



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**FACULDADE DE MEDICINA**  
**DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA E MEDICINA LEGAL**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA**

**ANDRÉ COSTA TEIXEIRA**

**AVALIAÇÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA DOS MARCADORES DE ANGIOGÊNSE  
VEGF E ANGIOPOIETINA-2 EM CARCINOMA HEPATOCELULAR E LESÕES  
PRECURSORAS DE EXPLANTES DE PACIENTES CIRRÓTICOS**

**FORTALEZA**  
**2016**

**ANDRÉ COSTA TEIXEIRA**

**AVALIAÇÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA DOS MARCADORES DE ANGIOGÊNESE  
VEGF E ANGIOPOIETINA-2 EM CARCINOMA HEPATOCELULAR E LESÕES  
PRECURSORAS DE EXPLANTES DE PACIENTES CIRRÓTICOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Patologia.

Área de concentração: Patologia.

Orientador: Prof. Dr. Fábio Rocha  
Fernandes Távora

**FORTALEZA**

**2016**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

Universidade Federal do Ceará

Biblioteca de Ciências da Saúde

---

T264a Teixeira, André Costa.

Avaliação imuno-histoquímica dos marcadores de angiogênese VEGF e Angiopietina-2 em carcinoma hepatocelular e lesões precursoras de explantes de pacientes cirróticos/ André Costa Teixeira. – Fortaleza, 2016.

66 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Ceará. Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Patologia, Fortaleza, 2016.

Área de concentração: Patologia.

Orientação: Prof. Dr. Fábio Rocha Fernandes Távora.

1. Neoplasias Hepáticas. 2. Patologia Cirúrgica. 3. Transplante de Fígado. I. Título.

---

CDD 616.99436



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO**  
**FACULDADE DE MEDICINA**  
**DEPTO. DE PATOLOGIA E MEDICINA LEGAL**  
**MESTRADO EM PATOLOGIA**

ATA DA 196ª SESSÃO DE DEFESA PÚBLICA DE DISSERTAÇÃO DE **ANDRÉ COSTA TEIXEIRA**, REALIZADA PELO CURSO DE MESTRADO EM PATOLOGIA DO DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA E MEDICINA LEGAL, DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ, NO DIA 24 DE FEVEREIRO DE 2016.

Às oito horas e trinta minutos do dia vinte e quatro de fevereiro de dois mil e dezesseis, realizou-se a centésima nonagésima sexta sessão de defesa pública da dissertação de mestrado do aluno **ANDRÉ COSTA TEIXEIRA**, que apresentou trabalho intitulado: **“AVALIAÇÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA DOS MARCADORES DE ANGIOGÊNESE VEGF E ANGIOPOIETINA-2 EM CARCINOMA HEPATOCELULAR E LESÕES PRECURSORAS EM EXPLANTES DE PACIENTES CIRRÓTICOS”**. Compunham a banca examinadora os doutores: Fábio Rocha Fernandes Távora (Orientador/ Presidente), Ivelise Regina Canito Brasil (UECE), Paulo Roberto Carvalho de Almeida (UFC) e José Telmo Valença Junior (UFC). A sessão foi aberta pela Profª. Drª. Cristiane Cunha Frota, Vice-Coordenadora do Curso de Pós-Graduação em Patologia (área de concentração Patologia), que apresentou a banca examinadora e passou o trabalho de condução de defesa para o Presidente da Sessão, Prof. Dr. Fábio Rocha Fernandes Távora, orientador do mestrando. Após a exposição do trabalho pelo aluno, seguiu-se o processo de arguição. O primeiro examinador foi a Profª. Drª. Ivelise Regina Canito Brasil. Logo em seguida, procederam à arguição o Prof. Dr. Paulo Roberto Carvalho de Almeida e o Prof. Dr. José Telmo Valença Junior. Em seguida a banca examinadora se reuniu, reservadamente, a fim de avaliar o desempenho do candidato, e atribuiu o conceito APROVADO para o trabalho do aluno. Nada mais havendo a relatar, a sessão foi encerrada às 10:47, e a presente ata, depois de lida e aprovada, foi assinada por mim e pelos membros da banca examinadora. Fortaleza, 24 de fevereiro de 2016.

**BANCA EXAMINADORA**

  
**PROF. DR. FÁBIO ROCHA FERNANDES TÁVORA**  
**PRESIDENTE (ORIENTADOR)**

  
**PROFª. DRª. IVELISE REGINA CANITO BRASIL**  
**EXAMINADORA (UECE)**

  
**PROF. DR. PAULO ROBERTO CARVALHO DE ALMEIDA**  
**EXAMINADOR (UFC)**

  
**PROF. DR. JOSÉ TELMO VALENÇA JUNIOR**  
**EXAMINADOR (UFC)**

  
**PROFª. DRª. CRISTIANE CUNHA FROTA**  
**VICE-COORDENADORA**

  
**VALÉRIA CORDEIRO DE OLIVEIRA**  
**SECRETÁRIA**

A meus pais, Dênio e Lúcia Helena, por todo carinho, amor e compreensão ao aceitarem minhas escolhas.

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, por me dar forças para viver momentos tão especiais em minha vida, aprender com meus erros e seguir meus próprios caminhos.

À minha família; meus pais, Dênio e Lúcia Helena, e minha irmã Sílvia, por estarem sempre ao meu lado respeitando minhas escolhas, tolerando minhas ausências e torcendo incondicionalmente pelo meu sucesso e meu crescimento como ser humano.

Ao meu orientador, chefe e amigo, Dr. Fábio Távora, pelo exemplo de profissional que é, por sua garra e por me inspirar a ter coragem para enfrentar as dificuldades impostas pelo cotidiano.

À Universidade Federal do Ceará, em especial à equipe do Programa de Pós-Graduação em Patologia e aos meus colegas do mestrado, por me acolher como seu aluno e me dar as condições necessárias para aprimorar meus conhecimentos na área acadêmica.

Ao Centro Universitário UNICHRISTUS, pelo apoio financeiro para a realização de meus experimentos e por me dar a oportunidade de descobrir a paixão pela docência.

A toda a equipe do Laboratório de Patologia ARGOS, em especial à Dra. Alba Fabíola, pelo auxílio fundamental que me prestaram ao longo da realização dos experimentos desta pesquisa.

Aos meus amigos, colegas e companheiros Ronaldo Ventura, Juliana Magalhães, Carlos Eduardo Lima, João Paulo Fontenele, Cleto Nogueira, Igor Costa e Daniel Araújo, por me darem apoio constante e ânimo nos momentos em que mais precisei nestes 3 anos em que moro na capital cearense.

**“Hoje me sinto mais forte, mais feliz, quem sabe?  
Só levo a certeza de que muito pouco eu sei”**

Trecho da música *Tocando em Frente*  
(Almir Sater e Renato Teixeira)

## RESUMO

O carcinoma hepatocelular (CHC) constitui um problema de saúde global e está relacionado a hepatopatias crônicas em fase de cirrose. Esta neoplasia é geralmente precedida por lesões precursoras denominadas nódulos displásicos de baixo grau (LGDN) e alto grau (HGDN), os quais por sua vez são provenientes dos nódulos regenerativos (NR) típicos da cirrose. Este trabalho avaliou a expressão imuno-histoquímica dos marcadores VEGF e Angiopietina-2 no CHC e nas lesões precursoras de explantes de pacientes cirróticos transplantados no Hospital Geral de Fortaleza nos anos de 2013 a 2015, correlacionando esta expressão a outros parâmetros de angiogênese e prognósticos. Foram incluídos no estudo 107 nódulos de 67 pacientes com CHC e/ou lesões precursoras para confecção de “tissue microarray” (TMA). Não houve diferenças demográficas entre os pacientes com CHC e nódulos displásicos ou regenerativos. O marcador Angiopietina-2 apresentou diferença de imunoexpressão entre as classes de nódulos ( $p < 0,0001^*$ ), sendo maior nos pacientes com CHC. Os marcadores VEGF e Angiopietina-2 mostraram correlação significativa entre si ( $p=0,006$ ) e com outros parâmetros, tais como número de artérias ( $p=0,03$  para VEGF) e positividade à imuno-histoquímica para CD34 ( $p < 0,0001$  para VEGF e  $p = 0,007$  para Ang-2). Não houve associação entre os marcadores avaliados e parâmetros utilizados para determinação de estadiamento e prognóstico do CHC, tais como tamanho, número de lesões no explante e grau histológico. A Angiopietina-2 apresentou sensibilidade de 54% e especificidade de 96,25% para o diagnóstico de malignidade, enquanto o VEGF apresentou sensibilidade de 69,23% e especificidade de 31,25%. Nosso estudo mostrou que a angiopietina-2 representa um bom marcador para o diagnóstico do



CHC quando comparado aos que são utilizados atualmente, enquanto o VEGF, embora tenha apresentado correlação com parâmetros prognósticos em outros estudos, não se mostra um bom marcador por sua baixa especificidade. Por fim, os dados reforçam a importância de melhor avaliação da angiogênese no desenvolvimento do CHC e seu papel no diagnóstico anatomopatológico destas lesões.

Palavras-chave: carcinoma hepatocelular, Imuno-histoquímica, VEGF, Angiopietina-2.

## ABSTRACT

Hepatocellular carcinoma (HCC) is a global health problem and is associated with chronic liver disease, especially in the cirrhotic phase. This tumor can be preceded by precursor lesions, namely low and high grade dysplastic nodules, and regenerative nodules, typical of cirrhosis. The current study evaluated the immunohistochemical expression of VEGF and angiopoietin-2 in HCC and precursor lesions in a single institution series of liver explants between 2013-2015 using tissue microarray methods. Immunohistochemical variables were correlated with angiogenesis and prognostic parameters. 107 nodules from 67 patients were studied, including 26 HCC and 5 dysplastic nodules. There was no significant epidemiologic difference between HCC, dysplastic nodules and regenerative nodule groups. Angiopoietin-2 was significantly more expressed in HCC nodules when compared with regenerative lesions ( $p < 0,0001^*$ ). VEGF and Ang-2 expression correlated with each other ( $p=0,006$ ) and with number of unpaired arteries within nodules ( $p=0,03$  – VEGF) and with the percentage of CD34 positive sinusoids ( $p < 0,0001$  – VEGF and  $p < 0,007$  – Ang-2). There was no significant correlation between any of the immunohistochemical parameters with clinical staging, number of gross lesions and histologic grade in cases of HCC. Angiopoietin-2 had a sensitivity of 54% and 96,25% of specificity for HCC diagnosis, and VEGF had a sensitivity of 69,23% and specificity of 31,25%. Our study shows that Ang-2 may be a good marker for HCC diagnosis when compared to others that are routinely used for this purpose. VEGF is not a good marker due to its lack of specificity, although other studies showed that it may be associated with prognostic parameters. Finally, our data reinforce the importance of angiogenesis evaluation in the development of HCC and its potential applicability as a diagnostic tool.

Keywords: hepatocellular carcinoma, Immunohistochemistry, VEGF, Angiopoietin-2.

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO .....	12
2 OBJETIVOS .....	21
2.1 Geral.....	21
2.2 Secundários .....	21
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	22
3.1 Seleção e preparo da amostra .....	22
3.2 Avaliação de parâmetros imuno-histoquímicos .....	25
3.3 Análise dos dados .....	27
3.4 Aspectos Éticos.....	28
4 RESULTADOS .....	29
4.1 Dados clínicos e epidemiológicos .....	29
4.2 Avaliação dos marcadores VEGF, Ang-2, CD34 e Actina de músculo liso .....	32
5 DISCUSSÃO .....	45
6 CONCLUSÃO.....	55
REFERÊNCIAS.....	56
APÊNDICE 1 – TABELA DE DADOS EPIDEMIOLÓGICOS BRUTOS.....	64
ANEXO 1 – APROVAÇÃO PELO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA.....	66

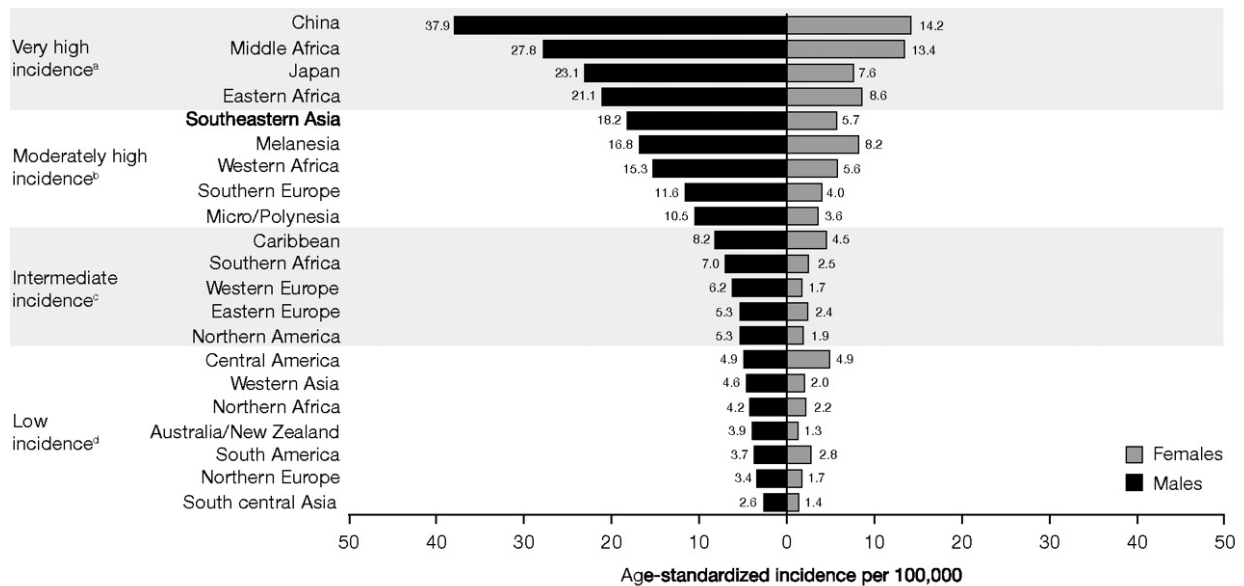
## 1 INTRODUÇÃO

O Carcinoma Hepatocelular (CHC) é definido como uma neoplasia maligna primária do fígado, composta por células de fenótipo hepatocitário, e constitui um problema de saúde global, posto que representa a terceira maior causa de morte por câncer e a sexta neoplasia maligna mais comum no mundo (Rahbari *et al.*, 2011). Sabe-se que a cirrose, principalmente quando relacionada a hepatites virais B e C, é um dos principais fatores de risco para o desenvolvimento desta neoplasia, sendo que 1 a 6% dos pacientes cirróticos apresentam evolução para CHC. A progressão da doença é usualmente rápida, com prognóstico desfavorável em curto prazo quando não tratado (Gomes *et al.*, 2013).

A distribuição do CHC varia de acordo com a localização geográfica (Gráfico 1). A prevalência da doença é maior em áreas onde a infecção pelo vírus da Hepatite B (HBV) é endêmica (8% ou mais da população acometida), como na África Subsaariana e na Ásia Oriental, com taxas de incidência superiores a 20 por 100.000 indivíduos. Países mediterrâneos, como Itália, Espanha e Grécia, têm incidências intermediárias entre 10-20 por 100.000 habitantes, enquanto na América, inclusive no Brasil, a incidência é relativamente baixa (menos de 5 casos por 100.000 habitantes) (Gomes *et al.*, 2013). A faixa etária acometida pela doença varia conforme o tipo de hepatite viral dominante na população e a idade na qual ela é adquirida, sendo que no Brasil acomete preferencialmente indivíduos adultos infectados pelo vírus da hepatite C (Venook *et al.*, 2010).

O diagnóstico do CHC é efetuado com base na suspeita clínica em pacientes que apresentem fatores de risco e a avaliação se dá por meio de exames radiológicos e dosagem sérica de alfa-fetoproteína (AFP). Exames como ressonância magnética e tomografia computadorizada permitem a presunção diagnóstica do CHC com base na avaliação da vascularização, a qual apresenta padrão característico em lesões estabelecidas. Em mais de 1/3 dos pacientes, o CHC é multifocal, definido pela presença de nódulos tumorais separados por parênquima não neoplásico, sendo que a multifocalidade pode ocorrer devido ao desenvolvimento de tumores hepáticos independentes ou a metástases intra-hepáticas de um tumor primário (Feo e Pascale, 2015)

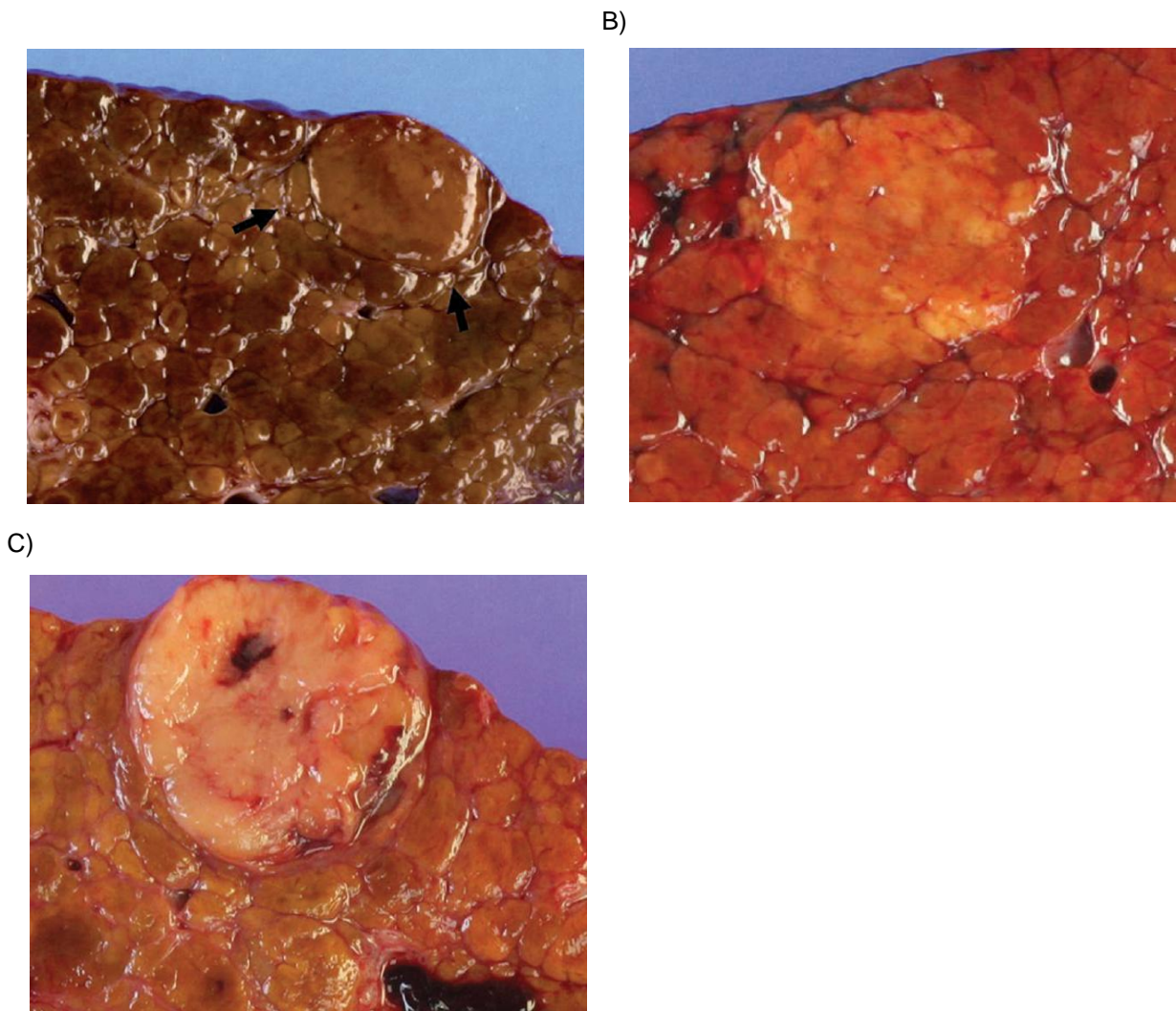
Gráfico 1 - Panorama epidemiológico global do Carcinoma Hepatocelular.



Fonte: (Venook *et al.*, 2010).

Sabe-se que o desenvolvimento de uma neoplasia resulta de uma série de alterações sequenciais na arquitetura tecidual e na programação genética celular, o que também tem sido observado para casos de CHC por meio de estudos de carcinogênese em modelos animais. Isto tem implicado no reconhecimento de lesões pré-neoplásicas, as quais podem ser detectadas antes do desenvolvimento de neoplasias invasivas (Mion *et al.*, 1996). Sendo assim, o CHC que se desenvolve no fígado cirrótico é comumente precedido por lesões pré-neoplásicas, denominadas nódulos displásicos (ND) (Blanc *et al.*, 2004; Kojiro, 2004; Caroli-Bottino *et al.*, 2005; Park, 2011; Sato *et al.*, 2015). Macroscopicamente, os nódulos displásicos constituem nódulos que medem mais de 1,0 mm e menos de 2,0 cm (Figura 1) e que, microscopicamente, caracterizam-se pela presença de displasia (grandes e/ou pequenas células) (Le Bail *et al.*, 1997), porém sem outros critérios definidores de malignidade, tais como infiltração do parênquima adjacente e invasão vascular. Conforme nomenclatura padronizada os nódulos displásicos são subclassificados em nódulo displásico de baixo grau (LGDN) e nódulo displásico de alto grau (HGDN) (Party, 1995).

Figura 1 - Aspectos macroscópicos do carcinoma hepatocelular e do nódulo displásico. A) Nódulo displásico; B) Carcinoma hepatocelular precoce; C) Carcinoma hepatocelular avançado.



Fonte: (Park, 2011).

Na análise microscópica, nódulos displásicos de baixo grau mostram atipia nuclear leve e podem ser confundidos com macronódulos regenerativos no contexto da cirrose, os quais exibem morfologia análoga aos nódulos cirróticos adjacentes, sendo que ambas as lesões não apresentam risco elevado de progressão para CHC (Hytioglou *et al.*, 1995; Blanc *et al.*, 2004). Ao contrário, nódulos displásicos de alto grau apresentam risco estabelecido de progressão a carcinoma, sendo caracterizados microscopicamente por maior densidade celular em relação ao parênquima adjacente e maior grau de displasia. Deste modo, eles possuem similaridades com o CHC em sua fase precoce (Wei e Shi, 2006; Desmet, 2009).

A próxima lesão do espectro de evolução consiste no próprio CHC, que pode se manifestar nas suas formas precoce e avançada. A transição do nódulo displásico de alto grau para a lesão maligna em sua fase precoce pode ocorrer pelo desenvolvimento de um “nódulo no nódulo”, em que se nota um subnódulo com menor grau de diferenciação em relação à lesão nodular maior (Kojiro, 2004; Kobayashi *et al.*, 2006).

CHCs precoces são um estágio incipiente do desenvolvimento do CHC, semelhante a carcinomas *in situ* e microinvasivos em outros órgãos. Já os CHCs avançados são lesões claramente malignas com habilidade de invadir vasos e metastatizar. As alterações macroscópicas e histológicas são variáveis, dependendo em parte do tamanho da lesão (Kojiro e Roskams, 2005). Os CHCs avançados geralmente são lesões nodulares distintas com margens bem definidas, enquanto as lesões precoces apresentam aspecto vagamente nodular e não comprimem o parênquima adjacente. Ao contrário do CHC precoce, que cresce e gradativamente toma o lugar do parênquima, o CHC avançado geralmente substitui e destrói o parênquima adjacente, sendo caracteristicamente circundado por cápsula fibrosa, podendo ainda apresentar septos fibrosos internos. Histologicamente, cerca de 80% dos CHCs em fase avançada são moderadamente diferenciados, sendo os 20% restantes divididos entre bem e pouco diferenciados, que representam graus de diferenciação estabelecidos na classificação corrente da OMS (Bosman *et al.*, 2010). As alterações arquiteturais mais comumente observadas incluem espessamento das trabéculas de hepatócitos, arranjos glandulares e pseudoacinares e padrão sólido compacto.

Poucas são as alterações clínico-radiológicas e anatomopatológicas características do CHC na sua fase inicial, de modo que nódulos hepatocelulares menores que 2,0 cm apresentam-se como grande desafio diagnóstico para clínicos, cirurgiões, radiologistas e patologistas (Caroli-Bottino *et al.*, 2005; Roncalli *et al.*, 2011). A capacidade dos exames de imagem é limitada para fazer o diagnóstico diferencial entre o CHC precoce e as lesões pré-neoplásicas neste estágio, tendo em vista o fato de estas lesões não apresentarem o padrão de vascularização classicamente associado a malignidade (Choi, Lee e Sirlin, 2014). Deste modo, há a necessidade de novos marcadores que possibilitem um melhor diagnóstico e condução dos pacientes, uma vez que um melhor prognóstico é atingido quando o CHC é descoberto na sua fase inicial (Nascimento *et al.*, 2009).



O diagnóstico anatomopatológico diferencial entre o CHC e suas lesões precursoras constitui um desafio mesmo para patologistas experientes, especialmente em biópsias por agulha que objetivam diferenciar casos de Nódulos displásicos de alto Grau e CHCs bem diferenciados. Os consensos recentes para o manejo do HCC enfatizam a necessidade de se identificarem características de malignidade em nódulos pequenos por meio da avaliação histopatológica e marcadores que possam estar associados a um comportamento mais agressivo da neoplasia (Rahbari *et al.*, 2011). Deste modo, o diagnóstico diferencial entre o CHC e as lesões precursoras tem sido crescentemente requisitado por hepatologistas e cirurgiões. Atualmente, o diagnóstico está baseado em alterações morfológicas conforme protocolo da OMS (Bosman *et al.*, 2010), as quais são suplementadas por colorações especiais (Reticulina e Masson) e pela avaliação imuno-histoquímica da vascularização dos nódulos (Quaglia *et al.*, 2005; Wei e Shi, 2006). Novos marcadores de imuno-histoquímica tem sido gradativamente empregados, como o painel Glypican-3, HSP-70 e Glutamina-Sintetase. Quando uma lesão suspeita apresenta positividade para 2 destes 3 marcadores, há uma sensibilidade superior a 70% para diagnóstico do CHC (Park, 2011), uma vez que moléculas como o Glypican-3, oncoproteína fetal membro da família heparan sulfato de proteoglicanos, possui expressão silenciada em tecidos adultos e comumente aumentada em lesões malignas hepatocitárias (Libbrecht *et al.*, 2006; Filmus e Capurro, 2013).

Sabe-se que a progressão tumoral envolve diversas alterações no hepatócito e no microambiente, buscando criar condições para o crescimento e progressão da neoplasia. A angiogênese, fenômeno responsável pela formação de novos vasos sanguíneos, apresenta fundamental papel na hepatocarcinogênese. A angiogênese é um processo fundamental envolvido em diversos quadros fisiopatológicos, como embriogênese e reparo tecidual. Quando há o crescimento desordenado de novos vasos, a angiogênese adquire caráter patológico e propicia um microambiente favorável à progressão neoplásica, havendo o fornecimento de nutrientes e oxigênio para o crescimento das células tumorais (Yu *et al.*, 2010; Brunckhorst *et al.*, 2014).

Histologicamente, a desordem na angiogênese no contexto do desenvolvimento do CHC é caracterizada pela presença de artérias desemparelhadas e por aumento da capilarização sinusoidal. As artérias desemparelhadas são isoladas, ou seja, não estão acompanhadas por ramos da veia porta ou ductos biliares, sendo melhor detectadas ao exame de imuno-

histoquímica para actina de músculo liso. Estas artérias estão comumente ausentes em nódulos cirróticos e podem estar presentes em alguns nódulos displásicos, porém são mais observadas no CHC (Nascimento *et al.*, 2009). A capilarização sinusoidal, representada pela aquisição de um fenótipo capilar pelo endotélio dos sinusoides e pela positividade à imuno-histoquímica para o marcador CD34, é mínima em nódulos cirróticos e nódulos displásicos, sendo sucessivamente mais proeminente em nódulos displásicos de alto grau e no CHC (Paschoal *et al.*, 2014). Concomitante a estas alterações, o número de espaços-porta progressivamente diminui com o aumento do grau da lesão (Segatelli *et al.*, 2014). O número de espaços-porta é normal em nódulos regenerativos (NR) e nódulos displásicos de baixo grau, e reduzido em nódulos displásicos de alto grau e nos CHCs precoces, sendo habitualmente ausentes em CHCs avançados. Fisiologicamente, a diminuição do número de espaços-porta causa uma redução gradual do fluxo arterial e venoso portal ao nódulo, enquanto a formação de neoartérias aumenta o fluxo arterial. O balanço é tal que na fase precoce da hepatocarcinogênese há uma diminuição do fluxo arterial intranodular e preservação do fluxo venoso portal, enquanto, nas fases avançadas, o fluxo portal diminui e eventualmente torna-se ausente, ao contrário do fluxo arterial, que tende a aumentar (Choi, Lee e Sirlin, 2014). Deste modo, nódulos displásicos de baixo grau usualmente apresentam um perfil vascular preservado em relação ao fígado cirrótico adjacente. Nódulos displásicos de alto grau e CHCs em fase precoce tendem a ter fluxo arterial e venoso portal diminuídos, enquanto CHCs avançados apresentam fluxo arterial aumentado e fluxo venoso ausente. Com o crescimento tumoral além de 5,0cm e progressão para o CHC pouco diferenciado, o fluxo arterial tende a diminuir.

É consenso que o papel da angiogênese no CHC encontra-se relacionado a diversos fatores, destacando-se aqueles ligados à via do Fator Hipóxia-Induzido HIF-VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*), bem como às angiopoietinas (Felcht *et al.*, 2012; Rahimi, 2012).

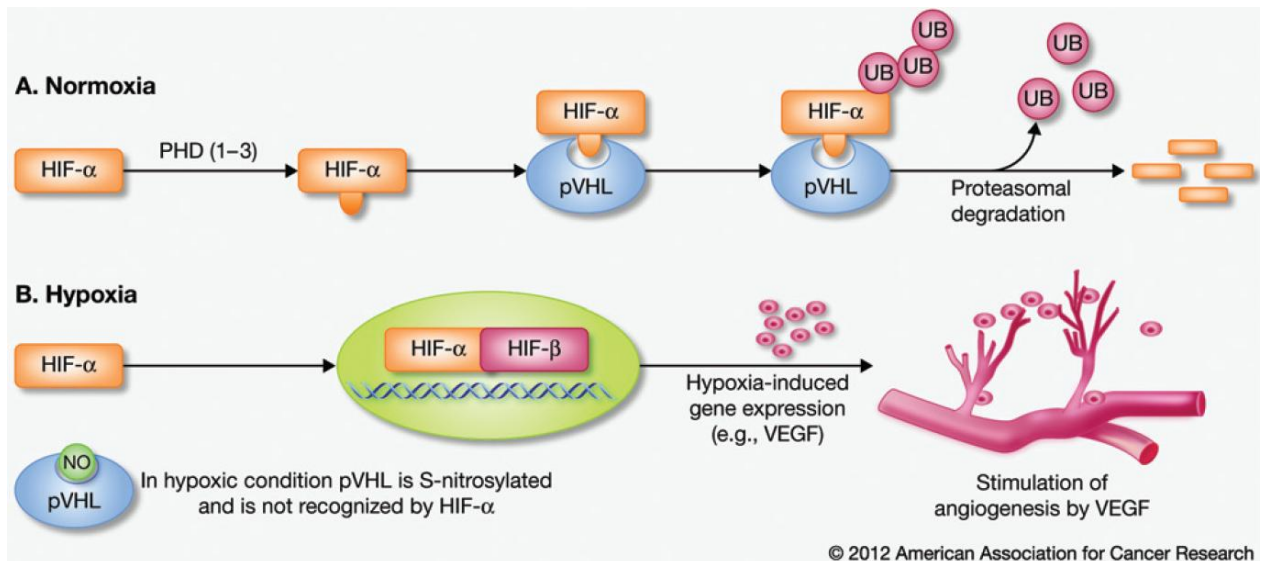
O Fator Hipóxia-induzido (HIF-1) é um fator de transcrição heterodimérico composto por duas subunidades (alfa e beta). A subunidade alfa, regulada pela concentração de oxigênio na célula, determina a atividade do HIF-1, ativando a síntese de uma série de mediadores que podem aumentar a sobrevivência de células tumorais sob condição de hipóxia (Figura 2), como VEGF, IGF (*Insulin Growth Factor*), NO sintase, PDGF (*Platelet Derived Growth Factor*), dentre outros

(Huang, Yang e Lu, 2005; Zello, Jovin e Huang, 2007; Huang *et al.*, 2014; Tian *et al.*, 2015). Com isso, o HIF-1 $\alpha$  apresenta importante papel na progressão tumoral (Rahimi, 2012; Wang, B. *et al.*, 2014).

O fator de crescimento derivado do endotélio vascular (VEGF) é o fator angiogênico mais bem estudado no CHC. Seu efeito angiogênico é atingido por meio da ligação aos receptores VEGFR1 e VEGFR2, presentes nas células endoteliais. Essa interação inicia várias vias de sinalização, como AKT/PIKE3 e MAPK, resultando em proliferação, migração e invasão por células endoteliais (Yu *et al.*, 2010). Estudos recentes demonstram que há expressão de VEGFR também nas células tumorais, sugerindo uma alça autócrina de regulação, sendo que o VEGF pode atuar diretamente nestas células, ativando mecanismos ligados à multiplicação celular. Além disso, ele pode contribuir de forma independente da angiogênese na invasão celular, induzindo perda de canalículos e ruptura de junções intercelulares nas células tumorais (Zhan, Qian e Yu, 2013; Akin Kabalak *et al.*, 2015).

As angiopoietinas constituem um grupo de mediadores que possuem papel direto na formação de novos vasos. A angiopoietina-1 (Ang-1) promove sinais de sobrevivência nas células endoteliais e promove o recrutamento de pericitos e células musculares lisas para formar vasos maduros, enquanto a angiopoietina-2 (Ang-2) funciona como um antagonista da Ang-1, aumentando a sensibilidade das células endoteliais a outros fatores angiogênicos, como o VEGF (Brunckhorst *et al.*, 2014). A angiopoietina 2 é uma molécula sintetizada pela própria célula endotelial e apresenta ação autócrina, `desestabilizando` a estrutura do vaso neoformado e facilitando ação de outras citocinas. Altos níveis de deste marcador são detectados em tecidos tumorais e no parênquima adjacente, estando associados a parâmetros clinicopatológicos relacionados ao CHC (Felcht *et al.*, 2012).

Figura 2 - Papel da expressão do VEGF no processo de angiogênese tumoral e sua relação com o HIF-alfa.



Fonte: (Rahimi, 2012)

As opções para o tratamento do CHC geralmente envolvem abordagens como ressecção cirúrgica lesão e quimioembolização (Rahbari *et al.*, 2011). Além disso, pode optar-se pelo transplante hepático como opção terapêutica para pacientes que apresentem deterioração acentuada da função hepática e contraindicações para a ressecção cirúrgica das lesões, conforme apregoadado pelos critérios de Milão. O transplante hepático promove uma ressecção oncológica completa associada à correção da disfunção associada. As experiências iniciais resultaram em prognóstico reservado no pós-transplante, sendo que as altas taxas de recorrência foram atribuídas à seleção inadequada dos pacientes. De acordo com os critérios de Milão, são candidatos ao transplante hepático aqueles pacientes com tumor único apresentando 5,0cm ou menos de maior diâmetro ou com no máximo de 3 lesões, nenhuma delas com mais de 3,0cm. Após o emprego destes critérios, houve aumento substancial dos índices de sobrevida global e sobrevida livre de doença (Onaca *et al.*, 2007; Gomes *et al.*, 2013; Ravaioli *et al.*, 2014).

A adequada avaliação anatomopatológica das lesões hepáticas neoplásicas/pré-neoplásicas pode evitar transplantes precoces em pacientes cirróticos devido a um diagnóstico clínico-radiológico errôneo de malignidade, bem como priorizar corretamente aqueles com diagnóstico de CHC (Quaglia *et al.*, 2005; Zhan, Qian e Yu, 2013).

Apesar dos crescentes avanços em relação à compreensão da patogênese do CHC, há a necessidade de melhor avaliação de marcadores que possam ser úteis no diagnóstico de nódulos hepáticos e que sejam acessíveis ao patologista em sua prática por meio de métodos cotidianos como a imuno-histoquímica (Deli *et al.*, 2005). Devem ainda ser estudadas as associações destes marcadores com outros parâmetros utilizados para o diagnóstico do CHC e sua expressão em diversos grupos de pacientes. O estudo descrito a seguir busca atender a esta demanda, testando métodos reprodutíveis em uma série de casos de nódulos hepatocelulares em paciente com cirrose estabelecida. Tenta-se, desse modo, contribuir para o entendimento dessas lesões e determinar como as alterações morfológicas e de expressão proteica podem ajudar em sua avaliação.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Geral**

- Avaliar a expressão imuno-histoquímica dos marcadores VEGF e Angiopoietina-2 no Carcinoma hepatocelular e em lesões precursoras presentes em explantes de pacientes cirróticos transplantados no Hospital Geral de Fortaleza (HGF) de Fevereiro de 2013 a Janeiro de 2015.

### **2.2 Secundários**

- Avaliar os aspectos clínicos e epidemiológicos dos pacientes transplantados com diagnóstico de Carcinoma hepatocelular e suas lesões precursoras no Hospital Geral de Fortaleza no período considerado.

- Correlacionar a expressão dos marcadores ligados à angiogênese (VEGF e Angiopoietina-2) a outros marcadores classicamente utilizados para esta avaliação, ou seja, número de artérias não pareadas e positividade para CD34.

- Correlacionar a expressão dos marcadores VEGF e Angiopoietina-2 a parâmetros de avaliação anatomopatológica do CHC, tais como tamanho da lesão e grau histológico.

### **3 MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1 Seleção e preparo da amostra**

Trata-se de um estudo observacional analítico do tipo transversal, que utilizou como amostra 67 explantes hepáticos referentes aos transplantes realizados em pacientes cirróticos no Hospital Geral de Fortaleza no período compreendido entre Fevereiro de 2013 e Janeiro de 2015, independente da etiologia.

Foram incluídos no estudo todos os explantes de pacientes com diagnóstico de cirrose confirmado por meio do exame anatomopatológico. Excluíram-se do estudo explantes de pacientes pediátrico, retransplantes e pacientes com hepatopatias agudas.

Conforme protocolo da equipe de transplante hepático, todos os fígados foram enviados para análise macroscópica e histopatológica no serviço de referência contratado. Excluíram-se do estudo pacientes transplantados por disfunção aguda do enxerto ou outras causas não relacionadas a cirrose.

Os dados clínicos de cada um dos pacientes incluídos no estudo foram obtidos por meio de revisão das solicitações de exame anatomopatológico enviadas pelo Serviço de Transplante Hepático do HGF, conforme autorização prévia da chefia do serviço. As variáveis clínico-epidemiológicas estudadas foram: idade, gênero e etiologia da hepatopatia.

Os fígados explantados foram criteriosamente submetidos a uma avaliação macroscópica inicial. Resumidamente, realizaram-se cortes seriados em toda a extensão do órgão, com espessura padronizada de 0,5 cm. Por meio destes cortes, avaliou-se a superfície do parênquima, registrando-se o padrão de nodularidade, coloração e consistência do órgão, o aspecto dos vasos e vias biliares, bem como a presença de lesões nodulares suspeitas conforme revisão na literatura, isto é, aquelas lesões maiores que 0,5 cm e que apresentavam aspecto macroscópico diferente dos demais nódulos, tendo como base parâmetros como coloração, textura e padrão de crescimento (Park, 2011).

Foram realizados 3 cortes de áreas diversas em cada lobo (direito e esquerdo) para avaliação histopatológica, além de vasos hilares, cápsula, ligamento redondo e vesícula biliar. Quando se observaram lesões nodulares suspeitas, elas

também foram representadas, sempre respeitando a proporção de 1 corte para cada centímetro de lesão. O material foi processado por meio de inclusão em parafina e cortes seriados em micrótomo, sendo posteriormente corado pela coloração padrão de Hematoxilina-Eosina (HE) e pelas colorações especiais de Tricrômio de Masson, Perls e PAS. O diagnóstico anatomopatológico das lesões nodulares e sua descrição no laudo foram efetuados tendo como base critérios padronizados por consenso internacional para avaliação destas lesões (Tabela 1). Para pacientes com o diagnóstico de CHC, foram avaliados ainda parâmetros classicamente utilizados para esta neoplasia, tais como presença de cápsula, número de lesões, invasão vascular e grau de Edmonson & Steiner (El-Serag e Rudolph, 2007).

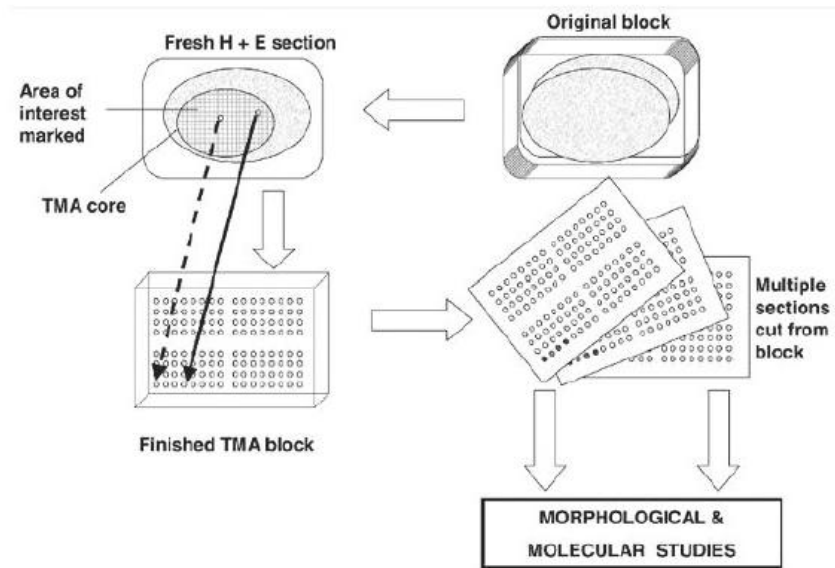
Os autores selecionaram, para cada explante de paciente cirrótico, blocos de parafina contendo cortes histológicos de nódulos regenerativos típicos da cirrose (1 ou 2 blocos de parênquima nodular cirrótico sem lesões suspeitas) e de lesões suspeitas ou positivas para malignidade, sempre que elas estiveram presentes (1 bloco para cada lesão.). Quando mais de uma lesão foi suspeita detectada no mesmo explante, selecionou-se 1 bloco para cada uma delas.

Os blocos selecionados foram encaminhados para realização de Tissue Microarray (TMA), realizado manualmente. Com um conceito extremamente simples, o TMA consiste em agrupar um grande número de amostras teciduais de vários blocos em um único bloco de parafina, permitindo o estudo de expressão de marcadores moleculares em larga escala com grande aproveitamento do material arquivado, do tempo e dos custos (Figuras 3 e 4).

Após confecção de Tissue Microarray (TMA) com os blocos selecionados, realizou-se o exame imuno-histoquímico para os marcadores CD34, Actina de músculo liso, VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) e Angiopietina-2.

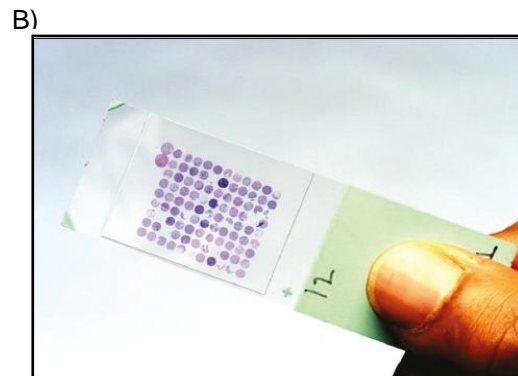
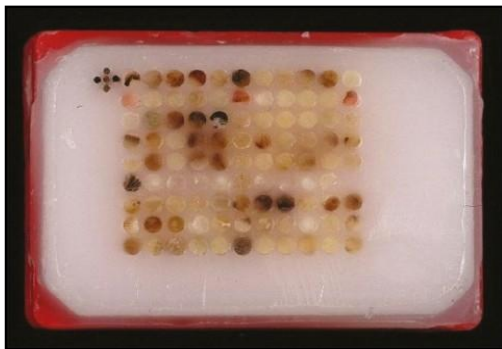


Figura 3 - Desenho esquemático ilustrando a técnica para confecção do Tissue Microarray (TMA).



Fonte: Adaptado de Jawhar, 2009.

Figura 4 - A) Exemplo de bloco de parafina de TMA; B) Lâmina de TMA corada em HE.



Fonte:(Jawhar, 2009).

Tabela 1 - Critérios morfológicos utilizados para o diagnóstico do carcinoma hepatocelular e de suas lesões precursoras.

Diagnóstico	Nódulo regenerativo	Nódulo displásico de baixo grau	Nódulo displásico de alto grau	Carcinoma hepatocelular
<b>Características citológicas</b>				
Alteração de pequenas células	-	-	+	+
Alteração de grandes células	+ OU -	+ OU -	+ OU -	-
Focos clonais	-	-	+	+
<b>Características arquiteturais</b>				
Espessamento de trabéculas superior a 3 céls.	-	-	-	+
Aumento da densidade celular	-	-	+	+
Pseudoglândulas	-	-	+ OU -	+
Nódulo em nódulo	-	-	-	+ OU -
Espaços-porta	+	+	+	+ OU -
Artérias não emparelhadas e capilarização	-	+ OU -	+ OU -	+
Invasão estromal	-	-	-	+
Trama reticulínica	+	+	+	+ OU -

Fonte: adaptado de Party, 1995.

### 3.2 Avaliação de parâmetros imuno-histoquímicos

O estudo imuno-histoquímico dos nódulos foi realizado por meio de cortes de parafina dos blocos contendo o TMA, seguindo técnica manual padronizada para este método. As técnicas para cada anticorpo foram realizadas de acordo com as instruções do fabricante. Resumidamente, cortes histológicos foram aquecidos por 30 min em 60°C, resfriados a temperatura ambiente, desparafinizados e reidratados. A recuperação de antígenos foi feita pelo aquecimento das amostras em tampão de citrato (pH 6.1) até fervura (100°C), seguido de esfriamento a temperatura ambiente. A coloração imuno-histoquímica foi feita usando métodos de cromogênios padrão de polímeros. Após bloquear a atividade endógena de peroxidase, os anticorpos

primários foram adicionados. Depois disso, os cortes foram incubados com o polímero de marcação. A reação foi completada com sistema de enzima-substrato que se utilizou de diaminobenzidina (DAB) como cromógeno. O tecido foi corado com Hematoxilina de Mayer em PBS com pH 7.4. O bloqueio do tecido foi realizado concomitantemente pela incubação de PBS contendo solução de triton X-100 a 1%, soro de caprino normal a 3% e albumina sérica de bovino normal a 1%.

Todas as lâminas foram coradas com os seguintes anticorpos e avaliadas conforme explicitado abaixo:

**- Angiopietina-2 (Santa Cruz®, USA), Clone H11, Titulação 1:100, marcação de membrana e citoplasma.**

Avaliação: determinação de porcentagem de sinusoides e vasos intranodais com endotélio apresentando marcação positiva em toda a extensão de cada secção do TMA. Não foram avaliados espaços-porta e vasos da interface com o parênquima não neoplásico.

**- VEGF (Santa Cruz®, USA), Clone JH121, Titulação 1:250, marcação de membrana citoplasmática.**

Avaliação: de escore 0 a 300, calculado por meio da multiplicação do percentual de células hepatocitárias com marcação positiva pela intensidade desta marcação (1+, 2+ e 3+).

**- CD34 (Leica®, USA), Clone 1A-4, Titulação 1:100, marcação de membrana.**

Avaliação: determinação, em toda a extensão de cada secção do TMA, da porcentagem de sinusoides com endotélio apresentando marcação positiva.

**- Actina de músculo liso (Leica®, USA), Clone QBEnd110, Titulação 1:100, marcação citoplasmática.**

Avaliação: utilizado para avaliar número de artérias não emparelhadas em toda a extensão de cada secção do TMA.

### 3.3 Análise dos dados

Os dados foram agrupados em tabelas e gráficos com o auxílio do Software Microsoft Excel. A análise estatística consta dos seguintes cruzamentos e testes estatísticos, realizados com o auxílio do Software Graphpad Prism 6.0 com nível de significância  $p < 0,05$ .

- Avaliação das diferenças em relação aos parâmetros imuno-histoquímicos de acordo com o diagnóstico do nódulo em questão, por meio do teste de Kruskal-Wallis, com pós-teste de Turkey para avaliação das diferenças entre os grupos específicos.
- Avaliação da associação entre os marcadores VEGF e Angiopietina-2 e os parâmetros de angiogênese avaliados (positividade para CD34 e número de artérias não pareadas), por meio do teste de correlação não paramétrica de Spearman.
- Avaliação da expressão dos marcadores VEGF e Angiopietina-2 no CHC e nos nódulos cirróticos adjacentes presentes no mesmo explante, por meio do teste T de Student pareado.
- Avaliação da expressão dos marcadores VEGF e Angiopietina-2 em nódulos cirróticos de pacientes com CHC no mesmo explante e nódulos cirróticos de pacientes sem CHC, por meio do teste T de Student não pareado.
- Avaliação da associação entre os marcadores VEGF e Angiopietina-2, por meio do cálculo do coeficiente de correlação de Spearman.
- Determinação de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo, valor preditivo negativo e acurácia para os marcadores Ang-2 e VEGF.

### **3.4 Aspectos Éticos**

O presente estudo foi submetido a avaliação pelo Comitê de Ética do Hospital Geral de Fortaleza após submissão na Plataforma Brasil, aprovado e registrado com o número de parecer 833.375 (Anexo 1). A confidencialidade dos sujeitos abordados na pesquisa foi integralmente garantida pela equipe executora, bem como o sigilo dos dados avaliados.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Dados clínicos e epidemiológicos

Durante o período de Fevereiro de 2013 a Janeiro de 2015, foram realizados 84 transplantes hepáticos no Hospital Geral de Fortaleza. Destes, 73 (86,9%) ocorreram devido a hepatopatias crônicas em fase de cirrose, sendo que 67 (79,8%) explantes foram incluídos neste estudo. As principais causas associadas ao diagnóstico de cirrose, conforme levantamento dos pedidos de anatomopatológico enviados pela equipe cirúrgica e revisão dos prontuários, foram etilismo (32,8% dos pacientes), hepatite C (22,4% dos pacientes) e hepatite autoimune (9,0% dos pacientes).

Dos 67 explantes avaliados neste estudo, 22 (32,9%) apresentavam lesões macroscopicamente suspeitas, ou seja, com medida superior a 5,0mm e coloração diferente em relação ao parênquima cirrótico adjacente. 14 explantes apresentavam CHC (20,9%), 04 explantes apresentavam nódulos displásicos (6,0%) e 05 apresentavam macronódulos regenerativos (7,5%). Foram detectadas 43 lesões nodulares suspeitas, com medidas variando 0,7cm e 5,5cm (média de 2,2cm). Os diagnósticos emitidos foram: 5 macronódulos regenerativos, 4 nódulos displásicos de baixo grau, 2 nódulos displásicos de alto grau e 32 CHCs (Tabela 2).

Foram amostrados, em 02 blocos de TMA, 107 nódulos para avaliação histopatológica, sendo 26 CHCs, 3 LGDN, 2 HGDN e 76 NR. Em relação aos nódulos regenerativos, 5 correspondiam a macronódulos regenerativos, 10 a NR de explantes com CHC e os 61 restantes a nódulos de explantes sem CHC, que tiveram 1 ou 2 lesões representadas por explante.

Ao se avaliarem os pacientes de acordo com os parâmetros sexo e diagnóstico de malignidade, não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes ( $p= 0,31$ ). Em ambos os grupos, houve predominância do sexo masculino, sendo esta proporção de 78,6% (11/14) no grupo com CHC e 64,2% (34/53) no grupo sem CHC. Quando considerada a variável contínua idade, também não se observaram diferenças estatisticamente significantes ( $p=0,13$ ) (Tabela 3).

Tabela 2 - Caracterização dos pacientes selecionados para o estudo e dos nódulos macroscopicamente suspeitos identificados por meio do exame anatomopatológico.

<b>Amostra do estudo</b>		<b>N</b>	<b>%</b>
Pacientes incluídos no estudo		67	100,0
Pacientes sem lesões macroscópicas suspeitas		45	67,1
Pacientes com lesões macroscópicas suspeitas		22	32,9
<b>Condições associadas à cirrose</b>			
Etilismo		22	32,8
Infecção por vírus C		15	22,4
Hepatite Autoimune		6	9,0
Criptogênica		6	9,0
Esteato-hepatite não alcoólica		5	7,5
Colangite Esclerosante Primária		3	4,5
Esquistossomose		3	4,5
Infecção por vírus B		2	3,0
Cirrose Biliar Primária		1	1,5
<b>Avaliação dos nódulos macroscopicamente suspeitos</b>			
Total de nódulos identificados		43	100,0
Macronódulos regenerativos		5	11,6
Nódulo displásico de baixo grau		4	9,3
Nódulo displásico de alto grau		2	4,7
Carcinoma Hepatocelular		32	74,4

Fonte: o autor.

Tabela 3 - Distribuição dos pacientes do estudo de acordo com sexo, idade e diagnóstico de carcinoma hepatocelular.

<b>Diagnóstico</b>	<b>Pacientes com CHC</b>		<b>Pacientes sem CHC</b>		<b>p</b>
	<b>N</b>	<b>%</b>	<b>N</b>	<b>%</b>	
<b>M</b>	11	16,4	34	50,8	0,31
<b>F</b>	3	4,5	19	28,4	
<b>Total</b>	<b>14</b>	<b>20,9</b>	<b>53</b>	<b>79,1</b>	
<b>Idade (média)</b>	57,4	-	52,7	-	0,13

Fonte: o autor.

Foram avaliados 26 nódulos que receberam o diagnóstico de carcinoma hepatocelular, sendo que a maioria deles era encapsulado (96,2%), com padrão morfológico trabecular (80,8%) e de grau histológico 2 segundo proposto por Edmondson (61,5%). Do total de pacientes com diagnóstico de CHC, a maioria deles (38,8%) foi estadiada como pT1 segundo o proposto pela classificação dos tumores TNM (Tabela 4).

Tabela 4 - Caracterização dos nódulos e pacientes com diagnóstico de carcinoma hepatocelular.

<b>Amostra do estudo</b>	<b>N</b>	<b>%</b>
<b>Total de CHCs avaliados</b>	26	100
<b>Cápsula</b>		
Presente	25	96,2
Ausente	1	3,9
<b>Padrão morfológico</b>		
Trabecular	21	80,8
Acinar	2	7,7
Misto (trabecular e acinar)	3	11,5
<b>Grau de Edmondson</b>		
Grau 1	5	19,2
Grau 2	16	61,5
Grau 3	5	19,2
Grau 4	0	0,0
<b>Total de pacientes com CHC avaliados</b>	13	100
<b>Estadiamento</b>		
pT1	5	38,5
pT2	4	30,8
pT3	4	30,8
pT4	0	0,0

A avaliação das morbidades apresentadas por pacientes com e sem carcinoma hepatocelular mostra que, em ambos os grupos, a principal condição presente foi etilismo, sendo detectado em 35,7% dos pacientes com CHC e 34,0% dos pacientes sem CHC ( $p=0,90$ ). Houve uma maior prevalência de pacientes com hepatite C no grupo com CHC (5/14) quando comparado ao grupo sem CHC (10/53), sem significância estatística, contudo ( $p = 0,28$ ) (Tabela 5).



Tabela 5 - Distribuição dos pacientes do estudo de acordo com as morbidades presentes e diagnóstico de carcinoma Hepatocelular.

Diagnóstico	Pacientes com CHC (N=13)		Pacientes sem CHC (N=53)		p
	N	%	N	%	
Álcool	5	35,7	18	34,0	0,90
Hepatite C	5	35,7	10	18,9	0,28
Esteato-hepatite não alcoólica	0	0	5	9,4	-
Hepatite Autoimune	0	0	6	11,3	-
Colangite Esclerosante Primária	0	0	3	5,7	-
Hepatite B	1	7,1	1	1,9	0,30
Esquistossomose	0	0	3	5,7	-
Cirrose Biliar Primária	0	0	1	1,9	-
Criptogênica	1	7,1	5	9,4	1,00

Fonte: o autor.

#### 4.2 Avaliação dos marcadores VEGF, Ang-2, CD34 e Actina de músculo liso

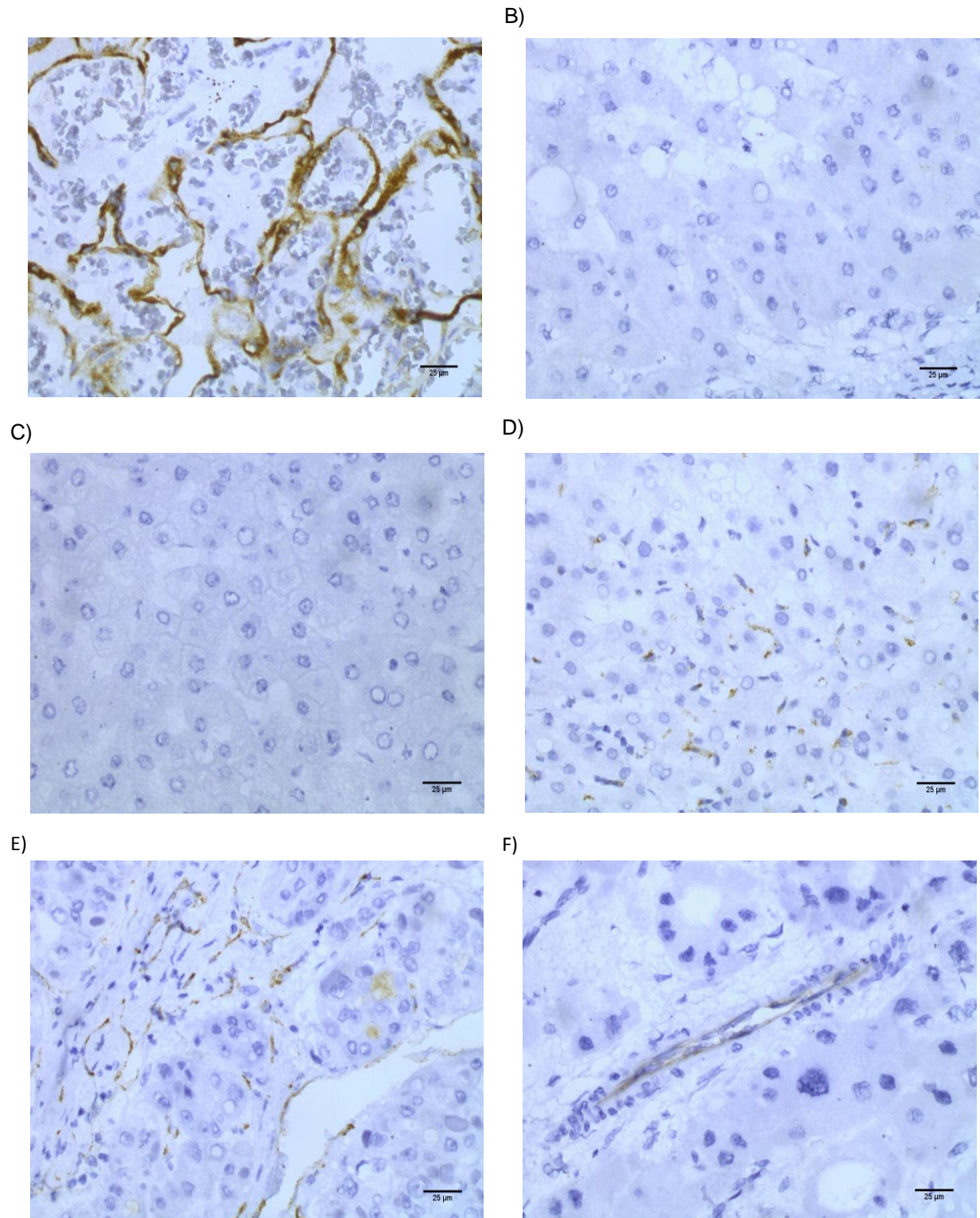
Observou-se diferença em relação à porcentagem de vasos positivos para Angiopietina-2 entre nódulos regenerativos ( $\bar{X}=0,1\%$ ) e CHCs ( $\bar{X}=8,4\%$ ) ( $p < 0,0001$ ). Em relação ao marcador VEGF, não foram observadas diferenças estatisticamente significantes entre os grupos de nódulos avaliados ( $p = 0,14$ ). Em relação aos demais parâmetros de angiogênese avaliados, houve maior marcação para CD34 em casos diagnosticados como CHC ( $\bar{X}=46,5\%$ ) em relação a nódulos displásicos ( $\bar{X}=30,0\%$ ) e nódulos regenerativos ( $\bar{X}=19,6\%$ ) ( $p = 0,008$ ). O mesmo foi observado para o número de artérias não pareadas evidenciadas por meio da marcação para actina de músculo liso ( $\bar{X}=1,5$  para CHC,  $\bar{X}= 1,2\%$  para ND e  $\bar{X}=0,1\%$  para NR) ( $p=0,007$ ). (Tabela 6; Figuras 5 e 6).

Tabela 6 - Avaliação das médias de marcação imuno-histoquímica para Angiopietina-2 (porcentagem de vasos positivos), VEGF (escore), porcentagem de vasos CD34 positivos e número de artérias não pareadas marcadas por meio de exame imuno-histoquímico conforme o diagnóstico das lesões nodulares identificadas; NR - nódulo regenerativo; ND - nódulo displásico, CHC - carcinoma hepatocelular.

<b>Diagnóstico/Marcador</b>	<b>NR</b>	<b>ND</b>	<b>CHC</b>	<b>p</b>
<b>Ang-2</b>	0,1 (0,8)	4,0 (8,9)	8,4 (16,9)	<0,0001*
<b>VEGF</b>	61,4 (69,2)	74,00 (75,4)	118,0 (112,7)	0,1400
<b>CD34 (% de vasos +)</b>	19,6 (35,3)	30,0 (33,7)	46,5 (38,4)	0,0080*
<b>Número de artérias</b>	0,1 (0,7)	1,2 (2,7)	1,5 (3,1)	0,0068*

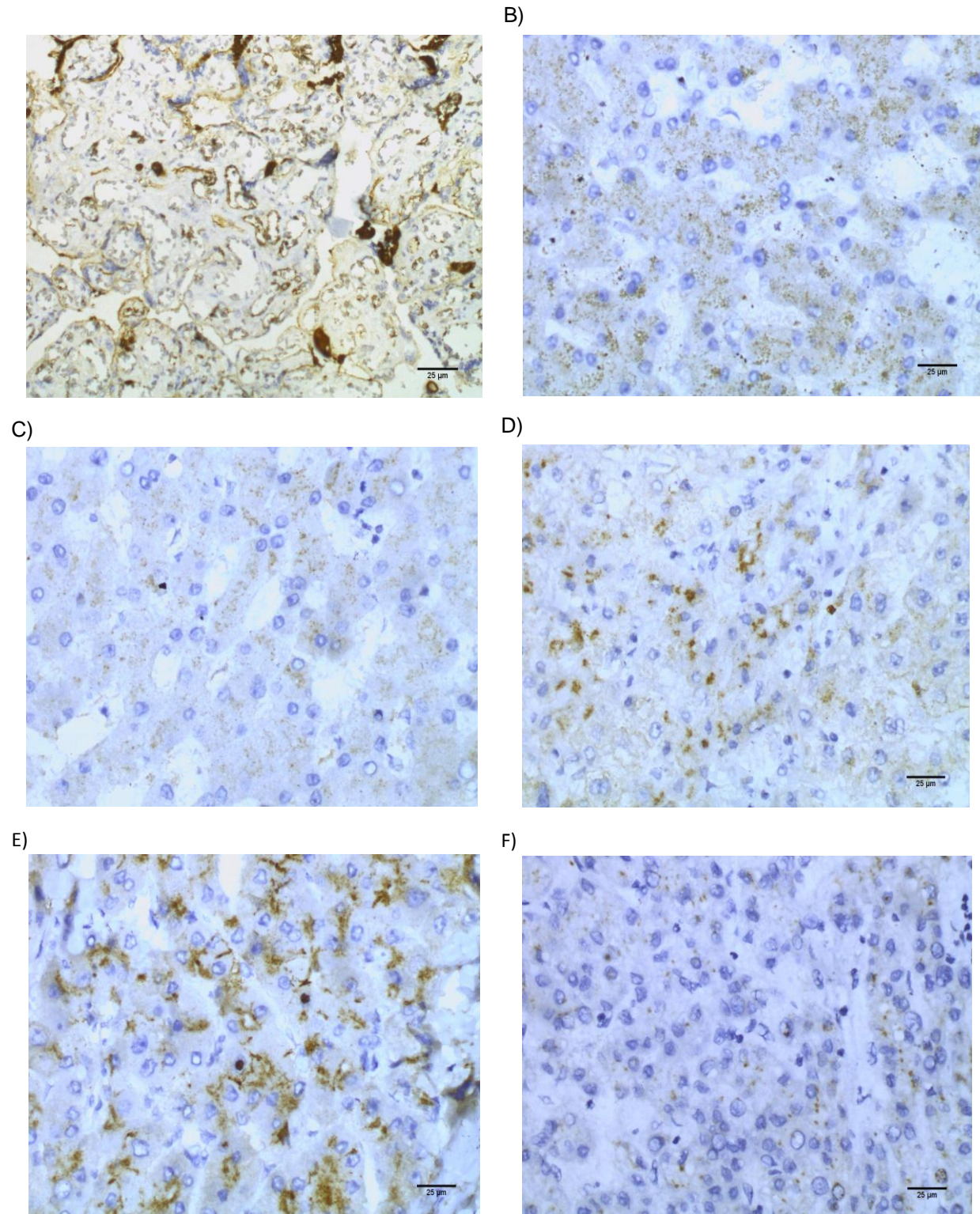
Fonte: o autor.

Figura 5 - Marcação imuno-histoquímica do carcinoma hepatocelular e de suas lesões precursoras com o marcador Ang-2 (400x). A) Controle; B) Nódulo regenerativo; C) Nódulo displásico de baixo grau; D) Nódulo displásico de alto grau; E) Carcinoma hepatocelular; F) Carcinoma hepatocelular.



Fonte: o autor.

Figura 6 - Marcação imuno-histoquímica do Carcinoma Hepatocelular e de suas lesões precursoras com o marcador VEGF (400x). A) Controle; B) Nódulo regenerativo C) Nódulo displásico de baixo grau; D) Nódulo displásico de alto grau; E) Carcinoma hepatocelular; F) Carcinoma hepatocelular.



Fonte: o autor.

O marcador Angiopietina-2 apresentou marcação positiva em 54,0% dos carcinomas hepatocelulares e em 3% de lesões precursoras não malignas. Já o marcador VEGF apresentou positividade em um número maior de lesões malignas (69,2%), contudo também apresentou marcação positiva em 69,7% das lesões precursoras. (Tabelas 7, 8 e 9).

Tabela 7 - Distribuição dos nódulos estudados de acordo com a marcação à imuno-histoquímica para Ang-2 e o diagnóstico de carcinoma hepatocelular.

Ang-2	Não CHC	CHC	Total
<b>Positivo</b>	3	12	<b>15</b>
<b>Negativo</b>	77	10	<b>87</b>
<b>Total</b>	<b>80</b>	<b>22</b>	<b>102</b>

Fonte: o autor.

Tabela 8 - Distribuição dos nódulos estudados de acordo com a marcação à imuno-histoquímica para VEGF e o diagnóstico de carcinoma hepatocelular.

VEGF	Não CHC	CHC	Total
<b>Positivo</b>	55	18	<b>73</b>
<b>Negativo</b>	25	8	<b>33</b>
<b>Total</b>	<b>80</b>	<b>26</b>	<b>106</b>

Fonte: o autor.

Tabela 9 – Sensibilidade (Sens.), especificidade (Esp.), valor preditivo positivo (VPP), valor preditivo negativo (VPN) e acurácia dos marcadores Ang-2 e VEGF para o diagnóstico do carcinoma hepatocelular.

Marcador	Sens.	Esp.	VPP	VPN	Acurácia
<b>Ang-2</b>	54,0%	96,3%	80,0%	88,5%	87,3%
<b>VEGF</b>	69,2%	31,3%	24,7%	75,8%	40,6%

Fonte: o autor.

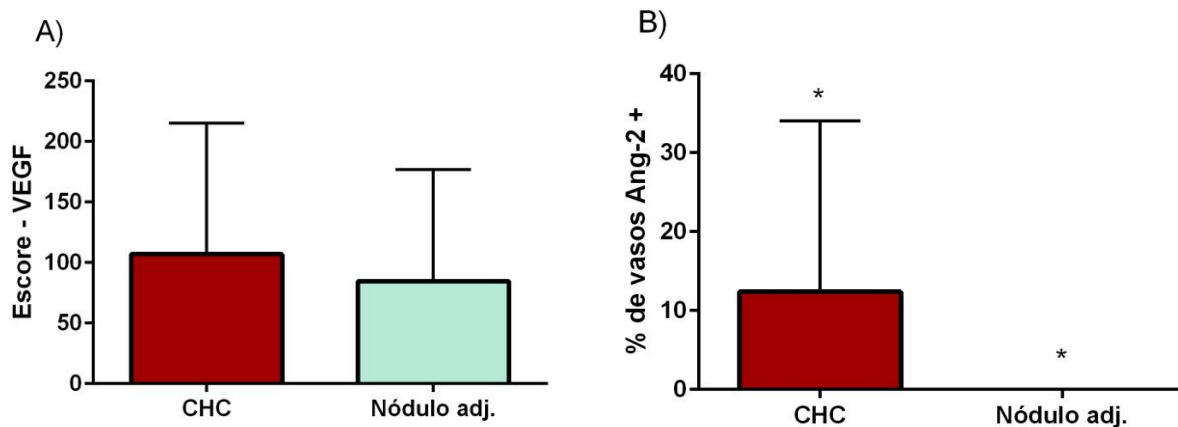
Quando se avaliaram os 2 marcadores em carcinomas hepatocelulares e nódulos regenerativos do mesmo explante, observou-se diferença apenas para o marcador Ang-2 ( $p=0,02$ ), com média de 0,0% em nódulos regenerativos e 12,4% nos CHCs. (Tabela 10; Gráfico 2).

Tabela 10 - Avaliação imuno-histoquímica do escore médio de positividade para VEGF e da porcentagem de vasos positivos para Ang-2 em CHCs e nódulos regenerativos do mesmo explante.

Diagnóstico/Marcador	NR	CHC	p
VEGF	84,6 (92,1)	106,0 (108,4)	0,68
Ang-2	0,0 (0,0)	12,4 (21,6)	0,02*

Fonte: o autor.

Gráfico 2 - Avaliação imuno-histoquímica do escore médio de positividade para VEGF e da porcentagem de vasos positivos para Ang-2 em CHCs e nódulos regenerativos do mesmo explante. A) VEGF; B) Ang-2.



Fonte: o autor.

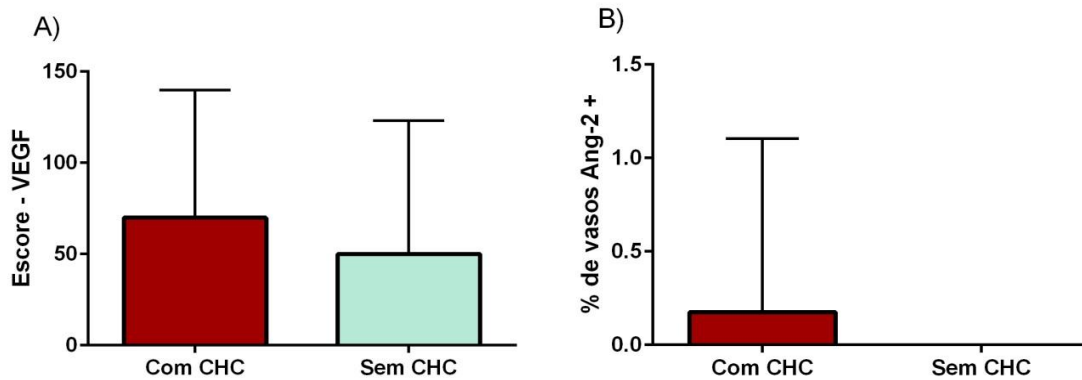
Quando se avaliaram os marcadores em nódulos regenerativos de explantes com CHC e nódulos com o mesmo diagnóstico em explantes sem CHC, não se observou diferença estatisticamente significativa para ambos os marcadores ( $p = 0,26$  para VEGF;  $p > 0,9999$  para Ang-2) (Tabela 11; Gráfico 3).

Tabela 11 - Avaliação imuno-histoquímica do escore médio de positividade para VEGF e da porcentagem de vasos positivos para Ang-2 em nódulos regenerativos de explantes com CHC e sem CHC.

Diagnóstico/Marcador	Pacientes com CHC	Pacientes sem CHC	p
VEGF	69,9 (69,9)	50,0 (73,2)	0,26
Ang-2	0,18 (0,9)	0,0 (0,0)	>0,9999

Fonte: o autor.

Gráfico 3 - Avaliação imuno-histoquímica do escore médio de positividade para VEGF e da porcentagem de vasos positivos para Ang-2 em nódulos regenerativos de explantes com e sem CHC. A) VEGF; B) Ang-2.



Fonte: o autor.

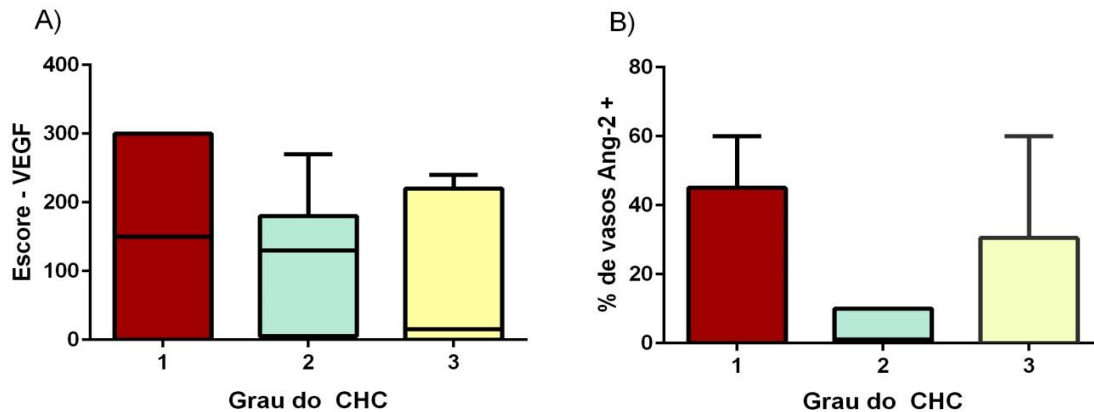
Ao se avaliarem unicamente os nódulos que receberam o diagnóstico de carcinoma hepatocelular de acordo com o grau de Edmonson-Steiner, não se observou associação entre o grau do CHC e os marcadores VEGF e Ang-2 ( $p=0,81$  para VEGF;  $p=0,84$  para Ang-2) (Tabela 12; Gráfico 4).

Tabela 12 - Avaliação imuno-histoquímica do escore médio de positividade para VEGF e da porcentagem de vasos positivos para Ang-2 de acordo com o grau do CHC segundo Edmonson-Steiner.

Marcador	CHC Grau 1	CHC Grau 2	CHC Grau 3	p
<b>VEGF</b>	150,0 (173,2)	121,9 (101,7)	91,0 (118,8)	0,8093
<b>Ang-2</b>	15,0 (30,0)	4,2 (5,0)	12,2 (26,7)	0,8404

Fonte: o autor.

Gráfico 4 - Avaliação imuno-histoquímica do escore médio de positividade para VEGF e da porcentagem de vasos positivos para Ang-2 de acordo com o grau do CHC segundo Edmonson-Steiner. A) VEGF; B) Ang-2.



Fonte: o autor.

Quando se avaliaram os CHCs do estudo conforme os parâmetros número de lesões malignas presentes no explante que continha o nódulo e tamanho destas lesões (cm), não se observou correlação destes parâmetros com o escore de positividade para VEGF e a porcentagem de vasos Ang-2 positivos (Tabela 13).

Tabela 13 - Correlação entre a avaliação imuno-histoquímica do escore médio de positividade para VEGF e da porcentagem de vasos positivos para Ang-2 e as seguintes variáveis: número de lesões no explante e tamanho da lesão (Carcinoma hepatocelular).

Parâmetro - CHC	Coefficiente de Spearman	p
<b>VEGF</b>		
<b>Tamanho</b>	0,08	0,73
<b>Número de lesões</b>	0,05	0,80
<b>Ang-2</b>		
<b>Tamanho</b>	0,39	0,09
<b>Número de lesões</b>	0,04	0,84

Fonte: o autor.

Quando a marcação para Ang-2 à imuno-histoquímica foi avaliada juntamente com outros parâmetros ligados a angiogênese, observou-se correlação diretamente proporcional entre esta marcação e a porcentagem de vasos positivos para CD34 em todos os nódulos do estudo ( $\rho=0,26$ ;  $p=0,01$ ). Não houve correlação com o número de artérias não pareadas presentes em cada nódulo ( $\rho=-0,15$ ;  $p=0,13$ ) (Tabela 14; Gráfico 5; Figuras 7 e 8).

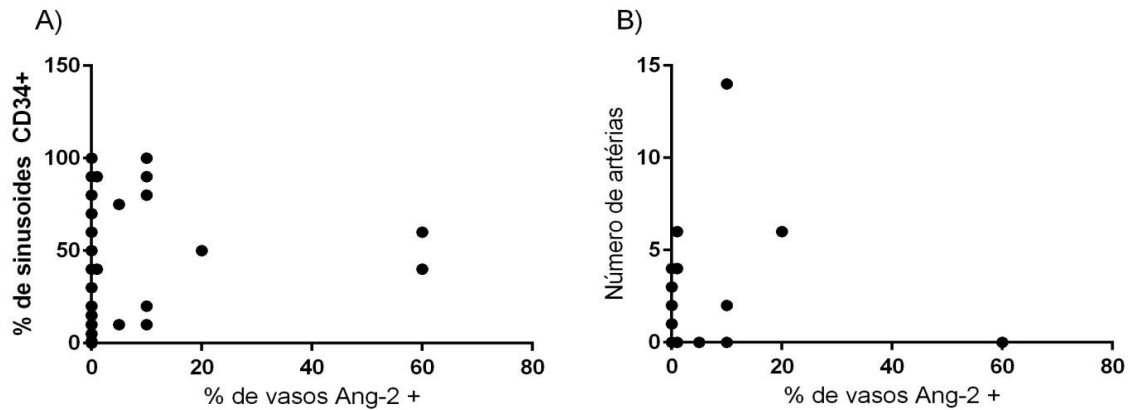


Tabela 14 - Correlação entre a porcentagem de vasos positivos para Ang-2 e as seguintes variáveis: porcentagem de sinusoides positivos para CD34 e número de artérias não pareadas presentes no nódulo.

Marcador	Coefficiente de Spearman	p
<b>CD34</b>	0,26	0,01*
<b>Número de artérias</b>	- 0,15	0,13

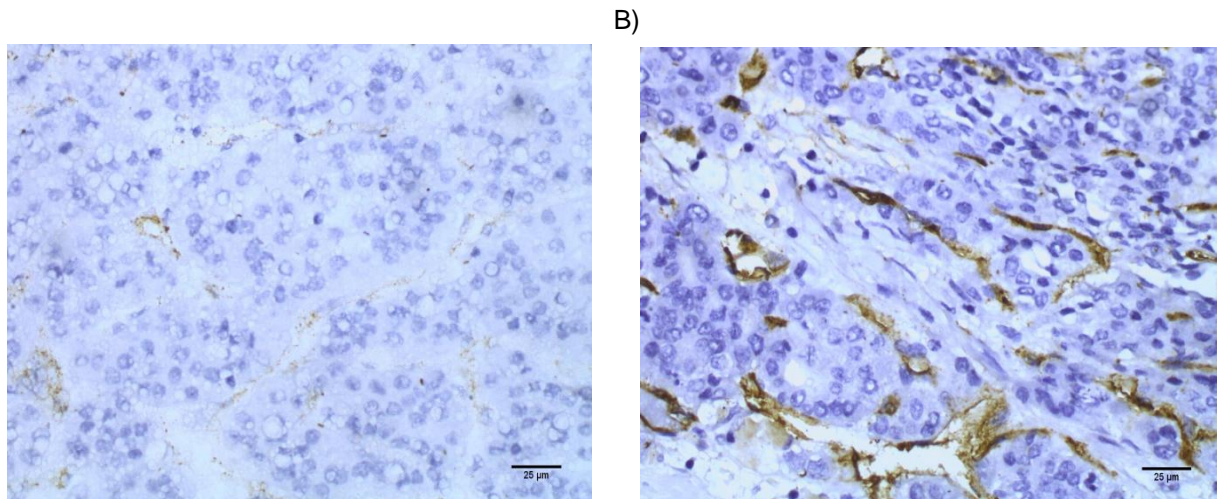
Fonte: o autor.

Gráfico 5 - Correlação entre a porcentagem de vasos positivos para Ang-2 e as seguintes variáveis: A) Porcentagem de sinusoides positivos para CD34; B) Número de artérias não pareadas presentes no nódulo.



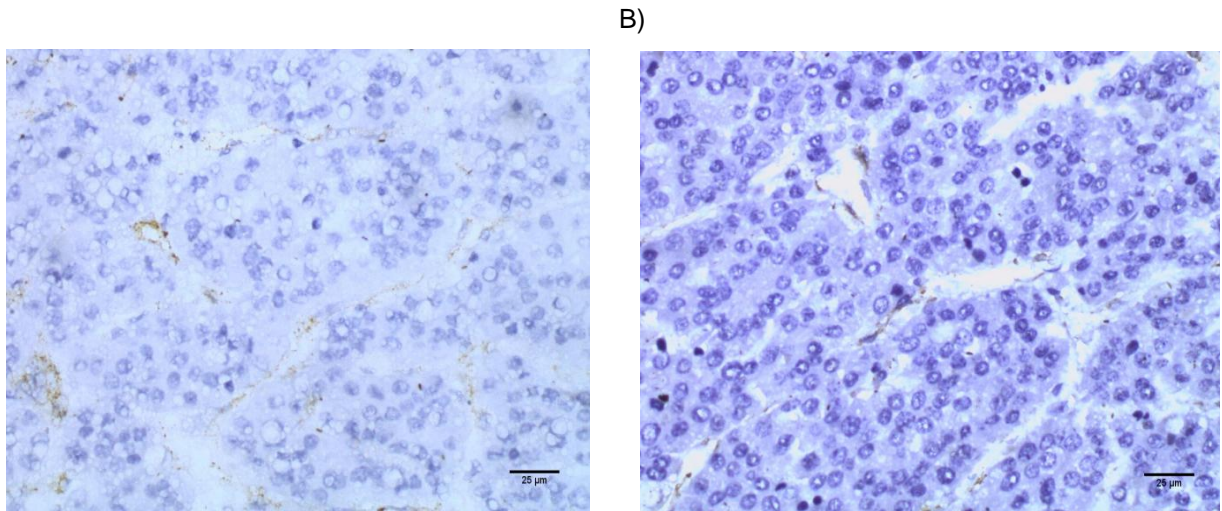
Fonte: o autor.

Figura 7 - Correlação entre marcação imuno-histoquímica para Angiopoietina-2 e a porcentagem de sinusoides CD34 positivos (400x). A) Angiopoietina-2; B) CD34 (mesmo nódulo em ambas as fotos).



Fonte: o autor.

Figura 8 - Correlação entre marcação imuno-histoquímica para Angiopietina-2 e o número de artérias evidenciadas pela imuno-histoquímica para actina de músculo liso (400x). A) Angiopietina-2; B) Actina de Músculo Liso (mesmo nóculo em ambas as fotos).



Fonte: o autor.

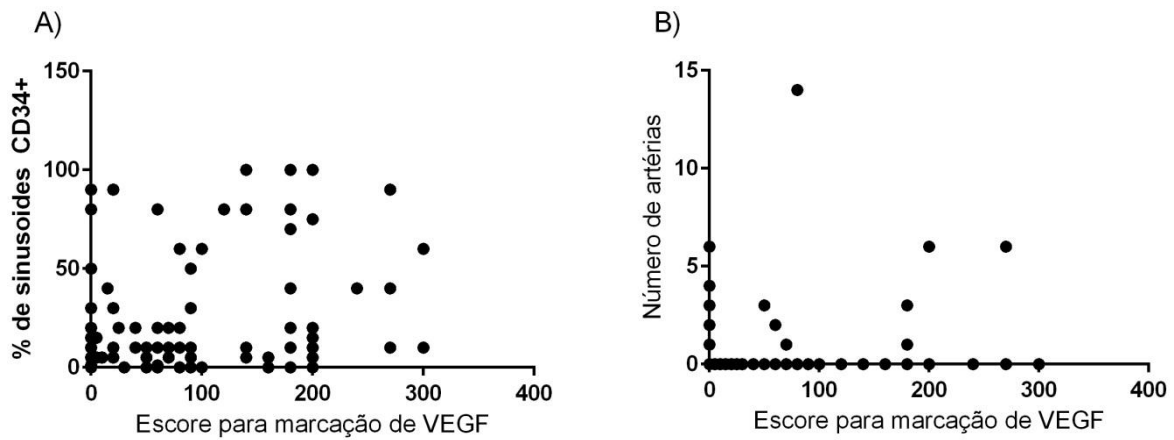
Quando a marcação para VEGF à imuno-histoquímica foi avaliada juntamente com outros parâmetros ligados a angiogênese, observou-se correlação diretamente proporcional entre esta marcação e a porcentagem de vasos positivos para CD34 nos nódulos ( $\rho=0,44$ ;  $p<0,0001$ ) e o com o número de artérias não pareadas presentes nos nódulos ( $\rho=0,26$ ;  $p=0,01$ ) (Tabela 15; Gráfico 6; Figuras 9 e 10).

Tabela 15 - Correlação entre o escore de marcação para VEGF e as seguintes variáveis: porcentagem de sinusoides positivos para CD34 e número de artérias não pareadas presentes no nóculo.

Marcador	Coefficiente de Spearman	p
<b>CD34</b>	0,44	<0,0001*
<b>Número de artérias</b>	0,27	0,01*

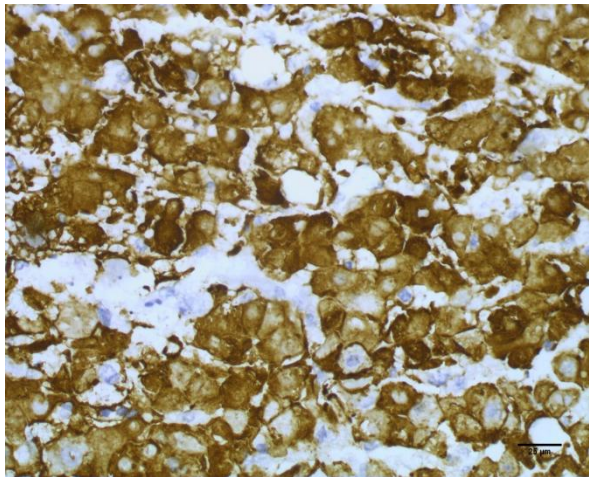
Fonte: o autor.

Gráfico 6 - Correlação entre o escore positividade para VEGF à imuno-histoquímica e as seguintes variáveis: A) Porcentagem de sinusoides positivos para CD34; B) Número de artérias não pareadas presentes no nódulo.

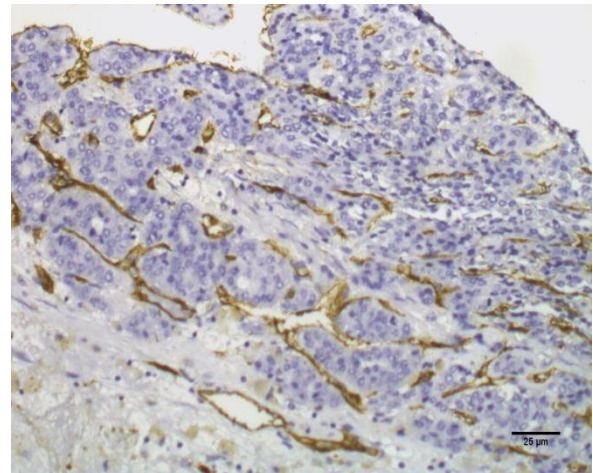


Fonte: o autor.

Figura 9 - Correlação entre marcação imuno-histoquímica para VEGF e a porcentagem de sinusoides CD34 positivos (400x). A) VEGF; B) CD34 (mesmo nódulo em ambas as fotos).

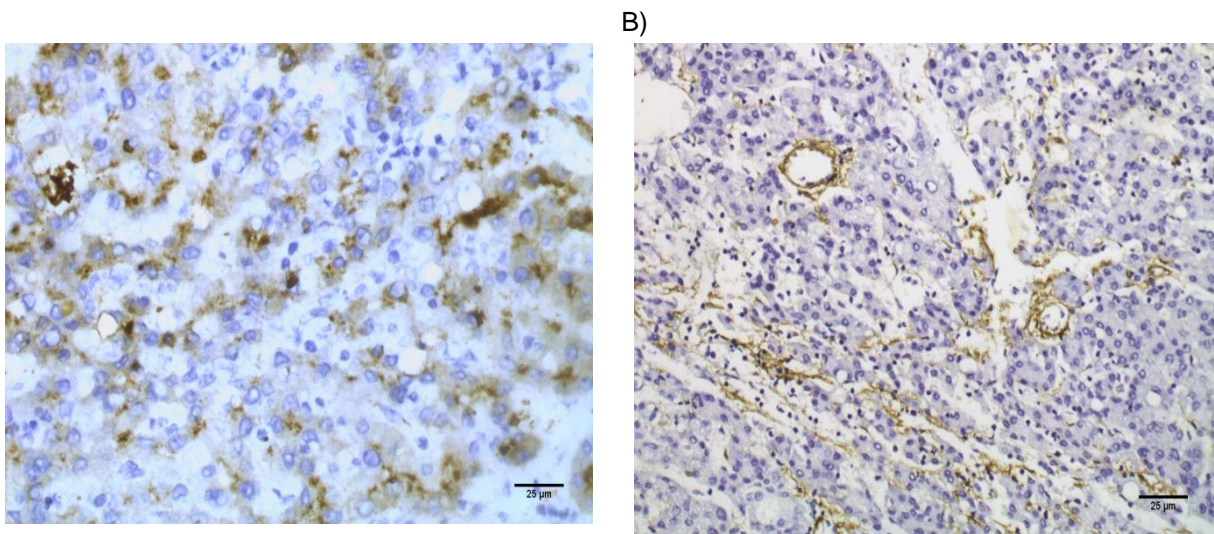


B)



Fonte: o autor.

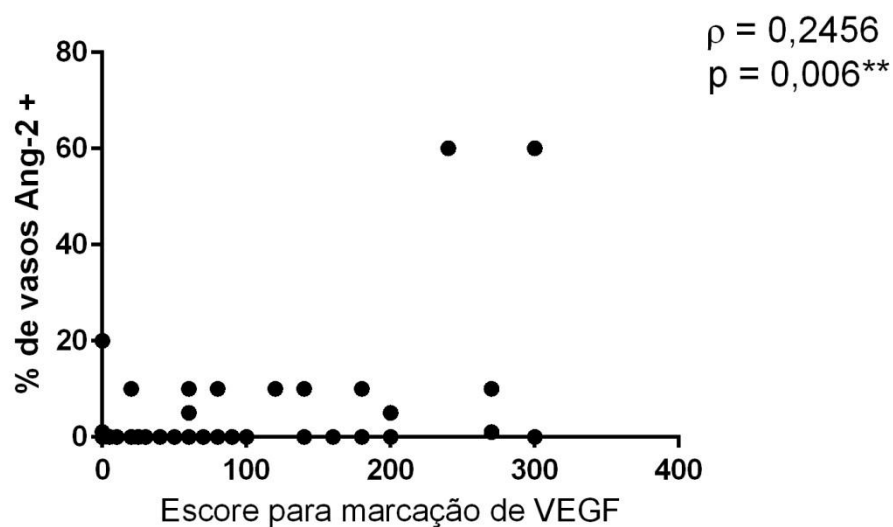
Figura 10 - Correlação entre marcação imuno-histoquímica para VEGF e o número de artérias evidenciadas pela imuno-histoquímica para Actina de Músculo Liso (400x). A) VEGF; B) Actina de Músculo Liso (mesmo nódulo em ambas as fotos).



Fonte: o autor.

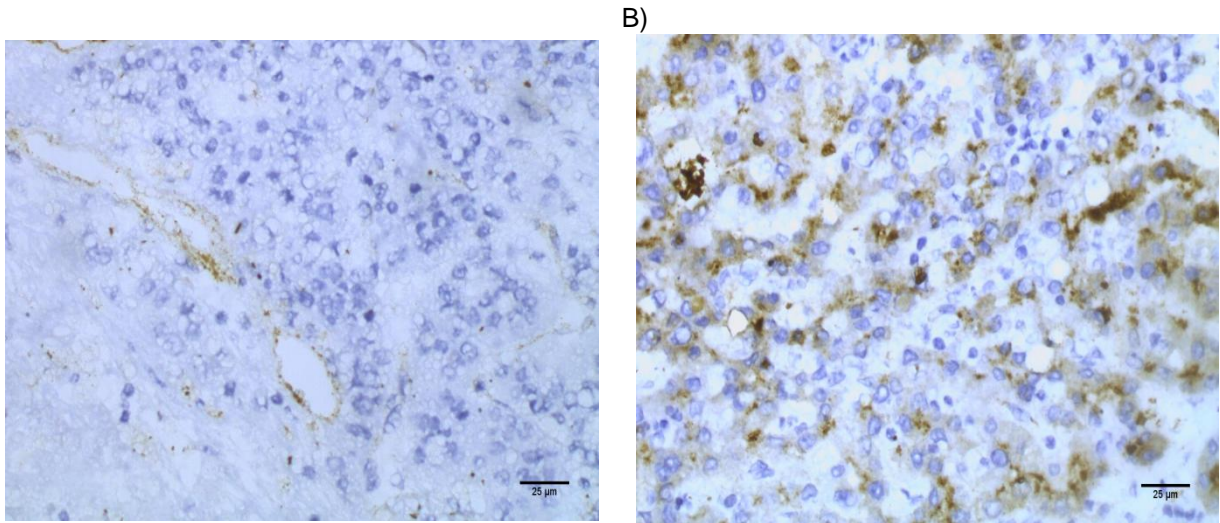
Por fim, observou-se correlação estatisticamente significativa entre o escore de positividade para VEGF e porcentagem de vasos positivos para Ang-2 nos nódulos avaliados ( $\rho=0,25$ ;  $p=0,01$ ) (Gráfico 7; Figura 11).

Gráfico 7 - Correlação entre o escore positividade para VEGF à imuno-histoquímica e a porcentagem de vasos positivos para Ang-2.



Fonte: o autor.

Figura 11 - Correlação entre marcações imuno-histoquímicas para VEGF e Angiopoietina-2 (400x). A) VEGF; B) Angiopoietina-2 (mesmo nódulo em ambas as fotos).



Fonte: o autor.

## 5 DISCUSSÃO

O Carcinoma hepatocelular representa uma das principais causas de morte relacionadas ao câncer em todo o mundo. O diagnóstico correto desta neoplasia é de fundamental importância para tratamento apropriado dos pacientes, bem como para a determinação de seu prognóstico. Embora muitas vezes o diagnóstico histopatológico do CHC possa ser realizado com segurança, dificuldades são comumente encontradas por patologistas em relação à distinção entre o CHC e lesões hepatocitárias benignas ou pré-neoplásicas, tais como o adenoma hepatocelular e os nódulos regenerativos/displásicos no contexto da cirrose (Wang *et al.*, 2008). Um diagnóstico bem estabelecido de CHC apresenta implicações clínicas importantes, uma vez que CHCs pequenos tem uma alta probabilidade de cura e podem ser abordados por meio de ressecções cirúrgicas menos agressivas ou outras técnicas como ablação. O diagnóstico apropriado também permite ao paciente ser adequadamente priorizado para o transplante hepático nos casos onde há indicação. Além disso, pacientes com lesões mimetizadoras de CHC, tais como nódulos displásicos, não devem ser submetidos a abordagens invasivas desnecessárias. Como nem sempre a imagem radiológica é característica, principalmente em nódulos pequenos, a biópsia hepática pode ser indicada para elucidação diagnóstica (Shafizadeh e Kakar, 2011).

O presente estudo teve como casuística os explantes hepáticos de pacientes transplantados no Hospital Geral de Fortaleza, um dos principais centros responsáveis por esta atividade no estado do Ceará e na região Nordeste. Os resultados mostraram que 23% dos pacientes transplantados apresentavam, em seus explantes, lesões macroscopicamente suspeitas para neoplasia, sendo que o CHC foi detectado em 21,2% dos explantes e representava 74,41% das lesões suspeitas amostradas para avaliação anatomopatológica, enquanto os nódulos displásicos foram detectados em 6% dos órgãos. Mion *et al.*, 1996, em um estudo com 80 pacientes desenvolvido na França, encontraram nódulos displásicos em 11% dos explantes e CHC em 17,5% destes. Le Bail *et al.*, 1997, em uma casuística de 100 explantes, encontraram lesões malignas em 38% dos pacientes. Kim, Lim e Lee, 2001 observaram uma incidência de 30,76% para CHC e 21,15% para nódulos displásicos, muitos deles não detectados por exames de imagem convencionais

quando apresentavam medidas inferiores a 2,0cm. Uma maior proporção de nódulos diagnosticados como CHC foi observada por De Lédighen *et al.*, 2002 (61,36%) e Burrel *et al.*, 2003 (59,84%), a qual pode estar associada à casuística avaliada, uma vez que havia muitos transplantes indicados devido ao próprio CHC em ambos os estudos. Uma proporção de 8,4% dos explantes avaliados por Hytioglou *et al.*, 1995 apresentava CHC, o qual observou também maior incidência de macronódulos regenerativos em determinados grupos, como cirrose alcoólica e hepatite B. Conforme os dados de Caroli-Bottino *et al.*, 2005, o CHC oculto (não detectado por exames de imagem) foi detectado em 17,5% dos explantes, sendo mais comum em pacientes com idade inferior a 50 anos. Por meio da revisão bibliográfica em bases indexadas, encontramos apenas um estudo desenvolvido em centro de saúde brasileiro, no estado de Minas Gerais, no qual foram observadas lesões suspeitas em 42,62% dos explantes avaliados, sendo de 10% a proporção de casos diagnosticados como CHC (Silva e Leite, 2005).

Cabe frisar que todos os trabalhos levantados mencionavam em sua metodologia que consideraram os mesmos critérios para o diagnóstico anatomopatológico do CHC e de suas lesões precursoras que foram utilizados em nosso estudo (Party, 1995). Deste modo, as variações observadas em relação à proporção de casos diagnosticados como CHC podem ser atribuídas a fatores como tamanho das amostras, causas que motivaram a cirrose, tempo de doença até o momento de transplante e a própria variação interobservadores em relação aos critérios atualmente utilizados para o diagnóstico (Silva e Leite, 2005). Deve ainda ser considerado o fato de a amostra deste estudo não representar necessariamente a realidade epidemiológica da região, considerando o fato de o Hospital Geral de Fortaleza ser um centro de referência para todo o estado do Ceará e os estados adjacentes, priorizando aqueles pacientes com condições mais graves e, deste modo, criando um viés de seleção.

Deve-se ressaltar que muitos estudos avaliados utilizaram o exame anatomopatológico em explantes como padrão-ouro para o diagnóstico desta neoplasia, buscando determinar parâmetros como sensibilidade e especificidade de métodos radiológicos para seu diagnóstico (Burrel *et al.*, 2003; Hytioglou *et al.*, 1995; Mion *et al.*, 1996; Bennett *et al.*, 2002; Krinsky *et al.*, 2000). Estes dados

reforçam a importância do estudo anatomopatológico de explantes como de fundamental importância para a melhor avaliação dos nódulos que surgem no fígado cirrótico, devido à excelente representatividade das lesões e à possibilidade de ampla amostragem para melhor definição de parâmetros como displasia, invasão do parênquima adjacente e arquitetura geral da lesão.

Quando considerada a marcação imuno-histoquímica para VEGF, observamos, em nosso estudo, 69,3% de marcação positiva em casos de CHC, notando-se uma maior tendência a marcação forte e difusa nestes nódulos. Contudo, ela não foi estatisticamente diferente em relação a nódulos displásicos e nódulos regenerativos, bem como em relação a nódulos regenerativos do mesmo explante que apresentava a lesão maligna. Houve ainda uma associação entre a marcação para VEGF e a marcação para CD34, indicativa de capilarização sinusoidal, e o número de artérias não pareadas presentes nos nódulos.

Wang, B. *et al.*, 2014, ao estudarem 150 CHCs por meio de imuno-histoquímica em *Tissue Microarray*, observaram marcação positiva para VEGF em 75% das lesões malignas, sendo esta mais forte em relação ao fígado não neoplásico adjacente, e associação significativa com parâmetros como tamanho do tumor, invasão vascular e níveis séricos de AFP. Segundo os dados de Deli *et al.*, 2005, ao se avaliarem 105 pacientes com CHC, observou-se imunoexpressão de VEGF em 68,6% deles, semelhante à observada por Yao *et al.*, 2005, a qual foi de 63,9%, e por Torimura *et al.*, 2004, a qual foi de 57%. Evidenciou-se ainda que a positividade para VEGF associava-se ainda a menor sobrevida e que uma alta marcação também estava presente em tecidos adjacentes (79,4%), mostrando que o papel deste marcador envolve tanto a progressão da neoplasia como também da angiogênese no contexto da cirrose (Yao *et al.*, 2005).

Claudio *et al.*, 2004 encontraram uma associação entre a positividade para VEGF e a sobrevida dos pacientes, não evidenciando correlação com parâmetros como tamanho do tumor, grau histológico e estadiamento. Nosso estudo, ao contrário do de Jia *et al.*, 2009, não observou associação entre a marcação para VEGF e o grau histológico da lesão, o que também foi observado por Uematsu *et al.*, 2005, Claudio *et al.*, 2004 e por Yao *et al.*, 2005.



O processo de carcinogênese hepática envolve uma mudança gradativa no imunofenótipo da célula endotelial, com perda de fenestrações e aquisição de membrana basal. Este processo é chamado de capilarização sinusoidal, e é evidenciado morfológicamente por meio de positividade das células endoteliais para o marcador CD34 à imuno-histoquímica. Notam-se ainda alterações no suprimento sanguíneo venoso e arterial, como aumento do número de artérias não pareadas (Pang e Poon, 2006). Nosso estudo utilizou a porcentagem de vasos CD34 positivos e o número de artérias não pareadas como parâmetros para a correlação com a imuno-histoquímica para VEGF e encontrou significância estatística para ambos, sendo que este achado também foi relatado por outros autores (Moon *et al.*, 2003; Huang, Yang e Lu, 2005; Tseng *et al.*, 2008).

Vários autores observaram marcação considerável em nódulos cirróticos adjacentes à lesão maligna (Deli *et al.*, 2005; Huang, Yang e Lu, 2005; Tseng *et al.*, 2008), ressaltando o papel do VEGF também na angiogênese não tumoral. Conforme os dados de Amaoka *et al.*, 2007, houve marcação significativa no parênquima cirrótico adjacente ao CHC, sendo esta mais intensa em fígados com melhor funcionamento. Este conceito parece estar associado à capacidade de fígados com melhor função conseguirem sintetizar o marcador com mais eficiência, embora sua produção seja mediada pela hipóxia decorrente de mau funcionamento. Campillo *et al.*, 2014 mostraram que a expressão aumentada de marcadores como VEGF e seu receptor pode estar associada a maior chance de recorrência do CHC após transplante hepático, enquanto Tseng *et al.*, 2008 mostraram que há correlação entre a marcação no parênquima não neoplásico e parâmetros como grau da neoplasia, estadiamento, idade e imunoexpressão para p53, reforçando o papel do microambiente nas lesões precursoras e sua associação ao processo de carcinogênese (Torimura *et al.*, 2004). Deste modo, estudos futuros também devem avaliar o impacto da angiogênese em tecidos não tumorais e sua associação com parâmetros clínicos, bioquímicos e de sobrevida.

Deve-se frisar a escassez de estudos avaliando nódulos displásicos. Nascimento *et al.*, 2009 avaliaram a imunomarcação para CD34 e o número de artérias não pareadas (por meio do marcador HHF-35) em CHC e nódulos displásicos, contudo não foram observados artigos que avaliaram nódulos

displásicos quando à expressão dos marcadores VEGF e Angiopietina-2. Um melhor conhecimento desta marcação pode ser útil no refinamento diagnóstico para estas lesões.

O VEGF é sabidamente um potente fator pró-angiogênico e sua imunoexpressão correlaciona-se a um pior prognóstico e estágios mais avançados em vários tumores sólidos (Wang, D. *et al.*, 2014). Segundo uma metanálise recente, há associação entre positividade para VEGF e a sobrevida geral em pacientes com CHC, porém não há associação para sobrevida livre de doença. Há várias metanálises que abordam o valor prognóstico do VEGF em outras neoplasias, como de cabeça e pescoço, pulmão e estômago. Esta associação com mau prognóstico pode embasar o uso de fármacos antiangiogênicos no tratamento do câncer, tais como anticorpos monoclonais anti-VEGF (Bevacizumab) e inibidores de tirosina-kinase (Moon *et al.*, 2003).

Já em relação à Angiopietina-2, o estudo imuno-histoquímico mostrou marcação positiva nos vasos (células endoteliais) em 54% dos CHCs, apresentando ainda marcação em 1 nódulo displásico e 2 nódulos regenerativos, sendo nestes últimos uma marcação focal em esparsas células. Observou-se também uma marcação diferente em relação a nódulos regenerativos adjacentes à lesão maligna. Não foi encontrada correlação com parâmetros como grau de Edmondson, tamanho da lesão e número de lesões. A marcação positiva foi considerada quando estava presente no endotélio de sinusoides e/ou vasos intratumorais. Houve associação com a imunoexpressão para CD34 (marcador de densidade microvascular).

Mitsuhashi *et al.*, 2003, ao avaliarem 46 casos de CHC, encontraram imunoexpressão de Ang-2 nas células hepatocitárias em 85% dos CHCs e em 53% dos casos no parênquima hepático adjacente. Em seu estudo, ele analisou ainda a relação entre a expressão de RNAm para Ang-2 e Ang-1, encontrando associação entre esta relação (predomínio de Ang-2 sobre Ang-1) e parâmetros como densidade microvascular, invasão vascular e tamanho da lesão. Cabe frisar que a correlação entre Ang-2 e parâmetros prognósticos do CHC também foi estabelecida utilizando a técnica de RT-PCR. Os autores supracitados reforçam a importância de melhor compreender a via deste marcador, que envolve a ativação de receptores Tie-2, também ativados pela Angiopietina-1. A via Ang-1/Tie-2 medeia as funções

vitais de estabilização vascular e remodelamento endotelial, por meio da integração de pericitos à parede vascular, particularmente na presença de VEGF. Ao contrário, a Ang-2 aumenta o brotamento vascular na sua presença, contribuindo para a formação de novos vasos. Sabe-se que a expressão ectópica de Ang-2 em células do CHC promove um crescimento tumoral acelerado e agrava seu prognóstico em modelos animais, sugerindo que a via Ang-Tie está intimamente envolvida na angiogênese relacionada a esta neoplasia. Propõe-se ainda que Ang-2 possui fundamental importância para potencializar o efeito do VEGF. Ele mostra que o VEGF possui expressão no parênquima hepático não neoplásico, contudo, na presença de Ang-2, tem seu efeito angiogênico potencializado em lesões malignas. Os achados deste trabalho mostraram que uma preponderância de Ang-2 sobre Ang-1, na presença de VEGF, pode ser o responsável pela maior expressão do fenótipo CD34 positivo em vasos do CHC. Assim, a melhor compreensão da via Angiopoietina/Receptor Tie também pode ser um bom candidato para terapia-alvo.

Tanaka *et al.*, 1999, ao avaliarem a expressão de Ang-2 por RT-PCR, encontraram expressão aumentada deste marcador em tecidos tumorais em detrimento do parênquima adjacente, reforçando seu papel no desenvolvimento da neoplasia. Deve-se ainda frisar que não houve diferença em relação à expressão para Ang-1.

Zhang, Liu e Sun, 2006, ao avaliarem espécimes a fresco de 38 CHCS, por RT-PCR, também encontraram expressão aumentada de Ang-2 em tecidos neoplásicos, não tendo encontrado essa correlação para Ang-1 e Tie-2. Observou-se correlação entre a expressão de Ang-2, VEGF e razão Ang-2-Ang-1 para tamanho do tumor, metástases e invasão venosa, contudo não se observou associação para o grau de Edmonson. Houve também correlação com a densidade microvascular, avaliada pelo marcador CD34 à imuno-histoquímica.

Segundo Torimura *et al.*, 2004, ao se avaliarem 59 pacientes com CHC, houve imunoexpressão positiva para Ang-2 em células hepatocitárias e musculares lisas, enquanto seu receptor, Tie-2, foi observado em células endoteliais. Houve correlação da expressão de Ang-2 com o tamanho e o grau de diferenciação do tumor, mostrando a importância deste marcador na progressão neoplásica. Notou-se

ainda que células hepatocitárias, quando submetidas a hipóxia, aumentam a expressão de VEGF, o que não foi observado para Ang-2.

Nosso estudo evidenciou marcação predominantemente em células endoteliais, local onde a Ang-2 age por meio de sua ligação o receptor Tie-2, sendo que o mesmo achado foi observado por Zhang *et al.*, 2003 em casos de câncer ovariano. Ao utilizar amostras desta neoplasia e estudá-las por meio de IHQ, RT-PCR e microdissecção a laser, os autores mostraram que o aumento da expressão de VEGF coordena o aumento na expressão de Ang-2 nas células endoteliais, por meio da via VEGFR2 – FLK1 – KDR. Em modelos animais de câncer ovariano, a expressão de Ang-2 associou-se a perda de pericitos e instabilidade das junções intercelulares. Neste estudo, assim como observado em nosso trabalho, houve correlação entre expressão de VEGF e Ang-2.

Buscamos avaliar o papel dos marcadores VEGF e Ang-2 como possíveis ferramentas úteis para o diagnóstico do CHC. Encontrou-se sensibilidade de 54% para Ang-2, enquanto a especificidade foi de cerca de 96%. Para o marcador VEGF, houve maior sensibilidade (69,23%), contudo houve baixa especificidade (31,3%) devido à marcação frequente em lesões não malignas.

Atualmente, o painel imunoistoquímico utilizado para auxiliar na confirmação de casos de CHC em nódulos com aspecto morfológico dúbio consiste no emprego dos marcadores Heat Shock Protein-70 (HSP-70), Glypican-3 (GPC3) e Glutamina-Sintetase (GS). Segundo os estudos de Di Tommaso *et al.*, 2007 e Di Tommaso *et al.*, 2009, ao se estudarem estes 3 marcadores em conjunto para o diagnóstico de CHC em biópsias por agulha, encontrou-se acurácia de 78% e especificidade de 100% quando 2 dos 3 apresentavam positividade. Todos os 3 marcadores foram negativos em mais de 70% dos nódulos displásicos de alto grau, notando-se positividade em 43% dos CHCs na sua fase inicial. Os 3 marcadores, quando empregados isoladamente, apresentam boa sensibilidade para o diagnóstico do CHC, contudo muitas vezes a marcação mostrou-se focal, não sendo evidenciada em biópsias por agulha, e pode haver resultados falso-positivos em lesões benignas, tais como hiperplasia nodular focal e adenoma hepatocelular (subtipo inflamatório) para GS (Shafizadeh e Kakar, 2011). Em nosso estudo, empregamos o marcador Ang-2 em amostras de TMA, e observamos, na maioria dos nódulos, uma marcação

positiva em torno de 10% dos vasos. Mesmo que focal, essa marcação foi estatisticamente diferente em relação à marcação para lesões não malignas.

Wang *et al.*, 2008, ao avaliarem a expressão para Glypican-3 em CHCs, adenomas hepatocelulares, HNF e macronódulos regenerativos, encontraram sensibilidade de 75,7% e especificidade de 100% para o diagnóstico do CHC. Deve-se frisar que as lesões foram avaliadas em cortes completos e a marcação negativa foi considerada quando havia menos de 5% de positividade, de modo que mesmo lesões negativas apresentaram marcação focal, podendo gerar dificuldades em biópsias por agulha. Shafizadeh e Kakar, 2011, ao examinarem 80 casos de CHC por meio de estudo imuno-histoquímico para Glypican-3, observaram marcação positiva em 79% dos casos, contudo esta foi menor para casos bem diferenciados (53%). Novamente, observou-se marcação focal em alguns macronódulos regenerativos, dificultando a avaliação por meio de amostras em biópsia. Houve marcação em 43% dos HGDN e imunoexpressão mais exuberante em casos pouco diferenciados. Cabe frisar que os marcadores do nosso trabalho foram utilizados predominantemente em tumores classificados como avançados, por apresentarem padrão distintamente nodular e cápsula bem definida, caracterizando um fenótipo de maior agressividade.

Estudo em TMA foi conduzido por Swanson *et al.*, 2015, avaliando marcação tripla para Reticulina, Glypican-3 e Glutamina sintetase. A combinação de reticulina intacta com negatividade para Glypican-3 ou GS foi 92% sensível e 95% específica em TMA para diferenciar adenoma de carcinoma. Estudo com adenomas hepatocelulares e CHCs também foi desenvolvido por Lagana *et al.*, 2013, que ressaltaram a importância dos marcadores Glypican-3 e HSP-70 para o diagnóstico de malignidade, com valores de sensibilidade de 43% (GPC3) e 46% (HSP-70) e especificidade de 100% para ambos. Nosso estudo não utilizou amostras de adenoma hepatocelular, sendo focado em lesões hepatocitárias no contexto do fígado cirrótico.

Tremosini *et al.*, 2012, em um trabalho com 40 casos de CHC, encontraram 57,5% de sensibilidade e 95% de especificidade para Glypican-3, 57,5% de sensibilidade e 85% de especificidade para HSP-70 e 50% de sensibilidade e 90% de especificidade. Quando pelo menos 2 dos 3 marcadores estavam positivos, a

sensibilidade foi de 60% e a especificidade foi de 100% para o diagnóstico de CHC. Este estudo, por ter avaliado de forma prospectiva biópsias pré-operatórias e a peça cirúrgica posteriormente, mostrou que este painel triplo ajudou a reclassificar apenas 1 de 3 casos diagnosticados erroneamente como não malignos pela equipe de Patologia Cirúrgica. Deste modo, o autor enfatiza a necessidade de marcadores que possam ser úteis para casos que realmente levantem dúvida diagnóstica e a fundamental importância de serem correlacionados com aspectos morfológicos clássicos. Isto reforça a importância de nosso estudo ter sido desenvolvido em explantes, o que possibilitou uma avaliação completa da lesão para seu diagnóstico e uma melhor correlação com os marcadores estudados. Contudo, pelo fato de nossa amostra conter muitos casos com alterações morfológicas clássicas de CHC, deve-se atentar para a necessidade de novos trabalhos que também abordem a questão do papel de marcadores como Ang-2 em lesões malignas precoces e bem diferenciadas.

Deve-se ressaltar que, embora a Ang-2 seja um marcador cada vez mais associado à progressão do CHC, ainda são escassos os estudos que a abordam como ferramenta diagnóstica e prognóstica na prática clínica diária. A busca bibliográfica efetuada mostrou uma maior quantidade de estudos envolvendo o marcador VEGF, havendo menos referências disponíveis para o entendimento do papel da Ang-2 e sua marcação. Nosso estudo, ao ser desenvolvido em explantes de pacientes submetidos a transplante hepático, permitiu ampla seleção de amostras de nódulos benignos e malignos, e o método utilizado, a avaliação por meio de estudo imuno-histoquímico, constitui uma ferramenta de mais fácil acesso ao patologista cirúrgico em sua prática diagnóstica diária quando comparado à biologia molecular. O estudo de amostras benignas e pré-neoplásicas separadamente permitiu ainda o cálculo de parâmetros como sensibilidade e especificidade dos marcadores avaliados, parâmetro pouco estudado por outros autores. Até onde sabemos, não foi encontrado outro estudo que avaliasse a imunexpressão de Ang-2 e VEGF conjuntamente em uma série de explantes hepáticos, considerando a separação entre lesões benignas, displásicas e malignas. O diagnóstico correto do CHC e de suas lesões precursoras é fundamental, tanto no pré-operatório, para melhor alocação dos pacientes segundo a prioridade

transplante, como no pós-operatório, para definição de condutas referentes a imunossupressão e acompanhamento clínico.

Cabe mencionar, contudo, que a amostragem de lesões displásicas neste estudo foi pequena, comprometendo uma análise estatística com maior poder de definição. Esta fraqueza deve ser mencionada pelo fato de as lesões displásicas serem as que mais apresentam dificuldades diagnósticas por parte da avaliação clínica, radiológica e anatomopatológica. Além disso, as lesões classificadas como CHC muitas vezes estavam localizadas no mesmo explante, dificultando a distinção entre uma mesma neoplasia com disseminação intra-hepática ou várias neoplasias com fenótipos distintos. Por fim, embora tenham sido diagnosticados 32 CHCs no período do estudo, houve perda de 10 casos após seleção dos blocos e confecção do Tissue Microarray, restando, pois, 22 spots para serem avaliados. A subjetividade inerente ao método de avaliação imuno-histoquímica também deve ser levantada como limitação de nosso estudo.

## 6 CONCLUSÃO

Nosso estudo mostrou que a Angiopietina-2, quando comparada a outros marcadores avaliados na literatura para o diagnóstico do CHC, pode representar um bom marcador para auxiliar no diagnóstico desta neoplasia. O marcador VEGF não constitui uma boa ferramenta auxiliar diagnóstica devido à sua baixa especificidade. Ambos os marcadores estudados mostraram boa associação com outros parâmetros para avaliação da angiogênese (capilarização e número de artérias), em especial o VEGF.

Não foi observada associação entre a marcação para Ang-2 e VEGF e critérios anatomopatológicos utilizados para a estratificação prognóstica de pacientes com Carcinoma Hepatocelular, devendo-se, contudo, avaliar parâmetros clínicos para melhor definição do papel prognóstico destes marcadores e suas vias como possíveis alvos terapêuticos.

Reforçamos ainda a necessidade de melhor compreensão dos marcadores de angiogênese e seu papel para definição diagnóstica e prognóstica na abordagem do carcinoma hepatocelular e de suas lesões precursoras.



## REFERÊNCIAS

AKIN KABALAK, P. et al. Prognostic significance of serum vascular endothelial growth factor and Angiopoietin-2 in patients with lung cancer. **Tuberk Toraks**, v. 63, n. 2, p. 71-7, Jun 2015. ISSN 0494-1373. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26167963> >.

AMAOKA, N. et al. Clinicopathological features of hepatocellular carcinoma evaluated by vascular endothelial growth factor expression. **J Gastroenterol Hepatol**, v. 22, n. 12, p. 2202-7, Dec 2007. ISSN 0815-9319. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18031381> >.

BENNETT, G. L. et al. Sonographic detection of hepatocellular carcinoma and dysplastic nodules in cirrhosis: correlation of pretransplantation sonography and liver explant pathology in 200 patients. **AJR Am J Roentgenol**, v. 179, n. 1, p. 75-80, Jul 2002. ISSN 0361-803X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12076908> >.

BLANC, J. F. et al. [Precancerous lesions in the cirrhotic and non-cirrhotic liver]. **Gastroenterol Clin Biol**, v. 28, n. 5 Suppl, p. D158-70, May 2004. ISSN 0399-8320. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15213676> >.

BOSMAN, F. T. et al. **WHO Classification of Tumours of the Digestive System, Fourth Edition**. IARC, 2010.

BRUNCKHORST, M. K. et al. Angiopoietins promote ovarian cancer progression by establishing a procancer microenvironment. **Am J Pathol**, v. 184, n. 8, p. 2285-96, Aug 2014. ISSN 1525-2191. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25043619> >.

BURREL, M. et al. MRI angiography is superior to helical CT for detection of HCC prior to liver transplantation: an explant correlation. **Hepatology**, v. 38, n. 4, p. 1034-42, Oct 2003. ISSN 0270-9139. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14512891> >.

CAMPILLO, A. et al. Angiogenesis and proliferation markers in adjacent cirrhotic tissue could predict hepatocellular carcinoma outcome after liver transplantation. **Eur J Gastroenterol Hepatol**, v. 26, n. 8, p. 871-9, Aug 2014. ISSN 1473-5687. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24922356> >.

CAROLI-BOTTINO, A. et al. Hepatocellular carcinoma: incidental finding in cirrhotic explanted livers. **Transplant Proc**, v. 37, n. 6, p. 2791-2, 2005 Jul-Aug 2005. ISSN 0041-1345. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16182811> >.

CHOI, J. Y.; LEE, J. M.; SIRLIN, C. B. CT and MR imaging diagnosis and staging of hepatocellular carcinoma: part I. Development, growth, and spread: key pathologic and imaging aspects. **Radiology**, v. 272, n. 3, p. 635-54, Sep 2014. ISSN 1527-1315. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25153274> >.

CLAUDIO, P. P. et al. pRb2/p130, vascular endothelial growth factor, p27(KIP1), and proliferating cell nuclear antigen expression in hepatocellular carcinoma: their clinical significance. **Clin Cancer Res**, v. 10, n. 10, p. 3509-17, May 2004. ISSN 1078-0432. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15161709> >.

DE LÉDINGHEN, V. et al. Detection of nodules in liver cirrhosis: spiral computed tomography or magnetic resonance imaging? A prospective study of 88 nodules in 34 patients. **Eur J Gastroenterol Hepatol**, v. 14, n. 2, p. 159-65, Feb 2002. ISSN 0954-691X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11981340> >.

DELI, G. et al. Immunohistochemical assessment of angiogenesis in hepatocellular carcinoma and surrounding cirrhotic liver tissues. **World J Gastroenterol**, v. 11, n. 7, p. 960-3, Feb 2005. ISSN 1007-9327. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15742396> >.

DESMET, V. J. East-West pathology agreement on precancerous liver lesions and early hepatocellular carcinoma. **Hepatology**, v. 49, n. 2, p. 355-7, Feb 2009. ISSN 1527-3350. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19127518> >.

DI TOMMASO, L. et al. The application of markers (HSP70 GPC3 and GS) in liver biopsies is useful for detection of hepatocellular carcinoma. **J Hepatol**, v. 50, n. 4, p. 746-54, Apr 2009. ISSN 1600-0641. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19231003> >.

DI TOMMASO, L. et al. Diagnostic value of HSP70, glypican 3, and glutamine synthetase in hepatocellular nodules in cirrhosis. **Hepatology**, v. 45, n. 3, p. 725-34, Mar 2007. ISSN 0270-9139. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17326147> >.

EL-SERAG, H. B.; RUDOLPH, K. L. Hepatocellular carcinoma: epidemiology and molecular carcinogenesis. **Gastroenterology**, v. 132, n. 7, p. 2557-76, Jun 2007. ISSN 0016-5085. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17570226> >.

FELCHT, M. et al. Angiopoietin-2 differentially regulates angiogenesis through TIE2 and integrin signaling. **J Clin Invest**, v. 122, n. 6, p. 1991-2005, Jun 2012. ISSN 1558-8238. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22585576> >.

FEO, F.; PASCALE, R. M. Multifocal hepatocellular carcinoma: intrahepatic metastasis or multicentric carcinogenesis? **Ann Transl Med**, v. 3, n. 1, p. 4, Jan 2015. ISSN 2305-5839. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25705636> >.

FILMUS, J.; CAPURRO, M. Glypican-3: a marker and a therapeutic target in hepatocellular carcinoma. **FEBS J**, v. 280, n. 10, p. 2471-6, May 2013. ISSN 1742-4658. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23305321> >.

GOMES, M. et al. **Carcinoma Hepatocelular: Epidemiologia, Biologia, Diagnóstico e Terapias**. São Paulo: Revista da Associação Médica Brasileira. 5: 514-524 p. 2013.

HUANG, G. W.; YANG, L. Y.; LU, W. Q. Expression of hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  and vascular endothelial growth factor in hepatocellular carcinoma: Impact on neovascularization and survival. **World J Gastroenterol**, v. 11, n. 11, p. 1705-8, Mar 2005. ISSN 1007-9327. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15786555> >.

HUANG, M. et al. Overexpression of hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  is a predictor of poor prognosis in cervical cancer: a clinicopathologic study and a meta-analysis. **Int J Gynecol Cancer**, v. 24, n. 6, p. 1054-64, Jul 2014. ISSN 1525-1438. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24978711> >.

HYTIROGLOU, P. et al. Macroregenerative nodules in a series of adult cirrhotic liver explants: issues of classification and nomenclature. **Hepatology**, v. 21, n. 3, p. 703-8, Mar 1995. ISSN 0270-9139. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7875667> >.

JAWHAR, N. M. Tissue Microarray: A rapidly evolving diagnostic and research tool. **Ann Saudi Med**, v. 29, n. 2, p. 123-7, 2009 Mar-Apr 2009. ISSN 0256-4947. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19318744> >.

JIA, J. B. et al. Protein expression profiling of vascular endothelial growth factor and its receptors identifies subclasses of hepatocellular carcinoma and predicts survival. **J Cancer Res Clin Oncol**, v. 135, n. 6, p. 847-54, Jun 2009. ISSN 1432-1335. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19066962> >.

KIM, C. K.; LIM, J. H.; LEE, W. J. Detection of hepatocellular carcinomas and dysplastic nodules in cirrhotic liver: accuracy of ultrasonography in transplant

patients. **J Ultrasound Med**, v. 20, n. 2, p. 99-104, Feb 2001. ISSN 0278-4297. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11211142> >.

KOBAYASHI, M. et al. Dysplastic nodules frequently develop into hepatocellular carcinoma in patients with chronic viral hepatitis and cirrhosis. **Cancer**, v. 106, n. 3, p. 636-47, Feb 2006. ISSN 0008-543X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16369988> >.

KOJIRO, M. Focus on dysplastic nodules and early hepatocellular carcinoma: an Eastern point of view. **Liver Transpl**, v. 10, n. 2 Suppl 1, p. S3-8, Feb 2004. ISSN 1527-6465. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14762831> >.

KOJIRO, M.; ROSKAMS, T. Early hepatocellular carcinoma and dysplastic nodules. **Semin Liver Dis**, v. 25, n. 2, p. 133-42, 2005. ISSN 0272-8087. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15918142> >.

KRINSKY, G. A. et al. Dysplastic nodules and hepatocellular carcinoma: sensitivity of digital subtraction hepatic arteriography with whole liver explant correlation. **J Comput Assist Tomogr**, v. 24, n. 4, p. 628-34, 2000 Jul-Aug 2000. ISSN 0363-8715. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10966200> >.

LAGANA, S. M. et al. Utility of an immunohistochemical panel consisting of glypican-3, heat-shock protein-70, and glutamine synthetase in the distinction of low-grade hepatocellular carcinoma from hepatocellular adenoma. **Appl Immunohistochem Mol Morphol**, v. 21, n. 2, p. 170-6, Mar 2013. ISSN 1533-4058. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22914605> >.

LE BAIL, B. et al. Prevalence of liver cell dysplasia and association with HCC in a series of 100 cirrhotic liver explants. **J Hepatol**, v. 27, n. 5, p. 835-42, Nov 1997. ISSN 0168-8278. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9382971> >.

LIBBRECHT, L. et al. Glypican-3 expression distinguishes small hepatocellular carcinomas from cirrhosis, dysplastic nodules, and focal nodular hyperplasia-like nodules. **Am J Surg Pathol**, v. 30, n. 11, p. 1405-11, Nov 2006. ISSN 0147-5185. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17063081> >.

MION, F. et al. Adult cirrhotic liver explants: precancerous lesions and undetected small hepatocellular carcinomas. **Gastroenterology**, v. 111, n. 6, p. 1587-92, Dec 1996. ISSN 0016-5085. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8942738> >.

MITSUHASHI, N. et al. Angiopoietins and Tie-2 expression in angiogenesis and proliferation of human hepatocellular carcinoma. **Hepatology**, v. 37, n. 5, p. 1105-13,

May 2003. ISSN 0270-9139. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12717391> >.

MOON, W. S. et al. Overexpression of VEGF and angiopoietin 2: a key to high vascularity of hepatocellular carcinoma? **Mod Pathol**, v. 16, n. 6, p. 552-7, Jun 2003. ISSN 0893-3952. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12808060> >.

NASCIMENTO, C. et al. Vascular immunohistochemical markers: contributions to hepatocellular nodule diagnosis in explanted livers. **Transplant Proc**, v. 41, n. 10, p. 4211-3, Dec 2009. ISSN 1873-2623. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20005371> >.

ONACA, N. et al. Expanded criteria for liver transplantation in patients with hepatocellular carcinoma: a report from the International Registry of Hepatic Tumors in Liver Transplantation. **Liver Transpl**, v. 13, n. 3, p. 391-9, Mar 2007. ISSN 1527-6465. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17318865> >.

PANG, R.; POON, R. T. Angiogenesis and antiangiogenic therapy in hepatocellular carcinoma. **Cancer Lett**, v. 242, n. 2, p. 151-67, Oct 2006. ISSN 0304-3835. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16564617> >.

PARK, Y. N. Update on precursor and early lesions of hepatocellular carcinomas. **Arch Pathol Lab Med**, v. 135, n. 6, p. 704-15, Jun 2011. ISSN 1543-2165. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21631263> >.

PARTY, I. W. Terminology of nodular hepatocellular lesions. **Hepatology**, v. 22, n. 3, p. 983-93, Sep 1995. ISSN 0270-9139. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7657307> >.

PASCHOAL, J. P. et al. Microvascular density of regenerative nodule to small hepatocellular carcinoma by automated analysis using CD105 and CD34 immunoeexpression. **BMC Cancer**, v. 14, p. 72, 2014. ISSN 1471-2407. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24507660> >.

QUAGLIA, A. et al. Classification tool for the systematic histological assessment of hepatocellular carcinoma, macroregenerative nodules, and dysplastic nodules in cirrhotic liver. **World J Gastroenterol**, v. 11, n. 40, p. 6262-8, Oct 2005. ISSN 1007-9327. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16419153> >.

RAHBARI, N. N. et al. Hepatocellular carcinoma: current management and perspectives for the future. **Ann Surg**, v. 253, n. 3, p. 453-69, Mar 2011. ISSN 1528-1140. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21263310> >.

RAHIMI, N. The ubiquitin-proteasome system meets angiogenesis. **Mol Cancer Ther**, v. 11, n. 3, p. 538-48, Mar 2012. ISSN 1538-8514. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22357635> >.

RAVAIOLI, M. et al. Liver transplantation for hepatic tumors: a systematic review. **World J Gastroenterol**, v. 20, n. 18, p. 5345-52, May 2014. ISSN 2219-2840. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24833864> >.

RONCALLI, M. et al. Liver precancerous lesions and hepatocellular carcinoma: the histology report. **Dig Liver Dis**, v. 43 Suppl 4, p. S361-72, Mar 2011. ISSN 1878-3562. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21459342> >.

SATO, T. et al. Natural history of large regenerative nodules and dysplastic nodules in liver cirrhosis: 28-year follow-up study. **Hepatol Int**, v. 9, n. 2, p. 330-6, Apr 2015. ISSN 1936-0541. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25788204> >.

SEGATELLI, V. et al. Evaluation and comparison of microvessel density using the markers CD34 and CD105 in regenerative nodules, dysplastic nodules and hepatocellular carcinoma. **Hepatol Int**, v. 8, n. 2, p. 260-5, Apr 2014. ISSN 1936-0541. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26202507> >.

SHAFIZADEH, N.; KAKAR, S. Diagnosis of well-differentiated hepatocellular lesions: role of immunohistochemistry and other ancillary techniques. **Adv Anat Pathol**, v. 18, n. 6, p. 438-45, Nov 2011. ISSN 1533-4031. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21993269> >.

SILVA, D.; LEITE, V. Cirrhotic liver explants: regenerative nodule, dysplasia and hepatocellular carcinoma occurrence. **J Bras Patol Med Lab**, v. 41, n. 6, p. 6, 2005.

SWANSON, B. J. et al. A triple stain of reticulin, glypican-3, and glutamine synthetase: a useful aid in the diagnosis of liver lesions. **Arch Pathol Lab Med**, v. 139, n. 4, p. 537-42, Apr 2015. ISSN 1543-2165. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25822763> >.

TANAKA, S. et al. Biologic significance of angiopoietin-2 expression in human hepatocellular carcinoma. **J Clin Invest**, v. 103, n. 3, p. 341-5, Feb 1999. ISSN 0021-9738. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9927494> >.

TIAN, Q. et al. Overexpression of hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  induces migration and invasion through Notch signaling. **Int J Oncol**, v. 47, n. 2, p. 728-38, Aug 2015. ISSN 1791-2423. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26094772> >.

TORIMURA, T. et al. Overexpression of angiopoietin-1 and angiopoietin-2 in hepatocellular carcinoma. **J Hepatol**, v. 40, n. 5, p. 799-807, May 2004. ISSN 0168-8278. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15094228> >.

TREMOSINI, S. et al. Prospective validation of an immunohistochemical panel (glypican 3, heat shock protein 70 and glutamine synthetase) in liver biopsies for diagnosis of very early hepatocellular carcinoma. **Gut**, v. 61, n. 10, p. 1481-7, Oct 2012. ISSN 1468-3288. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22287594> >.

TSENG, P. L. et al. Overexpression of VEGF is associated with positive p53 immunostaining in hepatocellular carcinoma (HCC) and adverse outcome of HCC patients. **J Surg Oncol**, v. 98, n. 5, p. 349-57, Oct 2008. ISSN 1096-9098. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18646041> >.

UEMATSU, S. et al. Altered expression of vascular endothelial growth factor, fibroblast growth factor-2 and endostatin in patients with hepatocellular carcinoma. **J Gastroenterol Hepatol**, v. 20, n. 4, p. 583-8, Apr 2005. ISSN 0815-9319. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15836707> >.

VENOOK, A. P. et al. The incidence and epidemiology of hepatocellular carcinoma: a global and regional perspective. **Oncologist**, v. 15 Suppl 4, p. 5-13, 2010. ISSN 1549-490X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21115576> >.

WANG, B. et al. Expression and significance of MMP2 and HIF-1 $\alpha$  in hepatocellular carcinoma. **Oncol Lett**, v. 8, n. 2, p. 539-546, Aug 2014. ISSN 1792-1074. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25013467> >.

WANG, D. et al. Significance of the vascular endothelial growth factor and the macrophage migration inhibitory factor in the progression of hepatocellular carcinoma. **Oncol Rep**, v. 31, n. 3, p. 1199-204, Mar 2014. ISSN 1791-2431. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24366206> >.

WANG, H. L. et al. Glypican-3 as a useful diagnostic marker that distinguishes hepatocellular carcinoma from benign hepatocellular mass lesions. **Arch Pathol Lab Med**, v. 132, n. 11, p. 1723-8, Nov 2008. ISSN 1543-2165. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18976006> >.

WEI, L. X.; SHI, H. Y. [Pathologic diagnosis and differential diagnosis of precancerous liver lesions and well-differentiated hepatocellular carcinoma]. **Zhonghua Bing Li Xue Za Zhi**, v. 35, n. 2, p. 117-8, Feb 2006. ISSN 0529-5807. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16630489> >.

YAO, D. F. et al. Quantitative analysis of vascular endothelial growth factor, microvascular density and their clinicopathologic features in human hepatocellular carcinoma. **Hepatobiliary Pancreat Dis Int**, v. 4, n. 2, p. 220-6, May 2005. ISSN 1499-3872. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15908319> >.

YU, D. C. et al. Mechanism of endothelial progenitor cell recruitment into neo-vessels in adjacent non-tumor tissues in hepatocellular carcinoma. **BMC Cancer**, v. 10, p. 435, 2010. ISSN 1471-2407. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20716344> >.

ZHAN, P.; QIAN, Q.; YU, L. K. Prognostic significance of vascular endothelial growth factor expression in hepatocellular carcinoma tissue: a meta-analysis. **Hepatobiliary Surg Nutr**, v. 2, n. 3, p. 148-55, Jun 2013. ISSN 2304-3881. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24570933> >.

ZHANG, L. et al. Tumor-derived vascular endothelial growth factor up-regulates angiopoietin-2 in host endothelium and destabilizes host vasculature, supporting angiogenesis in ovarian cancer. **Cancer Res**, v. 63, n. 12, p. 3403-12, Jun 2003. ISSN 0008-5472. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12810677> >.

ZHANG, Z. L.; LIU, Z. S.; SUN, Q. Expression of angiopoietins, Tie2 and vascular endothelial growth factor in angiogenesis and progression of hepatocellular carcinoma. **World J Gastroenterol**, v. 12, n. 26, p. 4241-5, Jul 2006. ISSN 1007-9327. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16830384> >.

ZIELLO, J. E.; JOVIN, I. S.; HUANG, Y. Hypoxia-Inducible Factor (HIF)-1 regulatory pathway and its potential for therapeutic intervention in malignancy and ischemia. **Yale J Biol Med**, v. 80, n. 2, p. 51-60, Jun 2007. ISSN 1551-4056. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18160990> >.



## APÊNDICE 1 – TABELA DE DADOS EPIDEMIOLÓGICOS BRUTOS

Paciente	Idade	Sexo	Cirrose	MNR	LGDN	HGDN	CHC precoce	CHC	Outros
1	62	F	1	0	0	0	0	0	0
2	57	M	0	0	0	0	0	4	0
3	55	M	0	0	0	0	0	2	0
4	66	M	1	0	0	0	0	1	0
5	53	M	1	0	0	0	0	0	0
6	45	F	2	0	0	0	0	2	2
7	43	M	1	0	0	0	0	0	0
8	53	M	1	0	0	0	0	0	0
9	56	F	1	0	0	0	0	2	0
10	45	M	1	0	0	0	0	0	0
11	53	M	1	0	0	0	0	0	0
12	60	F	1	1	0	0	0	0	0
13	48	M	1	1	0	0	0	0	0
14	66	M	1	0	0	0	0	2	0
15	28	F	1	2	0	0	1	0	0
16	27	F	1	0	0	0	0	0	0
17	69	M	1	0	0	0	0	1	0
18	62	F	1	0	0	0	0	0	0
19	32	F	1	0	0	0	0	0	0
20	70	F	1	0	0	0	0	0	0
21	63	M	1	0	0	0	0	0	0
22	0I	0I	1	0	0	0	0	0	0
23	43	F	0	0	0	0	0	1	0
24	51	M	1	0	0	0	0	0	0
25	40	F	1	0	0	0	0	0	0
26	44	M	1	0	0	0	0	0	0
27	60	M	2	0	0	0	0	2	0
28	57	M	1	0	0	0	0	5	0
29	51	M	1	0	0	0	0	0	0
30	59	F	1	0	0	0	0	0	0
31	50	M	1	0	0	0	0	0	0
32	54	M	1	1	0	0	0	0	0
33	39	M	1	0	0	0	0	0	0
34	D	M	1	1	0	0	0	0	0
35	48	M	1	0	0	0	0	0	0
36	72	M	1	0	0	0	0	0	0
37	56	M	1	0	0	0	0	0	0
38	39	F	1	0	0	0	0	0	0
39	66	M	1	0	0	0	0	0	0
40	70	M	1	0	0	0	0	0	0
41	59	F	1	0	0	0	0	0	0
42	47	M	1	0	0	0	0	0	1

43	70	M	1	0	0	0	0	0	0
44	44	M	1	0	0	1	0	0	0
45	46	M	1	0	0	0	0	1	0
46	64	M	0	0	0	0	0	6	0
47	60	M	1	0	0	0	0	0	0
48	61	M	1	0	0	0	0	2	0
49	60	M	1	1	0	0	0	0	0
50	31	F	1	0	0	0	0	0	0
51	58	M	1	0	0	1	0	1	0
52	58	M	1	0	1	0	0	0	0
53	56	F	1	0	3	0	0	0	0
54	42	M	1	0	0	0	0	0	0
55	46	F	1	0	0	0	0	0	0
56	53	M	1	0	0	0	0	0	0
57	48	M	1	0	0	1	0	0	0
58	42	M	1	0	0	0	0	0	0
59	63	M	1	0	0	0	0	0	0
60	51	F	1	0	0	0	0	0	0
61	66	F	1	0	0	0	0	0	0
62	44	F	1	0	0	0	0	0	0
63	67	M	1	0	0	0	0	0	0
64	68	M	1	0	0	0	0	0	0
65	46	M	1	0	0	0	0	0	0
66	39	F	1	0	0	0	0	0	0
67	59	F	1	0	0	0	0	0	0

Fonte: o autor

## ANEXO 1 – APROVAÇÃO PELO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** Correlação clínico-patológica e avaliação imuno-histoquímica dos marcadores de angiogênese VEGF, HIF-1alfa e Angiopoietina-2 em nódulos hepatocelulares de explantes do Hospital Geral de Fortaleza.

**Pesquisador:** André Costa Teixeira

**Área Temática:**

**Versão:** 2

**CAAE:** 35619014.7.0000.5040

**Instituição Proponente:** Hospital Geral de Fortaleza/SUS

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 833.375

**Data da Relatoria:** 09/10/2014

#### Apresentação do Projeto:

Estudo do tipo transversal, que utilizará amostras histológicas de fígados com diagnóstico de Cirrose para realização de exame imuno-histoquímico em lesões nodulares hepatocelulares e comparação entre os diversos grupos de lesões (marcadores de angiogênese VEGF, HIF-1alfa e Angiopoietina-2).

A avaliação da expressão proteica imuno-histoquímica dos marcadores de angiogênese VEGF, HIF-alfa e Angiopoietina 2 pode ser útil no diagnóstico diferencial de nódulos hepatocelulares nos pacientes cirróticos.

- Há uma associação entre a expressão imuno-histoquímica de marcadores de angiogênese no fígado cirrótico e a presença de hepatocarcinoma e nódulos displásicos nos explantes hepáticos.

#### Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

- Avaliar a expressão imuno-histoquímica de marcadores de angiogênese em nódulos hepatocelulares de explantes do Hospital Geral de Fortaleza no período de Janeiro de 2013 a Dezembro de 2014.

Objetivo Secundário:

- Verificar a incidência de nódulos displásicos e de hepatocarcinomas nos explantes hepáticos.-

**Endereço:** Rua Avila Goulart, nº 900

**Bairro:** Papicú

**CEP:** 60.155-290

**UF:** CE

**Município:** FORTALEZA

**Telefone:** (85)3104.3070

**Fax:** (85)3104.3183

**E-mail:** cep@hgfcc.gov.br