

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIRURGIA

**EXPRESSÃO DO EGFr COMO FATOR
PROGNÓSTICO DA RECIDIVA DO CARCINOMA
HEPATOCELULAR PÓS-TRANSPLANTE.**

Guillermo Kiss
Dissertação de Mestrado

Orientadora: **Maria Lúcia Zanotelli**

Porto Alegre, Dezembro de 2008

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIRURGIA

**EXPRESSÃO DO EGFr COMO FATOR PROGNÓSTICO
DA RECIDIVA DO CARCINOMA HEPATOCELULAR
PÓS-TRANSPLANTE.**

A apresentação desta dissertação é exigência do Programa de Pós-Graduação em Medicina: Cirurgia, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, para obtenção do título de Mestre

Guillermo Kiss
Dissertação de Mestrado

Orientadora: **Maria Lúcia Zanotelli**

Porto Alegre, Dezembro de 2008

AGRADECIMENTOS

À **Dra. Maria Lúcia Zanotelli**, do Programa de Pós-Graduação da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), por sua orientação na realização deste trabalho, por confiar em minha capacidade e por sua amizade.

Ao **Prof. Carlos Thadeu Schmidt Cerski**, do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da UFRGS e do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), por sua incondicional ajuda no preparo e interpretação das lâminas, e pelas sugestões, que possibilitaram a realização deste trabalho.

À **Dra. Lúcia Maria Kliemann**, querida amiga e excelente patologista, pela inestimável ajuda para realização deste estudo.

Aos **funcionários do Serviço de Anatomia Patológica HCPA**, em especial à técnica **Flávia**, pela preparação das lâminas.

Ao **Dr. Carlos Bacchi** e sua equipe, pela presteza em seus serviços e imensurável ajuda nesta pesquisa.

Ao **Dr. Mário Wagner**, pela preciosa ajuda na análise estatística.

A **Sra. Estela**, secretária do Programa de Pós-Graduação, sempre atenciosa e solícita.

À **Equipe de Transplante Hepático da Santa Casa de Porto Alegre**, pela incansável luta e dedicação aos pacientes, pelo apoio durante a realização deste trabalho e pela amizade.

Ao **Programa de Pós-Graduação em Medicina: Cirurgia e aos seus coordenadores**, por possibilitarem a realização do experimento.

Ao **Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação (GPPG) do HCPA**, pelas orientações e sugestões.

À **Universidade Federal do Rio Grande do Sul**, que me proporcionou a realização de um curso de pós-graduação de reconhecida qualidade.

Ao **Serviço de Patologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre**, que possibilitou a realização do trabalho.

À **Elisiane Neumann**, minha esposa, pelo seu amor, carinho, compreensão e incondicional apoio em todos os momentos.

À **minha família**, pelo carinho, pelo exemplo e pelo apoio em todas as horas de minha vida.

RESUMO

Justificativa: A recidiva do Carcinoma Hepatocelular (CHC) é um fator limitante da sobrevida nos indivíduos submetidos a transplante hepático (TxH). Além do número e tamanho do tumor, invasão vascular e grau de diferenciação, compreender a biologia tumoral e os biomarcadores relacionados é um passo importante para prever a recidiva e estabelecer estratégias terapêuticas. **Objetivos:** Analisar a expressão e valor prognóstico do receptor do Fator de Crescimento Epidérmico (EGFr) e sua relação com outros fatores implicados na recidiva no CHC. **Pacientes e métodos:** Foram analisados retrospectivamente os dados de 59 pacientes cirróticos submetidos a TxH no nosso centro com diagnóstico histopatológico confirmado de CHC no período de 2001 a 2006. **Resultados:** Foi registrada uma sobrevida global e em 1, 3 e 5 anos de 89,3%, 74,9% e 72,4% respectivamente e uma sobrevida livre de doença em 1, 3 e 5 anos de 84,8%, 69,6% e 69,6% respectivamente. A taxa de recidiva foi de 22,03%. O EGFr foi expresso em 93,2% dos tumores, mas não apresentou relação estatisticamente significativa com risco de recidiva ($p=0,147$) ou outros fatores de risco. Somente a invasão vascular ($p=0,046$) e o tamanho > 5 cm ($p=0,046$) foram capazes de predizer o risco de recidiva. **Conclusão:** O tamanho tumoral e a invasão vascular foram os principais fatores de risco relacionados à recidiva tumoral, enquanto a expressão do EGFr, embora bastante alta, não tem relação com este risco.

ABSTRACT

Background: Recurrent Hepatocellular Carcinoma (HCC) is a significant cause of death after liver transplantation (LT). Understanding tumor biology and correlate biomarkers is an important step to predict recurrence and establish new therapies.

Purpose: Analyze the expression and prognostic significance of Epidermal Growth Factor receptor (EGFr) on HCC and its relationship with other prognostic factors.

Patients and methods: Data from 59 cirrhotic patients who underwent LT between 2001 and 2006 with pathological confirmation of HCC were analyzed retrospectively.

Results: The overall survival at 1, 3 e 5 years was 89.3%, 74.9%, 72.4% while recurrence-free was 84.8%, 69.6, 69.6% respectively with a recurrence rate of 22%.

EGFr was expressed in 93.2% of tumors, but no statistical relationship with HCC recurrence ($p=0.147$) were found. Only vascular invasion ($p=0.046$) and tumor size > 5

cm ($p=0.046$) predicted tumor recurrence. **Conclusion:** EGFr was widely expressed on our series of tumors, and, as so, has a poor prognostic value, with no significance among groups (negative, weak and strong expression) considering HCC recurrence.

Only tumor size and vascular invasion were significant predictors of tumor recurrence.

Key words: Hepatocellular carcinoma, liver transplantation, risk factors, EGFr

ABREVIACÕES

- AASLD – *American Association for the Study of the Liver*
- AJCC – American Joint Committee on Cancer
- Akt – *v-akt murine thymoma viral oncogene homolog*
- AMPc - AMP cíclico
- AR – *Amphiregulin* (anfiregulina)
- ATP – *Adenosine triphosphat* (trifosfato de adenosina)
- BCLC – *Barcelona Clinic Liver Cancer staging system* (Sistema de estadiamento de Câncer Hepático do Grupo de Barcelona)
- BTC – *Betacellulin* (betacelulina)
- CHC – Carcinoma hepatocelular
- CLIP – *Cancer of the Liver Italian Program*
- CM /CMp – Critérios de Milão / Critérios de Milão baseado na análise anátomo- patologia do explante
- CTP – Child-Turcote-Pugh
- CUPI – *Chinese University Prognostic Index*
- DAB – *Diaminobenzin tetra-hydrochloride* (Tetrahidrocloreto de diaminobenedina)
- DNA – *Desoxiribonucleic acid* (ácido desoxirribonucléico)
- EASL – *European Association for the Study of the Liver*
- ECR – Ensaio clínico randomizado
- EGF – *Epidermal growth factor* (fator de crescimento epidérmico)
- EGFr – *Epidermal growth factor receptor* (receptor do fator de crescimento epidérmico)
- EUA – Estados Unidos da América
- GETCH – *Groupe d’Etude et de Traitement Du Carcinome Hepatocellulaire* (Grupo de estudo e tratamento do carcinoma hepatocelular)
- Grb2 – *Growth factor receptor-bound protein 2*
- HB-EGF – *Heparin binding – epidermal growth factor*
- HE – Hematoxilina-eosina
- HER – *Human epidermal growth factor* (fator de crescimento epidérmico humano)
- HGF – *Hepatocyte growth factor* (fator de crescimento do hepatócito)
- IGF – *Insulin-like growth factor* (fator de crescimento “tipo” insulina)
- JIS – *Japan Integrated Staging*
- kDa – Kilodalton
- MAPK – *Mitogen-activated serine/threonine kinase*
- MEK – Mitogen-activated protein kinase kinase
- MELD – *Model for End-Stage Liver Disease*
- PBS – Phosphate buffered solution (solução tampão de fosfato)

PEI – *Percutaneous ethanol injection* (injeção percutânea de etanol = Alcoolização tumoral)

PI3K – *Phosphoinositol-3-kinase*

QE – Quimioembolização

RF – *Radio frequency* (radio frequência)

SOS – *Son of Sevenless*

SV – Sobrevida

SVLD – Sobrevida livre de doença

TGF α – *transforming growth factor α* (fator de crescimento de transformação α)

TK – Tirocino-kinase

TNM – Tumor. Nódulo, Metástese

TxH – Transplante hepático

UICC – International Union Against Cancer

UCSF / UCSFp – Critérios da *University of California, San Francisco* (Universidade da Califórnia, São Francisco) / Critérios da UCSF baseados na análise anátomo-patológica do explante

UCLA – *University of California, Los Angeles* (Universidade da Califórnia, Los Angeles)

US – Ultrassonografia

VHB – vírus da hepatite B

VHC – vírus da hepatite C

ERBB / ErbB / HER / C-erbB identificam a mesma família de receptores / oncogenes

ÍNDICE

Agradecimentos	3
Resumo	5
Abstract	6
Abreviações	7
Índice	9
Introdução	10
Justificativa	29
Objetivos	30
Pacientes e métodos	31
Resultados	37
Discussão	44
Conclusões	53
Referências Bibliográficas	54
Anexo I	67

INTRODUÇÃO

Epidemiologia e fatores de risco

O câncer do fígado corresponde atualmente ao sexto tumor em frequência no mundo, respondendo por até 5,7% de todos os cânceres em humanos. Estima-se em torno de 711.000 casos por ano, sendo mais da metade destes ocorrendo na China (55%). Possui uma mortalidade quase igual a sua incidência (680.000), representando, assim, a terceira causa de morte relacionada ao câncer no mundo, chegando a atingir a primeira colocação em algumas áreas da Ásia e do Oriente Médio ^(1,2). O Carcinoma Hepatocelular (CHC) é o tumor primário do fígado mais freqüente em adultos, representando em torno de 85% dos tumores que acometem este órgão. Sua incidência vem crescendo na Europa e nos EUA e acredita-se, todavia, que sua frequência deva aumentar nas próximas duas décadas, decorrentes do alto número de pacientes infectados pelo vírus da hepatite C (VHC) antes dos anos 90 ⁽³⁾. De fato, este aumento observado nas duas últimas décadas não se deve apenas ao aumento na incidência do VHC. Na verdade, neste período, experimentou-se uma melhora no suporte e manejo do paciente cirrótico. As infecções bacterianas e hemorragias digestivas, ora tidas como principal causa de mortalidade destes indivíduos, agora são mais eficientemente prevenidas e tratadas, aumentando a sobrevida dos cirróticos avançados ⁽⁴⁾. Assim, o CHC atualmente lidera como principal causa de morte entre indivíduos cirróticos na Europa ^(3,5). No Brasil, não consta entre os dez mais incidentes, segundo dados obtidos dos Registros de Base Populacional existentes. A taxa de incidência padronizada por 100 mil habitantes variava de 1,07 em Belém (1988) a 9,34 em Porto Alegre (1991) em homens; e 0,28 em Belém (1988) a 7,04 em Goiânia (1990) nas mulheres ⁽⁶⁾.

Suas causas, em última análise, são bem conhecidas: qualquer agente que leva a lesão hepática crônica e, eventualmente a cirrose, constitui um agente oncogênico em potencial. Assim, a hepatopatia crônica e cirrose, em especial a relacionada ao Vírus da hepatite B (VHB) e C (VHC), ao álcool e a aflotoxina B₁, são os agentes mais relevantes, respondendo por até 90% dos casos de CHC, embora outras causas também estejam relacionadas em menor frequência, representando um menor impacto global. Aproximadamente 80% - 90% dos pacientes com CHC têm cirrose hepática e em torno de 5% desenvolvem Carcinoma Hepatocelular, a uma taxa estimada de 2% a 9% ao ano ^(2,7,8,9,10). A ampla variação na incidência do CHC no mundo reflete a grande heterogeneidade com que os fatores de risco se distribuem na população. Na Ásia e na África, o VHB - associado à Aflotoxina B₁ - são os fatores mais comuns, enquanto no ocidente e no Japão, o VHC e álcool são os fatores mais marcantes ^(7,8,9,10).

Rastreamento e opções terapêuticas

A detecção precoce, rastreando-se os pacientes sob risco, amplia a probabilidade de aplicar uma terapia curativa (que atualmente beneficia aproximadamente 30% dos indivíduos). A identificação precoce, especialmente de tumores < 2 cm, não é importante apenas pela potencialidade terapêutica. Neste tamanho, os nódulos são menos propensos à invasão do tecido hepático subjacente, invasão vascular e metástases ⁽⁴⁾. Pacientes com CHC detectados em programa de rastreamento possuem menor massa tumoral e melhores fatores prognósticos, com menos invasão portal e acometimento extra-hepático ⁽¹¹⁾.

Embora seja praticada por diversos grupos, há apenas um ensaio clínico randomizado (ECR) demonstrando uma mortalidade significativamente menor em

grupos de pacientes rastreados bianualmente para CHC ⁽¹²⁾. Outros estudos também demonstraram uma maior chance de receber terapia curativa nos grupos rastreados ^(5,11,13,14), enquanto que uma coorte teórica, que incluía o transplante hepático (TxH) como opção terapêutica, mostrou o benefício custo-efetivo desta prática quando a incidência de tumor excede 1,4% ao ano ⁽¹⁵⁾. Recomenda-se atualmente o rastreamento bianual com Ultrassonografia (US) ⁽¹⁶⁾. A Alfa-fetoproteína (AFP), comumente utilizada no rastreamento do CHC, tem perdido valor como instrumento para esta finalidade, uma vez que possui uma baixa sensibilidade (54%) ⁽¹⁷⁾. No entanto, seu valor como diagnóstico, associado aos exames de imagem, permanecem.

A maioria dos casos de CHC tem um mau prognóstico, evidenciado por uma mortalidade quase igual à sua incidência anual. Este quadro dramático ocorre em parte pela falta de um marcador que permita um diagnóstico precoce do CHC, pela hepatopatia subjacente que limita a aplicação de tratamentos locoregionais e pelo insucesso aos tratamentos quimioterápicos disponíveis. Uma revisão sistemática publicada em 2006 identificou apenas 77 ECRs no tratamento do CHC, atestando a carência de pesquisa e publicações nesta área. Dentre as diversas modalidades terapêuticas locoregionais e sistêmicas propostas, somente dois tratamentos têm potencial curativo: a cirurgia (ressecção e transplante) e os tratamentos percutâneos (ablação por radiofrequência e alcoolização), enquanto os tratamentos paliativos, com exceção da quimioembolização com resultado modesto, não se mostraram efetivos nos ECRs ⁽¹⁸⁾. No entanto, uma nova classe de agentes terapêuticos, ainda em fase de estudos, parece ter um resultado significativo em pacientes com CHC avançado ⁽¹⁹⁾.

A ressecção cirúrgica é, para muitos autores, a primeira escolha nos pacientes com nódulo solitário, função hepática preservada e pressão portal normal. A sobrevida

chega atingir 60% – 70% em 5 anos em grupos selecionados de pacientes. A recidiva tumoral, no entanto, é o maior problema (70% em 5 anos) sendo a invasão vascular, a presença de nódulos satélites e a má diferenciação os principais fatores preditivos (18,20,21,22). No entanto, o tamanho do nódulo não parece ter um impacto significativo na ausência de invasão vascular (23,24).

O CHC é, por natureza, um tumor multicêntrico, e o fígado cirrótico, uma “gigantesca lesão pré-neoplásica”. Até 60% dos indivíduos diagnosticados em programas de rastreamento possuem tumores multicêntricos e aproximadamente 10 – 15% das US intraoperatórias no curso de uma ressecção revelam nódulos não identificados previamente (4). Todavia, uma análise genômica demonstrou que mais de um terço das recidivas pós ressecção são tumores *de novo* (25). Sendo assim, não fica difícil compreender a alta taxa de recidiva em 5 anos após ressecção cirúrgica.

O TxH, por oferecer a maior margem cirúrgica permitida ao passo que trata concomitantemente o fígado cirrótico restabelecendo a função hepática normal, é considerado o tratamento ideal.

Desde o seu desenvolvimento inicial, o TxH tem sido utilizado como opção terapêutica no tratamento do CHC. De fato, as altas taxas de recidiva tumoral e de falência hepática pós-ressecção levaram a um entusiasmo inicial do transplante como opção terapêutica definitiva, em especial para os tumores irresssecáveis. No entanto, os resultados iniciais estavam associados a índices de recidiva tumoral na ordem de 32 – 54% com sobrevida em 5 anos <40% e, associada a universal escassez de órgãos, o entusiasmo por esta modalidade terapêutica rapidamente foi diminuindo (18,22). Apesar dos pobres resultados observados inicialmente, foi possível identificar um subgrupo de pacientes com resultados favoráveis. Este grupo incluía indivíduos com nódulo único

com tamanho máximo de 5 cm ou até 3 nódulos cujo diâmetro do maior não excede a 3 cm ^(20,21). Utilizando estes critérios, ora denominados critérios de Milão, demonstrou ter o transplante uma vantagem oncológica significativa sobre a ressecção com resultados comparados ao transplante em pacientes sem o diagnóstico de CHC. Neste contexto, a sobrevida chega a 75% em 5 anos com recidiva inferior a 15% ^(18,22). Atualmente, discute-se a expansão destes critérios visando beneficiar um maior número de pacientes ⁽²⁶⁻³⁴⁾. Uma limitação a expansão destes critérios é o subestadiamento pelos exames de imagem na avaliação pré-transplante, que podem chegar a 21% nos critérios de Milão (CM) e 29% quando se utiliza o critério da *University of California, San Francisco* (UCSF). O quadro 1 apresenta os respectivos critérios. Embora ainda persistam controvérsias, recentemente um estudo prospectivo validou este critério baseado na avaliação das imagens pré-operatórias ⁽³⁵⁾.

Quadro 1: Critérios de Milão e critérios expandidos (UCSF)

Critérios de Milão	Critérios UCSF
Nódulo único ≤ 5cm	Nódulo único ≤ 6,5 cm
3 nódulos ≤ 3 cm	2 – 3 nódulos ≤ 4,5 cm
	Diâmetro máximo 8cm

Estadiamento e prognóstico

Apesar dos diversos avanços nos estudos clínicos e dos bons resultados obtidos por alguns centros, somente uma pequena proporção dos pacientes é passível de cura no momento do diagnóstico. O desenvolvimento de metástases e a recidiva tumoral são as causas mais prevalentes de morte nos pacientes com CHC. Para a maioria dos tumores, o prognóstico e as indicações terapêuticas estão relacionados ao estágio tumoral no momento do diagnóstico. No entanto, este cenário é mais complexo no CHC, uma vez que a maioria ocorre em fígados cirróticos e a disfunção hepática subjacente tem um impacto no prognóstico a despeito do estágio tumoral. Após o diagnóstico do CHC, aproximadamente metade dos indivíduos sucumbem no primeiro ano. Assim, não apenas este último, mas também o estágio do desenvolvimento da hepatopatia são fatores que determinam simultaneamente o prognóstico, a aplicabilidade e eficácia dos tratamentos⁽³⁷⁾.

Desta forma, o prognóstico do CHC segue um modelo bastante complexo, que deve contemplar quatro aspectos: estágio tumoral, grau de função hepática, condição geral do paciente e a eficácia dos tratamentos⁽³⁷⁾. Diversos sistemas de escore foram desenvolvidos tais como o TNM, Okuda, Getch, CLIP, CUPI, JIS e BCLC entre outros⁽³⁷⁻⁴³⁾, com a intenção de prever o prognóstico deste tumor (Quadro 2). No entanto, a maioria identifica apenas os pacientes em estágio terminal e não associam o estadiamento com o tratamento^(44,45). O sistema TNM (AJCC/UICC) contempla apenas os aspectos tumorais em sua classificação e, embora tenha sofrido diversas modificações, possui valor limitado em estabelecer o prognóstico. O sistema desenvolvido por Okuda acrescenta variáveis relacionadas à função hepática (ascite, bilirrubina e albumina), mas não difere os casos precoces dos avançados, identificando

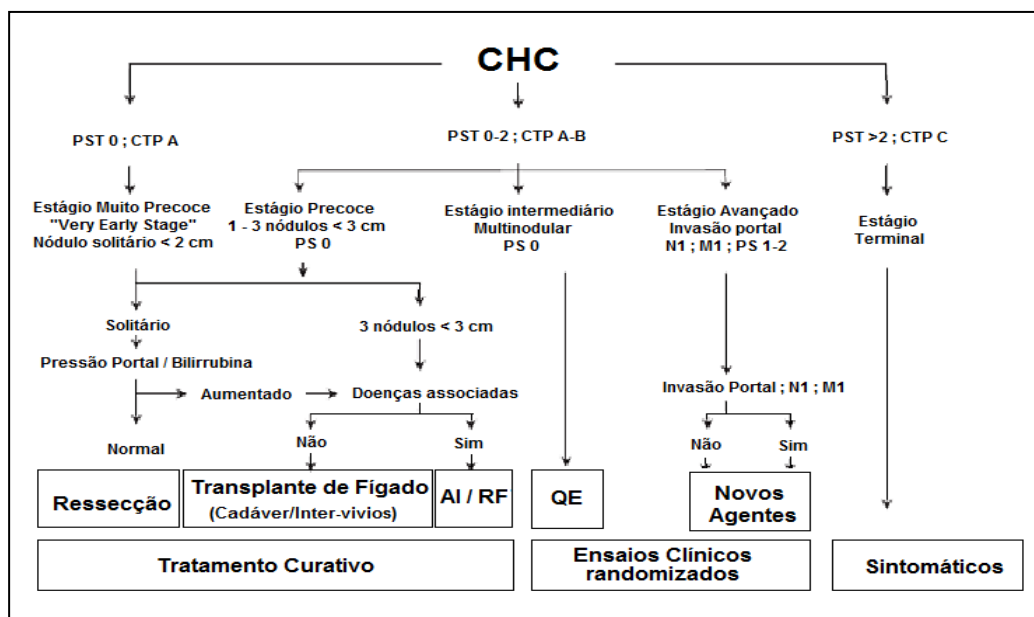
apenas os pacientes terminais. O sistema Francês (GETCH) foi construído baseado em uma coorte multicêntrica com pacientes em grande parte com hepatopatia alcoólica e neoplasia em estágio avançado e sua aplicabilidade em outros pacientes deve ser analisada e validada ⁽⁴⁴⁾. A classificação desenvolvida pelo grupo italiano (CLIP) foi construída a partir de uma coorte histórica e validada prospectivamente. Foi validada externamente por outros grupos ⁽⁴⁶⁾, mas apresentou menor poder discriminatório, em outros estudos ^(42,47,48). Assim como no sistema de Okuda, utiliza como parâmetro de avaliação do tumor uma massa superior ou inferior a 50% do volume hepático, tornando impossível a distinção dos tumores mais precoces (sobrevida em 3 anos no estágio 0 de 50% ⁽⁴⁰⁾). O sistema Chinês (CUPI) baseia-se na experiência em 926 pacientes, a maior parte com VHB (79%). A melhor sobrevida em um ano no grupo de baixo risco de apenas 47,9% põe em xeque a capacidade discriminatória nos estágios precoces ⁽⁴⁴⁾. O sistema japonês (JIS) associa uma modificação do sistema TNM ao escore Child-Turcote-Pugh (CTP) e mostrou-se mais efetivo que o sistema CLIP e Okuda em algumas avaliações ⁽⁴⁸⁾, mas inferior ao BCLC ^(47,49). Atualmente, a classificação proposta pelo grupo de Barcelona ⁽⁵⁰⁾, o Sistema de estadiamento de Câncer Hepático do Grupo de Barcelona (*Barcelona Clinic Liver Cancer Staging System* - BCLC) tem emergido como a classificação padrão para o design de estudos clínicos e no manejo clínico do CHC. Esta classificação usa variáveis relacionadas ao estágio tumoral, grau de função hepática, condição geral do paciente e sintomas relacionados ao câncer, e correlacionam os quatro estágios descritos a um algoritmo para o tratamento (Quadro 3). É endossada pela Associação Americana para o estudo das Doenças do Fígado (*American Association for the Study of the Liver Disease* - AASLD) e pela Associação

Européia para o Estudo do Fígado (*European Association for the Study of the Liver* - EASL), sendo recentemente validado por coortes de pacientes nos EUA e Europa ^(47,49).

Quadro 2: Sistemas de classificação (modificado de Sala M, et AL. *Semin Liver Dis*; 2005)⁽⁴⁴⁾

Classificação	Tipo	Variáveis			Estágios	Sobrevida (%)		
		Tumoral	Função Hepática	Condição de saúde		1 ano	3 anos	5 anos
TNM ⁽³⁸⁾	Estágio	Morfologia, invasão portal /metástase	-	-	I II III	90 80 60	75 65 25	55 33 15
OKUDA ^(39,51)	Estágio	Massa tumoral	Bilirrubina, Ascite, Albumina	-	1 2 3	82 36 14	50 9 0	35 0 0
GETCH ⁽⁴⁰⁾	Escore	Invasão portal, AFP	Fosfatase alcalina, Bilirrubina	Karnofski Index	A B C	71 33 7	38 12 3	- - -
CLIP ⁽⁴¹⁾	Escore	Invasão portal, Morfologia tumoral, AFP	CTP	-	Escore 0 1 2 3 4-6	84 66 45 36 9	50 35 12 5 0	- - - - -
CUPI ⁽⁴²⁾	Escore	TNM, AFP	Ascite, Bilirrubina, Fosfatase alcalina	Presença de sintomas	Baixo Intermediário Alto	47 17 5	25 5 0	- - -
JIS ⁽⁴³⁾	Escore	TNM modificado	CTP	-	0 1 2 3 4 5	- - - - - -	87 72 56 25 13 1	73 52 33 13 2 0
BCLC ⁽³⁷⁾	Estágio	Invasão portal /metástase, Morfologia tumoral, Okuda	CTP, Hipertensão portal, bilirrubina	Performance Clínico (<i>Performance Status Test - PST</i>)	A B C D	85 80 29 10	70 50 8 0	50 – 70 16 0 0

Quadro 3: Sistema BCLC de estadiamento (adaptado de Llovet JM et al. Semin Liver Dis; 1999)⁽⁴⁹⁾.



QE= Quimioembolização; AI= Alcoolização, RF= Termo ablação por radiofrequência.

A distinção entre biologia e morfologia em termos simples pode ser descrita como o comportamento *versus* a aparência. No entanto, em última análise, é o comportamento biológico do CHC o fator determinante do prognóstico, e a capacidade em prever este comportamento é um dos focos atuais das pesquisas. Os critérios atuais para transplante contemplam apenas a morfologia (aparência), baseados no número e tamanho dos tumores. Uma vez que a presença de linfonodos, invasão macro-vascular ou metástases exclui o paciente como candidato ao transplante, o sistema de estadiamento e seleção atual baseiam-se somente no componente T, do sistema TNM.

Diversos estudos têm tentado identificar fatores tumorais capazes de prever os resultados após o transplante. Em algumas séries, o tamanho do tumor, a multinodularidade, a má diferenciação celular e a invasão vascular demonstraram estar associados a uma maior recidiva e uma pior sobrevida (SV) e sobrevida livre de doença (SVLD)⁽⁵²⁻⁵⁷⁾. Em última análise, o grau de diferenciação (GN) e a invasão vascular

(passo primordial para disseminação tumoral) são os fatores com maior impacto associados à recidiva tumoral, porém não podem ser acessados antes do transplante, exceto por biópsia. No entanto, uma forte correlação entre estes e o tamanho do nódulo foram demonstrados em alguns estudos ^(24,52,53,57,58). A tabela 1 mostra uma revisão sobre a recidiva do CHC pós-transplante e os fatores de risco associados.

Tabela 1: Revisão sobre recidiva tumoral e fatores de risco

Autor/ano	Pacientes (n)	Recidiva (%)	Tempo TxH - Recidiva	Tempo Recidiva - óbito	Fatores prognósticos	Observação
Hemming/2001 ⁽⁵⁹⁾	112	11(9,8%)			> 5 cm GN Invasão vascular*	
Jonas/2001 ⁽⁵⁴⁾	120	20 (16,6%)			GN Invasão vascular	
Roayaie/2004 ⁽⁶⁰⁾	311	57 (18,3%)	12,3 m (1,5 – 60,3)	8,7	≥ 5cm GN Invasão vascular	26/57 (45,6%) ≥ 5 cm
Leung/2004 ⁽³³⁾	144	22 (15,3%)	12,3	8,9 (2 – 23,6)	AFP	12/22 (54,5%) excediam Cmp
Plessier/2004 ⁽⁶¹⁾	69	7 (10,1%)	12 m (3 – 47)	7 m (0,4 – 10)	Nódulo satélite Invasão vascular	Apenas pacientes com CM
Zhou/2005 ⁽⁶²⁾	67	13 (19,4%)	92,2% 3 – 6m 100% 1º ano		AFP > 5 cm* TVP* Bilobaridade GN TNM	60% Estágio III/IV 40% Tumores ≥5 cm
Zavaglia/2005 ⁽⁵³⁾	155	10 (6,4%)	9 m (4 – 39)	10 m (1 – 75)	TNM GN* Cmp Invasão vascular*	
Vivarelli/2005 ⁽⁵⁶⁾	70	7 (10%)	11m (2 – 40)		AFP Invasão microvascular Exposição CyA*	
Grasso/2006 ⁽⁶⁴⁾	96	14 (15,58%)	21 m (5 – 58)		Tumor > 3,5 cm* Número de nódulo GN Nódulo satélite TNM	
Pérez-Saborido/2007 ⁽⁶⁵⁾	95	15 (15,78%)	75% 1 ano		GN* Invasão vascular* > 5 cm > 3 nódulos TNM	
Shah/2007 ⁽⁶⁶⁾	155	22 (14,19%)	16,3m (8 - 28)		> 5 cm TNMp Inv. microvascular Inv. macrovascular*	Incluiu apenas pacientes com CM pré-TxH 36% estágio III/IV
Parfitt/2007 ⁽⁶⁷⁾	75	20 (26,6%)			AFP > 3 cm* GN* Número de nódulos Inv. microvascular* Nódulo satélite* Necrose tumoral Célula gigante*	
Zou/2008 ⁽⁶⁸⁾	303	48 (15,8%)			Invasão vascular* ≥ 6,5 cm* Lesões multiplas AFP*	Recidivas fatais 1º ano pos TxH

* Fatores com impacto significativo em modelo de análise multivariada

Cmp = Critérios de Milão no explante; GN = Grau de diferenciação; TVP = Trombose veia porta; LN + = Linfonodos positivos

Muitos esforços têm sido realizados para prever o comportamento biológico do CHC, mas indicadores prognósticos específicos ainda não existem⁽⁶⁹⁾. Ao contrário do câncer de mama, linfoma e outros tumores, nenhum marcador biológico/genético demonstrou possuir valor prognóstico no CHC até o momento⁽²²⁾.

Com novos avanços e descobertas na biologia do câncer, fatores patológicos e biológicos do CHC em relação ao prognóstico têm sido extensamente estudados. Algumas características morfológicas do tumor têm sido associadas significativamente à invasividade, recidiva tumoral e sobrevida do paciente e a análise de marcadores moleculares (biomarcadores) com significado prognóstico constitui um método complementar com um papel importante na determinação do fenótipo maligno do tumor.

Um grande número de fatores moleculares no CHC tem sido associado ao comportamento biológico do tumor e possui potencial tanto prognóstico como terapêutico. Alterações na ploidia do DNA, atividade proliferativa das células tumorais genes supressores e promotores, proteinases que degradam a matriz extracelular, moléculas de adesão, fatores angiogênicos e genes metabólicos têm sido descritos como marcadores moleculares do fenótipo maligno e relacionados ao prognóstico e resultado terapêutico⁽⁶⁹⁾.

Genética e patogênese molecular do CHC.

Os eventos moleculares ligados ao desenvolvimento e progressão do CHC, no entanto, ainda não são bem conhecidos. Assim como outros tumores, a carcinogênese do CHC é caracterizada pelo acúmulo de diversas alterações genômicas como aneuploidia e número anormal de cromossomas, perdas alélicas, instabilidade

microsatélite, alterações epigênicas e alteração na expressão de diversos genes ⁽⁷⁰⁻⁷³⁾. Estas alterações acumulam-se lentamente ao longo dos estágios pré-neoplásicos e progressão tumoral e refletem, de certo modo, a natureza do agente etiológico, como as mutações na expressão da p53 relacionado à infecção pelo VHB ^(71,72,74). Mutações em diversos outros genes críticos envolvidos no controle celular da proliferação e apoptose já foram descritos ⁽⁷⁰⁻⁷⁶⁾.

A teoria da oncogênese mais aceita no CHC descreve um processo passo-a-passo em que fatores externos induzem alterações genéticas no hepatócito maduro, ocasionando morte celular, proliferação e o surgimento de uma subpopulação de células monoclonais. A maioria dos CHC ocorre em fígados acometidos por hepatopatia crônica e cirrose, que se caracterizam por inflamação crônica persistente, morte hepatocitária e proliferação ativa dos hepatócitos residuais para recompor o parênquima perdido, gerando um ambiente altamente mitogênico e mutagênico. Esse processo culmina com a formação de tecido cicatricial que engloba nódulos de tecido hepatocitário regenerativo. Dentro desses nódulos regenerativos distinguem-se tais subpopulações de células monoclonais que acumularam alterações genéticas, que podem progredir para formação de nódulos displásicos e, por fim, formação do CHC ^(77,78). Nódulos com displasia de alto grau são verdadeiras lesões pré-neoplásicas e desenvolvem lesões malignas em 30% dos casos no período de 1 a 5 anos ⁽⁷⁷⁾.

Atualmente, reconhecem-se uma gama de fatores de crescimento e sinalizações envolvidos na proliferação e sobrevivência celular desde os estágios iniciais da hepatocarcinogênese e do crescimento autônomo e resistência as drogas das células malignas, como o fator de crescimento insulínico (*Insulin Growth Factor* - IGF), fator de crescimento hepatocitário (*Hepatocyte growth Factor* - HGF), fator de crescimento

transformador α (TGF α) e fator de crescimento epidérmico (*Epidermal Growth Factor* - EGF) ⁽⁷⁹⁾. A superexpressão destes fatores no fígado induz à transformação em CHC em modelos animais. De fato, diversos fatores de crescimento, atuando de forma autócrina, justácrina ou parácrina foram correlacionados com a progressão tumoral no CHC ⁽⁸⁰⁻⁸⁵⁾. Recentemente, a identificação de um gen polimórfico que codifica o EGF, envolvendo uma simples transição de uma Adenina (A) por uma Guanina (G) na posição 61, é responsável por um aumento na expressão de EGF e um aumento de até 4 vezes no risco de desenvolver CHC nos portadores dos alelos G/G em relação aos portadores dos alelos A/A ⁽⁸⁶⁾.

O Receptor do Fator de Crescimento Epidérmico (EGFr) e a atividade das Tirosino-Kinases.

Por definição, tirosino-kinase (TK) é uma enzima que cataliza a fosforilação de resíduos de tirosina em proteínas, com ATP (*adenosine triphosphate*) ou outros nucleotídeos como doadores de fosfato. As proteínas com atividade TK são uma grande família multigênica com particular relevância nas doenças humanas como o câncer. Foram identificados no genoma humano 90 genes TK, entre os quais 58 de tipo receptor. Este tipo receptor de genes está distribuído em 20 subfamílias entre as quais está a família HER/CerbB ⁽⁸⁷⁾. A maioria dos fatores de crescimento tem atividade de tirosina kinase, sendo assim capazes de autofosforilar seus domínios intracelulares nos resíduos de TK, tornando-se capazes de reagir com outras proteínas.

O EGFr, cujo gene encontra-se no braço longo do cromossomo 7 ⁽⁸⁸⁾, na região 7p12.3-p12.1, é uma glicoproteína transmembrana de 170 kDa com um domínio ligante

extracelular, um domínio lipofílico transmembrana e um domínio intracelular com atividade TK intrínseca⁽⁸⁹⁾. Faz parte de uma subfamília de 4 receptores intimamente relacionados, codificados pelo proto-oncogene *c-erb*: O EGFr (ErbB-1 ou HER 1), o HER- *neu* (ErbB-2), o HER 3 (ErbB-3) e o HER 4 (ErbB-4). Estes receptores possuem um importante papel na proliferação celular maligna em uma série de tumores⁽⁹⁰⁾.

O domínio extracelular amino-terminal de EGFr tem duas regiões ricas em cisteína que formam o domínio de ligação com o ligante. A região transmembrana é uma hélice alfa simples que ancora o receptor à célula⁽⁹¹⁾. O domínio citoplasmático contém uma região TK e uma cauda carboxi-terminal que contém pelo menos seis sítios de autofosforilação de tirosina: Y845, Y992, Y1045, Y1068, Y1148 e Y1173. A Figura 1 é uma representação gráfica do EGFr.

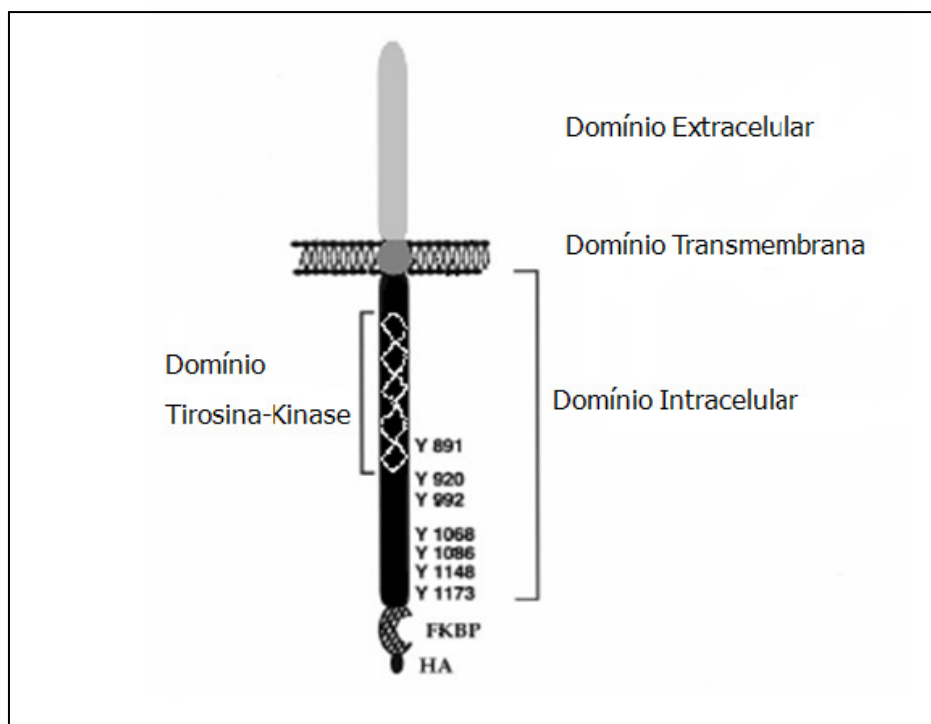


Figura 1: Esquema de representação gráfica do EGFr

Diversos peptídios, conhecidos como fatores de crescimento, são capazes de modular a atividade proliferativa e morte celular, tanto em células normais quanto em células malignas, ligando-se a receptores específicos. Vários destes ligantes podem interagir com o EGFr, ErbB-3, e ErbB-4, com diferentes especificidades para cada receptor, resultando em distintos efeitos celulares ⁽⁹²⁻⁹⁵⁾. O ErbB2 não possui ligantes conhecidos, enquanto o ErbB3 não possui atividade kinase intrínseca, parecendo atuar apenas como co-receptores. O EGF, um dos primeiros fatores de crescimento descobertos, faz parte de uma família de peptídios intimamente relacionados, que incluem o Fator de crescimento transformador α (*Transforming Growth Factor α - TGF α*), Anfiregulina (*Amphiregulin - AR*), Fator de crescimento ligador de heparina (*Heparin Binding – EGF - HB-EGF*) e Betacelulina (*Betacellulin - BTC*). A tabela 2 mostra os diversos ligantes e a especificidade de ligação de cada um aos diferentes receptores.

Tabela 2: Ligantes e receptores (Linggi B, et al. Trends in Cell Biology; 2006) ⁽⁹⁴⁾

Ligante	Receptor			
	HER 1	Her 2	HER 3	HER 4
EGF	+	-	-	-
TGF α	+	-	-	-
HB-EGF	+	-	-	+
AR	+	-	-	-
BTC	+	-	-	+
Epigen	+	-	-	-
Epiregulin	+	-	-	+
Neuregulin 1	-	-	+	+
Neuregulin 2	-	-	+	+
Neuregulin 3	-	-	-	+
Neuregulin 4	-	-	-	+

O EGFr existe como um monômero inativo que se ativa por intermédio de um ligante externo. Isto leva o receptor a dimerizar-se com outro monômero de EGFr

(homodimerização) ou com outro membro da família CerbB (heterodimerização) ⁽⁹⁶⁻⁹⁸⁾. Esta dimerização do EGFr induz à atividade catalítica tirosina kinase, o que leva à autofosforilação em vários sítios de tirosinas dentro da cauda carboxil-terminal do receptor. As fosfotirosinas resultantes Y845, Y992, Y1045, Y1068, Y1148, e Y1173 agem como “locais de ancoragem” para um número de enzimas transdutoras de sinal e proteínas “de adaptação”, que desencadearão os efeitos celulares ⁽⁹¹⁾. A ativação do EGFr ocorre por mecanismo intrácrino, parácrino, justácrino e/ou autócrino e diversos mecanismos têm sido postulados para sua participação no processo de carcinogênese, incluindo superexpressão do receptor, aumento da concentração dos ligantes, diminuição da atividade da fosfatase, diminuição da *rotatividade* do receptor ou a presença de receptores aberrantes ⁽⁹⁹⁾. Neste contexto, a alteração mais comum encontrada em câncer é o EGFr^{vIII} (145kd), um receptor “mutilado” que carece dos domínios I e II do domínio extra-celular. Esta mutação o torna incapaz de se ligar a um ligante externo. No entanto, sua atividade Tirosino-Kinase encontra-se constitutivamente ativada, induzindo à atividade proliferativa independente de um ligante externo ⁽¹⁰⁰⁾.

Uma vez ativados, os receptores desencadeiam o recrutamento e fosforilação de vários substratos intracelulares, levando à sinalização mitogênica e outras atividades celulares ⁽¹⁰¹⁾. A principal via de sinalização da família c-erbB parece ser a via *ras/raf/MEK/MAPK*, *p38-MAPK*, *PKC*, *PI3K/Akt* e *STAT* ^(95,102-108). A Figura 2 ilustra de forma simples a via de sinalização do EGFr.

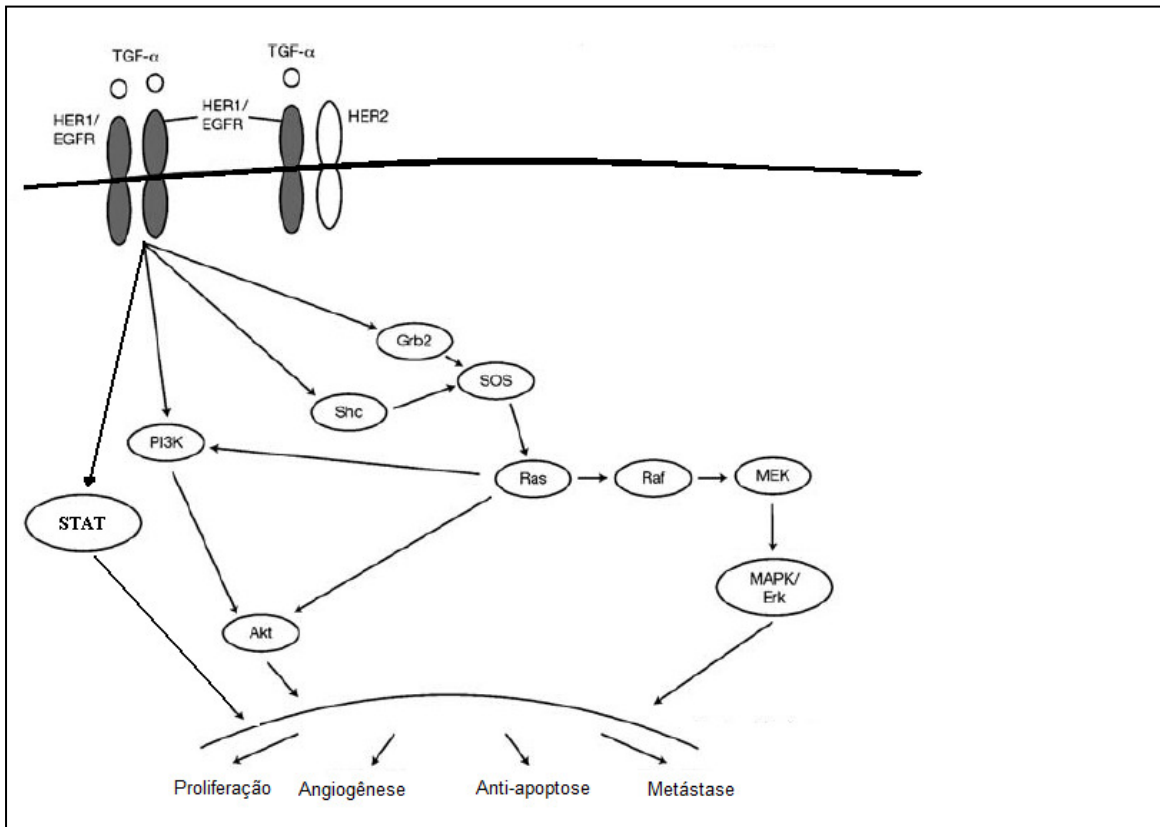


Figura 2: Via de sinalização do EGFr (modificado de Raizer JF, et al. Journal of Neuro-endocrinology; 2005) ⁽¹⁰⁹⁾

A sinalização do EGFr age sobre vários aspectos da biologia tumoral. A ativação do EGFr tem demonstrado aumentar processos responsáveis pelo crescimento e progressão do tumor, incluindo promoção da proliferação, angiogênese, invasão, metastatização e inibição da apoptose. A expressão do EGFr em tumores tem sido correlacionada com a progressão da doença, baixa sobrevida⁽⁸⁵⁾, pobre resposta a tratamento, e ao desenvolvimento de resistência a agentes citotóxicos.

Altos níveis de EGFr têm sido observados em uma variedade de tumores, incluindo pulmão (não de pequenas células), cabeça e pescoço (epidermóides), próstata, mama, estômago, cólon-retos, glioblastomas e ovário ^(95,110). Foi relatada uma relação entre câncer de mama e a expressão do EGFr com um pior prognóstico (menor sobrevida livre de doença e menor sobrevida geral). O EGFr era a variável mais

importante na predição da sobrevida livre de doença e geral nas pacientes linfonodo-positivas e a segunda variável mais importante nas pacientes linfonodo-negativas ⁽¹¹¹⁾.

No câncer colorretal tem sido proposto que a sua superexpressão possa promover a formação de metástases hepáticas ⁽¹¹²⁾ e no adenocarcinoma pancreático sua expressão tem sido associada a uma maior agressividade destes tumores ⁽¹¹³⁾.

No CHC, a superexpressão do EGFr foi relatada em até 68%, tendo sido correlacionado com uma maior atividade proliferativa, grau de diferenciação, estágio mais avançado, presença de metástases intra-hepáticas e pior sobrevida livre de doença, refletindo uma maior agressividade tumoral, desempenhando um importante papel na progressão tumoral ⁽¹¹⁴⁾.

A tabela 3 mostra a expressão dos diferentes receptores da subfamília HER em vários tipos de câncer em humanos.

Tabela 3: Expressão dos receptores HER em carcinomas em humanos (em %) (Normanno N, et al. Endocrine-Related Cancer; 2003)⁽⁹⁵⁾

Tipo de Câncer	HER 1 (EGFR)	HER 2	HER 3	HER 4
Pulmão	40 – 80	18 – 60	25 – 85	NA
Mama	14 - 91	9 – 39	22 – 90	82
Estômago	33 – 74	8 – 40	53 – 100	NA
Cólon	25 – 77	11 – 20	65 – 89	NA
Esôfago	43 – 89	7 – 64	64	NA
Fígado	47 - 68	0 – 29	84	61
Pâncreas	30 – 50	19 – 45	57 – 63	81
Próstata	40 – 80	40 – 80	22 – 96	NA
Rim	50 – 90	0 – 40	0	NA
Bexiga	35 – 86	9 – 50	30 – 56	30
Ovário	35 – 70	8 – 32	85	93
Cabeça e Pescoço	36 - 100	17 - 53	81	28 - 69

NA = Não avaliado

Evidências pré-clínicas e clínicas recentemente acumuladas com inibidores do EGFr e do eixo EGF sugerem ser este um alvo promissor no tratamento do CHC. Algumas estratégias desenvolvidas na prevenção da ativação do EGFr, como inibição da ligação ao receptor ou bloqueio da atividade da TK ^(79,110,115,116), parecem ter um potencial benéfico na quimioterapia-antitumoral, apesar do desenvolvimento de mecanismos de resistência às drogas, que ainda possam ser explorados ^(117,118).

Justificativa

O CHC é um tumor com alta incidência mundial e um prognóstico devastador e as previsões apontam para um aumento na incidência deste tumor nas próximas duas décadas, em especial nas regiões em que prevalece o VHC, como o caso do Brasil. Até o presente momento, excetuando-se a ressecção e o transplante que oferecem um potencial curativo para uma parcela muito pequena destes pacientes, nenhum outro tratamento local ou sistêmico demonstrou ter um impacto significativo na sobrevida, especialmente nos casos intermediários e avançados. Diferentemente de outras neoplasias, como o câncer de mama, por exemplo, nenhum marcador de atividade biológica demonstrou ser útil no CHC. No entanto, recentes estudos parecem apontar alguns marcadores com potencial prognóstico e terapêutico. Este é o caso do EGFr, um receptor com atividade tirosino-kinase intrínseco que tem sido implicado como importante fator na progressão tumoral. Em virtude do seu potencial como biomarcador no prognóstico e potencial como alvo terapêutico, através dos inibidores da tirosino-kinase, em fase III de investigação, os autores investigam a expressão do EGFr bem como seu valor prognóstico na recidiva do CHC em pacientes submetidos a transplante hepático.

OBJETIVOS

- Avaliar a expressão do receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFr) como fator prognóstico de recidiva do CHC pós-transplante.
- Correlacionar a expressão do EGFr com outros fatores prognósticos: número de nódulos, tamanho dos nódulos, invasão vascular, grau nuclear.

PACIENTES E MÉTODOS

Delineamento

Este trabalho consiste em um estudo transversal cujo fator analisado é a expressão do EGFr em CHC de indivíduos cirróticos submetidos a transplante de fígado para avaliar o papel prognóstico deste marcador. O desfecho é a recidiva do CHC pós-transplante de fígado.

Hipóteses do Estudo

H0 - EGFR não é fator prognóstico no CHC.

H1 - EGFR é fator prognóstico no CHC.

População

Foram avaliados todos os pacientes transplantados pelo Grupo de Transplante Hepático do Complexo Hospitalar da Santa Casa de Porto Alegre no período de janeiro de 2001 a dezembro de 2006, com diagnóstico de CHC confirmados pelo estudo anátomo patológico, seguindo os critérios de elegibilidade. Os mesmos foram seguidos até julho de 2008.

No período de 1° de janeiro de 2001 a 31 de dezembro de 2006 foram realizados 435 transplantes de fígado em 424 pacientes no Complexo Hospitalar da Santa Casa de Porto Alegre pelo Grupo de Transplante Hepático, equipe Dr. Cantisani. Deste total, 88 pacientes tiveram diagnóstico histológico confirmado de CHC. Conforme os critérios de

elegibilidade anteriormente expostos, 17 pacientes foram excluídos por óbito antes de 180 dias, 6 por excederem os critérios de Milão e UCSF ao exame do fígado explantado e 3 pacientes apresentaram colangiocarcinoma associado ao CHC. Três pacientes não tiveram as peças cirúrgicas recuperadas e não foram considerados neste estudo. Foram analisados efetivamente 59 casos. Do total, 40 (67,8%) pacientes são do gênero masculino e 19 (32,2%) femininos. A média de idade (desvio padrão) foi de $57,39 \pm 7,76$ com mediana de 57 (41 – 75) anos. A etiologia mais prevalente para cirrose e CHC foi o VHC, presente em 49 (83%) dos pacientes (em 9 casos associado ao uso crônico de álcool e 1 coinfeção com VHB). O grau de função hepática medido pela classificação de CTP em A, B e C foi 13 (22%), 29 (49,2%) e 17 (28,8%) respectivamente e a média do escore MELD foi de $14,47 \pm 5,03$ e mediana de 13 (7 – 30). Os dados demográficos estão expostos na tabela 4.

Tabela 4: Sumário dos dados demográficos dos pacientes.

<i>Características</i>	<i>n (%)</i>
Transplantes	435
Pacientes	424
CHC confirmados AP	88
Exclusões	29
Óbito em 180 dias	17
Excede CM e UCSF	6
Colangiocarcinoma	3
Sem bloco de parafina	3
Pacientes analisados	59
Masculino	40 (67,8)
Feminino	19 (32,2)
Idade, anos	
Média de idade ± DP	57,39 ± 7,76
Mediana (mínimo - máximo)	57 (41 – 75 anos)
Etiologia da cirrose	
VHC	39 (66,1)
VHC + Álcool	9 (15,2)
Álcool	3 (5,1)
VHB	2 (3,4)
VHC + VHB	1 (1,7)
Criptogênica	4 (6,8)
HAI	1 (1,7)
Tumor incidental	15 (25,4)
Seguimento, meses	
Média ± DP(mínimo – máximo)	40,7 ± 20,2 (6 – 76 meses)
Child-Turcote-Pugh	
A	13 (22)
B	29 (49,2)
C	17 (28,8)
MELD	
Média ± DP (mínimo – máximo)	14,47 ± 5,03 (7 – 30)

Critérios de elegibilidade

O presente estudo não tem por objetivo avaliar o conceito do TxH como tratamento do CHC, mas analisar os aspectos biológicos e patológicos dos tumores associado a recidiva pós-transplante. Para este propósito, a população estudada foi selecionada com base em 2 fatores: 1) Pacientes que preenchem os CM e / ou UCSF e 2) pacientes que sobreviveram ao menos 6 meses após o transplante, para obter resultados válidos e um melhor poder preditivo (uma vez que nenhum paciente transplantado com óbito inferior a 6 meses apresentava evidência de recidiva tumoral).

Foram incluídos os casos de pacientes com diagnóstico histológico de CHC no fígado explantado (incidentais e previamente diagnosticados).

Foram excluídos do estudo os seguintes casos:

- Pacientes com óbito nos primeiros 180 dias pós-transplante;
- Pacientes que excediam os critérios de Milão e critérios UCSF na análise do explante (Quadro 1);
- Pacientes com Colângiocarcinoma associado ao CHC;

Variáveis

Para caracterização da população estudada, foram apresentadas as seguintes variáveis: idade, gênero, etiologia da cirrose, classificação CTP, escore MELD, localização do tumor (lobo), número de nódulos, tamanho do maior nódulo, diferenciação (grau nuclear), invasão vascular, presença de cápsula, presença de nódulo satélite, AFP pré-transplante, procedimentos pré-transplante (quimioembolização, alcoolização e ressecção) e recidiva tumoral. Os dados foram coletados a partir de duas fontes:

- Revisão dos prontuários médicos;
- Avaliação das lâminas.

Preparação e leitura das lâminas

Os cortes dos blocos de parafina estocados das peças cirúrgicas foram submetidos inicialmente à análise histopatológica pela coloração de HE (*hematoxilina-eosina*).

O grau de diferenciação tumoral foi caracterizado como GN 1, 2 ou 3 segundo classificação de Lauwers et al⁽¹¹⁹⁾, sendo GN 1 os tumores bem diferenciados, GN 2 os moderadamente diferenciados e GN 3 os mal diferenciados.

Imunohistoquímica

A análise imunohistoquímica foi efetuada utilizando-se o anticorpo primário “*Monoclonal Mouse anti-EGFr Concentrate – clone 31G7 - Cat. Nº 28-0005 -*” (Zymed –CA, USA) que reconhecem o receptor de membrana EGFr. Para determinar a positividade destes anticorpos foi utilizado o método DAB (*Diaminobenzidine tetrahydrochloride – REF.: D-5637 – Sigma*). Os anticorpos foram diluídos em 1:50 e o procedimento foi executado seguindo uma rotina técnica, conforme detalhado no anexo I.

A leitura das lâminas foi feita por dois patologistas experientes, independentes e cegados quanto às condições clínicas e dados dos pacientes, seguindo-se um escore de 0 a 2 + (Tabela 5): zero, completamente negativo (-); 1+, fracamente positivo (+); 2+, fortemente positivo (++) . A coloração considerada positiva foi de membrana para o anticorpo. As figuras 3,4 e 5 mostram os distintos padrões de expressão do EGFr.

Os dados conflitantes foram reavaliados por ambos patologistas para obter-se um resultado de consenso.

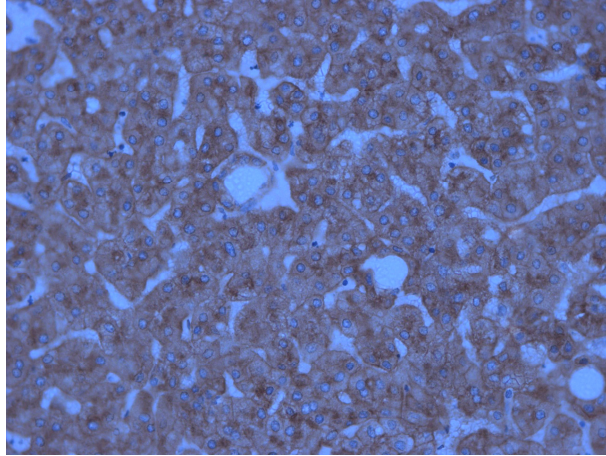


Figura 3: Imunohistoquímica negativa para EGFr.

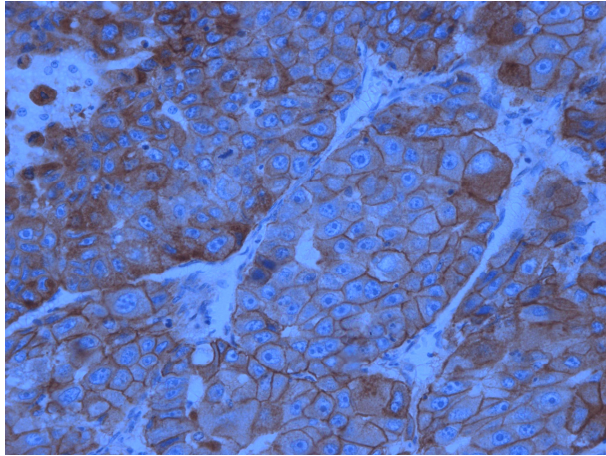


Figura 4: Imunohistoquímica fracamente positiva para EGFr

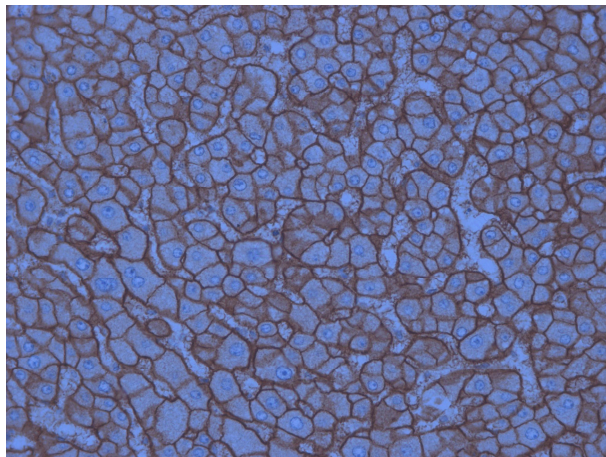


Figura 5: Imunohistoquímica fortemente positiva para EGFr.

Tabela 5: Classificação da expressão do EGFr

Escore	Expressão do EGFr	Padrão de coloração predominante
0	Negativa (-)	Não houve coloração, ou a coloração de membrana ocorreu em menos de 10% das células tumorais.
1+	Positiva (+)	Coloração fraca à moderada ou parcial da membrana observada em 10% ou mais das células tumorais.
2+	Positiva (++)	Coloração forte e completa da membrana observada em mais de 50% das células tumorais

Considerações éticas

Uma vez que a análise das peças cirúrgicas faz parte da rotina do Serviço de Patologia e que a coleta de dados de prontuário foi realizada de maneira retrospectiva, considerou-se desnecessária a utilização de termo de consentimento por parte dos pacientes.

Análise estatística

Para análise estatística, a determinação de médias, desvio-padrão, porcentagens e distribuição de frequência foram realizadas onde apropriado. A comparação de grupos para variáveis categóricas foi realizada através do teste exato de Fischer. A análise dos riscos de recidiva foi realizada através do modelo de regressão de azares proporcionais (modelo de Cox), e as curvas de sobrevida através do método de Kaplan Meier, comparando-se as curvas pelo teste log-rank. Utilizou-se o software SPSS v12.0 for Windows®, sendo considerado significativo $p < 0.05$ para um intervalo de confiança de 95%.

RESULTADOS

O lobo mais acometido isoladamente foi o direito, ocorrendo em 33 (56%) dos casos, sendo ambos os lobos envolvidos em 12 (20,3%). Os tumores foram classificados quanto ao grau nuclear 1, 2 e 3 em 6 (10,2%), 40 (67,8%) e 13 (22%) casos respectivamente. Quanto ao número de nódulos, possuíam 1,2,3 e 4 nódulos 39 (66,1%), 12 (20,3%), 5 (8,5%) e 3 (5,1%) casos respectivamente (média de $1,52 \pm 0,85$). O diâmetro do nódulo (maior nódulo nos tumores multicêntricos) foi < 2 cm em 21 (35,6%) e > 5 cm em 2 (3,4%) dos casos (média $2,42 \pm 1,14$ cm). Nos indivíduos com CHC diagnosticado antes do TxH (74,6%) o tamanho médio do nódulo foi de $2,68 \pm 1,10$ cm em comparação aos indivíduos com tumor incidental (25,4%), cujo tamanho médio do nódulo foi $1,64 \pm 0,87$ cm ($p=0,002$; $IC_{95\%}=0,412$ a $1,667$). Foi descrita presença de cápsula em 19 (32,2%), nódulo satélite em 8 (13,5%) e invasão vascular microscópica em apenas 2 (3,4%) dos casos. Nenhum paciente apresentou invasão vascular macroscópica. A AFP foi considerada normal ($<20ng/dl$) em 30 (50,8%) pacientes e estava acima de $400ng/dl$ em apenas 7 (11,9%) casos. Trinta e sete pacientes realizaram 1 ou mais procedimentos ablativos durante o período de espera em lista, sendo 7 (11,8%) quimioembolizações (QE), 27 (45,8%) alcoolizações (Al) e 3 (5,1%) terapias combinadas de QE + Al. Cinquenta e cinco pacientes (93,2%) expressaram o receptor EGFr em suas membranas, sendo que 30 (50,8%) expressaram de forma fortemente positivo (++) . As tabelas 6 e 7 mostram as características clínico-patológicas dos tumores e a relação entre a expressão do EGFr e diferentes características.

Tabela 6: Sumário das características anátomo-patológicas dos tumores

<i>Características do Tumor</i>	<i>n (%)</i>
Incidental	15 (25,4)
Lobo Hepático	
Direito	33 (56)
Esquerdo	14 (23,7)
Bilobar	12 (20,3)
Grau Nuclear	
GN 1	6 (10,2)
GN 2	40 (67,8)
GN 3	13 (22)
Critérios de Milão	50 (84,7)
Critérios UCSF	9 (15,3)
Cápsula	19 (32,2)
Invasão Vascular Microscópica	2 (3,4)
Nódulo satélite	8 (13,5)
Número de nódulos	
1	39 (66,1)
2	12 (20,3)
3	5 (8,5)
4	3 (5,1)
Tamanho do maior nódulo	
<2 cm	21 (35,6)
2 – 5 cm	36 (61)
>5 cm	2 (3,4)
Expressão do EGFr	
-	4 (6,8)
+	25 (42,4)
++	30 (50,8)
AFP	
< 20	30 (50,8)
20 – 400	22 (37,3)
>400	7 (11,9)
Procedimento pré-transplante	
Quimioembolização (QE)	7 (11,8)
Alcoolização (AI)	27 (45,8)
QE + AI	3 (5,1)
Nenhum procedimento	22 (37,3)
Recidiva Tumoral	13 (22)
Tempo TxH a recidiva	
Média ± DP (mínimo - máximo)	18,2±16,7 (6 – 67 meses)
Tempo recidiva ao óbito	
Média ± DP (mínimo - máximo)	7±9,07 (1 – 31 meses)

Tabela 7: Expressão do EGFr em relação à outras características patológicas do tumor.

Característica	Expressão do EGFr			p
	-	+	++	
GN 1/2/3	1/2/1	3/17/5	2/21/7	0,51
Número de Nódulos 1/2/3/4	3/1/0/0	16/5/1/3	20/6/4/0	0,49
Tamanho <2, 2-5, > 5 cm	2/2/0	9/14/2	10/20/0	0,93

Os pacientes foram acompanhados por um período médio de $40,7 \pm 20,2$ meses (6 – 76). A sobrevida em 1, 3 e 5 anos foram de 89,3%, 74,9% e 72,4% respectivamente e a sobrevida livre de doença em 1, 3 e 5 anos de 84,85, 69,6% e 69,6% respectivamente. Houve 13 (22%) recidivas em um tempo médio de $18,2 \pm 16,7$ meses (6 – 67 meses). A figura 6 mostra a curva de sobrevida e sobrevida livre de doença na população estudada. Três pacientes apresentavam metástases multifocais, sendo os linfonodos abdominais os locais mais acometidos (5), seguido pelos ossos (4), fígado (3), pulmões (3) e supra-renal (1).

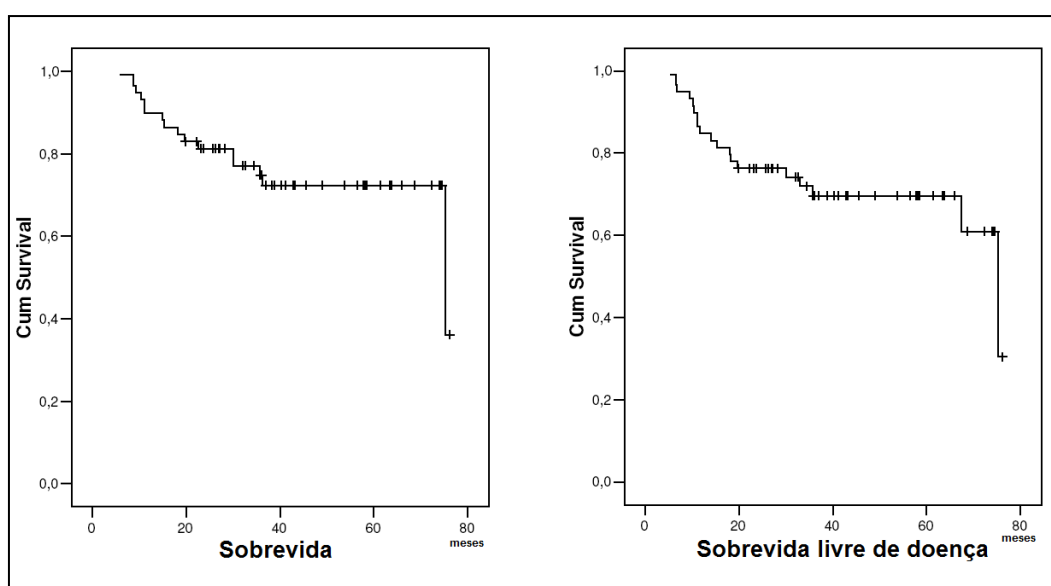


Figura 6: Curva de sobrevida e sobrevida livre de doença obtido através do método de Kaplan-Meier.

Até o momento da conclusão do estudo, 16 pacientes foram a óbito: 10 por recidiva tumoral (9 no primeiro ano após recidiva), 4 por sepse e 2 por outras neoplasias. O Tempo médio entre a recidiva e o óbito foi de $7\pm 9,07$ meses (1 – 31 meses). Três indivíduos com recidiva tumoral estão vivos após 6, 26 e 29 meses do diagnóstico da recidiva.

A análise univariada dos fatores associados a recidiva tumoral pós-transplante evidenciou uma associação estatisticamente significativa entre a invasão vascular microscópica ($p=0,046$) e tamanho tumoral > 5 cm ($p=0,046$). Outros fatores, incluindo grau nuclear ($= 0,165$), presença de nódulo satélite ($p=0,357$), distribuição bilobar ($p=0,716$), número de nódulos ($p=0,553$), expressão do EGFr ($p=0,147$), presença de cápsula ($p=0,738$), nível sérico de AFP ($p=0,598$) e procedimento ablativo pré-transplante ($p 0,644$) não demonstraram significância estatística para recidiva tumoral (tabela 8).

Tabela 8: Fatores de risco para recidiva tumoral.

	Recidiva	Sem Recidiva	<i>p</i>
	<i>n</i> = 13	<i>n</i> = 46	
Critérios de Milão	9	41	
Critérios UCSF	4	5	0,097
Incidental	1	11	0,268
VHC positivo	10	39	0,067
Invasão Vascular Microscópica	2	0	0,046
Grau Nuclear (GN)			
GN 1	0	6	
GN 2	8	32	
GN 3	5	8	0,165
Cápsula	5	14	0,738
Nódulo Satélite	3	5	0,357
Expressão do EGFr			
-	2	2	
+	7	19	
++	4	25	0,147
Unilobar	10	37	
Bilobar	3	9	0,716
Número de nódulos			
1 nódulo	10	29	
2 nódulos	1	11	
3 nódulos	1	4	
4 nódulos	1	2	0,553
Tamanho do maior nódulo			
<2 cm	3	18	
2 – 5 cm	8	28	
>5 cm	2	0	0,059
≤ 5 cm vs > 5 cm	11/2	46/0	0,046
Nível sérico de AFP			
AFP <20	5	25	
AFP 20 - 400	6	16	
AFP >400	2	5	0,589
AFP ≤ 400 vs AFP > 400	11/2	41/5	0,643
Procedimento pré-transplante			
Quimioembolização (QE)	1	6	
Alcoolização (AI)	8	19	
QE + AI	0	3	
Nenhum procedimento	4	18	0,644
QE e/ou AI vs Nenhum procedimento	9/4	28/18	0,749

Na análise multivariada, a invasão vascular microscópica ($p=0,02$) e tamanho tumoral > 5 cm ($p=0,014$) foram fatores independentes de prognóstico de recidiva.

Não foi encontrada uma associação entre a expressão do EGFr a uma maior ocorrência de óbito (HR=0,27; IC95%:0,5 a 1,49; $p=0,13$). Nossos achados apontaram na direção oposta, apesar de um moderado efeito de risco não poder ser descartado (tabela 9).

Tabela 9: Avaliação do nível de expressão do EGFr e ocorrência de óbito em CHC.

<i>Expressão do EGFr (n)</i>	<i>óbito</i>		HR*	IC95%	<i>p</i>
	n°	%			
Negativo (4)	2	50,0			
Fracamente positivo (26)	8	30,8	0,35	0,06 a 2,20	0,26
Fortemente positivo (29)	5	17,2	0,27	0,05 a 1,49	0,13

*HR = Hazard Ratio (risco relativo) obtido em modelo de regressão de Cox ajustado para invasão vascular microscópica, grau nuclear e tamanho tumoral.

No caso da recidiva, observou-se uma relação inversa ainda que não significativa, mas apontando de uma forma mais acentuada para menor ocorrência de recidiva entre os indivíduos com maior expressão do EGFr (HR=0,17; IC95% 0,03 a 1,02; *p* 0,052). Assim, nossos achados não são compatíveis com um aumento de risco de recidiva tumoral, e sim uma proteção (tabela 10; figura 7).

Tabela 10: Avaliação do nível de expressão do EGFr e ocorrência de recidiva em CHC.

<i>Expressão do EGFr (n)</i>	<i>Recidiva</i>		HR*	IC95%	<i>p</i>
	n°	%			
Negativo (4)	2	50,0			
Fracamente positivo (26)	7	26,9	0,19	0,02 a 1,24	0,083
Fortemente positivo (29)	4	13,8	0,17	0,03 a 1,02	0,052

*HR = Hazard Ratio (risco relativo) obtido em modelo de regressão de COX ajustado para invasão vascular microscópica, grau nuclear e tamanho tumoral.

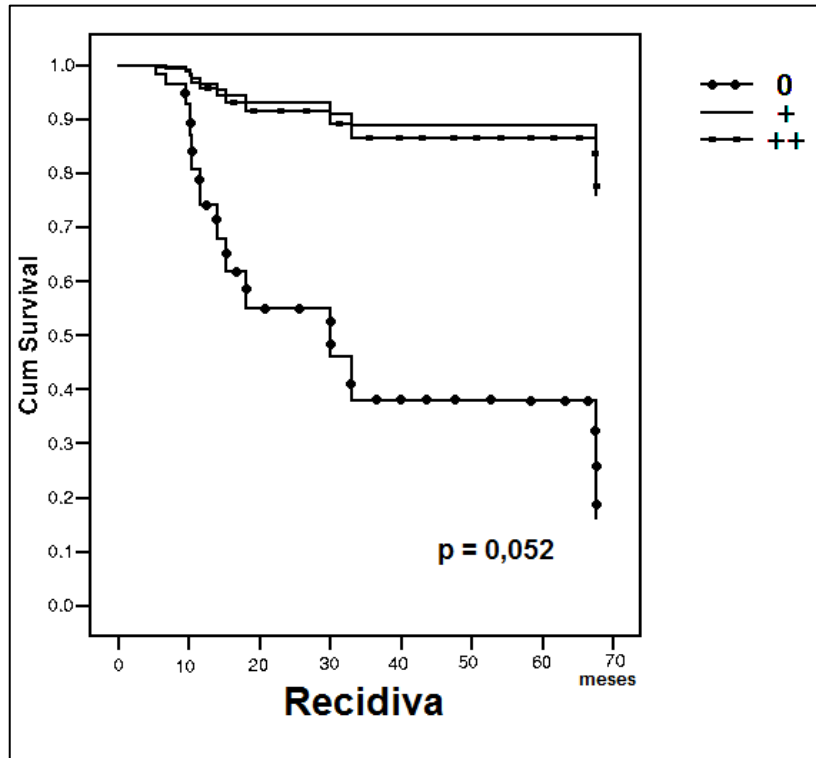


Figura 7: Curva representando a função de sobrevivência para a recidiva do CHC e expressão do EGFr, obtido em modelo de regressão de Cox ajustado para invasão vascular microscópica, tamanho tumoral e grau nuclear.

Discussão

O TxH é consagrado como o tratamento de escolha para os pacientes com CHC precoce e irresecável na presença de cirrose hepática. É a única opção capaz de tratar simultaneamente o tumor e a doença hepática subjacente. Até a década de 90, a experiência acumulada amargava um resultado pouco animador, onde o cenário mostava uma recidiva superior a 50% e uma sobrevida (SV) em 5 anos inferior a 40%^(18,22). No entanto, essa experiência inicial evidenciou um subgrupo de pacientes com tumores em estágios iniciais com prognóstico mais favorável quando comparado a ressecção cirúrgica⁽¹²⁰⁻¹²²⁾. Inicialmente destacado por Bismuth et al⁽²⁰⁾ e posteriormente consagrado e difundido pelo grupo de Milão, Itália⁽²¹⁾, que publicou um estudo com 48 pacientes com CHC em estágio precoce submetidos a TxH, com sobrevida em 4 anos de 74% e recidiva de apenas 8,3%, resultados estes semelhantes aos pacientes transplantados sem CHC. OS critérios adotados por este grupo, classicamente conhecidos como Critérios de Milão (1 nódulo \leq 5 cm ou 2 a 3 nódulos \leq 3 cm), vêm sendo adotado pela maioria dos grupos transplantadores desde então. Resultados satisfatórios semelhantes têm sido descritos por diversos autores^(27,53,123). Yoo et al⁽¹²⁴⁾, com base nos dados da United Network for Organ Sharing (UNOS) demonstrou uma significativa melhora na SV dos pacientes transplantados com CHC, com taxas de 25% em 5 anos entre 1987 e 1991 e 61% entre 1996 e 2001. Leung et al⁽³³⁾ também compararam a SV em 5 anos antes e após 1998 (ano em que o UNOS adotou oficialmente os CM) e notou uma melhora na sobrevida.

Embora a utilização de critérios mais restritos para indicação do transplante no CHC tenha melhorado de forma significativa a sobrevida dos pacientes, ainda são

relatados índices de recidiva entre 3 e 26% ^(21,33,53,54,57,59,60,62-64,66-68,123-132), devendo-se ressaltar o fato de que muitas das séries estudadas incluem uma grande porcentagem de pacientes com tumores avançados, portanto fora dos Critérios de Milão. No presente estudo, que inclui apenas pacientes transplantados entre 2001 e 2006, sob a égide dos CM, a recidiva alcançou um patamar de 22,03% (13/59), sendo de 18% (9/50) quando os pacientes satisfazem tais critérios no explante. O fato de excluírem-se os indivíduos que foram a óbito até 180 dias após o transplante influenciou o achado de uma recidiva relativamente alta.

A recidiva do CHC é um fator limitante na sobrevida, ocorrendo em torno de 90% nos três primeiros anos, com a maioria dos óbitos ocorrendo nos dois primeiros anos após o diagnóstico. Nesta análise, o tempo médio entre o TxH e a recidiva é de 18,2 (6 – 67) meses (92% nos primeiros 3 anos) e o tempo entre a recidiva e óbito de 7 (1 - 31) meses (90% no primeiro ano).

Diversos fatores relacionados à recidiva tumoral e/ou sobrevida livre de doença têm sido destacados pela literatura. Iwatsuki et al ⁽¹²²⁾ foram um dos primeiros a destacar uma SV maior nos pacientes transplantados com tumores precoces, identificando a presença de linfonodos positivos, invasão vascular, tamanho tumoral, número de nódulos e bilobaridade como fatores relacionados a mau prognóstico. Dentre os fatores apontados pela literatura como fatores de risco para recidiva, a invasão vascular, o grau de diferenciação (GN), o tamanho do tumor e o número de nódulos têm recebido especial destaque ^(53-68,125-135). Todavia, embora com controvérsias, outros fatores também têm sido relacionados: doença bilobar, presença / invasão de cápsula, nódulos satélites, AFP, regime e intensidade da imunossupressão, necrose parcial.

Nosso estudo destacou, através de análise univariada, o tamanho tumoral > 5cm ($p=0,046$) e a invasão vascular ($p=0,046$) como sendo os fatores significativamente associados a recidiva tumoral. Interessantemente, o grau de diferenciação (GN) não mostrou significância estatística ($p=0,165$), assim como o número de nódulos ($p=0,553$). O tamanho da população analisada e o a limitação do estudo apenas aos pacientes que preenchem os CM e UCSF pode explicar o fato do número de nódulos não apresentar significância estatisticamente relevante, embora isto também tenha sido observado por outros ^(56,59,60,67,127). Onaca et al ⁽²⁶⁾ ressalta um aumento da recidiva significativa em pacientes com mais de 4 nódulos.

Com relação ao tamanho do nódulo, este mostrou ser significativo preditor de recidiva mesmo utilizando-se um ponto de corte tão baixo quanto 3,5 cm ($p=0,0041$). Quando apenas os nódulos solitários < 3,5 cm foram analisados, ainda obteve-se significância estatística ($p=0,024$). Esses achados corroboram os de outros autores ^(64,136). Grasso et al ⁽⁶⁴⁾ verificaram que, para os nódulos medidos no explante, um ponto de corte de 3,5 cm era associado com um valor preditivo de recidiva com sensibilidade de 73% e especificidade de 72,8% 9 (AUC 0,763). Parfitt et al ⁽⁶⁷⁾ relataram que, quando controlado para invasão vascular, um ponto de corte de 3 cm foi o único a mostrar valor significativo para risco de recidiva (a invasão vascular era significativamente maior nos tumores > 5 cm, o que também foi relatado por outros ^(24,26,53,58)). Shetty et al ⁽¹²⁷⁾ encontraram o mesmo ponto de corte (3 cm no exame do fígado explantado e 4 cm no exame radiológico pré-transplante) enquanto Onaca et al ⁽²⁶⁾ relatam uma melhor SV nos pacientes com tumores $\leq 3,0$ cm. Quanto maior o tumor, menor o seu grau de diferenciação e maior a invasão vascular ^(23,24,33,35,53,54,58,64,67,127).

Há uma estreita relação entre o tamanho tumoral, grau nuclear e invasão vascular. Quanto maior ou mais indiferenciado o tumor, maior a probabilidade de invasão vascular. Zavaglia et al ⁽⁵⁶⁾ encontrou 27% de invasão vascular em nódulos > 3 cm (contra apenas 6,3% em < 3 cm), apesar de que nenhum dos tumores com GN 1 o tenha apresentado. Jonas et al ⁽⁵³⁾ encontrou 15% de invasão vascular em tumores < 3cm com GN 1 contra 100% em tumores > 3 cm GN 3. Associações semelhantes entre tamanho tumoral, GN e invasão vascular também foi relatado por outros ^(24,27,53,57,58,64). Esta íntima relação entre GN e tamanho tumoral com invasão vascular pode explicar por que em muitos modelos de análise multivariada a invasão microvascular é excluída como fator adverso quando a diferenciação tumoral e o tamanho tumoral são incluídos, e vice-versa ⁽⁶⁶⁾. Este aspecto sugere que o tamanho do tumor funciona como “sentinela” da invasão vascular. De fato, alguns autores referem que na ausência de invasão vascular, o tamanho do nódulo não tem um impacto significativo ^(23,24).

No que tange a invasão vascular, um predecessor da doença metastática, há autores que questionam o valor da invasão microvascular em relação a invasão macrovascular como fator prognóstico, enquanto outros relacionaram a invasão microvascular a uma maior recidiva mas não a uma maior mortalidade ^(56,66). Atualmente, a invasão vascular macroscópica (uma contraindicação absoluta para o transplante) quando presente pode ser detectado na maior parte dos pacientes durante o estadiamento pré-transplante. Na ausência de invasão vascular macroscópica, a invasão microvascular passa a ser um importante fator associado à recidiva ^(56,63,66,67,127). Assim, um exame pré-operatório capaz de identificar a presença de invasão vascular seria o exame mais apropriado para selecionar os candidatos para transplante.

Apesar de nenhum paciente com tumor bem diferenciado (GN 1) tenha apresentado recidiva, contra 20% e 38,5% nos indivíduos com tumor moderadamente diferenciado (GN 2) e mal diferenciados (GN3) respectivamente, o grau de diferenciação não mostrou ser um fator associado ao risco de recidiva ($p=0,165$).

A seleção de candidatos para transplante emprega apenas o número e tamanho do tumor como marcadores da biologia tumoral. Uma vez que o grau de diferenciação e invasão vascular parece ter um maior valor preditivo no que tange ao risco de recidiva, o exame histopatológico pode fornecer dados importantes na avaliação do comportamento biológico. Assim, a biópsia do tumor, apesar do risco de sangramento e disseminação tumoral no trato da agulha, pode oferecer uma informação valiosa na avaliação do risco de recidiva.

Os demais fatores de risco avaliados: bilobaridade, presença de cápsula, nódulo satélite, VHC positivo, AFP e procedimentos pré-transplante (Quimioembolização e/ou Alcoolização) não demonstraram ter valor preditivo neste estudo. Alguns autores ressaltam a presença de nódulos satélites como fatores importantes ^(61,64,67,133), e relacionam este achado a uma maior invasão vascular. Plessier et al ⁽⁶¹⁾ relata que em nenhum paciente onde não foram encontrados nódulos satélites houve recidiva, contra 25% nos pacientes com este achado. A AFP, um ponto controverso no que se refere ao prognóstico de recidiva, tem sido destacada por vários estudos ^(33,35,62,63,68,127,130,133,137). Nesta coorte, não mostrou significado estatístico ($p=0,598$), mesmo quando um nível tão alto como 1000ng/dl foi utilizado como ponto de corte ($p=0,395$). O tamanho da amostra, onde apenas 2 pacientes apresentaram estes níveis, certamente limita nossa análise.

EGFr e o risco de recidiva

A despeito dos marcadores clínico-patológicos associados ao prognóstico, diversos outros marcadores biológicos do comportamento tumoral tem sido investigados e associados ao risco de recidiva. Uma revisão destes marcadores foram publicados por Qin et al ⁽⁶⁹⁾ e Mann et al ⁽¹³⁸⁾. Procurar reconhecer estes marcadores tem sido alvo de diversos estudos. Marsh et al ⁽¹³⁹⁾ relataram que a perda alelica da heterozigosidade piora o prognóstico do transplante para CHC. Predizer o risco de recidiva no CHC é importante para determinar o prognóstico do transplante e expandir os critérios de inclusão. A recidiva tumoral é um evento catastrófico no curso do transplante, uma vez que, inexoravelmente, todos os pacientes padecerão dele, em sua maioria nos dois primeiros anos. Embora alguns pacientes tratados cirurgicamente após a recidiva alcancem uma sobrevida razoável ^(60,125), nenhum tratamento clínico mostrou-se efetivo nesta situação ⁽⁶⁰⁾.

Recentes pesquisas nos últimos anos têm identificado um número de fatores de crescimento e sinalizadores envolvidos nos estágios iniciais da hepatocarcinogênese, seu crescimento autônomo e resistência às drogas nas células transformadas ⁽⁷⁹⁾. Muitos destes fatores de crescimento estão associados ao controle regenerativo e à resposta natural do fígado ao dano celular. No entanto, quando cronicamente estimulados ou desregulados devido a uma série de alterações moleculares e funcionais, podem contribuir para transformação e a manutenção do fenótipo maligno do hepatócito. Conhecer detalhadamente os mecanismos moleculares envolvidos na transformação maligna, progressão e metastatização do CHC podem levar ao desenvolvimento de terapias mais focadas e efetivas, com menos efeitos colaterais.

O EGFr, um receptor de membrana com atividade tirosino-kinase da família do oncogene *cerb*, tem sido destacado como importante cofator na carcinogênese e progressão tumoral ⁽⁷⁹⁾. O acúmulo de informações sobrevividos de estudos pré-clínicos e clínicos tendo como alvo este receptor abre as portas para uma possível abordagem terapêutica no CHC ^(70,110,115,116,140-144). O EGFr é freqüentemente expresso no CHC, contribuindo para o crescimento agressivo do tumor ^(80,84,85,114,142). Especialmente em CHC mal diferenciados, a superexpressão do EGFr foi associado a um prognóstico negativo e uma recidiva precoce ^(80,85,114). Kira et al ⁽⁸⁵⁾ relatou uma positividade em 47% para o EGFr em CHC e Ito et al ⁽¹¹⁴⁾ relatou uma expressão de 68% de EGFr em 100 pacientes submetidos a ressecção do CHC, relacionando sua expressão a um alto índice proliferativo, estágios mais avançados, presença de metástases intra-hepáticas e pior SVLD, refletindo a agressividade biológica do tumor. Nossa coorte evidenciou uma expressão alta do EGFr (93,2%), sendo essa expressão fortemente positiva em metade (50,8%) dos pacientes. A diferença na expressão pode estar relacionada aos diferentes anticorpos ⁽¹⁴⁵⁻¹⁴⁷⁾ e à recuperação antigênica utilizados nos estudos. Moon et al ⁽¹⁴⁷⁾ analisando 52 casos de CHC com dois distintos anticorpos monoclonais encontrou expressão do EGFr em apenas 1/52 e 0/52 e Nakopoulou et al ⁽¹⁴⁸⁾ em apenas 3/71 (4,2%) casos. Embora tendo sido expressa na quase totalidade dos tumores, sua expressão em nenhum nível esteve associada a um risco aumentado de recidiva. De fato, entre os 4 indivíduos sem expressão deste marcador, 2 indivíduos (1 com nódulo 4cm e outro com GN 3) apresentaram recidiva tumoral. Sua expressão não está estatisticamente associada ao grau de diferenciação, ao número de nódulos, presença de invasão vascular e ao tamanho tumoral.

Embora não esteja associado ao risco de recidiva tumoral pós-transplante, sua alta expressividade a coloca como um importante alvo terapêutico, podendo contribuir para melhorar a sobrevida dos pacientes com CHC e recidiva tumoral após o transplante.

Conclusão

O receptor para fator de crescimento epidérmico foi detectado na maioria (93,2%) dos tumores. No entanto sua expressão não esteve relacionada a outros fatores como GN, tamanho e número de nódulo e não demonstrou ter nenhum valor como indicador de prognóstico

Dentre os fatores associados ao risco de recidiva tumoral, apenas o tamanho e a invasão vascular estiveram relacionados ao risco de recidiva na análise univariada. Na análise multivariada, a invasão vascular demonstrou ter o impacto significativo.

Quando comparados os CM e UCSF, não houve diferença estatisticamente significativa no risco de recidiva, embora uma maior recidiva tumoral uma menor sobrevida tenham sido verificadas nos pacientes com critérios expandidos.

Referências bibliográficas

1. Garcia M, Jemal A, Ward EM, et al. *Global Cancer Facts & Figures 2007*. Atlanta, GA: American Cancer Society, 2007. In: WWW.cancer.org.
2. Fattovich G, Stroffolini T, Zagni I, et al. Hepatocellular carcinoma in cirrhosis: incidence and risk factors. *Gastroenterol* 2004;127(suppl 1):s35-50.
3. Tanaka Y, Hanada K, Mizakomi M, et al. A comparison of the molecular Clock of hepatitis C virus in the United States and Japan predicts the hepatocellular carcinoma incidence in United States will increase over the next two decades. *Proc Natl Acad Sci SA* 2002;99:15584-9.
4. Llovet JM, Beaugrand M. Hepatocellular carcinoma: present status and future prospects. *Journal of Hepatology* 2003;38:s136-49.
5. Sangiovanni A, Del Nino E, Fasani P, et al. Increased survival of cirrhotic patients with hepatocellular detected during surveillance. *Gastroenterology* 2004;126:1005-14.
6. INCA - Ministério da Saúde do Brasil.
http://www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=330
7. Llovet JM, Burroughs A, Bruix J. Hepatocellular carcinoma. *Lancet* 2003;362:1907-17.
8. Velazquez RF, Rodriguez M, Navascues CA, et al. Prospective analysis of risk factors for hepatocellular carcinoma in patients with liver cirrhosis. *Hepatology* 2003;35:520-7.
9. Sherman M. Hepatocellular carcinoma: Epidemiology, Risk Factors, and screening. *Semin Liver Dis.* 2005;25(2):143-54.
10. Perz JF, Armstrong GL, Farrington LA, et al. The contribution of hepatitis B virus and hepatitis C virus infections to cirrhosis and primary liver cancer worldwide. *J Hepatol* 2006;45:529-38.
11. Kemp W, Pianko S, Nguyen S, et al. Survival in hepatocellular carcinoma: impact of screening and etiology of liver disease. *J Gastroenterol Hepatol* 2005;20(6):873-81.
12. Zhang BH, Yang BH, Tang ZY. Randomized controlled trial of screening for hepatocellular carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol* 2004;130:417-22.

13. Yuen MF, Cheng CC, Laufer JJ, et al. Early detection of hepatocellular carcinoma increases the chance of treatment: Hong Kong experience. *Hepatology* 2000;31:330-5.
14. Bolondi L, Sofia S, Siringo S, et al. Surveillance programme of cirrhotic patients for early diagnosis and treatment of hepatocellular carcinoma: a cost-effectiveness analysis. *Gut* 2001;48:251-9.
15. Arguedas MR, Chen VK, Eloubeidi MA, et al. screening for hepatocellular carcinoma in patients with hepatitis cirrhosis: a cost-utility analysis. *Am J Gastroenterol* 2003;98:679=90.
16. Chen YJ, Yeh SH, Chen JT, et al. Chromosomal changes and clonality relationship between primary and recurrent Hepatocellular Carcinoma. *Gastroenterology* 2000;119(2):431-40.
17. Farinati F, Marino M, Balzan A, et al. Diagnostic and prognostic role of α -Fetoprotein in Hepatocellular carcinoma: Both or neither? *Am J Gastroenterol* 2006; 101:524-32.
18. Lopez PM, Villanueva A, Llovet JM. Systematic review: Evidence-based management of hepatocellular carcinoma – an updated analysis of randomized controlled trials. *Alim Pharmacol & Therap* 2006;23:1535-47.
19. Llovet J, Ricci S, Mazzaferro V, et al. Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma. *NEJM* 2008;359(4):378-90.
20. Bismuth H, Chiche L, Adam R, et al. Liver resection versus transplantation for hepatocellular carcinoma in cirrhosis. *Ann Surg* 1993;218:145-51.
21. Mazzaferro V, Regalia E, Doci R, et al. Liver transplantation for the treatment of small hepatocellular carcinomas in patients with cirrhosis. *New Engl Jour of Medicine* 1996; 334:693-9.
22. Llovet JM. Updated treatment approach to hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol* 2005; 40:225-35.
23. Vauthey JN, Lauwers GY, Esnaola NF, et al. Simplified staging for hepatocellular carcinoma. *J Clin Oncol* 2002;20:1527-36.
24. Pawlik TM, Delman KA, Vauthey JN, et al. Tumor size predicts vascular invasion and histologic grade: implications for selection of surgical treatment for Hepatocellular Carcinoma. *Liver Transplnt* 2005;11(9):1086-92.

25. Chen YJ, Yeh SH, Chen JT, et al. Chromosomal changes and clonality relationship between primary and recurrent Hepatocellular Carcinoma. *Gastroenterology* 2000;119(2):431-40.
26. Onaca N, Davis GL, Jennings LW, 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*; 2007, 13:391-9.
27. Yao FY, Ferrell L, Bass NM, et al. Liver transplantation for hepatocellular carcinoma: expansion of the tumor size limits does not adversely impact survival. *Hepatology* 2001;6:1394-403.
28. Majno P, Mazzaferro V. Living donor liver transplantation for hepatocellular carcinoma exceeding conventional criteria: questions, answers and demands for a common language. *Liver Transpl* 2006;6:896-8.
29. Broelsch CE, Frilling A, Malago M. Should we expand the criteria for liver transplantation for hepatocellular carcinoma—yes, of course! *J Hepatol* 2005;4:569-73.
30. Hiatt JR, Carmody IC, Busuttil RW. Should we expand the criteria for hepatocellular carcinoma with living-donor liver transplantation?—no, never. *J Hepatol* 2005;4:573-7.
31. Decaens T, Roudot-Thoraval F, Hadni-Bresson S, et al. Impact of UCSF criteria according to pre- and post-OLT tumor features: analysis of 479 patients listed for HCC with a short waiting time. *Liver Transpl* 2006;12:1761-9.
32. Fernandez JA, Robles R, Marin C, et al. Can we expand the indications for liver transplantation among hepatocellular carcinoma patients with increased tumor size? *Transplant Proc* 2003;5:1818-20.
33. Leung JY, Zhu AX, Gordon FD, et al. Liver transplantation outcomes for early-stage hepatocellular carcinoma: results of a multicenter study. *Liver Transpl* 2004;11:1343-54.
34. Yao FY XL, Bass NM, Kerlan RK, et al. Liver transplantation for hepatocellular carcinoma: a 5-year prospective study validating extended criteria applied to pre-operative imaging. *Hepatology* 2006;(Suppl 1):191A. (Abstract)

35. Yao F, Xiao L, Bass NM, et al. Liver Transplantation for Hepatocellular Carcinoma: Validation of the UCSF-Expanded Criteria Based on Preoperative Imaging. *Am J Transplant* 2007;7(11): 2587-96.
36. Duffy JP, Vardanian A, Benjamin E, et al. Liver transplantation for hepatocellular carcinoma should be expanded. A 22-year experience with 467 patients at UCLA. *Annals of Surgery* 2007;246(3)502-11.
37. Bruix J, Sherman M, Llovet JM, et al. Clinical management of hepatocellular carcinoma. Conclusions of the 2000 EASL conference. *J Hepatol* 2001;35:421-30.
38. American Joint Committee on Cancer. *AJCC Cancer Staging Handbook*. New York: Springer; 2002 (6th edition).
39. Okuda K, Ohtsuki T, Obata H, et al. Natural history of hepatocellular carcinoma and prognosis in relation to treatment. Study of 850 patients. *Cancer* 1985;56:918–28.
40. Chevret S, Trinchet JC, Mathieu D, et al. A new prognostic classification for predicting survival in patients with hepatocellular carcinoma. Groupe d'Etude et de Traitement Du Carcinome Hepatocellulaire. *J Hepatol* 1999;31:133–41.
41. A new prognostic system for hepatocellular carcinoma: a retrospective study of 435 patients. The Cancer of the Liver Italian Program (CLIP) investigators. *Hepatology* 1998;28:751–5.
42. Leung TW, Tang AM, Zee B, et al. Construction of the Chinese University Prognostic Index for hepatocellular carcinoma and comparison with the TNM staging system, the Okuda staging system, and the Cancer of the Liver Italian Program staging system: a study based on 926 patients. *Cancer* 2002;94:1760–9.
43. Kudo M, Chung H, Osaki Y. Prognostic staging system for hepatocellular carcinoma (CLIP score): its value and limitations, and a proposal for a new staging system, the Japan Integrated Staging Score (JIS score). *J Gastroenterol* 2003;38: 207–15.
44. Sala M, Forner A, Varela M, et al. Prognostic prediction in Patients with hepatocellular carcinoma. *Semin Liver Dis* 2005;25(2)171-9.
45. Martins A, Cortez-Pinto H, Marques-Vidal P, et al. Treatment and prognostic factors in patients with hepatocellular carcinoma. *Liver Int* 2006;26(6):680-7.

46. Ueno S, Tanabe G, Sako K, et al. Discrimination value of the new western prognostic system (CLIP score) for hepatocellular carcinoma in 662 Japanese patients. *Hepatology* 2001;34:529–34.
47. Marrero JÁ, Fontana RJ, Barrat A, et AL. Prognosis of hepatocellular carcinoma: comparison of 7 staging systems in an american cohort. *Hepatology* 2005;41:707-16.
48. Kudo M, Chung H, Haji S, et al. Validation of a new prognostic staging system for hepatocellular carcinoma: the JIS score compared with the CLIP score. *Hepatology* 2004;40:1396–405.
49. Llovet JM, Bru, C, Bruix J. Prognosis of hepatocellular carcinoma: the BCLC staging classification. *Semin. Liver Dis.* 1999;19:329–38.
50. Cillio U, Vitalle A, Grigoletto F, et al. Prospective validation of the Barcelona Clinic Liver Cancer Staging System. *J Hepatol* 2006;44:723-31.
51. Levy I, Sherman M. Staging of hepatocellular carcinoma: assessment of the CLIP, Okuda, and Child-Pugh staging systems in a cohort of 257 patients in Toronto. *Gut* 2002;50:881–5.
52. Molmenti EP, Klintmalm GB. Liver transplantation in association with hepatocellular carcinoma: An update of the International Tumor Registry. *Liver Transpl*, 2002;8:736:48.
53. Jonas S, Bechstein WO, Steinmüller T, et al. Vascular invasion and histopathologic grading determine outcome after liver transplantation for hepatocellular carcinoma in cirrhosis. *Hepatology* 2001;33:1080-6.
54. Herrero JI, Sangro B, Quiroga J, et al. Influence of tumor characteristics on the outcome of liver transplantation among patients with liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma. *Liver Transpl* 2001;7(7):631-6.
55. Qin LX, Tang ZY. The prognostic significance of clinical and pathological features in hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2002;8(2):193-199.
56. Zavaglia C, de Carlis L, Alberti AB, et al. Predictors of long-term survival after liver transplantation for hepatocellular carcinoma. *Am J Gastroenterol* 2005;100:2708-16.
57. Tamura S, Kato T, Berho M, et al. Impact of histological grade of hepatocellular carcinoma on the outcome of liver transplantation. *Arch Surg* 2001;136:25-30.

58. Esnaola NF, Lawers GY, Mirza NQ, et al. Predictors of microvascular invasion in patients with Hepatocellular Carcinoma who are candidates for orthotopic liver transplantation. *Journal of Gastrointest Surg* 2002;6(2):224-32.
59. Hemming AW, Cattral MS, Reed AI, et al. Liver transplantation for hepatocellular carcinoma. *Ann Surg* 2001;233:652-9.
60. Roayaie S, Schwartz JD, Sung MW et al. Recurrence of hepatocellular carcinoma after transplante: patterns and prognosis. *Liver Transpl* 2004;10(4):534-40.
61. Plessier A, Codens L, Consigny Y, et al. Underestimation of the influence of satellite nodules as risk factors for post-transplant recurrence in patients with small hepatocellular carcinoma. *Liver Transpl* 2004;2(10), suppl 1;s86-90.
62. Zhou J, Fan J, WU Z, et al. Liver transplantation for patients with hepatocellular carcinoma at the Liver Cancer Institute of Fundan University, China. *Chin Med* 2005;118(8):654-9.
63. Vivarelli M, cucchetti A, Piscaglia F, et al. Analysis of risk factors for tumor recurrence after liver transplantation for hepatocellular carcinoma: Key role of immunosupression. *Liver Transpl* 2005;11(5):497-503.
64. Grasso A, Stigliano R, morisco F et al. Liver transplantation and recurrent hepatocellular carcinoma: Predictive value of nodule size in a retrospective and explants study. *Transplantation* 2006;81(11):1532-41.
65. Klintmalm GB. Liver transplantation for hepatocellular carcinoma: a registry report of the impact of the tumor characteristics on outcome. *Ann Surg* 1998;228:479-90.
66. Shah SA, Tan JCC, McGilvary ID, et al. Does microvascular affect outcome after liver transplantation for HCC? A histopathological analysis of 155 consecutve explants. *J Gastrointest Surg* 2007;11:464-71.
67. Parfitt JR, Marotta P, AlGhamdi, et al. Recurrent hepatocellular carcinoma after transplantation: Use of a pathological score on explants livers to predict recurrence. *Liver transpl* 2007;13:543-51.
68. Zou WL, Zang YJ, Chen XG, et al. Risk factors of hepatocellular carcinoma and their role in selecting candidates for liver transplantation. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2008;7(2):145-51.
69. Qin LX, Tang ZY. The prognostic molecular markers in hepatocellular carcinoma. *World J. Gastroenterol* 2002;8(3):385-92.

70. Buendia MA. Genetics of hepatocellular carcinoma. *Semin Cancer Biol* 2000; 10: 185-200.
71. Thorgeirsson SS, Grisham JW. Molecular pathogenesis of human hepatocellular carcinoma. *Nat Genet* 2002; 31: 339-46.
72. Laurent-Puig P, Zucman-Rossi J. Genetics of hepatocellular tumors. *Oncogene* 2006; 25: 3778-86.
73. Farazi PA, Depinho RA. Hepatocellular carcinoma pathogenesis: from genes to environment. *Nat Rev Cancer* 2006; 6: 674-87.
74. Feitelson MA, Sun B, Satiroglu Tufan NL, et al. Genetic mechanisms of hepatocarcinogenesis. *Oncogene* 2002; 21: 2593-604.
75. Calvisi DF, Ladu S, Gorden A, et al. Ubiquitous activation of Ras and Jak/Stat pathways in human HCC. *Gastroenterology* 2006; 130: 1117-28.
76. Lee JS, Thorgeirsson SS. Comparative and integrative functional genomics of HCC. *Oncogene* 2006; 25: 3801-9.
77. Borzio M, Trere D, Borzio F, et al. Hepatocyte proliferation rate is a powerful parameter for predicting hepatocellular development in liver cirrhosis. *Mol Pathol* 1998; 51: 96-101.
78. Thorgeirsson SS, Teramoto T, Factor V. Dysregulation of apoptosis in hepatocellular carcinoma. *Semin Liver Dis* 1998; 18: 115-22.
79. Berasain C, Castillo J, Prieto J, et al. New molecular targets for hepatocellular carcinoma: the ErbB1 signaling system. *Liver Int* 2007;153(2):174-85.
80. Davaeu M, Scotte M, Francois A, et al. Hepatocyte growth factor, transforming growth factor α , and their receptors as combined markers of prognosis in hepatocellular carcinoma. *Molecular carcinogenesis* 2003;36(3):130-41.
81. Ito Y, Takeda T, Higshiana S, et al. Expression of heparin binding epidermal growth factor-like growth factor in hepatocellular carcinoma: an immunohistochemical study. *Oncol rep* 2001;8(4):903-7.
82. Moon WS, Park HS, Yu KH, et al. Expression of betacellulin and epidermal growth factor receptor in hepatocellular carcinoma: implications for angiogenesis. *Human Patologist* 2006;37(10):1324-32.

83. Inui Y, Higashiyama S, Kawata S, et al. Expression of heparine-binding epidermal growth factor in human hepatocellular carcinoma. *Gastroenterol* 1994;107(6):1799-804.
84. Harada K, Shita G, Kawasaki H. Transforming growth factor- α and epidermal growth factor receptor in chronic liver disease and hepatocellular carcinoma. *Liver Int* 1999;19(4):318-25.
85. Kira S, Nakanish T, Suemori S, et al. Expression of transforming growth factor alpha and epidermal growth factor in hepatocellular carcinoma. *Liver* 1997;17(4):177-82.
86. Tanabe KK, Lemonie A, Finklstien DM, et al. Epidermal growth factor gene functional polymorphism and the risk of hepatocellular carcinoma in patients with cirrhosis. *JAMA* 2008;29(1):53-60.
87. Robinson DR, Wu YM, Lin SF. The protein tyrosine kinase family of the human genome. *Oncogene* 2000; 19:5548-57
88. Wang Y, Minoshima S, Shimizu N. Precise mapping of the EGF receptor gene on the human chromosome 7p12 using an improved FISH technique. *Jpn J Human Genet* 1993; 38: 399-406.
89. Ullrich A, Schlessinger J. Signal transduction by receptor with tyrosine kinase activity. *Cell* 1990; 61: 203–212.
90. Wells A. The epidermal growth factor receptor (EGFR)—a new target in cancer therapy. *Signal* 2000; 1: 4–11.
91. Wells A. EGF receptor. *Int J Biochem Cell Biol* 1999; 31:637-44.
92. Riese II DJ & Stern DF 1998 Specificity within the EGF family/ ErbB receptor family signaling network. *Bioessays* 20 41–48.
93. Jones JT, Akita RW, Sliwkowski MX. Binding specificities and affinities of egf domain for ErbB receptors. *FEBS Lett* 1999; 447:227-31.
94. Linggi B, Carpenter G. ErbB receptors: new insights on mechanisms and biology. *Trends in cell biology*, 2006;16(12):649-56.
95. Normanno N, Bianco C, De Luca A, et al. Target-based agents against ErbB receptors na their ligands: a novel approach to cancer treatment. *Endocrine-related Cancer* 2003;10:1-21.

96. Yarden Y, Sliwkowski MX. Untangling the ErbB signaling network. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001; 2:127-37.
97. Sako Y, Minoguchi S, Yanagida T. Single-molecule imaging of EGFR signaling on the surface of living cells. *Nat Cell Biol* 2000; 2:168-72.
98. Hynes NE, Horsh K, Olayioye MA, et al. The ErbB receptor tyrosine family as signal integrators. *Endocrine-Related Cancer* 2001; 8:151-9.
99. Ciardiello F, Tortora G. A novel approach in the treatment of cancer: Targeting the Epidermal Growth Factor Receptor. *Clin Cancer Res* 2001;7:2958-78.
100. Voldborg BR, Damstrup L, Spang-Thomsen M, et al. Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) and EGFR mutations, function and possible role in clinical trials. *Ann Oncol* 1997;8:1197-206.
101. Alroy I, Yarden Y. The ErbB signaling network in embryogenesis and oncogene signal diversification through combinatorial ligand-receptor interactions. *FEBS Lett* 1997; 410:83-86.
102. Chen WS, Lazar CS, Poenie M, Tsien RY, Gill GN, Rosenfeld NG. Requirement for intrinsic protein tyrosine kinase in the immediate and late actions of the EGF receptor. *Nature* 1987; 328:820-23.
103. Muthuswamy SK, Gilman M, Brugge JS. Controlled dimerization of ErbB receptors provides evidences for differential signaling by homo-and-heterodimers. *Mol Cell Biol* 1999; 19:6845-57.
104. Citri A, Yarden Y. EGF-ERBB signaling: towards the systems level. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2006; 7: 505-16.
105. Normanno N, De Luca A, Bianco C, et al. Epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling in cancer. *Gene* 2006; 366: 2-16.
106. Jorissen RN, Walker F, Pouliot N, et al. Epidermal growth factor receptor: mechanisms of activation and signalling. *Exp Cell Res* 2003; 284: 31-53.
107. Prenzel N, Fischer OM, Streit S, et al. The epidermal growth factor receptor family as a central element for cellular signal transduction and diversification. *Endocr Relat Cancer* 2001; 8: 11-31.
108. Cavin LG, Wang F, Factor VM, et al. Transforming growth factor-alpha inhibits the intrinsic pathway of c-Myc-induced apoptosis through activation of nuclear

- factor kappa b in murine hepatocellular carcinomas. *Mol Cancer Res* 2005; 3: 403-12.
109. Raizer JF. HER1/EGFR tyrosine kinase inhibitors for the treatment of glioblastoma multiforme. *Journal of Neuro-Oncology* 2005;74:77–86.
110. Baselga J. Why the epidermal growth factor receptor? The rationale for cancer therapy. *The Oncologist* 2002;7(suppl 4):2-8.
111. Sainsbury JR, Farndon JR, Needham GK, Malcolm AJ, Harris AL. Epidermal growth factor receptor status as predictor of early recurrence of and death from breast cancer. *Lancet* 1987; 1:1398-402.
112. Goldstein NS, Armin M. Epidermal growth factor receptor immunohistochemical reactivity in patients with American Joint Committee on Cancer stage IV colon adenocarcinoma: implications for a standardized scoring system. *Cancer (Phila)* 2001; 92:1331-46.
113. Arteaga CL, Targeting Her1/EGFR: a molecular approach to cancer therapy. *Semin Oncol* 2003; 3(7):3-14.
114. Ito Y, Takeda T, Sakon M, et al. Expression and clinical significance of erb-B receptor family in hepatocellular carcinoma. *British Journal of Cancer* 2001;84(10)1377–83.
115. Huang ZQ, Buchsbaum DJ, Raisch KP, Bonner JA, Bland KI, Vickers SM. Differential responses by pancreatic carcinoma cell lines to prolonged exposure to Eritux (IMC-C225) anti-EGFR antibody. *J of Surg Res* 2003; 111:274-83.
116. Giaccone G. Targeting HER/EGFR in cancer therapy: experience with erlotinib. *Future Oncol* 2005;1:449-60.
117. Bianco R, Gelardi T, Damiano V, et al. Mechanisms of resistance to EGFR inhibitors. *Targ Oncol* 2007;2:31–7.
118. Camp ER, Summy J, Bauer TW, et al. Molecular mechanisms of resistance to therapies targeting the Epidermal Growth Factor receptor. *Clinical Cancer Research* 2005;11:397–405.
119. Lauwers, GY, Terris B, Balis UJ, et al. Prognostic Histologic Indicators of Curatively Resected Hepatocellular Carcinomas: A multi-institutional analysis of 425 patients with definition of a histologic prognostic index. *American J of Surgical Pathology* 2002;26(1):25-34.

120. Ringe B, Pichlmayr R, Tusch G. Surgical treatment of hepatocellular carcinoma: experience with liver resection and transplantation in 198 patients. *World J Surg* 1991;15:270-285.
121. Selby R, Zakiyah K, Carr B et al. Liver transplantation for hepatocellular carcinoma. *World J Surg* 1995;19:53-8.
122. Iwatsuki S, Starzl TE, Sheahan DG, Yokoyama I, Demetris AJ, Todo S, et al. Hepatic resection versus transplantation for hepatocellular carcinoma. *Ann Surg* 1991;214:221-8.
123. Bismuth H, Majno PE, Adam R. Liver transplantation for hepatocellular carcinoma. *Semin Liver Dis* 1999;19:311-322.
124. Yoo HI, Patt CK, Geschwind JF et al. The outcome of liver transplantation in patients with hepatocellular carcinoma in the United States between 1988 and 2001: 5 year survival has improved significantly with time. *J Clin Oncol* 2003;21(23):4329-35.
125. Regalia E, Fassati LR, Valente U et al. Pattern and management of recurrent hepatocellular carcinoma after liver transplantation. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 1998;5:29-34.
126. Figueras J, Jaurrieta E, Valls C, et al. Resection or transplantation for hepatocellular carcinoma in cirrhotic patients: outcomes based on indicated treatment strategy. *J Am Coll Surg* 2000;190:580-7.
127. Shetty K, Timmins K, Brensinger C, et al. Liver transplantation for hepatocellular carcinoma validation of present selection criteria in predicting outcome. *Liver Transpl* 2004; 10:911-8.
128. Shimoda M, Ghobrial RM, Carmody IC, et al. Predictors of survival after liver transplantation for hepatocellular carcinoma associated with hepatitis C. *Liver Transpl* 2004;10(12):1478-856.
129. Pérez-Saborido B, Galanes SJ, Meneú-Díaz JC, et al. Tumor recurrence after liver transplantation for hepatocellular carcinoma: Recurrence pathway and prognosis factors. *Transpl Proc* 2007;39:2304-7.
130. Kim Y, Lim HK, Rhim H, et al. Recurrence of hepatocellular carcinoma after liver transplantation: Patterns and prognostic factors based on clinical and radiological features. *Am J Radiol* 2007;189:352-8.

131. Bozorgzadeh A, Orloff m, Abt P, et al. Survival outcomes in liver transplantation for hepatocellular carcinoma, comparing impact of hepatitis C versus other etiology of cirrhosis. *Liver Transpl* 2007;13:807-113.
132. Löhe F, Angele MK, Gerbes AL, et al. Tumour size is an important predictor for the outcome after liver transplantation for hepatocellular carcinoma. *EJSO* 2005;31(9):994-9.
133. Kondili LA, Lala A, Gunson B, et al. Primary hepatocellular cancer in the explanted liver: Outcome of transplantation and risk factors for HCC recurrence. *EJSO* 2007;33:868-73.
134. Marsh JW, Dvorchik I, Subotin M, et al. The prediction of risk of recurrence and time to recurrence of hepatocellular carcinoma after orthotopic liver transplantation: a pilot study. *Hepatology* 1997;26: 444–50.
135. Otto G, Heuschen U, Hofmann WJ et al. Survival and recurrence after liver transplantation versus resection for hepatocellular carcinoma. A retrospective analysis. *Annals of Surgery* 1998;227(3):424-32.
136. Marelli L, Grasso A, Stigliano R, et al. The size of the largest nodule – not the number of nodules – is the best predictor of recurrence of hepatocellular carcinoma after liver transplantation. *J hepatol*, 2007;46(suppl 1):s18. (Abstract)
137. Xu X, Ke QH, Shao ZX, et al. The value of serum α -fetoprotein in predicting tumor recurrence after liver transplantation for hepatocellular carcinoma. *Dig Dis Sci*, *in press*.
138. Mann CD, Neal CP, Garcea G, et al. Prognostic molecular markers in hepatocellular carcinoma: A systematis review. *Eur J of Cancer* 2007; 43:979-92.
139. Marsh JW, Finkelstein SD, Demetris AJ, ey al. Genotyping of hepatocellular carcinoma in liver transplant recipients adds predictive power for determining recurrence-free survival. *Liver Transpl*, 2003;9:664-71.
140. Baselga J, Arteaga CL. Critical care update and emerging trends in epidermal growth factor targeting in cancer. *J Clin Oncol* 2005;24:45-59.
141. Huether A, Höpfner M, Baradari V, et al. EGFR blockade by Cetuximab alone or as combination therapy for growth control of hepatocellular cancer. *Biochem Pharmacol*, 2005; 70(11):1168-78.

142. Höpfner M, Sutter AP, Heuther A, et al. Targeting the epidermal growth factor receptor by Gefitinib for treatment of hepatocellular carcinoma. *J Hepatol*, 2004; 41(6):1008-16.
143. Heuther A, Höpfner M, Sutter AP, et al. Erlotinib induces cell cycle arrest and apoptosis in hepatocellular cancer cells and enhances chemosensitivity towards cytostatics. *J Hepatol*, 2005; 43(4):661-9.
144. Liu Y, Poon RTP, Shao W, et al. Blockade of epidermal growth factor receptor by quinazoline tyrosine kinase inhibitors suppresses growth of human hepatocellular carcinoma. *Cancer Letters*, 2007; 248:32-40.
145. Penault-Lorca F, Cayre A, Arnould L, et al. Is there an immunohistochemical technique definitively valid in epidermal growth factor receptor assessment? *Oncology reports*, 2006; 16:1173-9.
146. Buckley AF, Kakar S. Comparison of the Dako EGFR pharmDx kit and Zymed EGFR antibody for assessment of EGFR status in colorectal adenocarcinoma. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*, 2007; 15(3):305-9.
147. Moon WS, Son HS, Park HS, et al. Rarity of EGFR and c-ErbB-2 Overexpressions in Hepatocellular Carcinoma: An immunohistochemical study. *The Korean Journal of Pathology*, 2004; 38: 244-8.
148. Nakopoulou L, Stefanaki K, Filaktopoulos D, et al. C-erb-B-2 oncoprotein and epidermal growth factor receptor in human hepatocellular carcinoma: An immunohistochemical study. *Histol Histopathol* 1994;9(4):677-82.

Anexo I

Técnica de preparo das lâminas para análise imunoistoquímica.

1) Desparafinização:

Passar por 4 cubas contendo xilol durante 5 minutos cada.

Passar por 4 cubas contendo álcool etílico.

Deixar por 5 minutos em uma cuba contendo PBS.

Passar por 2 cubas contendo PBS com H₂O₂ 3% 5 minutos cada.

Passar por 1 cuba contendo PBS para posteriormente iniciar a imunohistoquímica.

Colocar as laminas em bandejas e incubar as laminas por 5 minutos em Proteinase Type XXIV a 0,01% (P8038 – Sigma) em temperatura ambiente.

Ao término do tempo, lavar com PBS e pingar PBS sobre as lâminas. Aspirar o excesso de PBS e instilar o anticorpo EGFr (Monoclonal anti-EGFr – Cat. Nº 28-0005 - Zymed) na diluição de 1:50, e incubar overnight.

Lavar as lâminas com PBS com Tween, aspirar o excesso de PBS e instilar o “Post Primary Block – Novocastra REF.:7159 e incubar por 30 minutos.

Lavar as lâminas com PBS com Tween, aspirar o excesso de PBS e instilar o “ Polymer NovoLink – Novocastra REF.: 7161 e incubar por 30 minutos.

Lavar as lâminas com PBS com Tween, aspirar o excesso de PBS e instilar o DAB (Diaminobenzidine tetra-hydrochloride – REF.: D-5637 – Sigma)

2) Preparo do DAB:

10 ml de Trisma

10 ng de DAB

0,2 ml de H₂O₂ 10%

Instilar o DAB sobre as lâminas e incubar durante 5 minutos.

Lavar com H₂O destilada abundantemente, contracorar com Hematoxilina, azulecer em H₂O amoniacal, desidratar em 6 cubas com álcool etílico absoluto, passar em 3 cubas contendo xilol e por ultimo montar com resina permount.