 tumores ⁴. 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 ^{8; 16}.

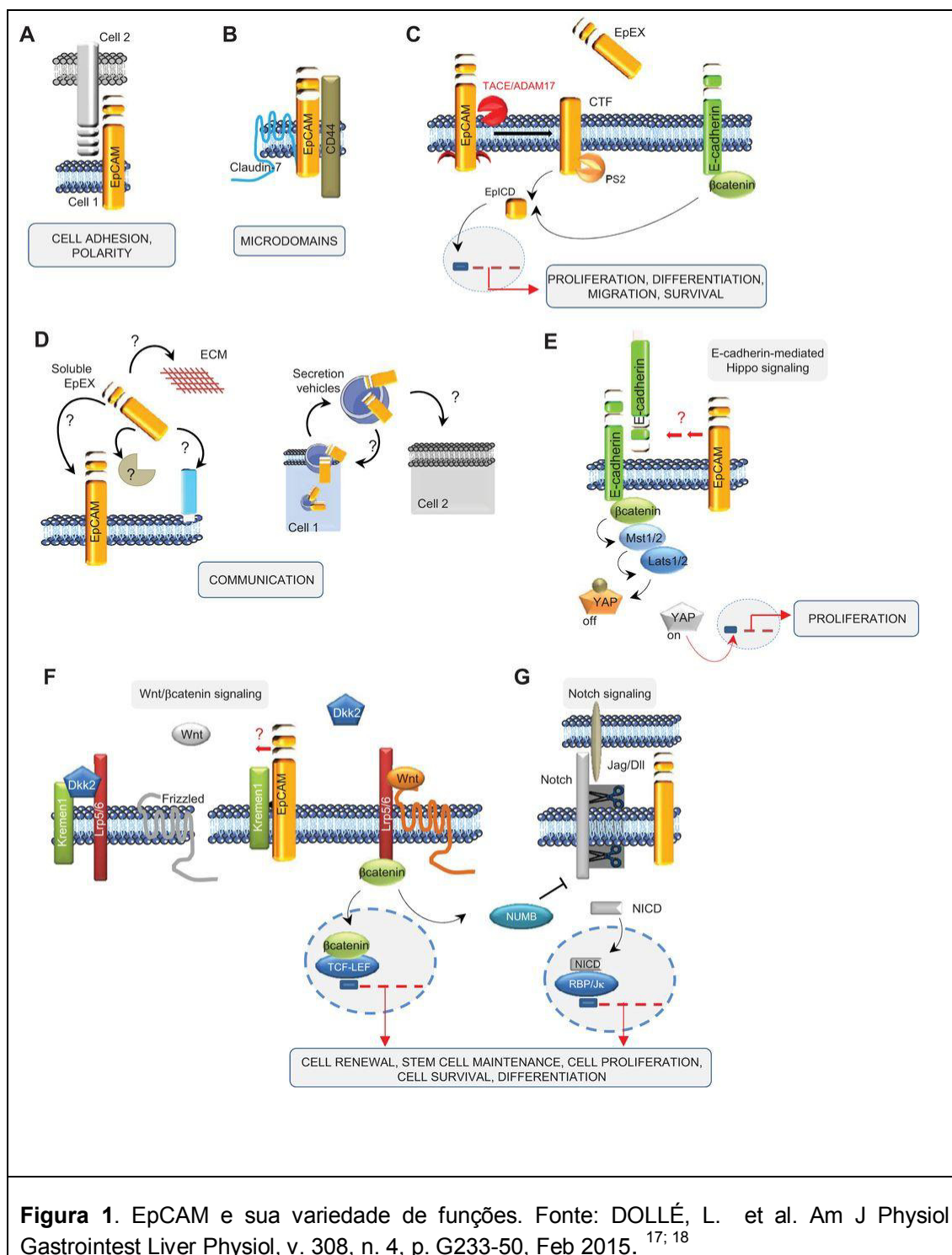


Figura 1. EpCAM e sua variedade de funções. Fonte: DOLLÉ, L. et al. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, v. 308, n. 4, p. G233-50, Feb 2015. ^{17; 18}

Yamashita et. al. foram os primeiros a caracterizarem a EpCAM na linhagem celular de CHC, demonstrando que células que expressam EpCAM possuem propriedades de autorenovação e diferenciação tais como as células tronco ¹⁹. Esses autores demonstraram que os CHCs EpCAM positivos exibiam um perfil molecular distinto com características de células progenitoras hepáticas, incluindo a presença de marcadores de células tronco progenitoras, como citoqueratina 19, c-Kit, EpCAM, e a via de sinalização beta Wnt-catenina ativada, ao passo que os CHCs EpCAM negativos exibiam genes com características de hepatócitos maduros ^{16; 17; 19; 20}. Além disso, CHCs EpCAM positivos e CHCs EpCAM negativos poderiam ser, ainda, subclassificados em quatro grupos com implicação prognóstica por determinação do nível de dosagem sanguínea de alfafetoproteína. Esses quatro subtipos (EpCAM+AFP+, EpCAM+APF-, EpCAM-AFP+ e EpCAM-APF-) exibiam padrões de expressão gênica distintos, com características semelhantes aos diversos estágios de linhagens das células hepáticas ²⁰.

Tomados em conjunto, Yamashita et. al. propuseram um novo sistema de classificação, utilizando a expressão de EpCAM e dosagem de AFP sanguínea, para revelar subtipos de CHC. Essa nova classificação poderia possibilitar a estratificação prognóstica e avaliação de pacientes apresentando CHCs com diferentes fenótipos. A principal importância disso seria fornecer novas perspectivas sobre a ativação das vias moleculares e origem celular do CHC, repercutindo na indicação de terapia adjuvante adequada ²⁰.

Segundo alguns estudos, o antígeno EpCAM poderia ser utilizado para detecção de células tumorais circulantes, apontando-o como possível marcador da presença destas células tumorais em pacientes com carcinoma hepatocelular ^{8; 21}. Tem se demonstrado que o EpCAM poderia ser utilizado como um biomarcador para quimioresistência, o que sugere que, quando positivo tenha um papel relevante na progressão do câncer ^{12; 13; 16; 21; 22}.

A EpCAM tem sido uma molécula alvo para o desenvolvimento de fármacos imunoterápicos contra o câncer ²³. Ensaios clínicos com o uso de anticorpos monoclonais 17-1 A (Edrecolomab; Panorex) já foram realizados para pacientes com câncer gástrico, colorretal, ovário e mama ²³. O anticorpo monoclonal Catumaxomab (Removab) foi desenvolvido para o tratamento de neoplasias avançadas ²³. O Catumaxomab tem duas ligações específicas direcionadas à EpCAM e antígenos de células T CD3 ²³. Em estudo clínico com esse medicamento, obteve-

se um resultado promissor em pacientes com carcinomatose peritoneal e pleural ²³. Essas moléculas alvo poderiam ser utilizadas como terapia adjuvante em pacientes com carcinoma hepatocelular positivos para EpCAM ⁴.

2 RELEVÂNCIA

As características morfológicas, associadas ao estudo molecular, poderiam contribuir para a identificação de um biomarcador específico e, potencialmente, no desenvolvimento de novas terapias moleculares alvo para o tratamento do carcinoma hepatocelular. O sorafenibe é hoje o único medicamento quimioterápico que mostrou aumento de sobrevida em estudos clínicos de fase três, sendo a opção para tratamento sistêmico disponível para o carcinoma hepatocelular. Novos fármacos que atuem na inibição de marcadores biomoleculares específicos poderiam vir a ser mais uma opção terapêutica, principalmente, naqueles tumores quimioresistentes e com índices mais elevados de recidiva.

Além disso, a maioria dos trabalhos na literatura foram realizados em população asiática (Japão, China, Coreia do Sul) e não existem estudos na população brasileira sobre a expressão de EpCAM e AFP no CHC. Nesse contexto, desenvolveu-se a presente pesquisa que estudou a expressão destes biomarcadores moleculares e a correlação com os níveis séricos de alfafetoproteína, além de características clinico-patológicas relevantes em pacientes com carcinoma hepatocelular submetidos a ressecção cirúrgica no HC-UFMG.

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Verificar a expressão dos biomarcadores moleculares EpCAM e AFP no carcinoma hepatocelular, por meio de imuno-histoquímica, em pacientes submetidos à ressecção hepática.

3.2 Específicos

Verificar a associação entre a expressão dos biomarcadores moleculares EpCAM e AFP, entre si, e com a dosagem sanguínea de AFP;

Identificar características dos tumores associadas à expressão imuno-histoquímica de EpCAM, AFP e níveis séricos de AFP;

Verificar características dos tumores associadas à sobrevida dos pacientes.

4 MÉTODO

4.1 Pacientes

Fizeram parte desse estudo 43 pacientes (30 homens e 13 mulheres) com diagnóstico de carcinoma hepatocelular, os quais foram submetidos à ressecção cirúrgica entre janeiro de 2008 a dezembro de 2015, 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-UFMG). Foram incluídos pacientes que não haviam sido submetidos a tratamentos prévios para o CHC e o procedimento cirúrgico foi indicado com proposta curativa. 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 - UFMG). 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, história pregressa (comorbidades), etiologia da doença hepática, níveis séricos de alfafetoproteína no pré-operatório, tipo de ressecção hepática (menor, equivalendo a dois ou menos segmentos hepáticos ressecados; ou maior, equivalendo a três ou mais segmentos ressecados), número de nódulos (único ou múltiplo), maior diâmetro do tumor (menor ou igual a 5 centímetros ou maior a 5 centímetros), tipo e grau de diferenciação histológica (bem, moderado ou pouco diferenciado), presença de invasão angiolinfática, estadiamento TNM e sobrevida

dos pacientes após o tratamento. Foram submetidos à ressecção hepática apenas os pacientes que tiveram classificação Child-Pugh A.

O diagnóstico de carcinoma hepatocelular foi baseado na história clínica, dosagem sérica de alfafetoproteína, exames de imagem (Ultrassom, Tomografia Computadorizada e/ou Ressonância Magnética) ou biópsia. O estadiamento seguiu os padrões preconizados pela *World Health Organization* (WHO)²⁴. 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.

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-UFMG. Todas as amostras foram fixadas em formaldeído a 10% por 24 horas, embebidas em parafina, cortadas em fragmentos com espessura de 4 micrômetros e coradas com hematoxilina e eosina. Os cortes destinados à imunohistoquímica foram depositados em lâminas carregadas por meio de silanização.

Por apresentarem material insuficiente no bloco de parafina, dois pacientes foram excluídos do estudo, restando 41, nos quais a análise imunohistoquímica foi realizada.

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 utilizados, Anti EpCAM e Anti alfa 1 fetoproteína

Anticorpo monoclonal	Clone	Marca	Diluição
Anti EpCAM (Camundongo)	B302 (323/A3)	Abcam	1:100
Anti alfa1fetoproteína (Coelho)	EPR9309	Abcam	1:50

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 alfafetoproteína utilizou-se um fragmento de fígado fetal como controle positivo externo da reação. Para a expressão de EpCAM utilizou-se o controle interno pela marcação positiva dessa proteína 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 AFP e EpCAM foi avaliada de forma binária, considerando-se marcação positiva quando mais de 10% das células tumorais expressou os marcadores de forma moderada ou acentuada. As amostras foram consideradas

negativas quando não houve marcação ou quando menos de 10% do tumor expressou as proteínas ¹⁵.

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.

Com o objetivo de aferir se havia associação entre os marcadores AFP e EpCAM, entre si, e com a dosagem sérica de alfafetoproteína, foi feita análise de associação, dois a dois marcadores. A alfafetoproteína sérica foi, então, categorizada em três níveis: até 100; entre 100 e 400; superior a 400. Foi feito o teste do Qui-quadrado ou teste de Fisher e obtida ainda a magnitude das associações por meio do *Odds Ratio* (OR).

Para verificar a associação das variáveis AFP e EpCAM 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), foi feito o teste do Qui-quadrado ou teste de Fisher. Também foi obtida a magnitude da associação por meio do *Odds Ratio*. Com base nos resultados dessa análise univariada, foram selecionadas aquelas variáveis cujos valores de p foram inferiores a 0,30 ($p < 0,30$) 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 0,10 ($p > 0,10$) – iniciando sempre da menor significância para a maior significância – e permaneceram no modelo final aquelas com valor de p inferior a 0,10 ($p < 0,10$) pelo teste de Wald.

A análise de sobrevida teve como variável dependente o tempo até a ocorrência de óbito. 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, Tarone Ware e o teste de Wilcoxon. Foram obtidos ainda, para os pacientes em geral, o tempo mediano de sobrevivência e respectivo intervalo interquartilico; e sobrevida (percentual de sobreviventes) aos 12, 24, 36 e 48 meses.

Em todas as análises, o nível de significância considerado foi igual 5% ($p < 0,05$). No caso das análises segundo AFP e EpCAM, apenas variáveis com completitude superior a 70% foram analisadas. Intervalos de 95% de confiança para as medidas de *Odds Ratio* foram obtidos.

5 RESULTADOS

5.1 Análise descritiva da amostra

As características demográficas, clínicas e laboratoriais dos pacientes com carcinoma hepatocelular podem ser observadas na Tabela 2. Entre os 41 pacientes com CHC incluídos no estudo, houve um predomínio de homens (68,29 %) em relação às mulheres (31,71%), com uma média de idade igual a 59 anos, variando de 25 a 75 anos. A etiologia viral foi a mais frequente, com predomínio da hepatite C (41,46%) seguida pela hepatite B (29,26%). A cirrose etanólica foi a menos frequente (12,19%) e, em sete pacientes (17,07%), o CHC incidiu em fígado com doença de etiologia desconhecida.

A média de dosagem sérica de alfafetoproteína foi de 1864,1 ng/mL com desvio padrão de 9266,3 ng/mL, enquanto a mediana foi de 59 ng/mL (IIQ: 54; 66), mínimo de 1,9 ng/mL e máximo de 59900 ng/mL. O nível sérico de AFP esteve abaixo de 100 ng/mL em 27 (64,3%) pacientes; em 7 (17,07%), esteve entre 100 e 400 ng/ml e; em 8, (19,1%), acima de 400ng/ml. Em relação ao tratamento cirúrgico, as resseções hepáticas menores (68,29%) predominaram em relação às hepatectomias maiores (31,71%).

Tabela 2. Frequências absolutas e relativas referentes às características demográficas, clínicas e laboratoriais em pacientes com carcinoma hepatocelular.

Variáveis	Estatísticas Descritivas (%)	Valor de p
Gênero		
Feminino	13 (31,71)	0,019**
Masculino	28 (68,29)	
Idade		
Média (Desvio Padrão)	59,2 (9,5)	
Mediana (IIQ)	59 (54;66)	
Mínimo; Máximo	25; 75	
Comorbidades		
Não	22 (53,65)	0,357
Sim	19 (46,34)	
Etiologia		
Idiopática	7 (17,07)	0,241
Etanólica	5 (12,20)	0,058*
Vírus B	12 (29,26)	0,528
Vírus C	17 (41,46)	0,015**
Alfafeto sérica (ng/mL)		
Média (Desvio Padrão)	1864,1 (9266,3)	
Mediana (IIQ)	59 (54;66)	
Mínimo; Máximo	1,9; 59900	
Alfafeto sérica (ng/mL)		
Menor que 100	26 (63,41)	0,001***
100 a 400	7 (17,07)	0,027**
Maior que 400	8 (15,51)	0,061
Procedimento cirúrgico		
Hepatectomia menor	28 (68,29)	0,019**
Hepatectomia maior	13 (31,71)	

Nota: foi realizado teste de homogeneidade entre as categorias; *p<0,10; **p<0,05; ***p<0,01

A Tabela 3 mostra as características morfológicas anatomopatológicas e imuno-histoquímicas dos carcinomas hepatocelulares. Os nódulos únicos (78,6%) foram predominantes em relação aos múltiplos (21,4%). Não houve diferença significativa entre a proporção de nódulos maiores que 5 cm e aqueles menores ou iguais a 5 cm.

Os carcinomas hepatocelulares foram operados, predominantemente, nos estágios iniciais I (45,2%) e II (40,55%). A invasão angiolinfática esteve presente em 41,5% dos pacientes. Houve predomínio de tumores bem e moderadamente diferenciados (46,3% e 43,9%, respectivamente). A expressão imuno-histoquímica de AFP e de EpCAM foi positiva em 12 (29,3%) carcinomas hepatocelulares e negativa em 29 (70,7%).

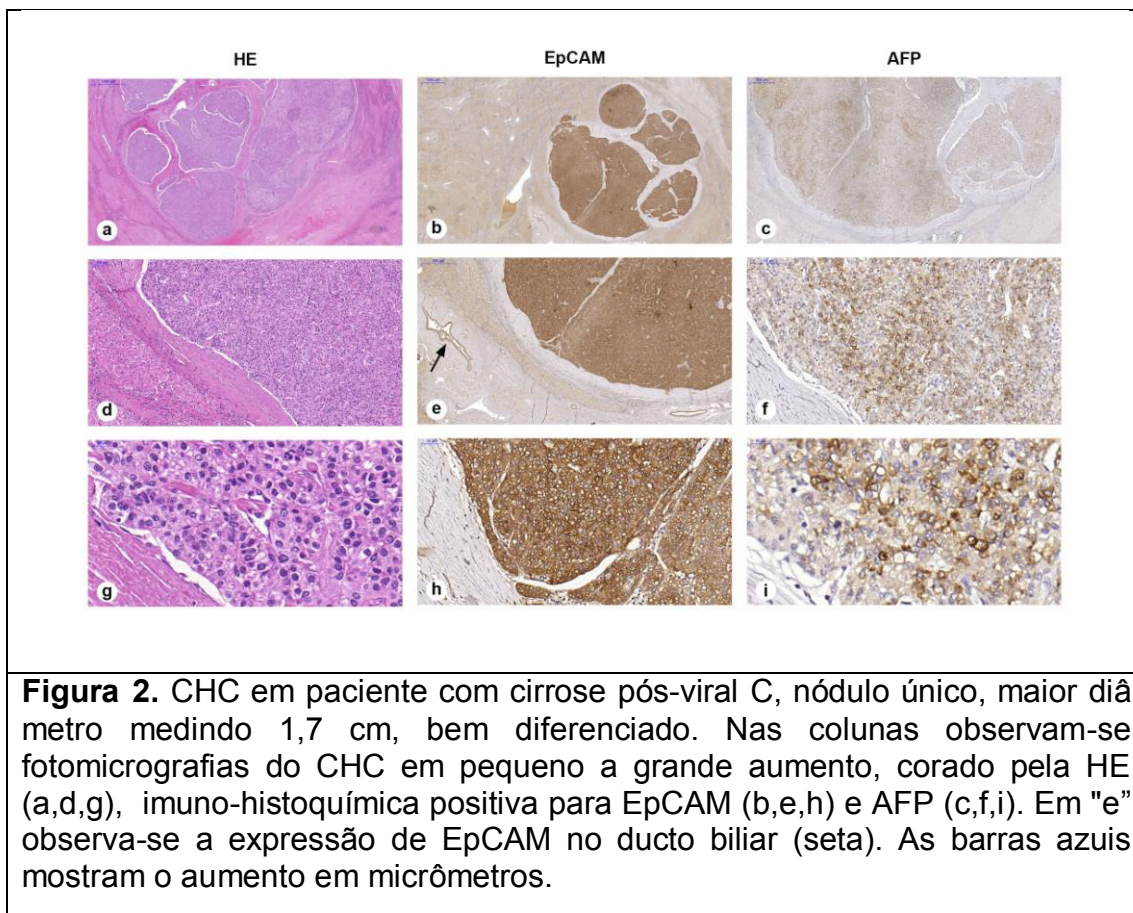
Tabela 3. Frequências absolutas e relativas referentes às características morfológicas, anatomopatológicas e imuno-histoquímicas dos carcinomas hepatocelulares.

Variáveis	Estatísticas Descritivas (%)	Valor de p
Nódulo		
Único	32 (78,0)	<0,001****
Múltiplo	9 (22,0)	
Diâmetro		
≤ 5 cm	23 (56,1)	0,357
> 5 cm	18 (43,9)	
Estadiamento TNM		
I	18 (43,9)	0,150
II	17 (41,5)	0,268
III	6 (14,6)	0,011**
Invasão angiolinfática		
Não	24 (58,5)	0,584
Sim	17 (41,5)	
Grau de diferenciação histológica		
Bem	19 (46,3)	0,077*
Moderadamente	18 (43,9)	0,150
Pouco	4 (9,8)	0,001***
Alfafeto no CHC		
negativo	29 (70,7)	0,008***
positivo	12 (29,3)	
EpCAM no CHC		
negativo	29 (70,7)	0,008***
positivo	12 (29,3)	

Nota: foi realizado teste de homogeneidade entre as categorias; *p<0,10; **p<0,05; ***p<0,01; ****p<0,001

5.2 Imuno-histoquímica

Os tumores foram negativos para EpCAM em 29 (70,7%) dos casos e positivos em 12 (29,3%). Resultados idênticos foram encontrados para a alfafetoproteína. O fenótipo EpCAM+AFP+ foi observado em 8 (66,7%) tumores, enquanto, EpCAM+AFP- foi observado em 4 (33,3%). O fenótipo EpCAM-AFP- foi encontrado em 25 (86,2%) tumores, enquanto EpCAM-AFP+ foi encontrado em 4 (13,8%). As Figuras 2 e 3 ilustram o fenótipo EpCAM+AFP+. A Figura 4 ilustra o fenótipo EpCAM-AFP- e a expressão de EpCAM na região periférica do nódulo cirrótico.



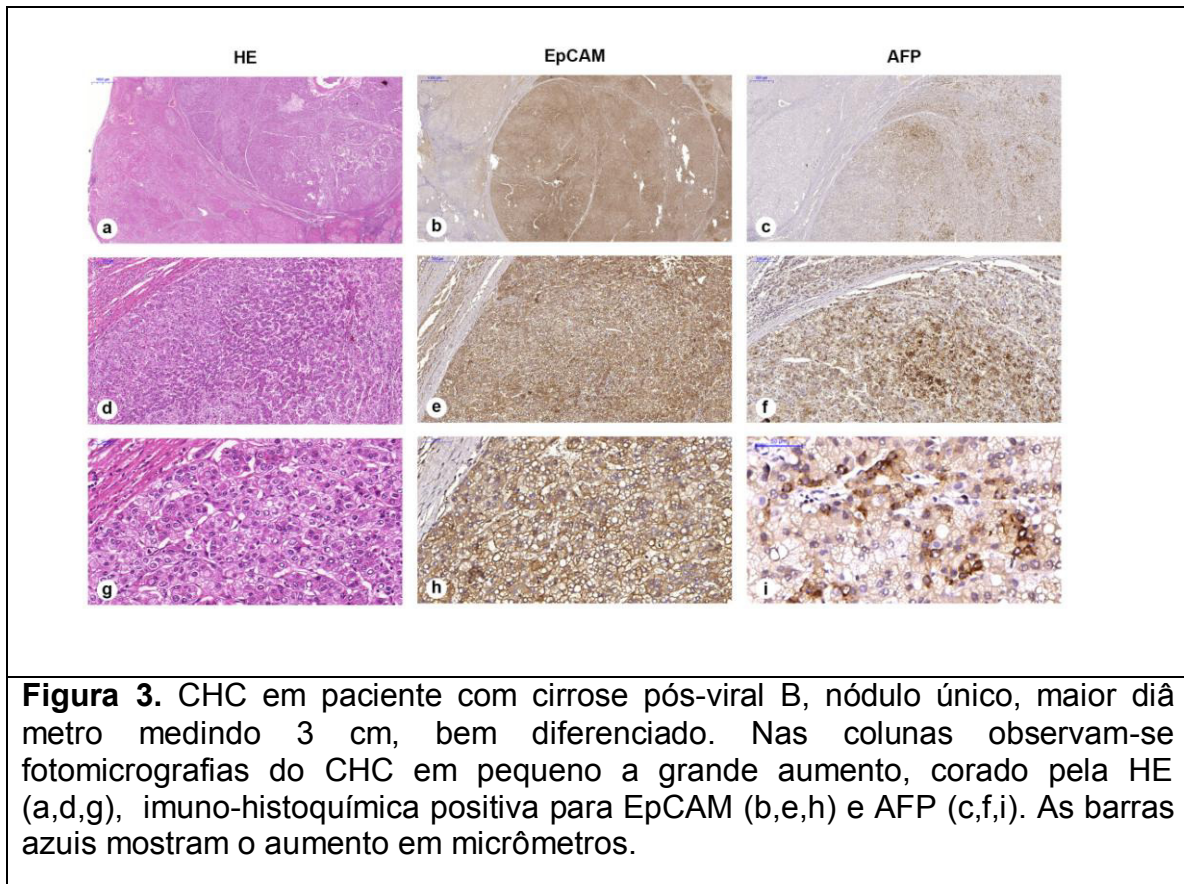


Figura 3. CHC em paciente com cirrose pós-viral B, nódulo único, maior diâmetro medindo 3 cm, bem diferenciado. Nas colunas observam-se fotomicrografias do CHC em pequeno a grande aumento, corado pela HE (a,d,g), imuno-histoquímica positiva para EpCAM (b,e,h) e AFP (c,f,i). As barras azuis mostram o aumento em micrômetros.

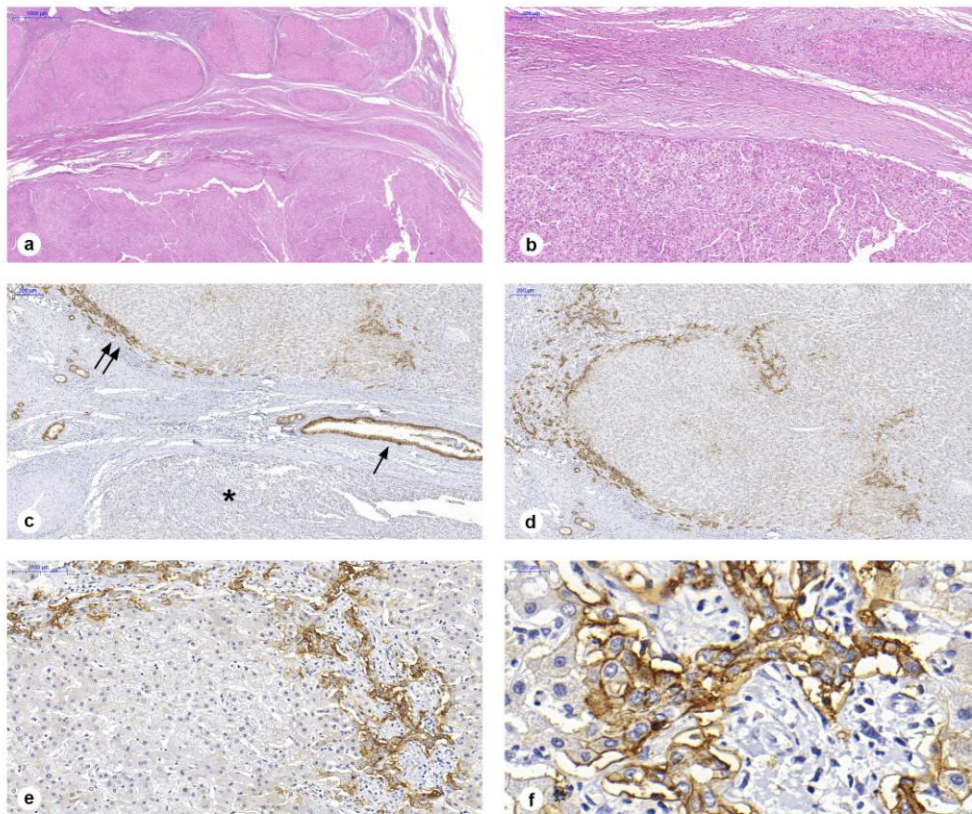


Figura 4. CHC em paciente com cirrose etanólica. Coloração HE, nódulo único, maior diâmetro medindo 3,5 cm, bem diferenciado (a,b); Imuno-histoquímica (c): EpCAM negativa (*), observar a expressão positiva de EpCAM no ducto biliar (seta) e na periferia do nódulo cirrótico (dupla seta). Expressão positiva de EpCAM na periferia do nódulo cirrótico em diferentes aumentos (d,e,f).

5.3 Análise Univariada

5.3.1 Associação entre AFP e EPCAM no carcinoma hepatocelular

A Tabela 4 mostra a associação entre a expressão imuno-histoquímica de EpCAM e AFP no CHC. Houve diferença significativa na relação da proporção entre os diferentes fenótipos ($p=0,002$). A chance de ocorrência de expressão de EpCAM positivo quando AFP é positivo foi 12,5 vezes a chance de expressão de EpCAM positivo quando AFP foi negativo (OR=12,5; IC95% 1,9-84,1; $p<0,001$).

Tabela 4. Associação entre a expressão imuno-histoquímica de EpCAM e AFP no carcinoma hepatocelular.

AFP	EpCAM		Total	Valor de p
	negativo	positivo		
negativo	25 (86,2%)	4 (13,8%)	29 (100,0%)	0,002*
positivo	4 (33,3%)	8 (66,7%)	12 (100,0%)	
Total	29 (70,7%)	12 (29,2%)	41 (100,0%)	

*Significância estatística pelo Teste Exato de Fisher

5.3.2 Associação entre os níveis séricos de alfafetoproteína e a expressão imuno-histoquímica de AFP no carcinoma hepatocelular.

A Tabela 5 mostra a associação entre os níveis séricos de alfafetoproteína e a expressão imuno-histoquímica de AFP no CHC. Houve diferença significativa na relação da proporção entre os diferentes fenótipos ($p=0,003$). Além disso, a chance de ocorrência de expressão positiva de AFP no CHC quando AFP sérica estava na faixa de valores de 100 ng/mL a 400 ng/mL foi 10,2 vezes a chance de expressão de AFP no CHC quando AFP sérica era inferior a 100 ng/mL (OR=10,2; IC95% 1,1-91,5; $p=0,010$). A chance aumentou para 12,8 em relação à expressão de AFP no

CHC, quando comparou-se valores de AFP sérica acima de 400 ng/mL com AFP sérica inferior a 100 ng/mL (OR=12,8; IC95% 1,4-116,0; p=0,003).

Tabela 5. Associação entre os níveis séricos de AFP e a expressão imuno-histoquímica de AFP no carcinoma hepatocelular.

Alfafetoproteína sérica (ng/mL)	Alfafetoproteína no CHC		Total	Valor de p
	negativo	positivo		
Até 100	23 (88,46%)	3 (11,53%)	26 (100,0%)	0,003*
100 a 400	3 (42,85%)	4 (57,14%)	7 (100,0%)	
> 400	3 (37,5%)	5 (62,50%)	8 (100,0%)	
Total	29 (70,7%)	12 (29,3%)	41(100%)	

*Significância estatística pelo Teste Exato de Fisher

5.3.3 Associação entre os níveis séricos de alfafetoproteína e a expressão imuno-histoquímica de EpCAM no carcinoma hepatocelular

A Tabela 6 mostra a associação entre os níveis séricos de AFP e a expressão imuno-histoquímica de EpCAM no CHC. Houve diferença significativa na relação da proporção entre os diferentes fenótipos (p=0,006). A chance de ocorrência de expressão de EpCAM positiva quando AFP sérica estava na faixa de valores de 100 a 400 foi 1,7 vezes a chance de expressão de EpCAM quando AFP sérica era inferior a 100, mas esta associação não se revelou estatisticamente significativa (OR=1,7; IC95% 0,2-11,8; p=0,597). Quando se comparou a expressão de EpCAM para os valores de alfafetoproteína sérica acima de 400ng/mL com aqueles de alfafetoproteína sérica inferior a 100, a associação já se revelou significativa, sendo o *Odds Ratio* igual a 7,0 (IC95% 1,03-47,8; p=0,021).

Tabela 6. Relação entre os níveis séricos de AFP e a expressão imuno-histoquímica de EpCAM no carcinoma hepatocelular.

Alfafetoproteína sérica (ng/mL)	EpCAM		Total	Valor de p
	negativo	positivo		
Até 100	21 (80,76%)	5 (19,24%)	26 (100,0%)	0,006*
100 a 400	5 (71,42%)	2 (28,58%)	7 (100,0%)	
> 400	3 (37,50%)	5 (62,50%)	8 (100,0%)	
Total	29 (70,70%)	12 (29,3%)	41(100,0%)	

*Significância estatística pelo Teste Exato de Fisher

5.3.4 Associação entre as variáveis clinico-patológicas e a expressão imuno-histoquímica de AFP.

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

Variáveis	Alfafetoproteína no CHC		Total	Valor de p
	negativo	positivo		
Etiologia				0,703
Idiopática	6 (85,71%)	1 (14,29%)	7 (100,0%)	
Etanólica	3 (60,00%)	2 (40,00%)	5 (100,0%)	
Vírus B	8 (66,67%)	4 (33,33%)	12 (100,0%)	
Vírus C	12 (70,59%)	5 (29,11%)	17 (100,0%)	
Número de nódulos				0,999
Único	23 (71,88%)	9 (28,12%)	32 (100,0%)	
Múltiplo	6 (66,67%)	3 (33,33%)	9 (100,0%)	
Diâmetro				0,171
≤ 5 cm	14 (60,87%)	9 (39,13%)	23 (100,0%)	
> 5 cm	15 (83,33%)	3 (16,67%)	18 (100,0%)	
Estadiamento TNM				0,241
I	15 (83,33%)	3 (16,67%)	18 (100,0%)	
II	11 (64,71%)	6 (35,29%)	17 (100,0%)	
III	3 (50,00%)	3 (50,00%)	6 (100,0%)	
Invasão angiolinfática				0,045**
Não	20 (83,33%)	4 (16,67%)	24 (100,0%)	
Sim	9 (52,94%)	8 (47,06%)	17 (100,0%)	
Grau de diferenciação histológica				0,492
Bem	15 (78,95%)	4 (21,05%)	19 (100,0%)	
Moderadamente	11 (61,11%)	7 38,89%)	18 (100,0%)	
Pouco	3 (75,00%)	1 (25,00%)	1 (100,0%)	

Notas: **p<0,05

5.3.5 Associação entre as variáveis clínico-patológicas e a expressão imunohistoquímica de EpCAM

Tabela 8. Associação entre as variáveis clínico-patológicas e a expressão de EpCAM no carcinoma hepatocelular.

Variáveis	EpCAM no CHC		Total	Valor de p
	negativo	positivo		
Etiologia				
Idiopática	6 (85,71%)	1 (14,29%)	7 (100,0%)	0,673
Etanólica	4 (80,00%)	1 (20,00%)	5 (100,0%)	
Vírus B	7 (58,33%)	5 (41,67%)	12 (100,0%)	
Vírus C	12 (70,59%)	5 (29,41%)	17 (100,0%)	
Número de nódulos				
Único	22 (68,75%)	10 (31,25%)	32 (100,0%)	0,702
Múltiplo	7 (77,78%)	2 (22,22%)	9 (100,0%)	
Diâmetro				
≤ 5 cm	13 (56,52%)	10 (43,48%)	23 (100,0%)	0,038**
> 5 cm	16 (88,89%)	2 (11,11%)	18 (100,0%)	
Estadiamento TNM				
I	13 (72,22%)	5 (27,78%)	18 (100,0%)	0,728
II	11 (64,71%)	6 (35,29%)	17 (100,0%)	
III	5 (83,33%)	1 (29,27%)	6 (100,0%)	
Invasão angiolinfática				
Não	18 (75,00%)	6 (25,00%)	24 (100,0%)	0,507
Sim	11 (64,71%)	6 (35,29%)	17 (100,0%)	
Grau de diferenciação histológica				
Bem	16 (84,21%)	3 (15,79%)	19 (100,0%)	0,182
Moderadamente	11 (61,11%)	7 (38,89%)	18 (100,0%)	
Pouco	2 (50,00%)	2 (50,00%)	4 (100,0%)	

Notas: **p<0,05

5.3.6 Associação entre as variáveis clínico-patológicas e os níveis séricos de alfafetoproteína.

Tabela 9. Associação entre as variáveis clínico-patológicas e a dosagem sérica de alfafetoproteína em pacientes com carcinoma hepatocelular.

Variáveis	Alfafetoproteína sérica (ng/mL)			Total	Valor de p
	Até 100	100 a 400	+ 400		
Etiologia					
Idiopática	4 (57,14%)	2 (28,57%)	1 (14,29%)	7 (100,0%)	0,703
Etanólica	2 (40,0%)	2 (40,0%)	1 (20,0%)	5 (100,0%)	
Vírus B	9 (75,0%)	1 (8,33%)	2 (16,67%)	12 (100,0%)	
Vírus C	11 (64,71%)	2 (11,76%)	4 (23,53%)	17 (100,0%)	
Nódulo único					
Único	20 (62,50%)	6 (18,75%)	6 (18,75%)	32 (100,0%)	0,999
Múltiplo	6 (66,67%)	1 (11,11%)	2 (22,22%)	9 (100,0%)	
Diâmetro					
≤ 5 cm	14 (60,87%)	4 (17,39%)	5 (21,74%)	23 (100,0%)	0,999
> 5cm	12 (66,67%)	3 (16,67%)	3 (16,67%)	18 (100,0%)	
Estadiamento TNM					
I	14 (77,78%)	0 (0,00%)	4 (22,22%)	18 (100,0%)	0,068*
II	8 (47,06%)	6 (35,29%)	3 (17,65v)	17 (100,0%)	
III	4 (66,67%)	1 (16,67%)	1 (19,51%)	6 (100,0%)	
Invasão angiolinfática					
Não	18 (75,00%)	1 (17,00%)	5 (20,83%)	24 (100,0%)	0,041**
Sim	8 (47,06%)	6 (35,29%)	3 (17,65%)	17 (100,0%)	
Grau de diferenciação histológica					
Bem	13 (68,42%)	3 (15,79%)	3 (15,79%)	19 (100,0%)	0,587
Moderadamente	11 (61,11%)	4 (22,22%)	3 (16,67%)	18 (100,0%)	
Pouco	2 (50,00%)	0 (0,00%)	2 (50,00%)	4 (100,0%)	

Notas: * p<0,1; **p<0,05

5.4 Análise Multivariada (Regressão logística exata)

5.4.1 Modelo final para expressão positiva de AFP no CHC

A chance de ocorrer invasão angiolinfática quando a expressão de alfafetoproteína foi positiva no carcinoma hepatocelular foi de 4,3 vezes a chance de ocorrer invasão angiolinfática quando a AFP foi negativa no CHC, porém, esse resultado não teve significância estatística (OR=4,27; p=0,079).

5.4.2 Modelo final para associação com AFP sérica

Considerando-se a AFP sérica inferior a 100ng/mL como base de comparação, a chance de ocorrer invasão angiolinfática quando AFP sérica esteve entre 100ng/mL e 400ng/mL foi de 12,4 vezes a chance de ocorrer invasão angiolinfática quando AFP sérica esteve abaixo de 100 ng/mL (OR=12,4; p=0,028) (Tabela 10). Não foi encontrada significância estatística para o modelo quando AFP sérica esteve acima de 400ng/mL.

5.4.3 Modelo final para expressão positiva de EpCAM no CHC

A chance de expressão de EpCAM positiva em tumores menores ou iguais a 5 cm foi 8,7 vezes a chance de expressão positiva de EpCAM em tumores maiores que 5 cm (OR=8,7; p=0,022) (Tabela 10). O modelo também revelou que, quanto ao grau de diferenciação histológica, a chance de expressão de EpCAM positiva em tumores moderadamente e pouco diferenciados foi 5,74 a chance de expressão positiva de EpCAM em tumores bem diferenciados, porém, esse valor não teve significância estatística (OR=5,74; p=0,063) (Tabela 10).

Tabela 10. Análises multivariadas de regressão logística exata para a associação entre as variáveis de interesse em relação à expressão de AFP, EpCAM e o níveis séricos de AFP em pacientes com CHC ressecados.

Variáveis	AFP no CHC OR (IC=95%) (valor de p)	EpCAM no CHC OR (IC=95%) (valor de p)	AFP sérica OR (IC=95%) (valor de p)
Invasão angiolinfática (Referência: ausência)	4,27 (0,87;24,8) (p=0,079)		12,4 (1,21;654,3) (p=0,028)
Diâmetro <= 5 (Referência: > 5 cm)		8,70 (1,27; 100,0) (p=0,022)	
Grau de diferenciação histológica Moderado/Pouco (Referência: Bem)		5,74 (0,93;50,3) (p=0,063)	

5.5 Análise de sobrevivência

Ocorreram cinco óbitos (12,2%) nos primeiros 30 dias do pós-operatório e, no tempo de seguimento, que variou de 2 meses a 48 meses, morreram 13 pacientes (36%). A média de sobrevida foi de 24,19 meses (+/- 18,9 meses) enquanto a mediana foi de 18 meses (IIQ: 9,5;38), com um mínimo de 2 meses e máximo de 48 meses.

Nenhuma das variáveis clínico-patológicas teve associação, estatisticamente significativa, na sobrevida dos pacientes (Tabela 11). A Figura 5 mostra a curva de sobrevida global dos pacientes com carcinoma hepatocelular que foram submetidos a ressecção cirúrgica. O índice de sobrevida global foi de 74,9%, 69,4%, 69,4% e 53,5% aos 12, 24, 36 e 48 meses, respectivamente.

Tabela 11. Análise de sobrevida em pacientes com CHC ressecados (n=41), de acordo com as variáveis clínico-patológicas, utilizando-se os testes de Log-Rank, Tarone-Ware e Wilcoxon.

Váriaveis	Log-Rank Valor de p	Tarone-Ware Valor de p	Wilcoxon Valor de p
Idade	0,59	0,30	0,19
Gênero	0,47	0,49	0,55
Comorbidades	0,06	0,15	0,27
AFP	0,49	0,59	0,68
EPCAM	0,81	0,76	0,74
Etiologia	0,15	0,15	0,16
Tipo de Hepatectomia	0,54	0,71	0,91
Número de Nódulos	0,60	0,31	0,48
Diâmetro do nódulo	0,29	0,43	0,53
Estadiamento T	0,37	0,42	0,43
Invasão Angiolinfática	0,27	0,44	0,59
Classificação histológica	0,91	0,85	0,81

Valores significativos para $p < 0,05$

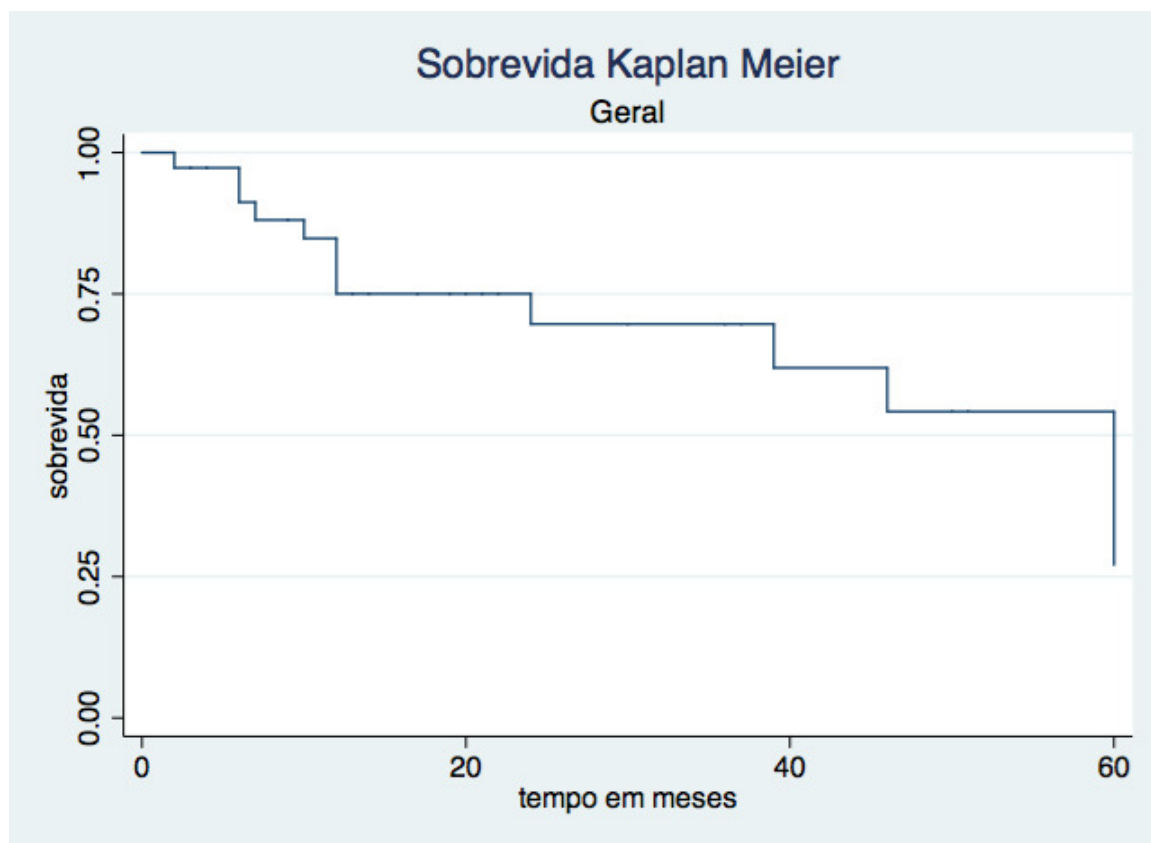


Figura 5. Curva de sobrevida global pelo método de Kaplan-Meier, em pacientes com CHC ressecados.

6 DISCUSSÃO

O carcinoma hepatocelular é o tumor primário do fígado mais comum e sua incidência tem aumentado nos países ocidentais ^{1; 8; 25}. A infecção pelos vírus das hepatites C e B, e também o abuso de álcool contabilizaram 82.92% dos tumores analisados o que retrata as causas mais frequentes de hepatopatias crônicas na população dos países ocidentais. Além disso, o predomínio de homens e a média de idade de manifestação foram semelhantes aos de outros centros com número maior de pacientes.

Na amostra da pesquisa, todos os pacientes submetidos à ressecção cirúrgica foram classificados como Child-Pugh A e a maioria foi operada em estádios iniciais I e II, com predomínio de nódulos únicos e submetidos a hepatectomias menores. Apesar do 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 curativo ²⁶. Nesses casos, pode-se indicar a quimioembolização intra-arterial ou quimioterapia sistêmica pois, em geral, tratam-se de lesões irresssecáveis e com risco cirúrgico elevado. Esses pacientes não foram incluídos no presente estudo o que corrobora para a homogeneidade da amostra.

A EpCAM é uma glicoproteína de superfície que funciona como uma molécula de adesão intercelular homofílica ^{27; 28}. Vários estudos publicados têm mostrado que a EpCAM também contribui para a sinalização, proliferação, diferenciação e migração celular, podendo ser um marcador útil para as células tronco no carcinoma hepatocelular ^{29; 30}. Em fígados normais, a expressão de EpCAM já foi descrita no epitélio dos ductos biliares intra-hepáticos ³¹ mas não está expressa na membrana de hepatócitos maduros. No presente estudo, a expressão no epitélio dos ductos hepáticos serviu como controle interno das reações imuno-histoquímicas para EpCAM permitindo dizer, com maior acurácia, quando essa reação foi positiva ou negativa no CHC.

A relação entre a expressão de EpCAM e elevados níveis séricos de alfafetoproteína tem sido demonstrada na literatura ^{16; 20}. A maioria das pesquisas utiliza a média dos níveis séricos da AFP nas análises estatísticas, o que mostra não ser um bom parâmetro, uma vez que, em geral, o desvio padrão é muito elevado,

como pudemos constatar nessa pesquisa, cuja média foi de 1864,1 (desvio padrão = 9266,3) mas com uma mediana de 59 ng/mL. Optou-se, então, por utilizar a mediana por ser um melhor parâmetro, identificando o quartil em que se concentrou a maior quantidade de casos, valores de AFP sérica até 100 ng/mL.

Para melhor se adequar à literatura, tendo como base publicações que utilizaram valores de referência maiores ou menores que 100ng/mL, ou valores maiores ou menores que 400ng/mL, optou-se nesta pesquisa por estratificar essa análise em três intervalos (até 100 ng/mL, de 100ng/mL a 400 ng/mL e acima de 400 ng/mL). Dessa forma, foi possível identificar que existe uma correlação positiva entre os marcadores AFP e EpCAM com os níveis séricos de AFP. Ou seja, quanto maiores os níveis séricos de AFP, maior o percentual de tumores positivos. Podemos, então, inferir que o nível de AFP sanguínea possa ser um indicador indireto da expressão desses biomarcadores nos tumores.

Elevados níveis séricos de alfafetoproteína são utilizados como critérios diagnósticos de carcinoma hepatocelular (na ausência de tumor testicular). Porém, cerca de 20% a 80% dos pacientes com CHC não possuem AFP sérica elevada ^{32; 33; 34; 35; 36}. Em acordo com a literatura, nossa amostra teve uma mediana de 59 ng/mL, com AFP abaixo de 100ng/mL em 63,41% dos pacientes.

Diferentemente de Yamashita et al. e de vários outros autores esta pesquisa parece ser única, ao se estudar a associação, tanto para os níveis plasmáticos de AFP, quanto para a expressão imuno-histoquímica de AFP no tecido tumoral do CHC, o que reforça a nossa análise.

Kimura et. al. (2014) encontraram maior expressão de EpCAM em associação com o vírus da hepatite B do que outras etiologias ⁸. Apesar dessa relação não ter mecanismo ainda bem elucidado, uma das hipóteses sugeridas é que o HBV promove a hepatocarcinogênese pelo desenvolvimento de células tronco cancerosas pela ativação da via de sinalização beta wnt-catenina levando a uma hiperexpressão de EpCAM ²¹. No presente estudo, assim como em outros publicados, essa associação não foi demonstrada. Assim como, não se observou diferenças na expressão de EpCAM e AFP entre os diversos grupos etiológicos.

Além disso, observaram uma forte expressão dessa proteína, especialmente, em pacientes com CHC ressecados que receberam tratamento prévio como quimioembolização intra-arterial ⁸. Esses dados sugerem que o aumento da expressão de EpCAM ocorre pelas células tumorais remanescentes derivadas de cé

lulas tronco cancerosas e estariam relacionado com o aumento da quimioresistência³⁷.

A expressão imuno-histoquímica positiva para EpCAM tem sido encontrada em 15,9 a 48,7 % dos carcinomas hepatocelulares^{20; 38; 39; 40; 41}. Neste estudo, 29,3% dos tumores foram positivos para EpCAM o que está de acordo com a literatura. Murakata et. al. (2011) encontraram a proteína EpCAM positiva em 50,9% dos CHCs do tipo multinodular confluyente e, somente, 23,9 % em nódulos únicos e 28,4% em nódulo único com crescimento extracapsular⁵. Se considerarmos que houve predomínio de nódulos únicos nesta casuística, o resultado obtido na presente pesquisa (31,25% de EpCAM positivo) está em correspondência com esses autores.

O diâmetro do tumor esteve associado à expressão de EpCAM. Os tumores menores ou iguais a 5cm foram aqueles que mais expressaram essa proteína, tanto na análise univariada quanto na multivariada. Bae et. al. (2012) estudaram 175 CHCs, nos quais a expressão positiva de EpCAM foi detectada em 72 (41%). Entre os 35 de tamanho pequenos (≤ 2 cm) a expressão de EpCAM foi detectada em 19 (54%). Acredita-se que essa molécula, por estar relacionada à propriedade de células-tronco, tenha papel importante nas fases iniciais de formação dos tumores⁴². Outro fator que nos leva a esse raciocínio, é o fato dessa proteína estar fortemente expressa na periferia dos nódulos cirróticos e displásicos, levando à hipótese de que contribuam para a carcinogênese no CHC. Uma hipótese é que, à medida que o tumor aumenta de tamanho e se diferencia, as células perdem o fenótipo de célula-tronco e, portanto, deixam de expressar a EpCAM. Entretanto, outros estudos necessitam ser realizados para se comprovar esta nossa hipótese.

Apesar de não estar entre os objetivos, a expressão de EpCAM na periferia dos nódulos cirróticos foi relatada nessa pesquisa. Publicações anteriores já mencionaram esse achado em relação aos nódulos cirróticos^{42; 43; 44}. Estudos explorando esses resultados poderão ser realizados em pesquisas futuras.

A associação entre a expressão de EpCAM e graus histológicos menos diferenciados não atingiu significância estatística ($p=0,06$). Essa significância não foi demonstrada, provavelmente, devido ao número pequeno de pacientes na amostra utilizada.

A invasão angiolinfática foi a variável que esteve associada à expressão de AFP no tecido tumoral e aos níveis séricos de AFP, tanto na análise univariada

quanto multivariada. Esse achado histopatológico está relacionado à agressividade do tumor e com pior prognóstico^{41; 45; 46}. Brian Carr & Guido (2016) encontraram uma diferença considerável na sobrevida entre pacientes com AFP sérica elevada e AFP baixa, associados à trombose da veia porta^{47; 48}.

A expressão de EpCAM associada a menor sobrevida já foi descrita em pacientes com câncer de mama^{49; 50; 51; 52}, ovário^{52; 53}, vesícula biliar⁵⁴ e tumor renal de células claras^{52; 55}. Zhe Guo et al. (2014) mostraram que a presença de EpCAM no tumor esteve associada a menor tempo de sobrevida em pacientes com CHC¹⁵ e pior prognóstico^{20; 38; 39; 42}.

De acordo com a classificação de Yamashita et al. (2008) os tumores EpCAM+AFP+ e EpCAM-AFP+ estiveram correlacionados a pior prognóstico, enquanto EpCAM-AFP- com melhor prognóstico e, ao contrário do que esperavam, EpCAM+AFP- se correlacionou ao melhor prognóstico²⁰. Na presente casuística, optou-se pela não estratificação em subgrupos para a análise de sobrevivência e a expressão positiva de EpCAM não esteve relacionada à sobrevida global dos pacientes. De forma igual, Bae et. al. (2012) também não encontraram associação entre a expressão de EpCAM e a sobrevida global dos pacientes. Porém, esses autores mostraram que o fenótipo EpCAM+ esteve, significativamente, associado com a sobrevida em pacientes com CHCs no estágio TI que, apesar do estágio inicial, tiveram menor sobrevida, tanto na análise univariada quanto multivariada⁴². Essa correspondência não foi encontrada nesse estudo.

EpCAM tem sido alvo em ensaios clínicos utilizando anticorpos monoclonais em diversos tipos de câncer^{56; 57; 58; 59} e acredita-se que esta molécula representa um novo alvo para a terapia gênica no CHC. Estudos demonstram que o siRNA pode ser usado com sucesso para o silenciamento de genes *in vivo*^{60; 61; 62}. Bae et al. (2012) demonstraram que o silenciamento do gene da EpCAM diminuiu, significativamente, a capacidade proliferativa e de potencial invasivo de células de CHC. Desde que anticorpos anti-EpCAM e/ou siRNA podem ser facilmente sintetizados, estudos mostram uma base racional para abordagens terapêuticas no CHC⁴². A presente pesquisa reforçou a informação de que apenas uma pequena porcentagem de CHCs expressa EpCAM e, provavelmente, esses pacientes com expressão positiva se beneficiariam de uma terapia alvo específica, corroborando com a premissa de que os pacientes devam ser selecionados, antes de instituir-se esse tipo de tratamento.

A identificação de uma subclasse de CHC EpCAM 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 EpCAM, assim como, contribuir na identificação de pacientes com diferentes prognósticos, adicionando-se mais um critério ao sistema de estadiamento TNM, já preconizado pela AJCC ⁶³.

Uma limitação desse estudo foi o número de pacientes da amostra. Apesar de ser uma neoplasia maligna comum em pacientes com doença hepática crônica, a documentação insuficiente de casos ressecados em outros períodos, impediu que esses fossem estudados. 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. A primeira delas é qual a importância desses biomarcadores na recorrência do carcinoma hepatocelular. Em segundo lugar, acredita-se que os mecanismos biomoleculares possam ser mais explorados em relação ao papel das células-tronco e da expressão de EpCAM e AFP na carcinogênese assim como de outros biomarcadores também envolvidos nesse processo.

Essa pesquisa reflete o resultado de grande esforço por parte da Equipe Multidisciplinar para o tratamento do CHC do Grupo de Fígado e Vias Biliares do IAG-UFMG, criada em 2011 que, aos poucos, tem conseguido sedimentar conhecimentos, definir condutas, estabelecer prioridades e estimular a investigação científica. Nesse contexto, pretende-se dar continuidade e desenvolver futuras pesquisas, agregando maior número de pacientes, com o intuito de contribuir para a melhor compreensão desse tipo de câncer na população brasileira.

7 CONCLUSÃO

Conclui-se que existe associação positiva entre a expressão imuno-histoquímica dos biomarcadores moleculares EpCAM e AFP, entre si, assim como com os níveis séricos de AFP. O diâmetro menor ou igual a cinco centímetros foi a variável que se associou à expressão de EpCAM. Enquanto a invasão angiolinfática esteve associada à expressão de AFP. Nenhuma das variáveis analisadas teve associação com a sobrevida dos pacientes.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 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> >.
- 2 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> >.
- 3 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> >.
- 4 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> >.
- 5 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> >.
- 6 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> >.
- 7 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> >.
- 8 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> >.
- 9 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> >.
- 10 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> >.

- 11 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> >.
- 12 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> >.
- 13 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> >.
- 14 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> >.
- 15 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> >.
- 16 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> >.
- 17 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> >.
- 18 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> >.
- 19 YAMASHITA, T. et al. Activation of hepatic stem cell marker EpCAM by Wnt-beta-catenin signaling in hepatocellular carcinoma. **Cancer Res**, v. 67, n. 22, p. 10831-9, Nov 2007. ISSN 1538-7445. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18006828> >.
- 20 YAMASHITA, T. et al. EpCAM and alpha-fetoprotein expression defines novel prognostic subtypes of hepatocellular carcinoma. **Cancer Res**, v. 68, n. 5, p. 1451-61, Mar 2008. ISSN 1538-7445. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18316609> >.

- 21 ARZUMANYAN, A. et al. Does the hepatitis B antigen HBx promote the appearance of liver cancer stem cells? **Cancer Res**, v. 71, n. 10, p. 3701-8, May 2011. ISSN 1538-7445. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21464043> >.
- 22 LIU, W. H. et al. Efficient enrichment of hepatic cancer stem-like cells from a primary rat HCC model via a density gradient centrifugation-centered method. **PLoS One**, v. 7, n. 4, p. e35720, 2012. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22558209> >.
- 23 OISHI, N.; WANG, X. W. Novel therapeutic strategies for targeting liver cancer stem cells. **Int J Biol Sci**, v. 7, n. 5, p. 517-35, 2011. ISSN 1449-2288. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21552419> >.
- 24 BOSEMAN FT, C. F., HRUBAN RH, THEISE ND, EDITORS. World Health Organization Classification of Tumours of the Digestive System. 4. Lyon: IARC; 2010. Tumours of the liver and intrahepatic bile ducts; pp. 195–262. In: (Ed.)
- 25 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> >.
- 26 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> >.
- 27 BAEUERLE, P. A.; GIRES, O. EpCAM (CD326) finding its role in cancer. **Br J Cancer**, v. 96, n. 3, p. 417-23, Feb 2007. ISSN 0007-0920. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17211480> >.
- 28 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> >.
- 29 MAETZEL, D. et al. Nuclear signalling by tumour-associated antigen EpCAM. **Nat Cell Biol**, v. 11, n. 2, p. 162-71, Feb 2009. ISSN 1476-4679. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19136966> >.
- 30 TRZPIS, M. et al. Epithelial cell adhesion molecule: more than a carcinoma marker and adhesion molecule. **Am J Pathol**, v. 171, n. 2, p. 386-95, Aug 2007. ISSN 0002-9440. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17600130> >.
- 31 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> >.

- 32 FERENCI, P. et al. World Gastroenterology Organisation Guideline. Hepatocellular carcinoma (HCC): a global perspective. **J Gastrointest Liver Dis**, v. 19, n. 3, p. 311-7, Sep 2010. ISSN 1842-1121. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20922197> >.
- 33 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> >.
- 34 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> >.
- 35 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> >.
- 36 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> >.
- 37 LI, Y. et al. Epithelial cell adhesion molecule in human hepatocellular carcinoma cell lines: a target of chemoresistance. **BMC Cancer**, v. 16, n. 1, p. 228, 2016. ISSN 1471-2407. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26984381> >.
- 38 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: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22045674> >.
- 39 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> >.
- 40 YEH, C. T. et al. CD133-positive hepatocellular carcinoma in an area endemic for hepatitis B virus infection. **BMC Cancer**, v. 9, p. 324, 2009. ISSN 1471-2407. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19744348> >.
- 41 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> >.

- 42 BAE, J. S. et al. Expression and role of epithelial cell adhesion molecule in dysplastic nodule and hepatocellular carcinoma. **Int J Oncol**, v. 41, n. 6, p. 2150-8, Dec 2012. ISSN 1791-2423. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22993038> >.
- 43 JAIN, D. Tissue diagnosis of hepatocellular carcinoma. **J Clin Exp Hepatol**, v. 4, n. Suppl 3, p. S67-73, Aug 2014. ISSN 0973-6883. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25755614> >.
- 44 ZHANG, Q. et al. Perinodular ductular reaction/epithelial cell adhesion molecule loss in small hepatic nodules. **World J Gastroenterol**, v. 20, n. 31, p. 10908-15, Aug 2014. ISSN 2219-2840. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25152593> >.
- 45 SALA, M. et al. Prognostic prediction in patients with hepatocellular carcinoma. **Semin Liver Dis**, v. 25, n. 2, p. 171-80, 2005. ISSN 0272-8087. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15918146> >.
- 46 SALA, M. [Early diagnosis of liver cancer]. **Gastroenterol Hepatol**, v. 28, n. 5, p. 292-7, May 2005. ISSN 0210-5705. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15871814> >.
- 47 CARR, B. I.; GUERRA, V. Erratum to: Low Alpha-Fetoprotein Levels Are Associated with Improved Survival in Hepatocellular Carcinoma Patients with Portal Vein Thrombosis. **Dig Dis Sci**, v. 61, n. 4, p. 1210, Apr 2016. ISSN 1573-2568. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26921077> >.
- 48 CARR, B. I.; GUERRA, V. Low Alpha-Fetoprotein Levels Are Associated with Improved Survival in Hepatocellular Carcinoma Patients with Portal Vein Thrombosis. **Dig Dis Sci**, v. 61, n. 3, p. 937-47, Mar 2016. ISSN 1573-2568. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26576554> >.
- 49 GASTL, G. et al. Ep-CAM overexpression in breast cancer as a predictor of survival. **Lancet**, v. 356, n. 9246, p. 1981-2, Dec 2000. ISSN 0140-6736. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11130529> >.
- 50 SPIZZO, G. et al. High Ep-CAM expression is associated with poor prognosis in node-positive breast cancer. **Breast Cancer Res Treat**, v. 86, n. 3, p. 207-13, Aug 2004. ISSN 0167-6806. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15567937> >.
- 51 GOSTNER, J. M. et al. Effects of EpCAM overexpression on human breast cancer cell lines. **BMC Cancer**, v. 11, p. 45, 2011. ISSN 1471-2407. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21281469> >.
- 52 SPIZZO, G. et al. EpCAM expression in primary tumour tissues and metastases: an immunohistochemical analysis. **J Clin Pathol**, v. 64, n. 5, p. 415-20, May 2011. ISSN 1472-4146. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21415054> >.

- 53 SPIZZO, G. et al. Overexpression of epithelial cell adhesion molecule (Ep-CAM) is an independent prognostic marker for reduced survival of patients with epithelial ovarian cancer. **Gynecol Oncol**, v. 103, n. 2, p. 483-8, Nov 2006. ISSN 0090-8258. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16678891> >.
- 54 PRINCE, S. et al. Expression of epithelial cell adhesion molecule in gallbladder carcinoma and its correlation with clinicopathologic variables. **Am J Clin Pathol**, v. 129, n. 3, p. 424-9, Mar 2008. ISSN 0002-9173. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18285265> >.
- 55 EICHELBERG, C. et al. Epithelial cell adhesion molecule is an independent prognostic marker in clear cell renal carcinoma. **Int J Cancer**, v. 132, n. 12, p. 2948-55, Jun 2013. ISSN 1097-0215. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23180689> >.
- 56 PATRIARCA, C. et al. Epithelial cell adhesion molecule expression (CD326) in cancer: a short review. **Cancer Treat Rev**, v. 38, n. 1, p. 68-75, Feb 2012. ISSN 1532-1967. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21576002> >.
- 57 SEBASTIAN, M. et al. Catumaxomab: a bispecific trifunctional antibody. **Drugs Today (Barc)**, v. 45, n. 8, p. 589-97, Aug 2009. ISSN 1699-3993. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19927225> >.
- 58 MARSCHNER, N. et al. Phase II study of the human anti-epithelial cell adhesion molecule antibody adecatumumab in prostate cancer patients with increasing serum levels of prostate-specific antigen after radical prostatectomy. **Urol Int**, v. 85, n. 4, p. 386-95, 2010. ISSN 1423-0399. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20606402> >.
- 59 SCHMIDT, M. et al. Phase IB study of the EpCAM antibody adecatumumab combined with docetaxel in patients with EpCAM-positive relapsed or refractory advanced-stage breast cancer. **Ann Oncol**, v. 23, n. 9, p. 2306-13, Sep 2012. ISSN 1569-8041. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22357251> >.
- 60 MCCAFFREY, A. P. et al. RNA interference in adult mice. **Nature**, v. 418, n. 6893, p. 38-9, Jul 2002. ISSN 0028-0836. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12097900> >.
- 61 LEWIS, D. L. et al. Efficient delivery of siRNA for inhibition of gene expression in postnatal mice. **Nat Genet**, v. 32, n. 1, p. 107-8, Sep 2002. ISSN 1061-4036. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12145662> >.
- 62 SIMON, M. et al. Epithelial cell adhesion molecule-targeted drug delivery for cancer therapy. **Expert Opin Drug Deliv**, v. 10, n. 4, p. 451-68, Apr 2013. ISSN 1744-7593. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23316711> >.
- 63 AJCC CANCER STAGING HANDBOOK. 7 ED. CHICAGO, I. **American Joint Committee on Cancer** 2010

9 ANEXOS

9.1 ANEXO 1 - Classificação TNM do Carcinoma Hepatocelular

T - O tumor primário

Tx - O tumor primário não pode ser avaliado

T0 - Não há evidência de tumor primário

T1 – Tumor único sem invasão vascular

T2 - Tumor único com invasão vascular ou múltiplos tumores, de no máximo 5 cm em sua maior dimensão

T3 - Múltiplos tumores maiores do que 5 cm ou tumor envolvendo um ramo principal da veia porta ou veia hepática (s)

T3a - Múltiplos tumores maiores do que 5 cm

T3b – Tumor único ou múltiplos tumores de qualquer diâmetro envolvendo um ramo principal da veia porta ou veia hepática (s)

T4 - Tumores 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

Estádio T N M

Estádio I T1 NO MO

Estádio II T2 NO MO

Estádio IIIA T3a NO MO

Estádio IIIB T3b 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 Imuno-histoquímica: EpCAM e AFP

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 laminas 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

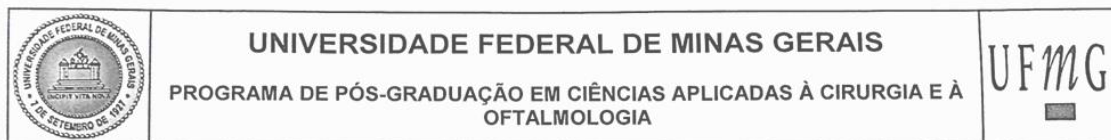
DECISÃO

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.

Profa. Maria Teresa Marques Amaral
Coordenadora do COEP-UFMG

9.4 ANEXO 4 – Folha de aprovação




FOLHA DE APROVAÇÃO

**EXPRESSÃO DOS BIOMARCADORES MOLECULARES EPCAM E
ALFATOPROTEÍNA NO CARCINOMA HEPATOCELULAR**

LEONARDO DO PRADO LIMA

Dissertação submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS APLICADAS À CIRURGIA E À OFTALMOLOGIA, como requisito para obtenção do grau de Mestre em CIÊNCIAS APLICADAS À CIRURGIA E À OFTALMOLOGIA.

Aprovada em 21 de junho de 2016, pela banca constituída pelos membros:



Prof(a). Vivian Resende - Orientadora
UFMG


Prof(a). Antônio Nodchi Kalil
UFCSA


Prof(a). Agnaldo Soares Lima
UFMG

Belo Horizonte, 21 de junho de 2016.

9.5 ANEXO 5 – Ata de defesa da dissertação

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

**ATA DA DEFESA DA DISSERTAÇÃO DO ALUNO
LEONARDO DO PRADO LIMA**

Realizou-se, no dia 21 de junho de 2016, às 14:00 horas, Auditório do Instituto Alfa - Hospital das Clínicas da UFMG, da Universidade Federal de Minas Gerais, a defesa de dissertação, intitulada *EXPRESSÃO DOS BIOMARCADORES MOLECULARES EPCAM E ALFAFETOPROTEÍNA NO CARCINOMA HEPATOCELULAR*, apresentada por LEONARDO DO PRADO LIMA, número de registro 2014659626, graduado no curso de MEDICINA, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em CIÊNCIAS APLICADAS À CIRURGIA E À OFTALMOLOGIA, à seguinte Comissão Examinadora: Prof(a). Vivian Resende - Orientador (UFMG), Prof(a). Antonio Nocchi Kalil (UFCSPA), Prof(a). Agnaldo Soares Lima (UFMG).

A Comissão considerou a dissertação:

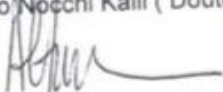
Aprovada

Reprovada

Finalizados os trabalhos, lavrei a presente ata que, lida e aprovada, vai assinada por mim e pelos membros da Comissão.
Belo Horizonte, 21 de junho de 2016.


Prof(a). Vivian Resende (Doutora)


Prof(a). Antonio Nocchi Kalil (Doutor)


Prof(a). Agnaldo Soares Lima (Doutor)