

Adélia d' Ascensão Simão

# Carcinoma hepatocelular: estudo clínico, caracterização bioquímica e marcadores de rastreio e diagnóstico

Tese de doutoramento em Ciências da Saúde, no ramo de Medicina, na especialidade de Medicina Interna, orientada pelos Professores Doutores José Manuel Borges do Nascimento Costa e Armando Simões Pereira de Carvalho, apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra

Julho de 2014



UNIVERSIDADE DE COIMBRA



## PREFÁCIO

O desejo de ser médica começou bem cedo, na minha infância. Olhando para trás, consigo lembrar-me de estar doente e ter sido levada a um senhor doutor de ar sereno e sorriso meigo que conversou comigo, me observou calmamente, prescreveu uns comprimidos, cujo nome obviamente já não sei, e me assegurou, de forma definitiva, que eu iria ficar bem. Recordo-me que, ao sair do consultório, pensei: quando for grande quero ser assim!

Os anos foram passando rapidamente e consegui concretizar o meu desejo sem grandes dificuldades. Felizmente, naquele tempo as pessoas conseguiam aceder ao curso que queriam desde que trabalhassem o suficiente e sem dependerem de grandes recursos financeiros. Mais tarde, na escolha da especialidade de medicina interna foi determinante o facto de entender o ser humano doente como um todo e o fascínio de, após uma história clínica minuciosa, poder construir o diagnóstico diferencial com base no raciocínio clínico e nos exames complementares mais adequados para cada caso concreto, ponderar qual a terapêutica indicada e, sempre que possível, estabelecer um prognóstico.

Quando me foi colocada a hipótese dum doutoramento académico, comecei por achar que esse nunca tinha sido o meu projecto profissional. No entanto, sempre havia cultivado a curiosidade científica, gostava de partilhar conhecimentos com outros colegas e com os alunos e tinha já uma vasta experiência de ensino, como assistente convidada da FMUC e algum trabalho de investigação clínica. Afinal, essa opção fazia algum sentido.

Como gosto de desafios, resolvi aceitar, com plena consciência de que não ia ser fácil acrescentar mais trabalho e preocupações a uma carreira já tão preenchida, que não iria ser aliviada, e a uma vida familiar que não queria, de forma alguma, prejudicar.

O tema da tese só poderia ser inspirado pela clínica, pelos problemas que era chamada a resolver. O número crescente de doentes com carcinoma hepatocelular e o

tremendo desenvolvimento científico nesta doença foram o estímulo final. Era um trabalho de internista, associando a hepatologia e a oncologia, numa aliança grave e complexa, abordando na maioria das vezes não uma, mas sim duas doenças (a cirrose e o carcinoma hepatocelular). Aliás, vários anos antes, no início da minha carreira, já bastante interessada nesta patologia, tinha apresentado uma comunicação livre intitulada "Hepatoma: uma entidade rara?", que parecia agora ter sido premonitória.

Não foi fácil levar esta tarefa a termo, pois além do acréscimo de trabalho, surgiram múltiplas dificuldades, que foi necessário ultrapassar, felizmente contando para isso com ajudas preciosas, sem as quais teria sido impossível concretizar este projeto e que me fazem hoje sentir muito grata.

Em primeiro lugar, agradeço profundamente aos meus pais, ao meu marido e aos meus filhos, que sempre me incentivaram e apoiaram de uma forma incondicional.

Aos meus orientadores, Professores Doutores José Manuel Nascimento Costa e Armando de Carvalho, obrigada por terem apostado em mim, por terem acreditado na minha capacidade de levar a cabo este projecto e por me ajudarem, com os seus conhecimentos e experiência, na concretização das diversas componentes desta tese de doutoramento.

Agradeço à Dr<sup>a</sup> Lurdes Correia, minha ex-interna e à Dr<sup>a</sup> Raquel Silva e ao Dr. Pedro Correia, internos que agora oriento, pelo precioso auxílio na recolha dos dados clínicos dos doentes, fundamentais para a elaboração da primeira parte da tese, trabalhando muitas horas para além das suas obrigações profissionais.

O estudo sobre o valor da osteopontina no carcinoma hepatocelular só foi possível graças à colaboração empenhada do Dr. Nuno Silva, responsável por muitos dos doentes incluídos, e do Dr. João Madaleno, que coligiu os dados e colaborou no seu tratamento estatístico. Obrigada a ambos.

O meu agradecimento à Dr<sup>a</sup> Graça Ribeiro, Directora do Serviço de Patologia Clínica do CHUC (HUC), que, desde a primeira hora em que o projecto lhe foi apresentado, se disponibilizou para que ali fossem feitas todas as determinações analíticas necessárias.

Um reconhecimento particular é devido ao Dr. Fernando Rodrigues e à Dr<sup>a</sup> Paula Caseiro, que tudo fizeram para que as técnicas laboratoriais fossem executadas com um profissionalismo e dedicação exemplares.

Ao Prof. Doutor Francisco Castro e Sousa, Director do Serviço de Cirurgia A do CHUC (HUC), estou muito grata por ter facilitado a colheita de fragmentos de tecido hepático nos doentes operados por si, ou por elementos do seu serviço, nomeadamente pelo Dr. Henrique Alexandrino e pelo Prof. Doutor Guilherme Tralhão, a quem agradeço também a ajuda e disponibilidade.

Ao Prof. Doutor Filipe Caseiro Alves, Director do Serviço de Imagem Médica do CHUC, agradeço a disponibilidade total do seu Serviço, que incluiu a excelente colaboração de todos os colegas envolvidos no estudo e tratamento dos doentes com CHC, a quem igualmente estou grata.

O Serviço de Anatomia Patológica do CHUC foi muito importante na preparação e acondicionamento das biopsias hepáticas e posterior envio para a Universidade de Aveiro, sendo devido um agradecimento particular à Dr<sup>a</sup> Ana Gomes, pela sua importante ajuda e pela disponibilidade e simpatia que sempre demonstrou. Obrigada também à Dr<sup>a</sup> Maria Augusta Cipriano pela profícua colaboração e pelo seu profissionalismo.

Ao Prof. Doutor Carlos Geraldês, professor catedrático da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra, agradeço a ajuda muito importante que, com a sua experiência e conhecimentos, permitiu delinear o estudo metabólico do CHC, bem como o seu empenhamento nas diligências necessárias à sua concretização no Departamento de Química da Universidade de Aveiro, dada a impossibilidade de o efectuar no seu departamento.

Aos investigadores do Departamento de Química da Universidade de Aveiro, Ana M. Gil, Brian Goodfellow, João Rodrigues, Cláudia Rocha, Sara Pereira e Letícia Costa, estou muito grata por terem feito a preparação das amostras, a aquisição dos espectros de <sup>1</sup>H RMN e colaborado na análise dos dados do estudo.

Aos Prof.s Alberto Cardoso e Pedro Abreu do Departamento de Engenharia Informática da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra, manifesto a minha gratidão pela forma empenhada com que abraçaram o projecto de construção duma base informática para apoio ao registo de dados e análise dos doentes com CHC do CHUC. Um agradecimento especial à aluna de Engenharia Biomédica, Miriam Santos, que nos escolheu para o seu estágio de mestrado, elaborando a referida base, duma forma tão empenhada quanto profissional. De igual modo, agradeço a colaboração do Hugo Amaro.

Ao Prof. Doutor Armando Porto, meu mestre e director do antigo Serviço de Medicina III, bem como ao Dr. Eurico Almiro agradeço os preciosos conhecimentos que me transmitiram e a amizade com que sempre me brindaram.

Também não posso esquecer o apoio e companheirismo da Dr<sup>a</sup> Conceição Reis nem os ensinamentos do Dr. Francisco Severo. É com carinho e saudade que a ambos recordo.

Aos colegas do Serviço de Medicina Interna, que comigo partilham o interesse pela hepatologia e se disponibilizaram a colaborar nestes trabalhos, manifesto o meu reconhecimento.

Aos doentes, razão de ser da minha profissão, com quem aprendi tantas lições de vida, com quem cresci como ser humano e de quem recebi tantos exemplos de dignidade, de força e de coragem, muito obrigada.

## LISTA DE ABREVIATURAS

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

AFP - Alfa-fetoproteína

AFP-L3 - Sub-fração L3 da alfa-fetoproteína

AKT<sub>1</sub> - Serina/treonina quinase 1

ALT - Alanina aminotransferase

ARNm – Ácido desoxi-ribonucleico mensageiro

AST - Aspartato aminotransferase

ATP - Trifosfato de adenosina

Brb - Bilirrubinemia

CEUS - *Contrast-Enhanced Ultrasonography*

CHC - Carcinoma hepatocelular

CISUC - Centro de Informática e Sistemas da Universidade de Coimbra

CLIP - *Cancer Liver Italian Program*

Cr - Creatininemia

CTCAE - *Common Terminology Criteria for Adverse Events*

CTP - Proteínas de transporte de citrato

CUPI - *Chinese University Prognostic Index*

DART-EM - Espectrometria de massa com análise directa em tempo real

DGP - Des-gammacarboxiprotrombina

DE Beads - *Drug Eluting Beads*

DEN - Dietilnitrosamina

DHA – Doença hepática alcoólica

EASL - *European Association for the Study of the Liver*

ECOG - *Eastern Cooperative Oncology Group*

EDTA - Ácido etilenodiaminotetracético

EGF - *Epidermal growth factor*

EGFR - *Epidermal growth factor receptor*

ELTR – *European Liver Transplant Registry*

EM - Espectrometria de massa

EMA - Agência Europeia de Medicamentos  
EORTC - *European Organization for Research and Treatment of Cancer*  
EpCAM - *Epithelial cell adhesion molecule*  
EUA - Estados Unidos da América  
FA - Fosfatase alcalina  
FDA - *Food and Drug Administration*  
FDG - *Fludeoxyglucose*  
FGFR - *Fibroblast Growth Factor Receptor*  
FH - Fumarato hidratase  
FID - *Free Induction Decay*  
GGT - Gama glutamiltransferase  
GLS – Glutaminase  
GP73 - Proteína de Golgi 73  
GPC3 - Glipicano 3  
GLS - Glutaminase  
Hb - hemoglobina  
HBC – Hepatite B crónica  
HCA - *Hierarchical cluster analysis*  
HCC – Hepatite C crónica  
HIF - Factor indutor de hipoxia  
HIFU - *High-intensity focused ultrasound*  
HR – *Hazard ratio*  
HRMAS - *High-resolution magic angle spinning*  
HSP - Proteínas de choque térmico  
HSQC - *Heteronuclear Single-Quantum Correlation*  
IARC - *International Agency for Research on Cancer*  
IC - Intervalo de confiança  
ICGHN - *International Consensus Group of Hepatocellular Neoplasia*  
IGFR - *Insulin-like growth factor 1 (IGF-1) receptor*  
IL-6 - Interleucina-6  
IMC – Índice de massa corporal  
INR - *International normalized ratio*

JAK2 - *Janus kinase 2*

JIS - *Japan Integrated Staging*

K19 - *Queratina 19*

LDLT - *Living donor liver transplant*

LPS – *Lipoproteínas*

LYVE1 - *Lymphatic vessel endothelial hyaluronan receptor 1*

MAPK - *Mitogen-activated protein kinases*

MCCV - *Monte Carlo Cross Validation*

MELD - *Model for End-stage Liver Disease*

MGF - *Medicina Geral e familiar*

mRECIST - *Modified Response Evaluation Criteria in Solid Tumors*

mTOR - *Mammalian target of rapamycin*

MUC – 1 - *Mucina 1*

OMS - *Organização Mundial da Saúde*

OPLS-DA - *Orthogonal projection to latent structure discriminant analysis*

OPN - *Osteopontina*

OPTN - *Organ Procurement and Transplantation Network*

PARs - *Population attributable risks*

PCA - *Principal component analysis*

PDGF - *Platelet-derived growth factor*

PEI - *Percutaneous ethanol injection*

PEP - *Fosfoenolpiruvato*

PET – *Tomografia de emissão de positrões*

Plaq - *Plaquetas*

PGAM1 - *Fosfoglicerato mutase 1*

PhD - *Prolil hidroxilase*

PIVKA-II - *Protrombina induzida pelo antagonista II da vitamina K*

PK - *Piruvato quinase*

PQN - *Probability Quotient Normalisation*

PTEN - *Phosphatase and tensin homolog*

PVE - *Portal vein embolization*

RECIST - *Response Evaluation Criteria in Solid Tumors*

RFA – Ablação por radiofrequência

RM - Ressonância magnética

RMN<sup>1</sup>H - Ressonância magnética nuclear de próton

RR - Risco relativo

RSPA - *Segment-Wise Peak Alignment Algorithm*

RTC – Ensaio aleatorizado controlado

SCCA - Antígeno do carcinoma de células escamosas

SDH - Succinato desidrogenase

SHARP - *Sorafenib HCC Assessment Randomized Protocol*

STOCSY - *Statistical Total Correlation Spectroscopy*

TACE - *Transarterial chemoembolization*

DEB-TACE- Drug eluting beads transcatheter chemoembolization

TAE - *Transarterial embolization*

TC - Tomografia computadorizada

TCA - *tricarboxylic acid*

TGF – beta - Transforming growth factor beta

TMAO - *Trimethylamine N-oxide*

TSP - Trimetilsililpropionato

TTP – *Time to progression*

UCSF - *University of California San Francisco*

UNOS - *United Network for Organ Sharing*

VEGF- Vascular endothelial growth factor

VEGFR - Vascular Endothelial Growth Factor Receptors

VGM - Volume globular médio

VHB - Vírus da hepatite B

VHC - Vírus da hepatite C

VHD - Vírus da hepatite delta

VIH - Vírus da imunodeficiência humana

VIP - *Variable Importance in the Projection*

WHO - *World Health Organization*

# ÍNDICE

	PÁG.
PREFÁCIO	I
LISTA DE ABREVIATURAS	V
RESUMO	XV
ABSTRACT	XIX
<b>Capítulo 1 – INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
1. GENERALIDADES E INTRODUÇÃO CLÍNICA	3
1.1. Epidemiologia e factores de risco	3
1.2. Prevenção	12
1.3. Vigilância	13
1.4. Diagnóstico	16
1.4.1. Métodos radiológicos	17
1.4.2. Histopatologia	20
1.4.3. Avaliação da extensão	23
1.5. Classificação e estadiamento	24
1.5.1. Conceitos genéricos, sistemas de estadiamento e sistema BCLC	24
1.5.2. Sistemas de estadiamento	26
1.5.3. Estadiamento BCLC	27
1.5.3.1. Estádio inicial	29
1.5.3.2. Estádio intermédio e avançado	30
1.5.3.3. Estádio terminal	33
1.5.3.4. Conceito de migração de estágio	33
1.5.4. Classificação molecular do CHC	34
1.6. Tratamento	35
1.6.1. Ressecção hepática	36

	PÁG.
1.6.1.1. Tratamentos adjuvantes para prevenir a recorrência	39
1.6.2. Transplantação hepática	41
1.6.2.1. Políticas de prioridade e de saída de lista	43
1.6.2.2. Tratamentos neo-adjuvantes em lista de espera	44
1.6.2.3. Extensão de indicações e <i>downstaging</i> na transplantação	45
1.6.2.4. Transplante de dador vivo	47
1.6.2.5. Dados sobre transplante hepático em Portugal	48
1.7. Tratamentos loco-regionais	49
1.7.1. Com intuito curativo: PEI e RFA	49
1.7.2. Tratamentos em investigação	52
1.8. Quimioembolização	53
1.8.1. Quimioembolização Convencional (TACE)	54
1.8.2. Quimioembolização com DE Beads	55
1.9. Radioembolização	56
1.10. Outros tratamentos loco-regionais paliativos	58
1.11. Terapêuticas sistémicas moleculares	58
1.11.1. Sorafenib	60
1.11.2. Outras moléculas-alvo em desenvolvimento clínico	62
1.12. Outras terapêuticas sistémicas	64
1.12.1. Quimioterapia	64
1.12.2. Compostos hormonais	65
1.12.3. Imunoterapia	66
1.12.4. Outros tratamentos	66
2. ESTUDO METABOLÓMICO COM ESPECTROSCOPIA DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE PROTÃO (RMN de $^1\text{H}$ ) EM TUMORES MALIGNOS	67
2.1. Conceitos	67
2.2. Alterações do metabolismo celular nos tumores malignos	68
2.3. Tecnologia analítica	71
2.4. Estudos metabolómicos com RMN $^1\text{H}$ de HRMAS em tumores	72

	PÁG.
2.5. Estudos metabolómicos com espectroscopia de RMN <sup>1</sup> H no CHC	74
2.5.1. Em tecidos	74
2.5.2. Em biofluidos	75
2.6. Conclusões e perspectivas	76
<b>3. MARCADORES DE RASTREIO E DIAGNÓSTICO</b>	<b>79</b>
3.1. Introdução	79
3.2. Biomarcadores tumorais	81
3.2.1. Alfa-fetoproteína	81
3.2.2. DCP (PIVKA - II)	83
3.2.3. Glipicano-3	85
3.2.4. Outros biomarcadores	86
3.3. Osteopontina	87
3.3.1. Osteopontina como potencial marcador de diagnóstico no CHC	88
3.3.1. Osteopontina noutras patologias hepáticas	93
<b>Capítulo 2 – OBJECTIVOS GERAIS E METODOLOGIA</b>	<b>97</b>
1. OBJECTIVOS GERAIS	99
2. METODOLOGIA	101
2.1. Estudo clínico de doentes com CHC	101
2.2. Estudo bioquímico (metabolómico) do carcinoma hepatocelular com espectroscopia de ressonância magnética nuclear de protão (RMN de <sup>1</sup> H)	101
2.3. Marcadores de rastreio e diagnóstico do CHC: o papel da OPN	103
<b>Capítulo 3 – CARCINOMA HEPATOCELULAR: ESTUDO CLÍNICO</b>	<b>105</b>
1. INTRODUÇÃO E OBJECTIVOS	107
2. DOENTES E MÉTODOS	110
2.1. Desenho do estudo e características dos doentes	110
2.2. Análise estatística	111
3. RESULTADOS	111
3.1. Dados gerais	111

	PÁG.
3.2. Factores de risco	112
3.3. Formas de apresentação clínica	113
3.4. Exames efectuados para obtenção do diagnóstico	114
3.5. Distribuição dos doentes pelos estádios BCLC	115
3.6. Metástases e sua localização	115
3.7. Tratamentos efectuados	116
3.8. Tratamento de doentes em estágio avançado com sorafenib	119
3.8.1. Casuística	119
3.8.2. Um caso clínico	127
3.9. Sobrevivência global dos doentes com CHC	129
3.10. Sobrevivência por estágio BCLC	130
3.11. Sobrevivência global dos doentes alcoólicos <i>versus</i> não alcoólicos	132
3.12. Agrupamento dos doentes de acordo com a sobrevivência	133
3.13. Heterogeneidade do estágio avançado (C)	135
4. DISCUSSÃO E CONCLUSÕES	137

<b>Capítulo 4 – ESTUDO BIOQUÍMICO (METABOLÓMICO) DO CARCINOMA HEPATOCELULAR COM ESPECTROSCOPIA DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE PROTÃO (RMN de <sup>1</sup>H)</b>	145
1. INTRODUÇÃO	147
2. OBJECTIVOS	150
3. MATERIAL E MÉTODOS	151
3.1. Caracterização dos doentes	151
3.2. Manuseamento dos tecidos	152
3.3. Preparação das amostras	153
4. RESULTADOS	156
4.1. Composição metabólica do tecido tumoral hepático	156
4.2. Diferenças metabólicas entre tumor e tecido não tumoral	156
5. DISCUSSÃO E CONCLUSÕES	161

	PÁG.
<b>Capítulo 5 – MARCADORES DE RASTREIO E DIAGNÓSTICO DO CHC:</b>	
<b>O PAPEL DA OSTEOPONTINA</b>	165
1. INTRODUÇÃO E OBJECTIVOS	167
2. DOENTES E MÉTODOS	171
2.1. Desenho do estudo e características dos doentes	171
2.2. Determinação dos níveis plasmáticos de OPN	172
2.3. Determinação dos níveis séricos de AFP	173
2.4. Análise Estatística	173
3. RESULTADOS	174
4. DISCUSSÃO E CONCLUSÕES	181
<b>Capítulo 6 – CONCLUSÕES</b>	185
<b>BIBLIOGRAFIA</b>	193



# RESUMO

## Introdução e objectivos

Na Europa, em 2008, houve cerca de 65.000 casos de carcinoma hepatocelular (CHC), com 60.240 mortes, estimando-se que em 2020 se atinjam 78.000 casos. Em Portugal, a incidência é de 3,5/100.000 nos homens e de 1,2/100.000 nas mulheres (GLOBOCAN, 2008) e os internamentos por CHC praticamente triplicaram entre 1993 e 2005, tendo o número de mortes quase duplicado de 1990 para 2004. Perante estes números e a manutenção de um prognóstico tão sombrio, pretendemos, partindo da experiência clínica, contribuir para o conhecimento acerca do CHC, especialmente no que se refere ao estadiamento e terapêutica e ao diagnóstico precoce (que pressupõe vigilância e capacidade de detecção e caracterização de nódulos hepáticos).

## Material e métodos

Planeámos um trabalho constituído por três partes: 1) Estudo clínico, baseado na análise retro-prospectiva de doentes com CHC (epidemiologia, métodos de diagnóstico, estadiamento, tratamento), sendo para esse efeito desenvolvido software para o registo e a monitorização dos doentes; 2) Estudo das características bioquímicas (metabólicas) do CHC e do tecido adjacente (controlo negativo), por espectroscopia de RMN  $^1\text{H}$ , sendo os espectros adquiridos num Espectrómetro Bruker Avance DRX-500, visando detectar e caracterizar alterações metabólicas do CHC, como ponto de partida para a obtenção de marcadores com potencial valor diagnóstico; 3) Estudo de marcadores serológicos de rastreio e diagnóstico do CHC, testando o papel da osteopontina (OPN) plasmática (por ELISA) no contexto da cirrose alcoólica, comparando-a com a alfafetoproteína (AFP) sérica (*IMMULITE 2000 AFP*, quimioluminescência).

## Resultados

1) Foram incluídos no estudo clínico 165 doentes (H:133; M:32), com idade média de 64,7 anos (20-93), 90,3% com cirrose hepática. A ingestão excessiva de álcool foi referida por 122 indivíduos (73,9%), que isoladamente ou associada à diabetes mellitus tipo 2 e/ou à obesidade foi responsável por 59% dos factores de risco identificados. Os vírus hepatotrópicos foram detectados em 26% dos casos, em metade deles associados ao álcool. O CHC foi diagnosticado após sintomas em 57,6% dos casos e em rastreio em 31,5%. Na classificação BCLC, aquando do diagnóstico, 32,7% estavam no estágio C, 23,6% no B, 22,4% no D e 19,4% nos estádios 0 e A. A sobrevivência global mediana foi de 364 dias (desvio absoluto: 337 dias); a probabilidade de sobrevivência a 1 e a 3 anos foi de, respectivamente, 63,9% e 48,2%; a probabilidade de sobrevivência a 1 ano para os estádios A, B, C e D foi, respectivamente, de 89,9%, 86,3%, 43,4% e 33,3%. No estágio C, encontramos 2 grupos com sobrevivências diferentes. Tratámos 48 doentes (estádio C) com sorafenib: sobrevivência média estimada de 11,89 meses (IC 95%: 6,46–17,32); efeitos secundários na maioria dos doentes, mais frequentes os gastrointestinais (n=86), dermatológicos (n=47) e constitucionais (n=28), quase sempre de grau 1 ou 2 do CTCAE.

2) Foram analisadas por espectroscopia 16 amostras de tecido hepático (8 de CHC e 8 de tecido envolvente) e também os extractos aquosos e lipídicos dos tumores e tecido não tumoral; obtiveram-se espectros de RMN de boa qualidade para tecido e para os extratos. Nos extratos aquosos registaram-se valores mais baixos de glicose e creatinina nos tumores, com diferença significativa, havendo ainda aumento de colina e lactato, embora não estatisticamente significativo.

3) No estudo sobre o papel da OPN foram incluídos 90 doentes com cirrose alcoólica, 45 sem CHC (Grupo I) e 45 com CHC (Grupo II); a distribuição pelas classes de Child-Pugh era ligeiramente diferente entre os grupos ( $p=0,052$ ), sendo semelhantes quanto ao *score* MELD ( $p=0,205$ ); relativamente ao estágio BCLC, no Grupo II, 4,4% estavam no 0, 42,2% no A, 24,4% no B, 15,6% no C e 13,3% no D. A mediana da AFP no Grupo I foi de 3,00 (0,90-17,00) ng/mL e no Grupo II de 11 (1,30-431272,00) ng/mL ( $p<0,001$ ); a mediana da OPN foi de 923,80 (193,80-2786,20) e de 946,30 (337,10-3583,00),

respectivamente para os Grupos I e II, sem diferença significativa ( $p=0,826$ ), o mesmo acontecendo quando se comparou o Grupo I com estádios precoces (0 e A) do Grupo II ( $p=0,353$ ). Verificou-se correlação positiva da OPN com o *score de Child-Pugh* ( $p=0,533$ ;  $p<0,001$ ) nos dois grupos; a OPN ( $p=0,428$ ;  $p=0,003$ ) e a AFP ( $p=0,522$ ;  $p<0,001$ ) apresentaram correlação positiva com o estágio BCLC. A análise da área sob a curva ROC para a AFP permitiu estabelecer um valor de corte de 8,2 ng/mL para sensibilidade de 57,8% e especificidade de 93,3%; aumentando o valor de corte para 23,5 ng/mL eleva-se a especificidade para 100%, mas diminui-se a sensibilidade (42,2%); a análise da curva ROC para a OPN não permitiu estabelecer um valor de corte capaz de distinguir os 2 grupos.

## Conclusões

1) A cirrose alcoólica é, de longe, o principal factor causal de CHC, associando-se com frequência a outros (diabetes, obesidade, vírus). O diagnóstico continua a ser feito tardiamente na maioria dos casos, devendo insistir-se na importância da vigilância dos doentes em risco. Foi significativamente maior a sobrevivência dos doentes em estádios precoces, o que estará relacionado com a eficácia da terapêutica. Identificámos dois grupos distintos no estágio C, quanto à sobrevivência, tendo como base um conjunto de variáveis, de que se destacam a PS, a ascite, a albuminemia e o número de nódulos. O sorafenib foi uma terapêutica útil em doentes do estágio C, Child-Pugh A.

2) São promissores os resultados do estudo da metabolómica tumoral, entreabrindo uma porta que pode levar a formas simples e eficazes de diagnóstico precoce, ainda que com a limitação da acessibilidade actual da tecnologia que empregámos.

3) A OPN não mostrou qualquer utilidade no diagnóstico do CHC enxertado em cirrose alcoólica, mas poderá ter algum interesse como factor de prognóstico, uma vez que se correlaciona com a gravidade da doença de base.



# **ABSTRACT**

## **Introduction and objectives**

In Europe, in 2008, there were about 65,000 cases of hepatocellular carcinoma (HCC), with 60,240 deaths and it is estimated that by 2020, 78,000 cases will be reached. In Portugal, the incidence is 3.5/100,000 in men and 1.2/100,000 in women (GLOBOCAN 2008) and admissions for HCC nearly tripled between 1993 and 2005, having the number of deaths almost doubled, from 1990 to 2004. Facing these numbers and the maintenance of such a grim prognosis, we intend, with the contribution of our clinical experience, to promote the knowledge of HCC, mainly in which concerns to staging, treatment and early diagnosis (which requires surveillance, detection and characterization of liver nodules).

## **Material and methods**

Our work-plan consisted of three parts: 1) Clinical study based on retro-prospective analysis of patients with HCC (epidemiology, methods of diagnosis, staging, treatment); software was developed for this purpose, in order to record and monitor patients; 2) Study of the biochemical characteristics (metabolomics) of HCC and adjacent tissue (negative control) by <sup>1</sup>H NMR spectroscopy; spectra were acquired on a Bruker Avance DRX-500, to detect and characterize metabolic changes of HCC, as a starting point for obtaining markers with potential diagnostic value; 3) Study of serological markers for HCC screening and diagnosis, testing the role of plasma (ELISA) osteopontin (OPN) in alcoholic cirrhosis, comparing it with alpha-fetoprotein (AFP) serum levels (IMMULITE 2000 AFP, chemiluminescence).

## Results

1) 165 patients (M: 133, W: 32), with a mean age 64.7 years (20-93), were included in the clinical study, 90.3% with liver cirrhosis. Excessive alcohol intake was reported by 122 individuals (73.9%) and, alone or associated with type 2 diabetes mellitus and/or obesity, was responsible for 59% of the identified risk factors. Hepatotropic viruses were detected in 26% of the cases, in half of them associated with alcohol. HCC was diagnosed due to symptoms in 57.6% of cases and 31.5% in screening. According to BCLC classification, at diagnosis 32.7% were in stage C, 23.6% in B, 22.4% in D and 19.4% in stages 0 and A. The median overall survival was 364 days (absolute deviation: 337 days); the probability of survival at 1 and 3 years was, respectively, 63.9% and 48.2%; the probability of survival at 1 year for stages A, B, C and D was respectively 89.9%, 86.3%, 43.4% and 33.3%. In stage C, we found 2 groups with different survivals. We treated, with sorafenib, 48 stage C patients with estimated median survival of 11.89 months (95% CI: 6.46 to 17.32); more frequent adverse events were gastrointestinal (n=86), dermatological (n=47) and constitutional (n=28), mostly grade 1 or 2 CTCAE.

2) Sixteen samples of liver tissue (8 HCC and 8 surrounding tissue) as well as aqueous and lipid extracts from tumor and non-tumor tissue were analyzed by spectroscopy; NMR spectra of good quality were obtained for intact tissue and extracts. Lower values of glucose and creatinine in aqueous extracts were recorded, with a significant difference to the non-tumor tissue; choline and lactate were increased in tumors, although without statistically significant difference.

3) The study on the role of OPN included 90 patients with alcoholic cirrhosis, 45 without HCC (Group I) and 45 with HCC (Group II); there was a slightly different distribution among Child-Pugh classes between groups ( $p=0.052$ ), being MELD score similar ( $p=0.205$ ); Group II BCLC stage distribution: 4.4% were at 0, 42.2% in A, B in 24.4%, 15.6% in C and 13.3% in D. The median AFP in group I was 3.00 (0.90 to 17.00) ng / mL and 11 in Group II (1.30 to 431,272.00) ng/mL ( $p<0.001$ ); the median of OPN was 923.80 (193.80 to 2786.20) and 946.30 (337.10 to 3583.00), respectively, for Groups I and II, showing no significant difference ( $p=0.826$ ); the same is true when

comparing group I with early stages (0 and A) of Group II ( $p=0.353$ ). There was a positive correlation between OPN and Child-Pugh score ( $\rho=0.533$ ,  $p<0.001$ ) in both groups; OPN ( $\rho=0.428$ ,  $p=0.003$ ) and AFP ( $\rho=0.522$ ,  $p<0.001$ ) positively correlated with BCLC stage. The analysis of the area under the ROC curve for AFP allowed to establish a cutoff value of 8.2 ng/mL with 57.8% sensitivity and 93.3% specificity; increasing the cutoff to 23.5 ng/mL increases specificity to 100%, but decreases sensitivity to 42.2%; the ROC curve analysis for OPN did not allow to establish a cutoff able to distinguish the 2 groups.

## Conclusions

- 1) Alcoholic cirrhosis is by far the main causal factor of HCC, often associated with other (diabetes, obesity, viruses). The HCC diagnosis is done very late in most of the cases, and we should insist on the importance of surveillance of patients at risk. Patient survival was significantly higher in early stages, related to the effectiveness of the therapy. We identified two distinct groups in stage C, in terms of survival, based on a set of variables: PS, ascites, albumin concentrations and the number of tumor nodules. Sorafenib was a useful therapy in patients in stage C, Child-Pugh A.
- 2) The tumor metabolomics study results are promising, opening a door that can lead to simple and effective ways of early diagnosis, although with the limitation of the current accessibility of the technology that we employed.
- 3) OPN has not shown any usefulness in the diagnosis of HCC in alcoholic cirrhotic patients, but may be of some interest as prognostic factor, since it correlated with the severity of the underlying disease.



## **Capítulo 1**

### **INTRODUÇÃO**



# 1. GENERALIDADES E INTRODUÇÃO CLÍNICA

## 1.1. Epidemiologia e factores de risco

O carcinoma hepatocelular (CHC) é o principal tumor hepático primário, sendo responsável por cerca de 90% dos tumores primitivos do fígado. Mundialmente é o 6º tumor maligno mais frequente, sendo o 5º no homem e o 8º na mulher. É a 3ª causa mais comum de morte por cancro, após o do pulmão e do estômago (IARC, 2011).

Constitui um problema importante de saúde pública, sendo diagnosticados cerca de 750.000 novos casos por ano, a nível mundial (Jemal *et al.* 2011). Existe uma grande assimetria na incidência do CHC, sendo as áreas geográficas mais afectadas o sudeste asiático e a África sub-sahariana, com cerca de 85% dos casos, maioritariamente relacionados com o vírus da hepatite B (VHB). O CHC é a doença maligna mais frequente em várias regiões da África e da Ásia, com pelo menos 300.000 das cerca de 600.000 mortes anuais a ocorrerem na China e a maioria das restantes em países da África sub-sahariana.

Nos países ocidentais (Europa e EUA) tem havido uma incidência crescente, que parece estar relacionada, sobretudo, com a infecção pelo vírus da hepatite C (VHC). Na Europa, com base em estimativas, em 2008 terá havido cerca de 65.000 casos de CHC, com 60.240 casos fatais e nos EUA 21.000, tendo falecido 18.400 doentes. Consequentemente, embora o CHC não esteja entre os 10 tumores mais frequentes, constitui a 7ª causa de morte por cancro. Calcula-se que no ano de 2020 o número de casos atinja os 78.000 e os 27.000, respectivamente na Europa e nos EUA (IARC, 2011).

Nos Estados Unidos a taxa de mortalidade parece ter aumentado cerca de 40% entre 1990-2004, enquanto a maioria dos tumores sofreu um declínio de aproximadamente 18% nesse mesmo período de tempo (Jemal A *et al.*, 2008). Além da emergência da doença associada à hepatite C, este aumento pode ser também devido a um acréscimo do CHC relacionado com o VHB, particularmente em emigrantes provenientes de áreas endémicas.

No Japão, país onde o impacto do VHC foi primeiramente observado após a 2ª guerra mundial, tem havido recentemente um aparente declínio deste tipo de tumor, pela primeira vez desde 1990 (Tanaka H *et al.*, 2008).

Na Europa a incidência e as taxas de mortalidade são muito heterogéneas. A mortalidade por CHC aumentou, nas últimas décadas, na maioria dos países (Áustria, Dinamarca, Alemanha, Grécia, Irlanda, Portugal, Noruega, Espanha, Suíça e Reino Unido), mas diminuiu noutros (Finlândia, França, Itália, Holanda e Suécia) (Bosetti C *et al.*, 2008).

Segundo os dados mais recentes da GLOBOCAN (2008) a incidência em Portugal é de 3,5/100.000 nos homens e de 1,2/100.000 nas mulheres. No nosso país, entre 1993 e 2005, os internamentos por CHC praticamente triplicaram e, de 1990 para 2004, o número de mortes quase duplicou, mais acentuadamente no sexo masculino (2,2x) do que no feminino (1,2x) (Marinho RT *et al.*, 2007). As razões para estes factos não estão bem esclarecidas, mas várias hipóteses se podem colocar, nomeadamente a maior acuidade diagnóstica (com destaque para os métodos de imagem) e o aumento do número de doentes em risco, quer pelo maior número de cirróticos (com realce para o papel recente do VHC), quer pelo aumento da sobrevivência dos doentes, devido ao progresso da terapêutica.

A incidência de CHC aumenta progressivamente com o avanço da idade em todas as populações, atingindo um pico por volta dos 70 anos (El-Serag HB, Mason AC, 1999). Nos chineses e nos negros africanos a idade média de aparecimento do tumor é significativamente mais baixa, o que contrasta com o que acontece no Japão, onde a maior incidência ocorre em homens entre os 70-79 anos (Tanaka H *et al.*, 2008).

Existe um franco predomínio deste tumor no sexo masculino com uma relação homem/mulher de aproximadamente 2,4 (IARC, 2011).

Estão identificados vários factores de risco para CHC (Quadro 1.1).

**Quadro 1.1** – Principais factores de risco para CHC.

<b>Viroses</b>
. Hepatite B crónica
. Hepatite C crónica
<b>Factores ambientais/toxinas</b>
. Aflatoxina
. Álcool
. Tabaco
. Hormonas sexuais
. Pesticidas
<b>Doenças metabólicas</b>
. Diabetes/insulino-resistência
. Esteato-hepatite não alcoólica
. Hemocromatose
. Deficit de $\alpha$ 1-antitripsina
. Tirosinemia.hereditária
. Doença de armazenamento do glicogénio
. Citrulinemia
. Porfíria cutânea tarda
<b>Doenças auto-ímmunes</b>
. Cirrose biliar primária
. Hepatite autoimune

Setenta a 90% por cento dos casos de CHC nos países ocidentais surgem em cirrose (El-Serag HB, Rudolph KL, 2007), sendo esta uma situação pré-cancerígena e constituindo o factor de risco mais importante, independentemente da sua etiologia. Todas as formas de cirrose, nomeadamente por VHC, VHB, álcool, doenças metabólicas hereditárias, esteato-hepatite não alcoólica, se podem complicar com aparecimento de CHC, embora o risco seja maior nos doentes com hepatites virais. Globalmente,

cerca de 1/3 dos doentes com cirrose vão desenvolver CHC ao longo da sua vida (Sangiovanni A *et al.*, 2006).

O VHB afecta cerca de 400 milhões de pessoas, a sua maioria residentes na Ásia e em África, onde é responsável por 60% dos casos de CHC (Parkin DM *et al.*, 2002). A nível mundial estima-se que cerca de 54 % dos CHC sejam devidos ao VHB (IARC, 2008).

Sendo o VHB oncogénico, os portadores crónicos deste vírus têm um risco pelo menos 100 vezes maior de sofrer de CHC, relativamente a pessoas não infectadas, aumentando a probabilidade de desenvolver CHC com a gravidade da doença hepática. Quando já existe cirrose, o risco aumenta para cerca de 1000 vezes, oscilando a taxa de incidência anual entre 1% e 15 %, consoante os estudos (Teufel A *et al.*, 2009). Vários trabalhos têm identificado factores relacionados com o VHB como preditores de desenvolvimento de CHC (Lok AS, 2004), nomeadamente seropositividade para o AgHBe (Yang HI *et al.*, 2002), viremia elevada (Chen CJ *et al.*, 2006) e genotipo C (Yu MW *et al.*, 2005).

A aflatoxina B1, uma micotoxina existente em sementes e especiarias (arroz, milho, trigo, amendoim, amêndoas, sementes de girassol, pimenta, etc) contaminadas com os fungos *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus* foi classificada como carcinogénio do grupo 1 pela IARC em 1987 (IARC, 1987). Os seres humanos são expostos ao seu efeito através da ingestão de alimentos contaminados, sobretudo nas regiões tropicais e subtropicais, nomeadamente na África sub-sahariana, sudeste asiático e China (IARC, 2008). Estudos epidemiológicos mostram uma forte correlação entre a ingestão de aflatoxina B1 e a incidência de CHC, sobretudo em indivíduos infectados com o VHB (Yeh FS *et al.*, 1989; Qian GS *et al.*, 1994; Ming L *et al.*, 2002; Yu MC e Yuan JM, 2004).

Segundo a Organização Mundial de Saúde cerca de 3% da população mundial foi infectada pelo VHC e 170 milhões são portadores crónicos do vírus, existindo grandes variações na sua distribuição geográfica, com áreas de elevada prevalência, nomeadamente em países de leste, região mediterrânica, América latina e em certas regiões de África e Europa Ocidental. Ao contrário de outros países asiáticos, o Japão tem uma elevada percentagem de CHC associado ao VHC.

O VHC é uma causa importante de CHC em áreas de baixa prevalência de VHB. Mundialmente, calcula-se que cerca de 31% dos CHC atribuídos a hepatites crónicas sejam devidos ao VHC (IARC, 2008).

Cerca de 70% a 80% das pessoas infectadas com o VHC progridem para infecção crónica e esta aumenta o risco de desenvolvimento de carcinoma hepatocelular pelo menos 20 vezes, em comparação com pessoas não infectadas. A incidência de CHC na população com infecção por VHC varia com a existência de co-factores, tais como cirrose, valor de AFP, contagem de plaquetas (Fattovich G, Lovet JM, 2006). Na presença de cirrose a incidência de CHC é de 3-5% ao ano (WHO, 2002). Em doentes infectados com VHC existem ainda outros factores associados a maior probabilidade de desenvolvimento de CHC, nomeadamente o sexo masculino, a idade avançada, a associação ao álcool, que pode aumentar 2 a 4 vezes a incidência (Fattovich G, Lovet JM, 2006) e ainda o genotipo 1b, com um risco duplo de desenvolver CHC, relativamente aos outros genótipos (Raimondi S *et al.*, 2009).

O mecanismo pelo qual o VHC causa CHC permanece obscuro. Sabe-se que, contrariamente ao VHB, não integra o genoma do hospedeiro e não parece codificar nenhuma proteína transformadora. A persistência da inflamação e regeneração hepatocitária, no contexto da hepatite crónica e subsequente progressão para cirrose, poderão conduzir a lesão cromossómica e, possivelmente, dar início ao processo de carcinogénese (Gomaa Al *et al.*, 2008).

Estudos epidemiológicos mostram que a co-infecção VHB e VHC conferem um aumento do risco de CHC, relativamente à mono-infecção B ou C (Chiaramonte *et al.*, 1999). Uma meta-análise mostrou que a co-infecção com VHB e VHC se associava a um *odds ratio* para o desenvolvimento de CHC de 136, comparado com 20,4 e 23,6 para a infecção B ou C isoladamente (Donato *et al.*, 1998).

No entanto, estudos prospectivos não apoiam estes dados. Com o objectivo de quantificar o risco de CHC em infectados com VHB e/ou VHC foram recrutados 39.109 indivíduos com VHB, 75.834 com VHC e 264 com VHB e VHC, seguidos desde 1990 a 2002; observaram-se incidências similares de CHC nos diversos grupos (Amin J *et al.*, 2006). Resultados semelhantes foram obtidos num estudo prospectivo em Taiwan

(Sun CA *et al.*, 2003). A superinfecção pelo VHD pode levar ao desenvolvimento mais precoce do tumor, de forma semelhante ao que sucede nos doentes co-infectados com VIH e VHC (Marcellin P *et al.*, 2008).

Outros factores de risco incluem toxinas ambientais e doenças metabólicas ou auto-imunes (Quadro 1.1).

Nos últimos 30 anos, a associação entre tabaco e risco de CHC tem sido amplamente estudada. Dos mais de 40 estudos realizados entre 1983 e 2002, o número daqueles que relataram resultados positivos foi praticamente igual ao dos que não mostraram qualquer associação (Schottenfeld D *et al.*, 2006). Embora tenha sido referida em 2004 uma relação causal (IARC, 2004), o "US Office of the Surgeon General" concluiu, no mesmo ano, que a evidência é sugestiva mas não suficiente (US Department of Health and Human Services, 2004). No sentido de clarificar esta situação foram efectuados estudos caso-controlo e de coorte e ainda várias revisões sistemáticas da literatura, com base neles.

Gandini *et al.* reviram 254 estudos epidemiológicos realizados entre 1961 e 2003 e reportaram um risco relativo (RR) de 1,56 (IC 95%: 1,29-1,87) para fumadores actuais *versus* não fumadores e um RR de 1,49 (IC 95%: 1,06-2,10) para ex-fumadores *versus* não fumadores (Gandini S *et al.*, 2008). Uma outra meta-análise, feita por Lee *et al.*, obteve um RR de 1,51 (IC 95%: 1,37-1,67) e de 1,12 (IC 95%: 0,78-1,60) respectivamente, para grupos idênticos. O aumento do risco nos fumadores actuais foi consistente quando estratificado por região, tamanho da amostra, desenho do estudo e período de publicação, sendo ainda observada uma relação dose-resposta positiva (Lee YC *et al.*, 2009).

Também foram relatadas interacções sinérgicas entre o tabaco e outros factores de risco, nomeadamente VHB, VHC, álcool, obesidade e diabetes (Mori M *et al.*, 2000; Yuan JM *et al.*, 2004; Marrero JA *et al.*, 2005; Hassan MM *et al.*, 2008).

Em suma, o tabaco parece correlacionar-se positivamente com o CHC em sub-grupos específicos, nomeadamente em cirróticos e doentes com infecção crónica por VHB ou VHC. No entanto, o efeito do tabagismo parece ser diminuto, limitando-se a um sub-

grupo da população e confundindo-se com o efeito do álcool, devido a uma frequente sobreposição da exposição a estes dois agentes.

Sabe-se que a ingestão de álcool está relacionada com aumento da incidência e mortalidade por CHC desde que foram realizados vários estudos em meados dos anos oitenta. Nanji *et al.* investigaram a relação entre consumo de álcool e mortalidade em dezoito países diferentes e encontraram um coeficiente de correlação de 0,4 (Nanji AA *et al.*, 1985). O consumo de álcool foi também considerado um factor de risco major no aumento da taxa de mortalidade por CHC, em homens japoneses, a partir de 1970 (Makimoto K *et al.*, 1999).

Em áreas de baixa prevalência de infecção por VHB e VHC o álcool é um factor de risco importante para CHC, tendo sido definida a existência de uma relação causal, pela IARC, desde 1988 (IARC, 1988). Nas regiões de elevada incidência de vírus, o álcool pode exacerbar a lesão hepática e promover o desenvolvimento tumoral.

O álcool pode promover a hepatocarcinogénese de três formas: através da indução de cirrose, como carcinogénio e actuando de forma sinérgica com outros factores de risco.

O consumo alcoólico é uma causa frequente de cirrose e nos países ocidentais pode contribuir para 15% a 45% dos casos de CHC. Três estudos populacionais feitos na Suécia mostraram que a taxa de *incidência standard* era de 3,1 para doentes alcoólicos, 35,1 para doentes com cirrose, e 34,3 para ambos os diagnósticos (Adami HO *et al.*, 1992). Nos EUA, o abuso de álcool é 5 vezes mais prevalente que a infecção pelo VHC, sendo responsável por mais casos de CHC. Os *population attributable risks* (PARs) para CHC nos EUA eram 16% para o VHB, 22% para o VHC, e 32% para o álcool. Na Itália, as proporções eram 22%, 36% e 46%, respectivamente (Morgan TR *et al.*, 2004). Na área Mediterrânica os PARs eram 28,8% para o álcool, 21,6% para VHC, e 16,2% para álcool e VHC simultaneamente (Donato F *et al.*, 2006).

Estudos caso-controllo mostraram que a ingestão crónica excessiva de etanol está associada a um aumento de 2 vezes o *odds ratio* para CHC, variando o risco com a

quantidade ingerida e, nalguns estudos, continuando elevado vários anos após manutenção de abstinência (Morgan TR *et al.*, 2004).

Da mesma forma, estudos longitudinais mostraram que o consumo crónico de álcool aumenta o risco de CHC. Um estudo de coorte com 11.837 homens residentes em Taiwan mostrou um risco moderado (RR de 1,46) entre o consumo de álcool e o CHC (Wang LY *et al.*, 2003). Foi também observada uma relação dose/resposta em vários estudos, sumariada numa meta-análise que revelou que o RR para CHC foi de 1,19 (95% IC: 1,12-1,27), 1,40 (95% IC:1,25-1,56), e 1,81 (95% IC:1,50-2,19), respectivamente, para ingestão de 25, 50, e 100 g de álcool por dia (Corrao G *et al.*, 2004). No entanto, alguns estudos mostram que pode haver um limiar para o efeito do álcool sobre o CHC. Um estudo caso-controlo feito por Yuan *et al.* nos EUA demonstrou que, em comparação com os indivíduos que nunca consumiram álcool, aqueles que ingeriram menos de 2 bebidas por dia tinham uma redução de aproximadamente 40% no risco de CHC, enquanto os que beberam mais de 4 por dia tiveram um aumento de 3 vezes no risco de CHC, após o ajuste para possíveis fatores de confusão (Yuan JM *et al.*, 2004). Um estudo caso-controlo, de base hospitalar, feito em Brescia (Itália), observou um aumento mantido do risco de CHC para um consumo de álcool de mais de 60 g/dia para homens e mulheres (Donato F *et al.*, 2002).

Assim, o uso prolongado e excessivo de álcool (sobretudo a ingestão diária igual ou superior a 40 a 60 g por dia) é um factor de risco de CHC muito importante, existindo um efeito sinérgico quando em combinação com o VHC e, de forma menos marcada, com a infecção por VHB (Donato F *et al.*, 2002) e também com diabetes, obesidade e tabaco (Wang LY *et al.*, 2003; Yuan JM *et al.*, 2004; Singal AK *et al.*, 2007; Chuang SC *et al.*, 2009). Como o consumo de álcool continua a aumentar em várias partes do mundo (Morgan TR *et al.*, 2004) o CHC devido a esta causa pode tornar-se um problema ainda mais grave nessas áreas.

Doentes com hemocromatose hereditária têm também um aumento do risco de desenvolver CHC, que em alguns estudos foi reportado como sendo de 200 vezes (Niedermaier C *et al.*, 1985; Kowdley KV *et al.*, 2004). Num estudo de base populacional

dos EUA esse risco foi de 24 (Yang Q *et al.*, 1998) e noutra, realizado na Suécia, a taxa de incidência padronizada foi de 1,7 (IC 95%: 1.5-2.0) (Elmberg M *et al.*, 2003).

Habitualmente o excesso de ferro evolui para CHC através da cirrose, mas existe evidência de que o tumor possa ocorrer de forma independente (Blumberg RS *et al.*, 1988). Além disso, a sobrecarga de ferro pode interagir com o VHB, o VHC, o álcool e muitos outros fatores de risco conhecidos e agir como um co-fator na fisiopatologia do CHC (Kew MC *et al.*, 2009).

O fígado gordo não alcoólico também foi claramente identificado como um factor de risco. É uma patologia existente em pelo menos 20% da população, nos países desenvolvidos, e está relacionada com a obesidade, resistência à insulina e síndrome metabólica. Em algumas pessoas a esteatose hepática causa alterações necro-inflamatórias (esteato-hepatite não alcoólica) que podem posteriormente progredir para fibrose e cirrose e, eventualmente para CHC. A esteato-hepatite não alcoólica afecta 2 a 3% da população adulta e 20% deste sub-grupo pode desenvolver cirrose.

Em estudos populacionais realizados nos Estados Unidos, Escandinávia, Taiwan e Japão o CHC ocorreu 1,5 a 2 vezes mais em obesos que em não obesos (Calle EE *et al.*, 2003; Moller H *et al.*, 1994; Wolk A *et al.*, 2001). Nos Estados Unidos foram reportadas taxas de mortalidade por CHC cinco vezes maiores em homens com índices de massa corporal (IMC) muito elevados (35-40 kg/m<sup>2</sup>) *versus* homens com IMC normal (El-Serag HB, Rudolph KL, 2007). Em diabéticos tipo 2, alguns estudos caso-controlo e estudos de coorte apontam também para uma probabilidade dupla de desenvolvimento de CHC, relativamente a indivíduos sem diabetes (El-Serag HB *et al.* 2004; El-Serag HB *et al.* 2006). A doença gorda não alcoólica que existe em cerca de 90% dos obesos e em até 70% dos diabéticos tipo 2 tem sido proposta como possível factor de risco para CHC nestes doentes (Neuschwander-Tetri BA, Caldwell SH, 2003).

Nos países europeus a infecção crónica pelo VHC (60-70%), a cirrose hepática alcoólica (cerca de 20% dos casos) e a infecção pelo VHB (10-15%), constituem os principais factores de risco (Llovet JM, Burroughs A, Bruix J, 2003).

No nosso país, os escassos dados existentes mostram que a maioria dos doentes com CHC tem cirrose alcoólica (cerca de 2/3 dos casos) e/ou associada ao VHC.

## **1.2. Prevenção**

A prevenção primária do CHC que surge no contexto da infecção por VHB consegue-se com a vacinação universal contra a hepatite B, como foi claramente documentado em Taiwan, onde os programas de vacinação se iniciaram em 1984 (Chang MH *et al.* 2009). Actualmente a OMS recomenda a vacinação de todos os recém-nascidos (WHO, 2009). Como a transmissão peri-natal e pós-natal precoce é, globalmente, uma causa importante de infecção crónica pelo VHB, preconiza-se que a primeira dose da vacina seja dada o mais cedo possível após o nascimento, mesmo em áreas de baixa endemicidade. A vacinação está também recomendada em jovens adolescentes e pessoas com factores de risco para aquisição de infecção por VHB (trabalhadores da saúde, viajantes para áreas onde a infecção é endémica, utilizadores de drogas injectáveis e pessoas com múltiplos parceiros).

O tratamento antiviral das hepatites crónicas B e C deve ser efectuado de acordo com as recomendações existentes. No caso da hepatite B os dados disponíveis apontam para um efeito positivo do tratamento eficaz na diminuição da incidência do CHC, embora o risco não seja eliminado, mantendo-se portanto a indicação de fazer rastreio seriado, mesmo quando existem respostas virológicas mantidas (Liaw YF *et al.*, 2004; Sung JJ *et al.*, 2008).

Relativamente aos doentes com cirrose por VHC existe evidência, quer em doentes caucasianos, quer em asiáticos, de que a terapêutica bem sucedida (com resposta viral mantida) reduz drasticamente a taxa de incidência de CHC. Existe ainda assim uma pequena percentagem de doentes cirróticos onde este ocorre, que são, segundo um estudo francês, aqueles em que não existe regressão da cirrose, apesar de haver resposta viral mantida (Singal AK *et al.*, 2010; Di Bisceglie AM *et al.*, 2008). Por isso, a vigilância dos cirróticos deve continuar, mesmo após a cura da infecção.

Ainda no campo da prevenção primária, é fundamental que sejam implementadas medidas governamentais visando actuar nos outros factores de risco, que em alguns países, no qual Portugal se inclui, têm um contributo muito importante no aparecimento do CHC. Assim, deverá existir legislação adequada sobre o consumo de bebidas alcoólicas, acções de esclarecimento das populações e promoção de estilos de vida saudável, evitando a obesidade, consumo de álcool e tabaco, prevenindo e tratando adequadamente situações metabólicas, nomeadamente a diabetes mellitus.

#### **Quadro 1.2 - Prevenção do CHC.**

- Vacinação contra a hepatite B (recém-nascidos e grupos de risco)
- Implementação de medidas de prevenção da transmissão dos VHB e VHC, da obesidade e abuso do álcool e controlo adequado de situações metabólicas, nomeadamente diabetes mellitus
- Tratamento das hepatites B e C, prevenindo a evolução para cirrose
- Quando já existe cirrose, os benefícios da terapêutica anti-viral no aparecimento do CHC, não estão robustamente demonstrados

Adaptado de: EASL-EORTC Clinical Practice Guidelines: Management of HCC. J Hepatol 2012; 56: 908-943.

### **1.3. Vigilância**

O mau prognóstico do CHC, sobretudo quando diagnosticado na fase sintomática (0 a 10% de sobrevivência aos 5 anos) e o facto da maioria dos casos ocorrer em indivíduos com factores de risco, leva a que se recomende o rastreio seriado (vigilância) para detecção precoce deste tumor.

O objectivo da vigilância é o diagnóstico precoce do CHC, isto é, antes de se ultrapassarem as dimensões que permitem terapêuticas com intenção curativa (transplantação hepática, ressecção cirúrgica, ou destruição percutânea), de acordo

com os critérios de Milão (um nódulo com menos de 5 cm, ou até 3 nódulos com diâmetro até 3 cm), mas desejavelmente em estádios ainda mais precoces.

Existe um único estudo randomizado, efectuado em 18.816 doentes chineses com evidência de infecção actual ou passada pelo VHB, que comparou a vigilância (com determinação de AFP e realização de ecografia abdominal, semestralmente) com a não vigilância, tendo havido benefício claro da primeira, com uma redução da mortalidade de 37%, apesar de existir uma baixa adesão (<60%) à vigilância (Zhang BH *et al.*, 2004). Outros estudos não randomizados e alguns observacionais evidenciaram benefício da vigilância na sobrevivência dos doentes, nos casos em que foram identificados tumores pequenos e iniciais (Trevisani F *et al.*, 2002; Sherman M, 2007).

Apesar das recomendações existentes para rastreio seriado, a maioria (60 a 75%) dos doentes com CHC apresenta doença avançada/irressecável aquando do diagnóstico, quer nos Estados Unidos da América, quer em vários países Europeus (Llovet JM, 2005). Assim, é muito importante que sejam efectivamente implementados programas de rastreio seriado, cujo cumprimento rigoroso poderá melhorar o prognóstico tão sombrio deste tumor.

O doseamento da alfa-fetoproteína sérica (AFP) e a ecografia abdominal têm sido os principais exames propostos para a vigilância do CHC. Tendo por base a estimativa do tempo de duplicação do tumor, o intervalo recomendado é de seis meses, ainda que intervalos de um ano possam ser igualmente eficazes (Santagostino E *et al.*, 2003; Sangiovanni A *et al.*, 2004).

O desempenho da ecografia depende de vários factores, como a experiência do executante, a tecnologia utilizada, o hábito corporal, a presença de cirrose e as dimensões do tumor. Estudos existentes apontam para uma sensibilidade superior a 60% e especificidade superior a 90% (Bolondi L, 2003; Kim CK *et al.*, 2001), embora a cirrose dificulte a caracterização dos nódulos hepáticos (Colombo M, 2007). Para o sucesso dos programas de vigilância é necessário que a ecografia seja realizada nas melhores condições técnicas (Quadro 1.3).

**Quadro 1.3** - Desempenho da ecografia na vigilância do CHC.

Ecografia abdominal	População alvo	
	Portadores do VHB (%)	Cirrose (%)
Sensibilidade	79	58
Especificidade	94	94
Valor predictivo positivo	15	69
Valor predictivo negativo	98	91

Adaptado de: Colombo M. Hepatology Research 2007. 37: S146-51.

A sensibilidade e a especificidade da AFP não são ideais para o rastreio do CHC. Para valores de 20 ng/ml (habitual limite superior do normal) a sensibilidade é baixa (25% a 65%), diminuindo para 22% se o *cut-off* for de 200 ng/ml. Diminuindo o *cut-off* aumentar-se-ia a hipótese de diagnosticar o CHC, mas à custa de uma alta taxa de falsos positivos (por exemplo, doentes com patologia crónica não maligna do fígado podem ter elevação da AFP, principalmente aqueles que têm um elevado grau de regeneração hepatocitária) (Trevisani F *et al.*, 2001). Actualmente a determinação isolada da AFP é considerada inadequada como teste de rastreio e em associação à ecografia abdominal não é consensual.

Segundo as recomendações da EASL-EORTC está apenas indicada a realização de ecografia abdominal, com uma periodicidade de 6 meses. A combinação com a AFP não é aconselhada, pois o ganho de 6-8% na taxa de detecção não contrabalança o aumento dos falsos-positivos, levando ainda a um incremento de cerca de 80% no custo de cada pequeno CHC diagnosticado (EASL-EORTC Clinical Practice Guidelines, 2012).

A decisão de introduzir um indivíduo em programa de vigilância é baseada no risco que este apresenta para desenvolver CHC, que por seu lado está relacionado com a incidência do tumor, não existindo dados experimentais que indiquem o nível de risco ou a incidência de CHC que impliquem a necessidade de rastreio. Existem alguns modelos de análise de decisão de custo-eficácia e com base neles considera-se que para doentes com cirrose de várias etiologias o rastreio seriado deve ser efectuado quando o risco de CHC é de, pelo menos, 1,5% ao ano (Sarasin FP *et al.*, 1996). No Quadro 1.4 estão descritos os grupos de doentes cujo risco é superior a este valor e para os quais é recomendada vigilância.

**Quadro 1.4** - Doentes com indicação para vigilância de CHC.

1. Doentes com cirrose, estágio A e B de Child-Pugh
2. Doentes com cirrose, estágio C de Child-Pugh a aguardar transplante hepático
3. Portadores crónicos do VHB sem cirrose, com hepatite activa ou história familiar de CHC
4. Hepatite crónica C sem cirrose, mas com fibrose hepática avançada (F3)

Adaptado de EASL-EORTC Clinical Practice Guidelines: Management of hepatocellular carcinoma. *Journal of Hepatology* 2012; 56:908-943

## 1.4. Diagnóstico

Os programas de rastreio têm, apesar de tudo, conduzido a um aumento de detecção de lesões nodulares de pequenas dimensões, sendo o diagnóstico precoce do CHC feito actualmente em cerca de 30% a 60% dos casos, nos países desenvolvidos.

Os nódulos pequenos constituem um desafio diagnóstico, pois são difíceis de caracterizar, quer imagiológica, quer histopatologicamente. A distinção entre nódulos displásicos e CHC inicial é, no entanto, de primordial importância por ter implicações na conduta a adoptar: enquanto as lesões displásicas devem ser vigiadas através de

estudos imagiológicos regulares (pois cerca de 1/3 vão transformar-se em tumores), o CHC em fase inicial deve ser submetido a terapêuticas potencialmente curativas.

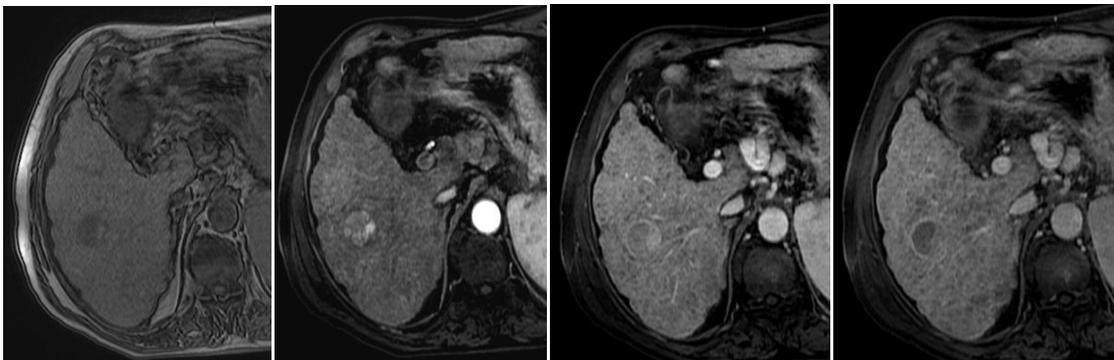
#### 1.4.1. Métodos radiológicos

As recomendações existentes para a estratégia de diagnóstico de uma lesão nodular hepática, detectada em ecografia abdominal de rastreio, em fígado cirrótico, contemplam a hipótese de em determinadas condições se poder prescindir do critério histopatológico, sendo o diagnóstico feito com base no comportamento dinâmico típico do tumor nos métodos de imagem (TC espiral e/ou RM, com contraste) que devem, obviamente, ser efectuados com equipamento adequado e por radiologistas experientes. Este padrão típico (lesão hipervascular em fase arterial e rápido *wash out* em fase venosa/tardia) (Figura 1.1 e 1.2) tem uma elevada especificidade para nódulos entre 0,5 e 2 cm, mas uma sensibilidade baixa.

Com efeito, dois estudos prospectivos mostraram que a utilização de 2 técnicas de imagem é uma abordagem com elevado valor preditivo positivo e elevada especificidade (Bruix J, Sherman M, 2005; Forner A *et al.*, 2008). Um estudo com 89 casos consecutivos de nódulos entre 0,5 e 2 cm, detectados em programa de vigilância, em doentes cirróticos, mostrou que os critérios não invasivos têm uma especificidade de 100% na detecção de CHC (Forner A *et al.*, 2008). No entanto a sensibilidade é de apenas 30%, o que significa que 2/3 dos casos necessitam de confirmação anátomo-patológica. O outro estudo sugere que a utilização de um algoritmo sequencial, permite manter a especificidade, mas aumentar a sensibilidade, diminuindo a realização de biopsias em nódulos entre 1 e 2 cm (Bruix J, Sherman M, 2005) (Figura 1.3).



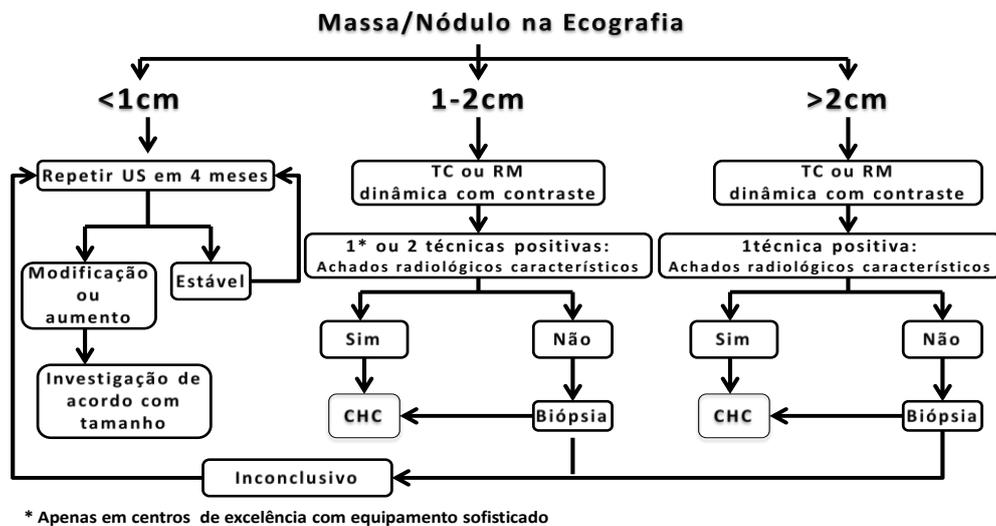
**Figura 1.1** - TC Abdominal: nódulo hepático com comportamento típico de CHC. Antes do contraste, fase arterial (*wash in*), fase portal e fase tardia (*wash out*).



**Figura 1.2** – RM de CHC típico: nódulo discretamente hipointenso em T1, com captação intensa e homogénea do contraste em fase arterial (*wash in*) e lesão hipointensa na fase portal (*wash out*).

Um estudo retrospectivo avaliou a acuidade diagnóstica da RM numa casuística com um elevado número de doentes transplantados e mostrou uma taxa de falsos positivos superior a 10%, quando se utilizava apenas uma técnica de diagnóstico (Yu NC *et al.*, 2011). Por fim, um estudo prospectivo recente testou a acuidade das técnicas de imagem em nódulos entre 1 e 2 cm e mostrou um número de falsos positivos (a maioria devidos a nódulos displásicos de alto grau) superior a 10%, com uma ou duas técnicas de imagem, com especificidades de, respectivamente, 81% e 85% (Sersté T *et al.*, 2011).

O diagnóstico não invasivo de lesões entre 1 e 2 cm permanece um desafio, sem dados inequívocos validados em estudos prospectivos. Assim, recomenda-se a utilização de um ou dois métodos radiológicos, consoante o grau de excelência do centro e a sofisticação do material existente localmente, sendo necessários mais estudos prospectivos que validem e suportem este tipo de recomendação (EASL-EORTC Clinical Practice Guidelines, 2012).



**Figura 1.3** - Algoritmo de diagnóstico do CHC em cirrose.

Adaptado de EASL-EORTC Clinical Practice Guidelines: Management of HCC. J Hepatol 2012; 56: 908-943.

Relativamente às técnicas de imagem que devem ser utilizadas e partindo do pressuposto que o aspecto típico do CHC se baseia na *performance* vascular dinâmica do tumor, fica prejudicada a utilização da ecografia com contraste, porque as microbolhas utilizadas estão confinadas ao espaço intra-vascular, enquanto o contraste utilizado quer na CT (iodado), quer na RM (gadolinium) passam rapidamente do sangue para o espaço extra-vascular. Um estudo recente mostrou que outras lesões, que não o CHC, nomeadamente o colangiocarcinoma, mostram uma captação homogénea do contraste ecográfico, seguido de lavagem (o padrão vascular assumido como representando a imagem de marca do CHC) (Rimola J *et al.*, 2011). Assim, a TC ou a RM são os únicos métodos recomendados para o diagnóstico não invasivo do CHC

(Lencioni R *et al.*, 2005). Ainda não existem dados seguros que permitam aconselhar o uso de CT ou RM com contrastes hepato-específicos como alternativa.

É importante salientar que o padrão radiológico típico do CHC é pouco frequente em tumores pequenos (1-2 cm) e portanto são necessários biopsias ou bio-marcadores tissulares na maioria dos casos (Bolondi L *et al.*, 2005). Protelar o diagnóstico para além dos 2 cm conduz a um aumento dos níveis de falência terapêutica e de recorrência, pois, como é sabido, o aparecimento de satélites e a invasão vascular crescem exponencialmente a partir deste tamanho (Roskams T, 2011). Por isso, é crucial que existam ferramentas credíveis que permitam o diagnóstico final antes do tumor ter 2 cm.

#### 1.4.2. Histopatologia

O estudo histopatológico está indicado nos nódulos que surgem em fígado não cirrótico ou, nos cirróticos quando o diagnóstico não é possível com base em critérios não invasivos, devido a uma aparência radiológica inespecífica. Caso a biopsia seja inconclusiva, recomenda-se uma vigilância mais apertada, realizada cada 4 meses, devendo considerar-se uma segunda biopsia em caso de crescimento ou mudança no padrão de realce. Após detecção de um nódulo suspeito está recomendada a avaliação do doente num centro de referência onde existam recursos adequados, técnicos e humanos.

O risco de sementeira do tumor após biopsia hepática é de cerca de 2,7%, com um intervalo médio entre a biopsia e a sementeira de aproximadamente 17 meses (Silva MA *et al.*, 2008).

A sensibilidade da biopsia depende da localização e dimensões da lesão e da experiência do operador, oscilando entre 70% e 90%, devendo salientar-se que o diagnóstico histopatológico é particularmente difícil precisamente em nódulos com dimensões entre 1 e 2 cm (Roskams T, Kojiro M, 2010).

O critério morfológico, isoladamente, coloca problemas de diagnóstico diferencial entre nódulos displásicos de alto grau e CHC inicial, porque a invasão do estroma (a imagem de marca anátomo-patológica) pode não estar presente ou ser difícil de identificar no material de biópsia (Roskams T, Kojiro M, 2010). Num estudo prospectivo, a primeira biópsia apenas foi positiva em 60% dos casos em tumores com menos de 2cm (Forner A *et al.*, 2008). Assim, uma biópsia positiva é clinicamente útil para afirmar o diagnóstico de CHC, mas uma biópsia negativa não exclui malignidade.

Recentemente têm sido utilizadas várias tecnologias (*DNA microarray* de todo o genoma, qRT-PCR, estudos proteômicos e de *immunostaining*), numa tentativa de identificar marcadores de diagnóstico precoce do carcinoma hepatocelular. No entanto, poucos trabalhos incluíram uma análise minuciosa de vários marcadores, num esquema de treino de validação e um número significativo de amostras. Um estudo realizado em 128 amostras humanas descreveu uma assinatura de 13 genes, capaz de identificar lesões iniciais de CHC, com elevada precisão de diagnóstico (Colombat M *et al.*, 2003).

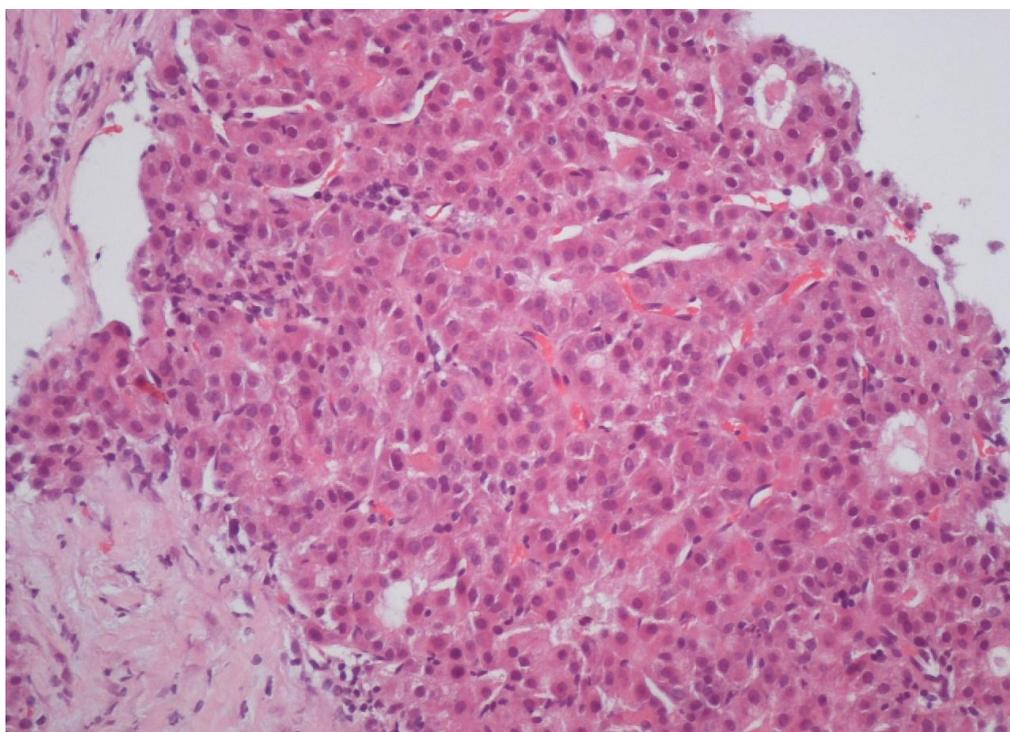
De forma semelhante, uma assinatura de três genes (que codificam GPC3, LYVE1 e survivina) tem sido proposta como sendo uma ferramenta molecular precisa (> 80% de precisão), que permite diferenciar nódulos displásicos de pequenos tumores (<2 cm) (Llovet JM *et al.*, 2006). O desempenho desta assinatura foi validado externamente num conjunto diferente de amostras (Llovet JM *et al.*, 2006; Wurmbach E *et al.*, 2007).

A acuidade diagnóstica de alguns marcadores de CHC inicial, identificados por estudos genómicos, foi avaliada prospectivamente por imuno-histoquímica, uma técnica de baixo custo. Ao examinar o tecido, o patologista pode selecionar uma amostra representativa do tumor sem necrose nem inflamação, e definir o tipo de células pelo padrão específico e expressão de marcadores proteicos.

Um marcador promissor é o GPC3, que apresenta uma sensibilidade de 68-72% e uma especificidade superior a 92% (Capurro M *et al.*, 2003; Di Tommaso L *et al.*, 2007). Combinações de vários marcadores proteicos (HSP70, GPC3, e GS) foram estudadas em 105 nódulos hepatocelulares com resultados aceitáveis, com sensibilidade e especificidade de 72% e 100%, respectivamente (Di Tommaso L *et al.*, 2007) e foram

posteriormente validadas em duas séries maiores (Di Tommaso L *et al.*, 2009; Tremosini S *et al.*, 2011). O *International Consensus Group of Hepatocellular Neoplasia* recomenda que o diagnóstico anátomo-patológico de CHC seja feito quando pelo menos dois desses marcadores forem positivos (ICGHN, 2009).

Podem ser consideradas colorações adicionais para avaliar a neovascularização (CD34) ou a potencial origem em células progenitoras (queratina 19, EpCAM) (Durnez A *et al.*, 2006, Roskams T, Kojiro M, 2010; Roskams T., 2011). A queratina 19 (K19), um marcador de célula progenitora/biliar, num valor de corte de 5% de células tumorais positivas por imuno-histoquímica, correlaciona-se com pior prognóstico (Durnez A *et al.*, 2006, Roskams T, Kojiro M, 2010; Kim *et al.*, 2011). Além disso, a K19 tem a capacidade de reconhecer características biliares em formas mistas de CHC/colangiocarcinoma, que nem sempre são identificadas com a técnica de hematoxilina-eosina (Figura 1.4).



**Figura 1.4** – Biopsia hepática de CHC com padrão pseudoglandular (HE, 200x).

### 1.4.3. Avaliação da extensão

É fundamental avaliar a extensão do tumor para definir o estadiamento e delinear a estratégia de tratamento adequada a cada doente. Vários estudos com correlação anátomo-patológica têm demonstrado que a RM dinâmica com contraste e a CT multidetector de 4-fases são as técnicas de imagem mais eficazes para detectar tumores com dimensões inferiores a 2 cm. No entanto, mesmo com a melhor tecnologia, calcula-se que exista uma subestimação de 25-30% (Burrel M *et al.*, 2003; Colli A *et al.*, 2006).

A detecção de nódulos adicionais e/ou invasão vascular é um aspecto chave para o estadiamento, porque ambas indicam que o tumor está em estágio avançado, descartando a hipótese de terapêuticas potencialmente curativas. A RM é a técnica de escolha para detectar lesões com 1 a 2 cm de tamanho (Burrel M *et al.*, 2003; Colli A *et al.*, 2006). Apesar dos avanços tecnológicos, lesões adicionais de dimensões inferiores a 1 cm representam um problema de diagnóstico, porque a acuidade da RM e da TC, nestes casos é inferior a 50%. (Burrel M *et al.*, 2003). A ecografia com contraste (CEUS) não é capaz de competir com a TC e a RM em termos de precisão na detecção de lesões.

A invasão vascular tumoral apresenta-se geralmente como uma trombose extensa que, em alguns casos, apresenta hipervascularização tumoral. A utilização de técnicas dinâmicas (CEUS, CT, and MR) pode ajudar a identificar vascularização arterial intra-tumoral, e a distingui-la da trombose benigna e do cavernoma da veia porta. Em caso de dúvida, uma biopsia aspirativa com agulha, pode estabelecer a sua natureza maligna (Vilana R *et al.*, 1993).

A disseminação extra-hepática é pouco comum nos estádios iniciais da doença. A realização de TC torácica deve depender de critérios clínicos. As metástases ósseas são geralmente sintomáticas e, em caso de suspeita, deve ser efectuada uma cintigrafia óssea. As metástases cerebrais são raras.

A tomografia de emissão de positrões (PET)–TC, efectuada com 2-[fluorina-18] fluoro-2-desoxi-d-glicose (<sup>18</sup>FDG) combina a análise anatómica efectuada pela TC com a

informação metabólica fornecida pela PET. No entanto, a sensibilidade da PET  $^{18}\text{F}$ FDG no CHC é de apenas 50–55%, especialmente para tumores com menos de 5 cm (Wolfort RM *et al.*, 2010) e tem uma baixa sensibilidade nas metástases ganglionares (Lambrecht M, Haustermans K, 2010). Embora alguns estudos tenham sugerido que a PET com  $^{18}\text{F}$ FDG possa ser utilizada como predictora da ocorrência de recorrência tumoral após transplantação hepática em doentes com CHC (Kornberg A *et al.*, 2009), outros discordam da utilização deste método neste contexto, devido à sua baixa sensibilidade, quer para lesões primárias, quer metastáticas (Buchmann I *et al.*, 2008; Kim YK *et al.*, 2010).

A PET com  $^{18}\text{F}$  Fluorocolina parece ser significativamente mais sensível para a detecção de CHC, sobretudo da variante bem diferenciada (Talbot JN *et al.*, 2010). As recentemente introduzidas PET–TC com  $^{11}\text{C}$ -acetato e  $^{18}\text{F}$ -FDG e a PET–CT com FDG de fase tardia poderão trazer uma sensibilidade adicional para o diagnóstico de CHC e inclusivé avaliar o grau de diferenciação celular do tumor (Lin WY, Tsai SC, Hung GU, 2005; Kuker RA, Mesoloras G, Gulec SA, 2007; He YX, Guo QY, 2008).

De acordo com as recomendações actuais, o estadiamento do CHC antes da transplantação hepática deve incluir TC abdominal dinâmica ou RM, TC do tórax e cintigrafia óssea (EASL-EORTC Clinical Practice Guidelines, 2012).

## **1.5. Classificação e estadiamento**

### **1.5.1. Conceitos genéricos, sistemas de estadiamento e sistema BCLC**

Uma classificação adequada do CHC visa permitir a seleção do tratamento mais adequado para cada doente e estabelecer o prognóstico. Além disso, facilita a partilha de informações entre investigadores e permite o desenho de ensaios clínicos com critérios comparáveis.

Nos doentes com CHC, de forma diferente do que acontece com a maioria dos tumores sólidos, a coexistência frequente de duas situações clínicas graves (o cancro e a cirrose), complica a avaliação prognóstica (Llovet JM, Burroughs A, Bruix J, 2003;

D'Amico G, Garcia-Tsao G, Pagliaro L, 2006). Assim, os sistemas de estadiamento para este tipo de tumor devem ser elaborados com base em dados provenientes de duas fontes: em primeiro lugar, das variáveis de prognóstico obtidas a partir de estudos que descrevam a história natural do CHC e da cirrose; em segundo, das variáveis dependentes de tratamentos, obtidas a partir de estudos baseados em evidências, que forneçam justificação para atribuição de um dado tratamento a doentes numa determinada subclasse.

Com base em dados que relatam a história natural da doença, os principais factores de prognóstico clínico estão relacionados com o tumor (número e tamanho dos nódulos, presença de invasão vascular, proliferação extra-hepática), a função hepática (definida pela classe de Child-Pugh e tendo em conta especialmente a bilirrubinemia, a albuminemia, a hipertensão portal e a ascite) e o estado geral de saúde (definido pela classificação de ECOG e presença de sintomas) (Okuda K *et al.*, 1985; The Cancer of the Liver Italian Program (CLIP) Investigators, 1998; Llovet JM *et al.*, 1999; Villa E *et al.*, 2000; Cabibbo G *et al.*, 2010). A etiologia não tem sido identificada como fator prognóstico independente.

Biomarcadores tecidulares e serológicos que consigam prever o prognóstico têm sido menos explorados em doentes com CHC, embora tenham sido publicadas algumas regras visando a incorporação de marcadores preditivos ou de prognóstico na prática clínica (Simon RM, Paik S, Hayes DF, 2009). De acordo com essas regras, os biomarcadores devem ser obtidos a partir de estudos randomizados, como é o caso do *status* KRAS e resposta ao cetuximab no cancro do cólon. Marcadores preditivos, ou de prognóstico, testados em estudos de coorte apenas em circunstâncias particulares poderão ser adoptados na prática clínica.

Existem recomendações para incorporar biomarcadores na gestão do CHC quando forem cumpridos os seguintes requisitos: (1) demonstrar previsão prognóstica em estudos randomizados devidamente efectuados, ou em treinamento e validação de séries de estudos de coorte, (2) evidenciar valor prognóstico independente na análise multivariada, incluindo variáveis preditivas clínico-patológicas conhecidas e (3) haver confirmação dos resultados utilizando a mesma tecnologia num grupo externo,

efectuada por investigadores independentes. Nenhum dos biomarcadores testados até agora no CHC cumpre estes critérios, embora quatro deles aguardem apenas validação externa.

Quanto aos marcadores séricos, níveis de AFP, VEGF e Ang2 têm demonstrado ter valor prognóstico independente em grandes grupos de tumores avançados não tratados (Llovet JM *et al.*, 2008).

A importância prognóstica de níveis elevados de AFP tem sido pouco relatada em estudos controlados (Llovet JM, Bruix J, 2003), mas foi evidenciada na previsão do risco de *drop out* de doentes em lista para transplante hepático (200 ng/ml, ou aumento superior a 15 ng/ml) (Vibert E *et al.*, 2010; Toso C *et al.*, 2008), na resposta à ablação local (N’Kontchou G *et al.*, 2009) e às terapêuticas loco-regionais (Riaz A *et al.*, 2009) e também em tumores avançados, com valores de *cut off* de 200 ng/ml num estudo (Llovet JM *et al.*, 2008) e de 400 ng/ml noutros (The Cancer of the Liver Italian Program (CLIP) Investigators, 1998; Vora SR *et al.*, 2009). A heterogeneidade dos estudos efectuados impede a formulação de uma recomendação clara, mas é aconselhável que valores superiores a 200 e/ou a 400 ng/ml de AFP sérica sejam considerados como fatores de mau prognóstico.

### 1.5.2. Sistemas de estadiamento

Têm sido propostos vários sistemas de estadiamento para a classificação clínica do CHC. A classificação TNM, o padrão utilizado em oncologia, na sua sétima edição de acordo com a AJCC (Edge SB, Byrd DR, Compton CC, Fritz AG, Greene FL, Trotti A, editors. 2010), foi elaborada a partir da análise de uma série de doentes submetidos a ressecção, mas tem várias limitações (Llovet JM *et al.*, 1998). Em primeiro lugar, as informações patológicas que são necessárias para avaliação da invasão microvascular só estão disponíveis em doentes tratados com cirurgia, que são menos de 20%. Além disso, não incorpora qualquer informação sobre o estado funcional hepático, nem sobre o estado geral do doente. Sistemas unidimensionais, como o estadiamento de

Okuda e a classificação de Child-Pugh, embora de uso bastante difundido, servem propósitos distintos de uma classificação do CHC.

Entre os sistemas de estadiamento mais abrangentes, cinco foram amplamente testados. Três deles são europeus: a classificação francesa (Chevret S *et al.*, 1999), a classificação do Cancer Liver Italian Program (CLIP) (CLIP Investigators, 1998) e o sistema de estadiamento do Barcelona Clinic Liver Cancer (BCLC) (Llovet JM, Brú C, Bruix J, 1999; Llovet JM *et al.*, 2008); dois são asiáticos: o "Chinese University Prognostic Index" (CUPI score) (Leung TW *et al.*, 2002) e o "Japan Integrated Staging"(JIS), aperfeiçoado recentemente, com a inclusão de biomarcadores (AFP, DCP, AFP- L-3), constituindo o bm-JIS (Kitai S *et al.*, 2008).

Os *scores* CUPI e CLIP sub-dividem doentes em estádios avançados, com um pequeno número tratado eficazmente. Globalmente, os sistemas mais utilizados foram externamente validados (BCLC, CUPI, CLIP, e bm- JIS), apenas dois incluem os três tipos de variáveis de prognóstico (BCLC, CUPI) e apenas um atribui alocação de tratamento para subclasses, com prognóstico específico (BCLC).

### 1.5.3. Estadiamento BCLC

As atuais recomendações da EASL e da AASLD utilizam a classificação BCLC. Esta inclui variáveis prognósticas relacionadas com a função hepática, o estado do tumor e a *performance status*, juntamente com variáveis dependentes do tratamento, obtidas a partir de estudos de coorte e de ensaios clínicos randomizados. Tem sido validada externamente em diferentes contextos clínicos e é um sistema em evolução que liga a fase do tumor com a estratégia de tratamento, de uma forma dinâmica, permitindo a incorporação de novos avanços no prognóstico ou na gestão do CHC.

Assim, a classificação inicial de 1999 (Llovet JM *et al.* 1999) foi actualizada com a incorporação da fase 0 (CHC muito inicial) e com a quimioembolização como tratamento adequado do CHC em estágio intermédio, em 2003 (Llovet JM, Burroughs A, Bruix J, 2003), posteriormente modificada em 2008 (Llovet JM *et al.*, 2008) para

incorporar o sorafenib, como opção de tratamento de primeira linha em tumores avançados. São esperadas alterações nos próximos anos, nomeadamente para incorporar biomarcadores ou alocação de tratamentos, resultantes de ensaios clínicos positivos.

A classificação BCLC divide os doentes com carcinoma hepatocelular em 5 estádios (0, A, B, C e D) de acordo com as variáveis de prognóstico pré-estabelecidas e aloca as terapêuticas aos diferentes estádios do doente (Figura 1.5), fornecendo também informações sobre o prognóstico.

O prognóstico é definido por variáveis relacionadas com o tumor (tamanho, número de lesões, invasão vascular, N1, M1), a função hepática (classe de Child-Pugh) e o estado de saúde (ECOG). A alocação ao tratamento incorpora variáveis que têm influência no tratamento a instituir, porque se verificou estarem associadas aos resultados terapêuticos, como a bilirrubinemia, a hipertensão portal ou a presença de sintomas ECOG.

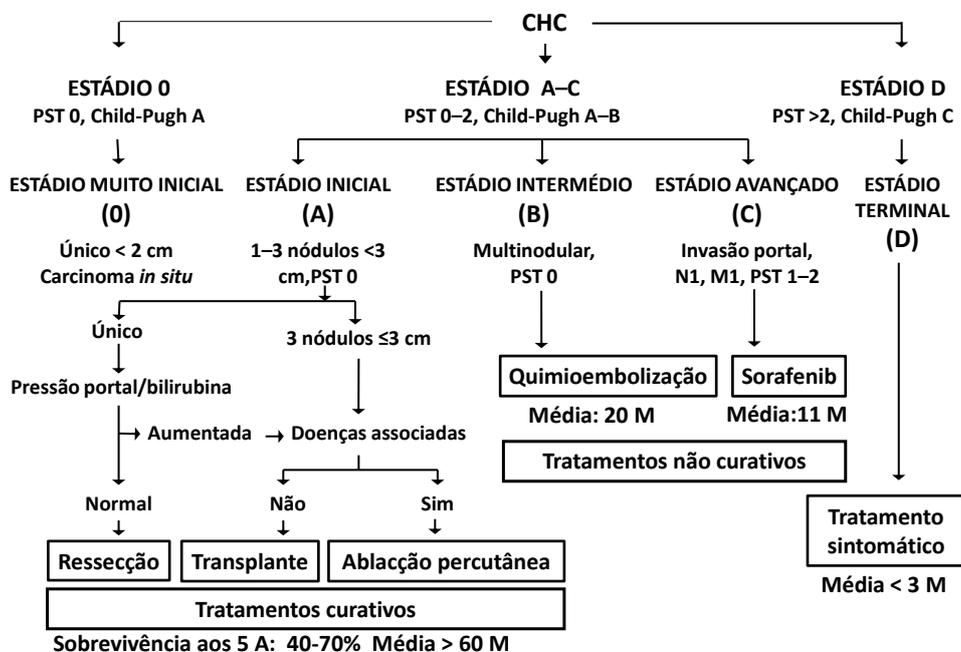


Figura 1.5 - Algoritmo de estadiamento BCLC do CHC.

Adaptado de: EASL-EORTC Clinical Practice Guidelines: Management of HCC. J Hepatol 2012; 56:908-943.

### 1.5.3.1. Estádio inicial

O **CHC muito inicial** (BCLC fase 0) é definido pela presença de um único tumor com menos de 2cm de diâmetro, sem invasão vascular/satélites, em doentes com bom estado geral (ECOG-0) e função hepática preservada (classe A de Child- Pugh). Hoje em dia, 5-10% dos doentes no ocidente são diagnosticados nesta fase, enquanto no Japão o número é de quase 30%, devido à aplicação generalizada de programas de vigilância (Kudo M, 2007).

Estudos histopatológicos permitiram a divisão destes tumores em 2 tipos: vagamente nodular (tamanho de cerca de 12 mm, sem invasão local), e distintamente nodular (tamanho médio de 16 mm, podendo mostrar locais de invasão).

Os tumores vagamente nodulares são muito bem diferenciados, contêm canais biliares e veia porta, têm aparência nodular mal definida e, por definição, não invadem estruturas. O tipo distintamente nodular pode ter metástases locais, que cercam o nódulo, em cerca de 10% dos casos e invasão portal microscópica em 25% (Roskams T, Kojiro M, 2010, Roskams T, 2011). Portanto, alguns tumores inferiores a 2 cm são propensos a disseminar localmente, mas outros comportam-se como carcinoma *in situ*, sendo definidos como Fase 0. Dados recentes mostraram sobrevivência de 80-90% aos 5 anos nos doentes submetidos a ressecção ou transplante hepático e de 70% quando tratados com ablação local (Takayama T.*et al.*, 1998; Livraghi T *et al.*, 2008; Roayaie S *et al.*, 2009; Roayaie S *et al.*, 2013).

É controverso que aos doentes em fase muito precoce possa ser oferecida ablação local como primeira opção de tratamento, porque nenhum estudo randomizado e controlado (RCT) abordou até hoje esta questão e a comparação de estudos de coorte sofre de viés de seleção.

O **CHC inicial** (BCLC fase A) inclui tumores únicos com mais de 2 cm ou até 3 nódulos com menos de 3 cm de diâmetro em doentes com ECOG-0 e na classe A ou B de Child-Pugh. A sobrevivência mediana de doentes com CHC inicial atinge 50-70% 5 anos após ressecção, transplante hepático ou ablação local, em candidatos selecionados (Arii S *et al.*, 2000; Llovet JM, Bruix J, 2008). A evolução natural desses casos é mal conhecida,

devido à escassez de dados notificados, mas estima-se que a sobrevivência média seja de cerca de 36 meses. Quando se aplicam na seleção de candidatos as variáveis que influenciam o resultado do tratamento existe uma melhoria universal da sobrevivência.

O *status* do tumor é definido pelo tamanho do nódulo principal e multicentricidade (único entre 2-5 cm; até três nódulos, até 3 cm), cada uma destas categorias exibindo resultados significativamente diferentes. Tumores únicos com mais de 5 cm poderão ser ainda considerados para ressecção cirúrgica, como primeira opção, pois quando se utiliza a RM no estadiamento pré-operatório, o facto de grandes tumores permanecerem únicos e sem envolvimento macrovascular (que é comum no CHC relacionado com o VHB) reflete um comportamento biológico menos agressivo.

As variáveis relacionadas com a função hepática são relevantes para os candidatos a ressecção. A ausência de hiperbilirrubinemia e de hipertensão portal clinicamente significativa constituem importantes preditores de sobrevivência, em doentes com um único nódulo, quando submetidos a ressecção (Llovet JM, 1999). De igual modo, a classe A de Child-Pugh é a mais importante variável prognóstica em doentes submetidos a ablação local, juntamente com o tamanho do tumor e a resposta ao tratamento (Sala M *et al.*, 2004). Como o transplante hepático pode, potencialmente, curar tanto o tumor como a doença hepática subjacente, as variáveis relacionadas sobretudo com o tumor foram claramente estabelecidas como fatores prognósticos (tumores únicos até 5 cm ou até 3 nódulos com até 3 cm), definindo os chamados critérios de Milão.

#### 1.5.3.2. Estádio intermédio e avançado

O prognóstico do CHC é mau para casos irressecáveis, com uma sobrevivência média inferior a 1 ano. A análise dos resultados heterogéneos de 25 RCTs (com sobrevivência aos dois anos entre 8-50 %) permite a identificação de, pelo menos, três subgrupos de doentes com CHC irressecável: intermédio, avançado e terminal, de acordo com a classificação BCLC (Llovet JM *et al.*, 1999; Llovet JM, Bruix J, 2003; Lopez PM, Villanueva A, Llovet JM, 2006; Cabibbo G *et al.*, 2010).

**CHC intermédio** (BCLC fase B) - Os doentes não tratados numa fase intermédia - classe B BCLC (tumores assintomáticos, multinodulares, sem um padrão invasivo) apresentam uma sobrevivência média de 16 meses (Llovet JM, Bruix J., 2003; Llovet JM, Bruix J, 2008) ou 49% aos dois anos (Cabibbo G *et al.*, 2010). A quimioembolização prolonga a sobrevivência destes doentes para uma média de 19-20 meses, de acordo com RCT e meta-análise de dados reunidos (Llovet JM, Bruix J, 2003). No entanto, a previsão de resultados é bastante heterogénea para doentes da subclasse BCLC B, variando entre cerca de 36 a 45 meses para os melhores respondedores a quimioembolização, em séries recentes (Takayasu K *et al.*, 2006; Varela M *et al.*, 2007; Burrell M *et al.*, 2012), até 11 meses para o pior cenário, em indivíduos não tratados (braço placebo dos doentes BCLC B do estudo Sharp) (Llovet JM *et al.*, 2008). Uma meta-análise recente de RCTs, que avaliou os resultados dos doentes no braço de controlo, sugere que a ascite (que contraindica o tratamento com TACE) é o pior factor prognóstico para esta subclasse (Cabibbo G *et al.*, 2010).

Os doentes classificados como tendo CHC intermédio (BCLC estágio B) constituem um grupo muito heterogéneo, com carga tumoral, idade, função hepática, e provavelmente co-morbilidades, muito variáveis, tendo também prognóstico muito diverso. Em Abril de 2012 um painel de especialistas, convocado para discutir questões não resolvidas na aplicação das diretrizes actuais para o manejo destes doentes, explorou a aplicabilidade de um sistema de subclassificação para CHC intermédio, tentando adequar diversas intervenções terapêuticas, com base nas provas disponíveis e na opinião de especialistas. Foi assim elaborado um relatório que propõe a subdivisão do CHC intermédio em 4 estádios, de B1 a B4 (Bolondi L *et al.*, 2012) (Quadro 1.5), apontando também várias estratégias terapêuticas (Figura 1.6).

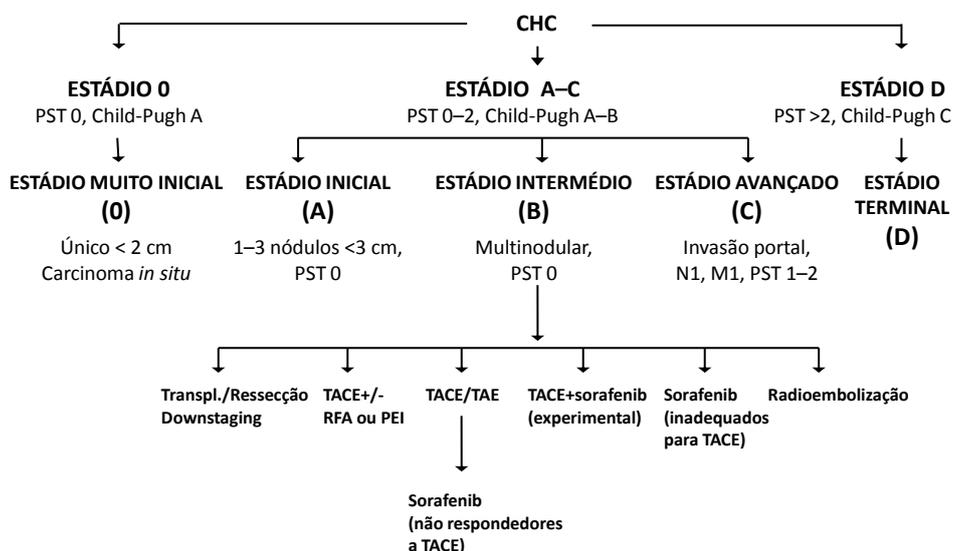
Existe ainda um sub-grupo de doentes na classe A de Child Pugh, com trombose segmentar ou sub-segmentar, que pode ser considerado uma sobreposição entre o estágio intermédio e o avançado (quase C). As recomendações asiáticas aconselham tratamento com TACE para estes doentes. Caso exista suspeita de que a trombose seja tumoral, há evidência de que estes doentes beneficiam com sorafenib, embora não existam contra-indicações técnicas para a realização de TACE nem de radioembolização quando a trombose é segmentar, desde que exista boa função

hepática, tendo sido reportados bons resultados de sobrevivência com radioembolização com  $Y^{90}$  (Bolondi L *et al.*, 2012).

**Quadro 1.5** – Sub-estadiamento do estágio intermédio (Adaptado de Bolondi L *et al.*, 2012).

Sub-estádio BCLC	B1	B2	B3	B4
Score Child-Pugh	5,6,7	5-6	7	8-9*
Além dos critérios de Milão Nos Critérios "Up to seven"	Dentro	Fora	Fora	Qualquer
PS (ECOG relacionado com o tumor)	0	0	0	0-1
TVP	Não	Não	Não	Não
1ª opção terapêutica	TACE	TACE ou TARE		Terapêutica de suporte
Alternativa	TH TACE+ablação	Sorafenib	Ensaios clínicos TACE Sorafenib	TH**

\*Com ascite grave/refractária e/ou icterícia; \*\*Apenas se tiver os critérios Up to seven e for PS0; TARE:radioembolização



**Figura 1.6** – Opções de tratamento do estágio intermédio.

(Adaptado de Bolondi L *et al.*, 2012)

**CHC avançado** (BCLC fase C) - Indivíduos com sintomas relacionados com o tumor (tumores sintomáticos ou ECOG 1-2), invasão macrovascular (segmentar ou portal), ou disseminação extra-hepática (envolvimento de gânglios linfáticos ou metástases) têm um prognóstico sombrio, com sobrevivência média esperada de 6 meses (Llovet JM *et al.*, 1999; Llovet JM, Bruix J, 2008), ou 25% ao fim de 1 ano (Cabibbo G *et al.*, 2010). No entanto, é óbvio que este resultado varia de acordo com o estado funcional do fígado e com outras variáveis. Por exemplo, a sobrevivência mediana é de 7 meses nos doentes com função hepática preservada (classe A de Child-Pugh) e de 5 meses nos que estão na classe B de Child-Pugh (Llovet JM *et al.*, 2008).

Em 2006 não havia nenhum tratamento de primeira linha aprovado pela FDA para doentes com CHC avançado. Esse cenário mudou com o resultado dos dados do estudo SHARP, que mostrou benefícios na sobrevivência de doentes que receberam sorafenib (um inibidor multikinase) em casos avançados. A sobrevivência média global no braço com sorafenib foi de 10,7 meses, variando entre 14,7 meses em doentes no estágio BCLC B e 9,5 meses em doentes BCLC C (Llovet JM *et al.*, 2008) *versus* 7,9 meses no grupo controlo.

#### 1.5.3.3. Estádio terminal

Doentes em estágio terminal caracterizam-se por apresentarem muito mau estado de desempenho (ECOG 3-4), o que reflete uma grave incapacidade relacionada com o tumor. A sua sobrevivência média é de 3-4 meses (Llovet JM, Brú C, Bruix J, 1999) ou 11% ao fim de 1 ano (Cabibbo G *et al.*, 2010). Da mesma forma, os doentes Child-Pugh C com tumores que ultrapassem os critérios de transplante, também têm um prognóstico muito reservado.

#### 1.5.3.4. Conceito de migração de estágio

Existe uma percentagem de doentes em cada estágio que não cumpre todos os critérios para a atribuição do tratamento padrão. Nesses casos recomenda-se oferecer

ao doente a próxima opção mais adequada dentro da mesma fase, ou da fase seguinte. Por exemplo, aos doentes em BCLC A sem resposta a destruição local deve ser oferecida quimioembolização. De igual modo, os doentes em fase BCLC B sem resposta à quimioembolização (pelo menos dois ciclos de tratamento) devem ser tratados com sorafenib, como relatado no estudo SHARP (Llovet JM *et al.*, 2008; Raoul JL *et al.*, 2011).

#### 1.5.4. Classificação molecular do CHC

A classificação molecular dum tumor maligno pode ajudar na compreensão das subclasses biológicas e mecanismos da doença, na optimização dos benefícios das terapêuticas moleculares e na melhoria dos estudos experimentais.

Poucas classificações moleculares têm sido propostas nos tumores malignos, mas existem algumas excepções, como é o caso do cancro da mama, onde o *status* Her2/nu discrimina subgrupos de doentes com resultados e respostas diferentes ao tratamento com trastuzumab (Slamon DJ *et al.*, 2001), do cancro do pulmão, em que o estado mutacional de EGFR no tumor de células não-pequenas identifica um subgrupo de respondedores a inibidores da tirosina-cinase (Tsao MS *et al.*, 2005), ou, mais recentemente, no melanoma, onde um subgrupo de doentes com mutações BRAF responde aos inibidores específicos B-RAF, definindo um novo paradigma e subclasse na gestão deste tumor (Flaherty KT *et al.*, 2010).

No CHC não foi identificada nenhuma subclasse molecular respondedora a terapêutica específica de alvo, mas houve avanços claros no entendimento da fisiopatologia e das subclasses moleculares da doença durante a última década.

Do ponto de vista biológico, diferentes classes tumorais têm sido caracterizadas, incluindo uma subclasse de Wnt, uma classe de proliferação (com duas subclasses: S1 - TGF - beta e S2 - EpCAM positiva) e uma classe de inflamação (Boyault S *et al.*, 2007; Chiang DY *et al.*, 2008; Yamashita T *et al.*, 2008; Hoshida Y *et al.*, 2008).

As amostras obtidas a partir de diferentes partes de um determinado nódulo neoplásico mostraram estratificação de classe idêntica em 95% dos casos. Igualmente relevante é o facto do perfil genético do tecido não tumoral adjacente definir dois subgrupos de doentes, um com bom e outro com mau prognóstico (Hoshida Y *et al.*, 2008). Assim, um retrato do efeito de campo está disponível, embora mais estudos sejam necessários para confirmar o significado prognóstico destas subclasses e se existem condutores específicos dentro delas que possam fornecer a justificação para uma medicina mais individualizada.

## 1.6. Tratamento

Relativamente ao início dos anos 90 tem havido uma proporção cada vez maior de doentes diagnosticados em estádios mais precoces da doença, devido ao efeito da vigilância e à melhoria das técnicas de diagnóstico (National Cancer Institute SEER Stat Fact Sheets. <http://seer.cancer.gov/statfacts/html/livibd.html>). Ainda assim, dados relativamente recentes indicam que, na Europa, a taxa global de sobrevivência aos 5 anos dos doentes com CHC é de apenas 8,6% (Berrino F *et al.*, 2007; Verdecchia A *et al.*, 2007).

O prognóstico é particularmente mau quando o CHC é diagnosticado em fases tardias. No entanto, mesmo quando detectado em fases precoces, apesar de existirem tratamentos mais agressivos e potencialmente curativos, a recidiva ocorre com frequência. Surgir, na grande maioria das vezes, num fígado cirrótico dificulta o tratamento. Assim, a escolha da terapêutica mais adequada para cada caso tem sempre que ter em conta o estágio do tumor, a função hepática e o estado geral do doente e exige uma abordagem multidisciplinar, incluindo hepatologistas, oncologistas, cirurgiões, radiologistas e patologistas.

Em oncologia, os benefícios dos tratamentos devem ser avaliados através de ensaios clínicos randomizados e meta-análises. Outras fontes de evidência, tais como ensaios clínicos não randomizados ou estudos observacionais são considerados menos robustos. Poucos tratamentos foram já devidamente testados no CHC, em contraste

com outros tipos de tumores malignos com elevada prevalência mundial, como o do pulmão, mama, colo-retal e estômago. Como resultado, a força da evidência para a maioria das intervenções terapêuticas realizadas no CHC está muito atrás dos tumores malignos mais prevalentes em todo o mundo (EASL-EORTC Clinical Practice Guidelines, 2012).

### 1.6.1. Ressecção hepática

A cirurgia é o pilar fundamental do tratamento do CHC. Ressecção e transplante conseguem alcançar os melhores resultados terapêuticos, em candidatos bem selecionados (60-80% de sobrevivência aos 5 anos) e competir entre si como primeira opção em doentes com tumores iniciais, numa perspectiva de intenção de tratar (Llovet JM, Schwartz M, Mazzaferro V, 2005; Mazzaferro V *et al.*, 2011).

A ressecção hepática é o tratamento de escolha para o CHC em doentes não cirróticos (5% dos casos no Ocidente, 40% na Ásia) (Belghiti J *et al.*, 2000; Lang H *et al.*, 2005), onde grandes ressecções podem ser realizadas, com baixos índices de complicações graves e resultados aceitáveis (30-50% de sobrevivência aos 5 anos).

Os padrões actuais de ressecção do CHC, em doentes cirróticos, são definidos da seguinte forma: taxas de sobrevivência esperada aos 5 anos de 60%, com mortalidade peri-operatória de 2-3% e necessidade de transfusão de sangue de menos de 10% (Poon RT *et al.*, 2002; Mazzaferro V *et al.*, 2006; Ishizawa T *et al.*, 2008; Llovet JM, Bruix J, 2008; Roayaie S *et al.*, 2009).

Na verdade, na maioria das unidades de referência a mortalidade peri-operatória diminuiu de 15% em 1980 para 3-5% actualmente, chegando à ausência de mortalidade em alguns centros (Makuuchi M, Sano K, 2004; Llovet JM, Schwartz M, Mazzaferro V, 2005).

A perda de sangue está associada significativamente à evolução do doente e pode ser controlada pela seleção de doentes com reserva funcional hepática mantida e pela aplicação de oclusão de influxo intermitente durante a transecção do parênquima

hepático. A seleção de candidatos à ressecção tem sido aprimorada, tanto na técnica cirúrgica como na gestão do pós-operatório imediato. Estas estratégias levaram a uma diminuição da necessidade de transfusão de sangue de 80% a 90% para menos de 10% em duas décadas (Makuuchi M, Sano K, 2004).

Além disso, a implementação de ressecções anatómicas, de acordo com Couinaud, tem assegurado uma abordagem cirúrgica com base em princípios oncológicos sólidos, apesar de estar associada apenas a uma diminuição modesta da recidiva precoce (Arii S *et al.*, 2010). Ressecções anatómicas com margens de 2 cm mostram um melhor resultado de sobrevivência do que margens de ressecção estreitas (inferiores a 1 cm) (Shi M *et al.*, 2007), sendo estas recomendadas apenas nos casos em que é estritamente necessário para assegurar a manutenção de função adequada do fígado remanescente. Existem estudos retrospectivos que associam ressecções anatómicas a melhores resultados, mas devem ser interpretados com cautela, devido à tendência para efectuar intervenções mais amplas em doentes com função hepática preservada.

A eleição dos candidatos ideais envolve uma adequada avaliação da reserva funcional hepática e da extensão do tumor. A avaliação da função hepática passou da determinação da classe de Child-Pugh para uma medição mais sofisticada através da taxa de retenção do verde de indocianina aos 15 minutos (ICG15) (Makuuchi M *et al.*, 1993) ou do gradiente de pressão venosa hepática (HVPG) como uma medição directa de hipertensão portal relevante (Bruix J *et al.*, 1996). Este conceito de hipertensão portal como fator de prognóstico, em doentes submetidos a ressecção, foi recentemente validado na Ásia (Ishizawa T *et al.*, 2008). Medidas indirectas de hipertensão portal incluem duas variáveis: valor de plaquetas abaixo de 100.000/mm<sup>3</sup> e esplenomegalia, sendo o tamanho do baço menos importante na previsão da hipertensão portal (Simpson KJ, Finlayson ND, 1995). A contagem de plaquetas foi recentemente confirmada como predictor independente de sobrevivência em casos de CHC ressecados (Cucchetti A *et al.*, 2009). De acordo com estas considerações, embora a avaliação de cada componente da hipertensão portal (HVPG, varizes esofágicas, esplenomegalia e contagem de plaquetas) seja recomendada antes da cirurgia, a contagem de plaquetas continua a ser o parâmetro mais acessível.

Na prática, a selecção de doentes com HVPG inferior a 10 mmHg, ou sem dados indirectos de hipertensão portal (varizes esofágicas, ou esplenomegalia com contagem de plaquetas  $<100.000/\text{mm}^3$ ), conduz a uma taxa de ressecabilidade inferior a 10% (Llovet JM, Burroughs A, Bruix J, 2003). A expansão destas restrições através da aplicação de critérios de pontuação MELD necessita ser validada prospectivamente, tendo a sobrevivência como *end point* (Cucchetti A *et al.*, 2009).

Alguns grupos, quando é prevista uma grande ressecção, efectuam embolização da veia porta (PVE) (dos ramos que abastecem a porção do fígado a ser ressecada) no pré-operatório, a fim de aumentar o volume de fígado residual (Farges O *et al.*, 2003; Makuuchi M, Sano K, 2004). Esta abordagem está associada a uma taxa de complicações de 10-20% e à ocorrência de hipertensão portal grave em 1% dos doentes com cirrose (Abulkhir A *et al.*, 2008). No entanto, a eficácia da PVE no contexto de CHC em cirrose ainda não foi devidamente validada em estudos controlados de grandes dimensões.

Recentemente tem havido um número crescente de relatos de ressecção hepática laparoscópica vídeo-assistida, como uma abordagem não invasiva alternativa. Os resultados positivos que foram reportados em estudos de coorte (Croome KP, Yamashita MH, 2010) necessitam confirmação por comparação prospectiva com a ressecção tradicional, antes de se propor qualquer alteração da prática actual.

Em doentes adequadamente seleccionados de acordo com o estado funcional do fígado, os principais predictores de sobrevivência são o tamanho e o número de tumores, a presença de microssatélites e a invasão vascular (Llovet JM, Schwartz M, Mazzaferro V, 2005). A utilização da ultra-sonografia intra-operatória (IOUS) permite a detecção de nódulos entre 0,5 cm e 1 cm e é considerada o *state of care* para descartar a presença de nódulos adicionais e orientar ressecções anatómicas (Torzilli G *et al.*, 2004).

Os japoneses demonstraram, numa série com milhares de doentes, que o tamanho do CHC é um predictor independente de sobrevivência, ao verificarem que a taxa de sobrevivência aos cinco anos foi de 66% para tumores com diâmetro inferior ou igual a 2 cm, de 52 % para tumores entre 2 e 5 cm e de 37% para dimensões superiores a 5 cm

(Ikai I *et al.*, 2004). A multinodularidade também tem valor predictivo para a sobrevivência, com taxas de 57% e 26% aos 5 anos, após ressecção de tumores únicos ou de três ou mais nódulos, respectivamente.

Recentemente, alguns centros de referência relataram taxas de sobrevivência aos 5 anos superiores a 50% em doentes não adequados para transplante, submetidos a ressecção de tumores múltiplos, com os critérios de Milão (até 3 nódulos, iguais ou inferiores a 3 cm) (Poon RT *et al.*, 2002; Mazzaferro V *et al.*, 2006; Ishizawa T *et al.*, 2008). Estes resultados positivos necessitam de mais estudos comparando ressecção *versus* terapêuticas loco-regionais, antes de poderem ser recomendados.

A invasão vascular é um indicador conhecido de recorrência e de diminuição da sobrevivência, directamente ligado à diferenciação histológica, ao grau e ao tamanho do nódulo principal. A invasão vascular microscópica ocorre em 20 % dos tumores com 2 cm de diâmetro, 30-60% em nódulos de 2 a 5 cm e até 60-90% em nódulos com mais de 5 cm de tamanho (Llovet JM, Schwartz M, Mazzaferro V, 2005).

#### 1.6.1.1. Tratamentos adjuvantes para prevenir a recorrência

A recorrência do tumor ocorre em cerca de 70% dos casos submetidos a ressecção, aos 5 anos, consistindo tanto em metástases intra-hepáticas (verdadeiras recorrências) como no aparecimento de tumores de novo (Belghiti J *et al.*, 1991; Llovet JM, Fuster J, Bruix J, 1999; Vauthey JN *et al.*, 2002; Poon RT *et al.*, 2002; Mazzaferro V *et al.*, 2006; Ishizawa T *et al.*, 2008; Roayaie S *et al.*, 2009). Não foi estabelecida nenhuma definição clínica para estas entidades, mas o *cut off* de 2 anos tem sido adoptado para classificar, grosseiramente, as recidivas em precoces e tardias (Imamura H *et al.*, 2003; Llovet JM *et al.*, 2008).

Têm sido tentadas várias estratégias para prevenir e tratar a recorrência, em estudos randomizados, quase todos realizados na Ásia. O interferão tem sido o medicamento mais frequentemente testado até ao momento, com diferentes meta-análises a avaliarem o seu efeito como adjuvante (Miyake Y *et al.*, 2010; Shen YC *et al.*, 2010;

Singal AG *et al.*, 2010). Numa meta-análise que incluiu 13 estudos (9 pequenos RCTs), demonstrou-se uma melhoria significativa da sobrevivência livre de recorrência (RFS) sob interferão (RFS estimada aos 3 anos de 54% *versus* 30% com placebo) (Shen YC *et al.*, 2010). Resultados semelhantes foram relatados noutros estudos, com diferentes populações de doentes. No primeiro RCT ocidental, com o objectivo de avaliar o interferão-alfa em terapêutica adjuvante, em 150 doentes foram obtidos resultados negativos, mas observou-se uma tendência positiva na prevenção de recorrências tardias *de novo*, justificando que se avalie esta estratégia em investigações futuras (Mazzaferro V *et al.*, 2006). Recentemente, o micro ARN 26 (miR-26) foi identificado como potencial marcador predictivo de resposta à terapêutica adjuvante com interferão (Ji J *et al.*, 2009). Futuros estudos deverão incluir este marcador molecular para identificar com maior precisão os doentes que respondem a este tipo de terapêutica.

Por enquanto, com base nos dados disponíveis, não se recomenda a administração de interferão como terapêutica adjuvante, devido à pequena dimensão dos estudos e à discrepância dos dados disponíveis.

Outras estratégias testadas incluem quimioterapia, quimioembolização, radiação interna, terapêuticas imunológicas e retinóides. A quimioembolização e a quimioterapia adjuvante não trazem qualquer benefício em termos de prevenção de recidiva (Yamasaki S *et al.*, 1996). A radiação interna com lipiodol, marcado com  $I^{131}$ , mostrou efeito positivo num pequeno ensaio e estudo de coorte (Lau WY *et al.*, 1999; Boucher E *et al.*, 2003). A imunoterapia com linfócitos ativados com interleucina-2 reduziu a primeira recorrência num ensaio com 150 doentes (recorrência aos 3 anos: 33% contra 48 % no grupo controlo) (Takayama T *et al.*, 2000). Um efeito benéfico semelhante, descrito com retinóides e vitamina K2 para prevenir tumores *de novo*, não foi confirmado recentemente em dois grandes estudos RCT (Muto Y *et al.*, 1996; Okita K *et al.*, 2010; Yoshida H *et al.*, 2011). Globalmente, de acordo com uma revisão sistemática recente da Cochrane, foram identificados 12 RCTs com menos de 1000 doentes randomizados, havendo uma falta de evidência clara para a eficácia de qualquer terapêutica adjuvante e neo-adjuvante (Samuel M *et al.*, 2009), pelo que nenhuma destas estratégias é recomendada na prática clínica.

Deverão ser realizados estudos maiores, com um menor risco de erro sistemático, tendo como *end point* primário o tempo de recorrência ou a sobrevivência global. Devido à falta de tratamentos eficazes comprovados, justificam-se estudos multicêntricos, com grupo de controlo sem tratamento. A selecção dos doentes deve basear-se no sistema de estadiamento BCLC e a estratificação antes da aleatorização deve ser feita de acordo com o tamanho do tumor, o número de nódulos/satélites e a invasão vascular. Neste sentido, os resultados positivos obtidos com sorafenib no CHC no estágio avançado, motivaram já a realização dum estudo internacional em terapêutica adjuvante, que está ainda a decorrer.

### 1.6.2. Transplantação hepática

A transplantação hepática constitui a primeira opção de tratamento para doentes com tumores pequenos, multinodulares (até 3 nódulos, com até 3 cm) ou tumores únicos (menores ou iguais a 5 cm) com insuficiência hepática avançada. Teoricamente, o transplante é o único método que pode curar simultaneamente o tumor e a cirrose subjacente.

Os critérios gerais de selecção aplicados há duas décadas conduziram a maus resultados em termos de recorrência (32-54% aos 5 anos) e sobrevivência (inferior a 40% aos 5 anos), mas permitiram a identificação dos melhores candidatos para este procedimento (Iwatsuki S *et al.*, 1985; Iwatsuki S *et al.*, 1991). Com base neste conceito alguns grupos pioneiros, seleccionando "candidatos ideais", obtiveram 70% de sobrevivência aos 5 anos, com uma taxa de recorrência inferior a 15% (Bismuth H, *et al.*, 1993; Mazzaferro V, *et al.* 1996; Bismuth H, Majno PE, Adam R. 1999; Llovet JM, Fuster J, Bruix J, 1999; Jonas S, *et al.* 2001).

Num artigo de referência foram estabelecidos os critérios de Milão, restringindo a transplantação a doentes com nódulo único inferior ou igual a 5 cm ou com até três nódulos de dimensões até 3 cm (Mazzaferro V, *et al.* 1996). Seguindo estes critérios, e de acordo com os padrões actuais, a mortalidade peri-operatória, ao fim de um ano e

aos 5 anos, deverá ser de 3%, menor ou igual a 10 % e menor ou igual a 30 %, respectivamente.

Os dados sobre a sobrevivência aos 10 anos são escassos, devendo ser avaliados de acordo com o princípio de intenção de tratar, a fim de melhor discriminar eventuais diferenças no resultado entre ressecção e transplantação não aparentes nos convencionais 5 anos de *cut off*. Contudo, uma revisão sistemática recente, incluindo 90 estudos, com um total de 17.780 doentes seguidos durante mais de 15 anos, identificou os critérios de Milão como um fator de prognóstico independente para o resultado após o transplante hepático (Mazzaferro V *et al.*, 2011). Muito significativo do ponto de vista clínico é ter-se verificado que a sobrevivência global aos 5 anos de doentes com CHC, obedecendo aos critérios de Milão (65-78 %), foi semelhante à dos indivíduos transplantados pelas outras causas, segundo os registos Europeus (European Liver Transplant Registry-ELTR) e Americanos (Organ Procurement and Transplantation Network-OPTN) (65-87 %) (Mazzaferro V *et al.*, 2011; ELTR. <[www.eltr.org/](http://www.eltr.org/)>; 2011; OPTN <[http://www.ustransplant.org/annual\\_reports/current/](http://www.ustransplant.org/annual_reports/current/)>; 2011). A ELTR relata taxas de sobrevivência aos 10 anos de cerca de 50% em mais de 12.000 transplantes realizados (ELTR. <[www.eltr.org/](http://www.eltr.org/)>; 2011).

Como consequência do seu sucesso os critérios de Milão foram integrados no sistema de estadiamento BCLC e no estadiamento UNOS pré-transplante para alocação de órgãos nos EUA (Freeman Jr RB *et al.*, 2002) e continuam a servir de referência para todos os outros critérios de prognóstico, propostos para expandir a indicação para transplantação hepática em doentes cirróticos com CHC (Clavien PA *et al.*, 2012).

A principal limitação da transplantação no tratamento do CHC é a escassez de órgãos. O aumento do tempo de espera leva a que cerca de 20% dos candidatos a transplante abandonem as listas antes de receber o órgão, comprometendo o resultado numa avaliação em intenção de tratar (Llovet JM, Fuster J, Bruix J, 1999; Yao FY *et al.*, 2001).

No contexto da transplantação de doentes com CHC há quatro conceitos que importa abordar: (1) política de prioridade e de saída de lista, (2) tratamento neoadjuvante em lista de espera, (3) extensão de critérios e *downstaging* para transplante e (4) transplante hepático de dador vivo.

### 1.6.2.1. Políticas de prioridade e de saída de lista

O UNOS desenvolveu um sistema de prioridade para gerir listas de espera para transplante com base na pontuação MELD (Clavien PA *et al.*, 2012), que foi originalmente criada para prever a sobrevivência a três meses de indivíduos com doença hepática terminal (Kamath PS *et al.*, 2001). Como o MELD não consegue prever a taxa de abandono de doentes com CHC, surgiram vários *scores* de prioridade para este caso, variando inicialmente entre 24 (nódulo único <2 cm) e 29 pontos (nódulo único 2-5 cm ou até 3 nódulos cada  $\leq 3$  cm); actualmente propõem-se valores entre zero a 22 pontos, respectivamente. A principal dificuldade no estabelecimento de políticas prioritárias está na definição dos doentes em risco de *drop out*, que em alguns estudos são identificados como aqueles que têm tumores multinodulares, falhas no tratamento neoadjuvante, ou níveis de AFP sérica basal superiores a 200 ng/ml, ou com elevação constante superior a 15 ng/ml/mês (Vibert E *et al.*, 2010). No extremo oposto do espectro estão doentes com tumores UNOS-T1 (único, inferior a 2 cm), que poderão beneficiar de tratamentos alternativos, pelo menos até que a recorrência ocorra, evitando assim o transplante fútil (Yao FY *et al.*, 2001).

Há estratégias que defendem abordagens "transplante de resgate" em populações de baixo risco a ser investigadas em estudos prospectivos, com foco na análise de intenção de tratar e benefício de sobrevivência, dependentes também do tempo de espera e da disponibilidade local de dadores. Por outro lado, tem sido proposto que doentes submetidos a ressecção com alto risco de recorrência devam ser recrutados para transplante hepático (Sala M *et al.*, 2004).

Como os tempos de espera variam de forma significativa nos diversos locais do mundo, recomenda-se que os responsáveis modulem políticas prioritárias, de acordo com essas variáveis.

Existem ainda menos informações disponíveis sobre políticas de exclusão. As recomendações actuais aconselham manter os doentes cujo CHC tenha progredido para além dos critérios de Milão enquanto em lista, explorando terapêuticas neoadjuvantes. Deverão ser retirados da lista doentes que desenvolvam invasão

macrovascular ou disseminação extra-hepática (EASL-EORTC Clinical Practice Guidelines, 2012).

#### 1.6.2.2. Tratamentos neo-adjuvantes em lista de espera

Na maioria dos centros são utilizadas terapêuticas adjuvantes em doentes dentro dos critérios de Milão, que se encontrem em lista de espera, visando prevenir a progressão do tumor. Faltam dados robustos de RCTs, sendo os alegados benefícios potenciais da ablação ou quimioembolização provenientes de estudos observacionais e de análises de custo-efetividade. Os principais estudos que avaliam tratamentos neo-adjuvantes são casuísticas, estudos de caso-controlo e estudos de coorte que mostram que a RFA atinge os índices mais altos de necrose completa (12-55 %) (Mazzaferro V et al, 2004; Lu DS *et al.*, 2005) em comparação com a TACE (22-29 %) (Majno PE *et al.*, 1997; Decaens T *et al.*, 2005; Porrett PM *et al.*, 2006).

O impacto destes tratamentos na taxa de abandono, recorrência e sobrevivência tem sido estimado apenas a partir de estudos não-randomizados. Com base em estudos iniciais de taxas de abandono foi estimada uma probabilidade atuarial entre 15-30%, ao fim de 1 ano (Llovet JM, Fuster J, Bruix J, 1999; Yao FY et al, 2001). Os estudos de coorte e casuísticas existentes sugerem um impacto favorável do tratamento, diminuindo a taxa de *drop out* para níveis que variam entre 0 e 25% (Pomfret EA *et al.*, 2010; Mazzaferro V *et al.*, 2004).

Os tratamentos em lista de espera têm sido estudados também de forma não controlada, sendo os seus efeitos sobre a sobrevivência após o transplante hepático difíceis de avaliar. Desde a publicação do estudo inicial (Majno PE *et al.*, 1997), estudos de caso-controlo, incluindo casos índice tratados e controlos emparelhados, indicam taxas de sobrevivência similares às dos indivíduos não tratados (Decaens T *et al.*, 2005; Porrett PM *et al.*, 2006). A análise de custo-eficácia baseada no modelo Markov, pelo contrário, apontou para a existência de benefício dos tratamentos neo-adjuvantes, quando o tempo de espera exceder os 6 meses (Llovet JM *et al.*, 2002).

O uso de sorafenib no tratamento de doentes UNOS - T2 em lista de espera não está recomendado, de acordo com pequenos estudos piloto e com as análises de custo-efectividade até hoje publicados (Vitale A *et al.*, 2010; Truesdale AE *et al.*, 2011).

Portanto, considerando o nível de evidência actualmente disponível, recomenda-se tratamento com ablação local nos doentes à espera de transplante e, como segunda escolha, quimioembolização, quando os tempos de espera são estimados em mais de 6 meses.

### 1.6.2.3. Extensão de indicações e *downstaging* na transplantação

Na transplantação hepática a expansão para além dos critérios de Milão e *downstaging* a Milão têm sido amplamente debatidos. O conceito principal é de que, para estabelecer uma nova política que permita a expansão dos critérios para transplante, é essencial a existência de dados robustos sobre qual a categoria específica de doentes a incluir na proposta de expansão.

Novos critérios poderão ter um grande impacto sobre todos os programas de transplante e os dados existentes para apoiar qualquer mudança devem ser incontestáveis. Além disso, o impacto da expansão sobre os doentes não-CHC à espera de transplante hepático deve ser também tido em conta

O entendimento atual é de que os critérios da *University of California San Francisco* (UCSF), que consideram doentes com nódulo únicomenor ou igual a 6,5 cm ou com 2-3 nódulos de dimensões menores ou iguais a 4,5 cm e diâmetro total do tumor até 8 cm (Yao FY *et al.*, 2001; Yao FY *et al.*, 2007) já foi contestada pelo critério *up to seven*, ou seja, tumores possuindo o número 7 como a soma do tamanho do maior tumor, com o número de tumores (Mazzaferro V *et al.*, 2009). Esta proposta foi recentemente validada numa série independente (Raj A, McCall J, Gane E, 2011). Outros estudos recentes contestando os critérios de Milão propuseram diferentes algoritmos para otimizar a seleção dos doentes.

As principais preocupações sobre as propostas de expansão são a falta de dados específicos sobre a sobrevivência global e sobre a taxa de abandono em lista dos doentes fora dos critérios actuais, mas cumprindo os critérios expandidos. No entanto, a previsão dos resultados aos 5 anos pode variar entre 70% e 40%, de acordo com a presença ou ausência de invasão microvascular. Assim, são muito importantes marcadores pré-operatórios de invasão vascular, antes de adoptar esses critérios.

Numa meta-análise para avaliar o tamanho do tumor e o número de nódulos, um *cut off* acima de 10 cm de diâmetro quadruplicou o risco de morte (Germani G *et al.*, 2011), enquanto uma combinação de volume tumoral e níveis de AFP foi considerada a melhor estratégia noutros estudos (Vibert E *et al.*, 2010; Toso C *et al.*, 2008). Marcadores moleculares, tais como o desequilíbrio alélico reflectindo instabilidade cromossómica, também têm mostrado prever a recorrência após o transplante (Schwartz M *et al.*, 2008).

Considerando a evidência actualmente existente, não se recomenda a extensão dos critérios de elegibilidade para transplante, além dos critérios de Milão, excepto no contexto de protocolos de investigação (EASL-EORTC Clinical Practice Guidelines, 2012).

Quanto ao *downstaging*, não há um único RCT, estudo caso-controle, ou grande estudo de coorte bem concebido em doentes tratados de forma consistente e seguidos correctamente. Pequenos estudos prospectivos sugerem que o *downstaging* para os critérios de Milão, por meio de radiofrequência ou quimioembolização, em casos de doença localizada ao fígado, conseguem sobrevivências aos 5 anos semelhantes às dos doentes incluídos nos critérios de Milão (Yao FY *et al.*, 2008; Ravaioli M *et al.*, 2008). No entanto, não há um limite superior claro para a elegibilidade para *downstaging*.

Considerando os dados actualmente existentes, o *downstaging* de doentes fora dos critérios de Milão não pode ser adoptado como uma ferramenta para refinar a seleção dos doentes. São necessários mais estudos (EASL-EORTC Clinical Practice Guidelines, 2012), baseados no princípio de que os resultados de sobrevivência aos 5 anos de doentes submetidos a transplante após *downstaging* devem ser semelhantes aos dos doentes transplantados cumprindo os critérios de Milão (Clavien PA *et al.*, 2012).

Alguns peritos consideram que deve ser adoptada uma política especial para doentes já em lista de espera, com tumores que progridem para além dos critérios de Milão, mas têm doença confinada ao fígado. Nesta circunstância especial, recomenda-se colocar o candidato em espera até ser obtido e mantido, por um período de pelo menos 3 meses, *downstaging* por ablação local ou quimioembolização (EASL-EORTC Clinical Practice Guidelines, 2012).

#### 1.6.2.4. Transplante de dador vivo

O transplante hepático de dador vivo (LDLT), utilizando o lobo hepático direito de um dador saudável, surgiu como uma alternativa ao transplante de fígado de cadáver (Trotter JF *et al.*, 2002; Clavien PA *et al.*, 2007).

Em 2000 houve um grande entusiasmo com o LDLT, estimando-se então que este tipo de transplante pudesse vir a representar uma proporção significativa de doentes transplantados por CHC (Bruix J, Llovet JM, 2002). Infelizmente, o risco de morte (estimada em 0,3%) e as complicações graves (cerca de 2%) para o dador saudável diminuíram o interesse por esta técnica (Siegler M *et al.*, 2006; Ghobrial RM *et al.*, 2008; Browns Jr RS, 2008).

Actualmente, o LDLT constitui menos de 5% dos transplantes hepáticos em adultos, sendo significativamente menor que nos transplantes renais, onde os dadores vivos representam cerca de 40% de todos os casos realizados (Browns Jr RS, 2008).

Os riscos e benefícios do LDLT devem ter em conta tanto o dador como o receptor, um conceito conhecido como "duplo equilíbrio" (Sarasin FP *et al.*, 2001; Cronin 2nd DC, Millis JM, 2008; Clavien PA *et al.*, 2012) e, devido à complexidade do processo, deve ser efectuado apenas em centros de excelência em cirurgia hepática e de transplantação.

Os resultados do LDLT em comparação com o transplante de dador cadavérico têm sido controversos, com alguns estudos a sugerir que se associa a maior risco de

recorrência, sem que esses dados tenham sido confirmados (Lo CM *et al.*, 2007; Fisher RA *et al.*, 2007).

Estudos de custo-efectividade sugeriram que o LDLT pode ser oferecido a doentes com CHC se a espera em lista for superior a 7 meses (Sarasin FP *et al.*, 2001). Alguns autores recomendam um período de observação de 3 meses antes do transplante, a fim de evitar fazê-lo em tumores potencialmente mais agressivos (Kulik L, Abecassis M, 2004; Fisher RA *et al.*, 2007), o que deve ser confirmado com novas investigações.

#### 1.6.2.5. Dados sobre transplante hepático em Portugal

Em Portugal, entre 1993 e 2006 foram transplantados por CHC 137 doentes (122 homens e 15 mulheres). As etiologias mais frequentes foram a cirrose alcoólica, o VHC e o VHB. Quarenta e sete doentes foram submetidos a vários tipos de terapêutica pré-operatória, sendo a mais frequente a quimioembolização. O tamanho médio do maior nódulo foi de 4,3 cm e 16 doentes tinham mais de 3 nódulos. Os critérios de Milão foram cumpridos em 80 doentes e os da Universidade da Califórnia-São Francisco (UCSF) em 95.

A mortalidade peri-operatória, considerada até aos 3 meses, foi de 13,1% (18 doentes). Vinte e sete doentes (19,7%) recidivaram, sendo os locais mais frequentes de recidiva o pulmão e o fígado. A sobrevivência foi de 56% aos 5 anos e 32% aos 10 anos. A sobrevivência nos doentes que foram transplantados respeitando os critérios de Milão foi de 73% aos 5 anos. Respeitando os critérios da UCSF a sobrevivência foi de 72% aos 5 anos. Os factores que mais influenciaram a sobrevivência foram o tamanho dos nódulos, o seu número e a invasão vascular.

Em Portugal o transplante por CHC, respeitando os critérios universalmente aceites, teve resultados sobreponíveis aos das grandes séries internacionais. A expansão destes critérios obteve, nos nossos centros, resultados satisfatórios (Pinto Marques H *et al.*, 2007).

## 1.7. Tratamentos loco-regionais

### 1.7.1. Com intuito curativo: PEI e RFA

Os tratamentos loco-regionais (também conhecidos por terapêuticas médicas invasivas) consistem na destruição do tumor, com controlo imagiológico. Nos últimos 25 anos, vários métodos para destruição química ou térmica têm sido desenvolvidos e testados clinicamente (Lencioni R, 2010). A maioria destes procedimentos são efectuados utilizando uma abordagem percutânea, embora em alguns casos seja recomendada a laparoscopia.

A técnica inicialmente utilizada foi a injeção percutânea de etanol (PEI), que induz a necrose de coagulação da lesão, como resultado de desidratação celular, desnaturação das proteínas e oclusão química de pequenos vasos tumorais. A PEI foi uma técnica bastante utilizada no tratamento do CHC, conseguindo necrose completa em 90% dos tumores com menos de 2 cm, 70% nos de 2-3 cm e 50 %, entre 3 e 5 cm (Livraghi T *et al.*, 1992; Sala M *et al.*, 2004; Lencioni R, 2010).

Especulou-se que a difusão do etanol pode ser bloqueada por septos fibróticos intratumorais e/ou cápsula do tumor, o que prejudica a capacidade curativa desta técnica, em particular em tumores maiores do que 2 cm. A introdução de um dispositivo específico para uma sessão única de PEI, uma agulha múltipla com três pinos retráteis, resultou numa taxa de resposta completa mantida de 80-90% em tumores inferiores a 4 cm (Kuang M *et al.*, 2009).

Em doentes com cirrose Child-Pugh A e tumor em estágio inicial o tratamento com PEI conseguiu taxas de sobrevivência de 47-53% aos 5 anos (Lencioni R *et al.*, 1995; Livraghi T *et al.*, 1995). A principal limitação da PEI é a elevada taxa de recorrência local, que pode chegar a 43% em lesões superiores a 3 cm (Khan KN *et al.*, 2000), tendo vindo progressivamente a ser abandonada.

Outra técnica de ablação química, a injeção percutânea de ácido acético (PAI), não ofereceu vantagens substanciais relativamente à PEI (Huo TI *et al.*, 2003).

Posteriormente, surgiram terapêuticas ablativas térmicas, classificadas como tratamentos de hipertermia (aquecimento do tecido entre 60-100° C), que incluem a ablação por radiofrequência (RFA), por microondas e com laser, ou a crioablação, que consiste na congelação do tecido entre -20° C e -60° C.

A RFA tem sido a alternativa mais amplamente avaliada relativamente à PEI, para ablação local do CHC. A energia gerada pela RFA induz necrose de coagulação do tumor, produzindo um anel de segurança no tecido peri-tumoral, o que pode eliminar pequenos satélites não detectados.

Cinco RCTs comparando a RFA com a PEI no tratamento do CHC em fase inicial mostraram consistentemente que a RFA tem um efeito superior à PEI, conseguindo um melhor controlo local da doença (taxa de recorrência aos 2 anos: 2-18% *versus* 11-45%) (Lencioni R *et al.*, 2003; Lin SM *et al.*, 2004; Lin SM *et al.*, 2005; Brunello F *et al.*, 2008).

A avaliação do impacto da RFA na sobrevivência tem sido mais controversa. Foram identificadas vantagens de sobrevivência favorecendo RFA vs PEI num estudo japonês, que incluiu 232 doentes (Shiina S *et al.*, 2005), mas não foram encontradas diferenças em 2 RCTs europeus (Lencioni R *et al.*, 2003; Brunello F *et al.*, 2008). Dois outros RCTs, do mesmo grupo, relataram vantagens na sobrevivência da RFA em comparação tanto com a PEI como com a PAI, no subgrupo de doentes com tumores de dimensão superior a 2cm (Lin SM *et al.*, 2004; Lin SM *et al.*, 2005).

A principal desvantagem da RFA é a taxa mais elevada de complicações (4%; IC 95%, 1,8-6,4%) em comparação com a PEI (2,7%, IC 95%, 0,4-5,1%) (Imamura J *et al.*, 2008; Bouza C *et al.*, 2009). Considerando os dados existentes, os resultados obtidos em séries de doentes com CHC, tratados por RFA evidenciam taxas de sobrevivência de 40-70% aos 5 anos (Omata M *et al.*, 2004; Lencioni R *et al.*, 2005) e até mesmo superiores, em candidatos altamente selecionados (N'Kontchou G *et al.*, 2009).

Os melhores resultados foram relatados em doentes Child-Pugh A, com tumores pequenos, únicos, geralmente com menos de 2 cm de diâmetro (Sala M, *et al.*, 2004; Livraghi T *et al.*, 2008). Os preditores independentes de sobrevivência são uma resposta inicial completa, a pontuação de Child-Pugh, o número ou o tamanho dos nódulos, e os níveis basais de AFP. Assim, doentes Child-Pugh A, com tumores pequenos, com contra-indicação para cirurgia, são os candidatos ideais para RFA.

Cerca de 10-15% dos tumores com localizações difíceis de abordar por RFA podem ser tratados com PEI (Lencioni R, Llovet JM, 2005). O tratamento de doentes com tumores maiores (3-5 cm), com vários tumores (até 3 nódulos, com até 3 cm) ou insuficiência hepática avançada (Child-Pugh B) pode ser feito com a combinação de ambas as técnicas, numa base individual.

Nos doentes com CHC em estágio inicial tratados com ablação percutânea, a sobrevivência a longo prazo é influenciada por múltiplas intervenções diferentes, pois uma elevada percentagem desenvolverá nódulos de CHC intra-hepáticos recorrentes dentro de 5 anos após o tratamento inicial e irá receber terapêuticas adicionais. Ainda assim, três meta-análises independentes, que incluíram todos os RCTs efectuados, confirmaram que o tratamento com RFA oferece um benefício de sobrevivência quando comparado com a PEI em tumores maiores que 2 cm (Cho YK *et al.*, 2009; Bouza C *et al.*, 2009; Germani G *et al.*, 2010).

Embora estes tratamentos proporcionem bons resultados, aparentemente são incapazes de alcançar taxas de resposta e resultados comparáveis à cirurgia, mesmo quando aplicados como primeira opção (Ikai I *et al.*, 2004).

Uma questão em aberto é se a RFA pode ou não competir com a ressecção cirúrgica como tratamento de primeira linha em doentes com CHC únicos, pequenos. Foram publicados dois RCTs, com resultados contraditórios (Chen MS *et al.*, 2006; Huang J *et al.*, 2010). Enquanto o primeiro não identificou diferenças, o segundo sugeriu uma vantagem de sobrevivência para a ressecção cirúrgica. Investigações não controladas têm relatado resultados semelhantes para ressecção e RFA em doentes BCLC 0 (Livraghi T *et al.*, 2008).

São necessários mais estudos para superar problemas metodológicos que impedem a obtenção de conclusões sólidas com base nos actuais. Além disso, enquanto a remoção completa do tecido neoplásico (R0) é comum após cirurgia de ressecção, alguns indícios apontam para a necessidade de analisar com cautela os dados de espécimes patológicos de tumores ablacionados com RFA. Foram relatadas necroses tumorais completas inferiores a 50 % em tumores maiores do que 3 cm, devido à perda de calor pelo arrefecimento tecidual dentro da área ablacionada (Lu DS *et al.*, 2005). Além disso, tumores com localização subcapsular ou adjacente à vesícula biliar possuem um maior risco de ablação incompleta (Komorizono Y *et al.*, 2003) e de complicações (Llovet JM *et al.*, 2001; Teratani T *et al.*, 2006; Imamura J *et al.*, 2008).

Assim, neste momento, não há dados que permitam apoiar a RFA em detrimento da ressecção, como primeira linha de tratamento, em doentes com CHC em estágio precoce (BCLC A).

### 1.7.2. Tratamentos em investigação

A ablação por micro-ondas, a laser e a crio-ablação têm sido propostas para destruição local do CHC.

A eficácia da ablação por micro-ondas tem, relativamente à RFA, a vantagem importante de ser menos afectada por vasos localizados na proximidade do tumor. Os resultados dos estudos iniciais foram limitados pela indução de um pequeno volume de coagulação (Yu NC *et al.*, 2006), que levou a um desempenho abaixo do ideal do tratamento por micro-ondas, quando comparado com a RFA, no RCT publicado (Shibata T *et al.*, 2002).

No que diz respeito à eficácia da ablação com laser, nenhum RCT foi publicado até agora. Numa análise retrospectiva multicêntrica recente, que incluiu 432 doentes com CHC em estágio inicial, com contra-indicação cirúrgica, a sobrevivência global foi de 34% (41% na classe A de Child-Pugh) (Pacella CM *et al.*, 2009).

A crioablação tem tido uma aplicação limitada no CHC e não foi publicado nenhum RCT (Orlacchio A *et al.*, 2008). A taxa de complicações não é desprezível, principalmente pelo risco de "cryoshock", que pode surgir após crioablação e é potencialmente fatal, resultando em falência múltipla de órgãos, coagulopatia grave e coagulação intravascular disseminada.

Técnicas de ablação não químicas nem térmicas estão atualmente sob investigação clínica, como a eletroporação irreversível, cuja abordagem pré-clínica foi positiva (Guo Y *et al.*, 2010).

HIFU (*High-intensity focused ultrasound*) é uma nova técnica ablativa relatada em coortes de doentes com tumores pequenos (Ng KK *et al.*, 2011), mas ainda não existem estudos randomizados.

## **1.8. Quimioembolização**

A quimioembolização (TACE) é o tratamento primário mais amplamente usado para o CHC irressecável (Arii S *et al.*, 2000; Ikai I *et al.*, 2003; Takayasu K *et al.*, 2006), sendo o recomendado em primeira linha para doentes no estágio intermédio da doença (Llovet JM, Bruix J, 2003; Llovet JM *et al.*, 2008; Bruix J, Sherman M, 2011).

O CHC apresenta intensa actividade neo-angiogénica durante a sua progressão e a TACE consiste na infusão intra-arterial de um agente citotóxico, com embolização dos vasos sanguíneos que alimentam o tumor, o que vai resultar num efeito isquémico e citotóxico forte.

A TACE deve ser distinguida da quimio-lipiodolização (distribuição de uma emulsão de quimioterapia misturada com lipiodol), da embolização transcateter (TAE), onde nenhum agente quimioterápico é veiculado e da quimioterapia intra-arterial, onde não é realizada embolização (Bruix J, Sala M, Llovet JM, 2004; Brown DB *et al.*, 2009).

### 1.8.1. Quimioembolização Convencional (TACE)

Este procedimento combina a injeção de agentes quimioterapêuticos emulsionados com lipiodol, seguida de estagnação vascular conseguida com agentes embolizantes. Com este método conseguem-se respostas parciais em 15-55% dos doentes e protela-se significativamente a progressão do tumor e a invasão macrovascular.

O benefício em termos de sobrevivência da TAE ou da quimioembolização tem sido objecto de alguns RCTs, com resultados contraditórios (Lin DY *et al.*, 1988; Pelletier G *et al.*, 1990; Group d'Etude et de Traitment du Carcinome Hépatocellulaire, 1995; Bruix J *et al.*, 1998; Pelletier G *et al.*, 1998; Lo CM *et al.*, 2002; Llovet JM *et al.*, 2002). Foram relatados benefícios em dois estudos (Lo CM *et al.*, 2002; Llovet JM *et al.*, 2002), um deles identificando a resposta ao tratamento como preditor independente de sobrevivência (Llovet JM *et al.*, 2002).

A meta-análise dos sete RCTs existentes, incluindo um total de 516 doentes, mostrou um efeito benéfico na sobrevivência da embolização/quimioembolização, em comparação com o grupo controlo (Llovet JM, Bruix J, 2003). A análise da sensibilidade mostrou um significativo benefício da quimioembolização com cisplatina ou doxorrubicina em quatro estudos, mas nenhum benefício com a embolização isoladamente, em três estudos (Llovet JM, Bruix J, 2003). Globalmente, a média de sobrevivência dos doentes com CHC em estágio intermédio é de cerca de 16 meses, sendo após quimioembolização de aproximadamente 20 meses.

Uma meta-análise recente, efectuada pela Cochrane, desafiou a eficácia da TACE (Oliveri RS, Wetterslev J, Gluud C, 2011), mas vários viéses contidos nesta abordagem, incluindo ensaios com controlos inapropriados e com populações-alvo com mau prognóstico, retiram-lhe impacto.

Como resultado destas investigações, a TACE tem sido considerada o tratamento padrão para doentes que preencham os critérios para o estágio intermédio do sistema BCLC.

Os benefícios obtidos com a quimioembolização não devem ser anulados pelo aparecimento de insuficiência hepática induzida pelo tratamento. As mortes relacionadas com esta terapêutica são inferiores a 2% dos casos se for feita uma selecção adequada dos doentes. Os melhores candidatos são indivíduos com função hepática preservada e tumores multinodulares, assintomáticos, sem invasão vascular nem disseminação extra-hepática (Llovet JM *et al.*, 2002; Bruix J, Sala M, Llovet JM, 2004). Os doentes devem apresentar função hepática relativamente bem preservada (Child-Pugh A ou B7, sem ascite) e os que tiverem descompensação ou insuficiência hepática mais avançada devem ser excluídos pois o insulto isquémico pode levar a efeitos adversos graves.

Não existe boa evidência de qual será o melhor agente quimioterapêutico, nem da estratégia ideal de re-tratamentos, embora se recomende aplicar os procedimentos 3 a 4 vezes por ano, utilizando a doxorrubicina ou a cisplatina como quimioterapia convencional. Regimes mais intensivos, nomeadamente TACE a cada 2 meses, podem induzir insuficiência hepática numa proporção inaceitável de doentes (Group d'Etude et de Traitment du Carcinome Hépatocellulaire, 1995).

A disseminação extra-hepática e a invasão vascular macroscópica de qualquer tipo são as principais contra-indicações para a quimioembolização. Um estudo com resultado positivo não mostrou benefício da TACE no subgrupo de doentes com invasão da veia porta, (Lo CM *et al.*, 2002).

Estão a ser investigados os eventuais benefícios da combinação da TACE com procedimentos de ablação local e com terapêuticas sistémicas.

### 1.8.2. Quimioembolização com DE Beads

A quimioembolização deve ser superseletiva, visando minimizar o insulto isquémico no tecido não tumoral. Actualmente é efectuada quimioembolização com veiculação de agentes quimioterapêuticos (mais frequentemente doxorrubicina) com eluição de *beads* (TACE-DEB) (Figura 1.7). As microesferas embólicas utilizadas têm a capacidade

de sequestrar os medicamentos, libertando-os de um modo controlado ao longo de 1 semana. Desta forma aumenta-se a concentração local do fármaco com uma toxicidade sistémica negligenciável (Varela M *et al.*, 2007).

Um estudo randomizado de fase II que comparou TACE e TACE-DEB evidenciou uma redução significativa da toxicidade hepática e de eventos adversos relacionados com o medicamento no braço que utilizou TACE-DEB e uma tendência não significativa de melhor efeito anti-tumoral (Lammer J *et al.*, 2010).



**Figura 1.7** - Quimioembolização com DE Beads.

### **1.9. Radioembolização**

A radioembolização é uma técnica percutânea de infusão intra-vascular de partículas radioactivas destinada a provocar a oclusão dos vasos sanguíneos e a bloquear a irrigação de lesões malignas conduzindo à sua necrose. Tem sido efectuada em CHCs irrissecáveis, em metástases hepáticas e também noutros tumores hepáticos.

Inicialmente foi utilizado o iodo-131 ( $I^{131}$ ) com lipiodol (Raoul JL *et al.*, 1997) e mais recentemente microesferas contendo ítrium 90 ( $Y^{90}$ ) (Kulik LM *et al.*, 2008; Salem R *et al.*, 2010; Hilgard P *et al.*, 2010). Existem microesferas de resina ou de vidro,

carregadas com Yttrium90 (substância que emite radiação beta de curto alcance, característica que permite garantir uma acção localizada apenas à área do tumor).

Este tratamento requer um centro especializado, com equipamento sofisticado e radiologistas treinados. Devido ao efeito minimamente embólico das microesferas de  $Y^{90}$ , pode ser efectuado com segurança em doentes com trombose da veia porta (Kulik LM *et al.*, 2008).

Os doentes são previamente submetidos a uma avaliação angiográfica completa para identificar qualquer vascularização extra-hepática que possa alimentar o tumor, para detectar e obstruir cada vaso colateral que surja a partir da artéria hepática, que possa transportar microesferas para o trato gastrointestinal ou para outros órgãos extra-hepáticos e ainda para avaliar a patência e as características do fluxo de sangue na veia porta e seus ramos.

Dependendo da extensão tumoral, são tratados com uma abordagem segmentar, lobar, ou de todo o fígado. Uma vez que tenham sido identificados os locais ideais para a injeção de microesferas, é realizado um cintigrama com macroagregados de albumina com tecnécio-99m para calcular o grau de *shunt* hepato-pulmonar, para identificar mais vasos colaterais e, eventualmente, para calcular a distribuição diferencial de partículas entre tumor e tecido não tumoral.

Deve ser utilizado o julgamento clínico para avaliar a adequação do método em doentes com contra-indicações relativas, incluindo função pulmonar comprometida e reserva hepática inadequada para o tratamento de todo o fígado.

Uma ou duas semanas mais tarde, os doentes são injectados com microesferas de  $Y^{90}$ . Doentes com envolvimento bilobar são tratados numa única sessão ou usando tratamentos lobares sequenciais, de acordo com os protocolos locais, com 4-6 semanas de intervalo. A alta habitualmente ocorre no dia após o procedimento.

Os estudos de coorte que relatam resultados a longo prazo mostraram uma sobrevivência mediana de 17,2 meses nos doentes no estágio intermédio (Salem R *et al.*, 2010) e de 12 meses nos doentes em estágio avançado e invasão da veia porta

(Kulik LM *et al.*, 2008; Sangro B *et al.*, 2009; Hilgard P *et al.*, 2010). As taxas de resposta objectiva variam entre 35% e 50% (Kulik LM *et al.*, 2008; Salem R *et al.*, 2010; Hilgard P *et al.*, 2010). Cerca de 20% dos doentes apresentam toxicidade hepática e a mortalidade relacionada com o tratamento é de 3% (Salem R *et al.*, 2010).

Apesar da quantidade de dados disponíveis, não existem RCTs que comparem a eficácia da radioembolização com a quimioembolização e o sorafenib, em doentes em estágio intermédio e avançado, respectivamente.

### **1.10. Outros tratamentos loco-regionais paliativos**

O uso de radioterapia de feixe externo convencional no tratamento do CHC tem sido limitado pela baixa tolerância do fígado cirrótico à radiação, que muitas vezes resultou em doença hepática, anteriormente conhecida como hepatite induzida pela radiação (Cheng JC *et al.*, 2002). Os benefícios da radioterapia tridimensional externa conformacional foram apenas testados em investigações não controladas. Não existe nenhuma evidência científica que permita recomendar estas terapêuticas no CHC (Ben-Josef E *et al.*, 2005).

### **1.11. Terapêuticas sistémicas moleculares**

A hepatocarcinogénese é um processo em várias etapas, complexo, onde múltiplas cascatas de sinalização estão alteradas, conduzindo a uma grande heterogeneidade biológica da doença (Roberts LR, Gores GJ, 2005; Farazi PA, DePinho RA, 2006; Villanueva A *et al.*, 2007).

Várias vias têm sido implicadas na progressão e difusão do tumor:

(1) O factor de crescimento vascular (VEGF), a pedra angular da angiogénese no CHC (Semela D, Dufour JF, 2004; Chiang DY *et al.*, 2008), pode ser alvejado pelo anticorpo monoclonal bevacizumab dirigido contra o VEGF, ou através da inibição da tirosina

quinase intracelular por pequenas moléculas como o sorafenib, sunitinib, brivanib, linifanib, vatalinib, cediranib, entre outros;

(2) O factor de crescimento epidérmico (EGF) é frequentemente sobre-expresso no CHC (Ito *et al.*, 2009) e é o alvo do anticorpo monoclonal cetuximab e de pequenas moléculas que inibem a tirosina-quinase intracelular, tais como o erlotinib, o gefitinib, ou o lapatinib;

(3) O factor de sinalização Ras da MAPK tem mostrado estar activado em metade dos CHCs iniciais e em quase todos os avançados (Calvisi DF *et al.*, 2006; Villanueva A *et al.*, 2007), as mutações de K-Ras são raras no CHC (inferiores a 5%) e nenhum inibidor Ras/ERK/MAPK selectivo foi aprovado, mas o sorafenib e o regorafenib bloqueiam parcialmente esta cascata (Wilhelm SM *et al.*, 2008);

(4) A via PI3K/PTEN/Akt/mTOR controla a proliferação, o ciclo celular e a apoptose e é activada por vários RTKs, tais como o EGFR ou IGFR e por inactivação do supressor de tumor PTEN. Está ativado em 40-50% dos CHCs (Sahin F *et al.*, 2004; Villanueva A *et al.*, 2008) e vários compostos inibidores mTOR (rapamicina, temsirolimus e everolimus) estão a ser testados em estudos de fase II e III;

(5) Quanto à via HGF/c-MET, a desregulação do receptor de c-MET e do seu ligando HGF, crítica para a regeneração de hepatócitos após lesão hepática, é um evento comum no CHC (Takami T *et al.*, 2007), mas o seu papel na terapêutica-alvo necessita de maior investigação;

(6) O receptor de sinalização do fator de crescimento semelhante à insulina (IGFR), o IGF-1R e a expressão de IGF-II estão aumentados no CHC, embora o IGF-II esteja reprimido num subgrupo de CHCs (Breuhahn K, Longerich T, Schirmacher P, 2006; Tovar V *et al.*, 2010) e vários inibidores de IGF -1R já estão sob investigação clínica precoce no CHC;

(7) A via Wnt /  $\beta$  -catenina é crucial para a hepatocarcinogénese (De La Coste A *et al.*, 1998; Colnot S *et al.*, 2004; Villanueva A *et al.*, 2005; Roberts LR, Gores GJ, 2005; Farazi PA, DePinho RA, 2006; Zucman-Rossi J *et al.*, 2007) e está activada em cerca de um

terço dos CHC (particularmente os relacionados com o VHC), estando sob investigação clínica inicial novos compostos para a bloquear.

### 1.11.1. Sorafenib

Cerca de 20 terapêuticas moleculares foram aprovadas nos últimos anos para doentes com tumores malignos, nomeadamente da mama, colo-rectal, do pulmão de células não-pequenas, carcinoma de células renais e CHC, entre outros. Recentemente, um inibidor multiquinase, o sorafenib, mostrou benefícios na sobrevivência em doentes com CHC avançado, representando um avanço no tratamento desta complexa doença e mostrando que as terapêuticas moleculares podem ser eficazes neste tipo de tumor.

É fundamental uma melhor compreensão da hepatocarcinogénese molecular para a identificação de alvos terapêuticos. Sabe-se que não existe nenhum mecanismo molecular patognomónico ou dominante e isso explica por que razão um medicamento com um único alvo não vai conseguir resposta mantida completa no CHC. Consequentemente, é concebível inibir os sinais a diferentes níveis de uma das principais vias, ou inibir duas ou três vias diferentes ao mesmo tempo.

O carcinoma hepatocelular é conhecido como um dos tumores mais quimio-resistentes e até 2007 nenhum medicamento sistémico foi recomendado para doentes com tumores avançados, uma situação sem paralelo em oncologia.

O sorafenib surgiu como o primeiro tratamento sistémico eficaz no CHC, após 30 anos de pesquisas, continuando a ser o único medicamento que até hoje demonstrou benefícios na sobrevivência em doentes com CHC em estágio avançado (Llovet JM, Ricci S, *et al.*, 2008; Daniele G, *et al.* 2013).

Após um estudo inicial de fase II que mostrou alguma eficácia (Abou-Alfa GK *et al.*, 2006), uma grande investigação de fase III, em dupla ocultação, controlada com placebo foi realizada e evidenciou resultados positivos, com um aumento da sobrevivência global mediana de 7,9 meses no grupo placebo para 10,7 meses no grupo do sorafenib (HR = 0,69, IC 95%, 0,55-0,87, p = 0,00058), o que representa uma

redução de 31% no risco relativo de morte. Além disso, o sorafenib mostrou um benefício significativo em termos de tempo para progressão (TTP) avaliado por revisão radiológica independente, com um TTP mediano de 5,5 meses, para o sorafenib e 2,8 meses para o placebo (Llovet JM, Ricci S, *et al.*, 2008).

A mesma magnitude do benefício foi encontrada num ensaio de Fase III conduzido na população Ásia-Pacífico, em que a hepatite B foi a principal causa de CHC, observando-se sobrevivência global mediana de 6,5 meses no grupo do sorafenib e de 4,2 meses no grupo placebo (HR = 0,68, IC 95%, 0,50-0,93,  $p = 0,014$ ) (Cheng AL *et al.*, 2009). O pior resultado dos doentes incluídos neste estudo, em comparação com o SHARP, deveu-se ao facto de terem doença mais avançada (ECOG 1-2 ou doença metastática).

Nestes estudos o sorafenib foi bem tolerado, sendo os efeitos adversos de grau 3 mais comuns a diarreia e a reacção cutânea mão-pé, que ocorreram em 8-9% e 8-16% dos doentes, respectivamente. Houve descontinuação da medicação devido a efeitos adversos em 15% dos doentes no braço sorafenib e em 7% no grupo placebo. Os efeitos adversos relacionados com o medicamento foram considerados manejáveis e não foi descrito nenhum óbito relacionado com toxicidade. Como resultado, o sorafenib recebeu autorização da Agência Europeia de Medicamentos (EMA) em Outubro de 2007 e foi aprovado nos EUA, pela Food and Drug Administration (FDA), em Novembro de 2007.

Actualmente, recomenda-se a utilização de sorafenib em doentes com função hepática preservada (classe A de Child- Pugh) e tumores avançados (BCLC C), ou tumores em progressão sob terapêuticas loco-regionais (conceito de migração de tratamento). Não existe recomendação clara em doentes Child-Pugh B, embora estudos de coorte tenham relatado um perfil de segurança semelhante em doentes desta classe, que não tenham descompensação (Kim JE *et al.*, 2011; Hollebecque A *et al.*, 2011).

O tratamento com sorafenib deve manter-se até existir progressão da doença e, quando esta ocorre, podem ser consideradas terapêuticas experimentais de segunda linha. Este medicamento está actualmente a ser testado no estágio inicial como adjuvante, após ressecção ou ablação local, em combinação com quimioembolização no estágio intermédio (Dufour JF *et al.*, 2010), em associação ao erlotinib ou a

doxorrubicina sistêmica em estágio avançado, e como tratamento de primeira linha em doentes Child-Pugh B. Dados preliminares de um estudo aleatorizado de fase II sugerem um potencial efeito aditivo em combinação com a doxorrubicina, embora com um significativo aumento da cardiotoxicidade (Abou-Alfa GK *et al.*, 2010).

### 1.11.2. Outras moléculas-alvo em desenvolvimento clínico

#### **Inibidores de factores de crescimento e da via proliferativa**

1) Inibidores de mTOR - A rapamicina (sirolimus) e os seus análogos (temsirolimus e everolimus) são agentes de bloqueio da sinalização da cascata mTOR e foram testados em investigações pré-clínicas e clínicas precoces (Decaens T *et al.*, 2008); o everolimus, um bloqueador de mTOR aprovado para tratamento do carcinoma de células renais, está a ser testado em fase III como indicação de segunda linha.

2) Inibidores de EGFR - Cinco inibidores de EGFR foram testados: erlotinib, gefitinib, cetuximab, lapatinib e vandetanib; o erlotinib mostrou atividade num estudo de fase II com populações mistas de CHC, com mediana de sobrevivência de 13 meses (Philip PA, *et al.*, 2005) e atualmente está a ser testado em combinação com sorafenib, em fase III. Os outros medicamentos ou não têm mostrado sinais significativos de eficácia na fase II, como o gefitinib e o lapatinib (Bekaii-Saab T *et al.*, 2009), ou ainda estão em fase inicial de investigação.

#### **Agentes anti-angiogénicos**

1) O sunitinib é um inibidor multi-tirosinaquinase oral, aprovado para o tratamento de carcinoma de células renais, tumores estromais gastrointestinais e tumores neuroendócrinos do pâncreas. Três estudos de fase II demonstraram potenciais sinais de eficácia, mas com efeitos adversos significativos e mortes relacionadas com o tratamento, devido à disfunção hepática grave em 5-10% dos doentes (Favre S *et al.*,

2009; Zhu AX *et al.*, 2009; Koeberle D *et al.*, 2010). Um estudo multicêntrico recente, de fase III, randomizado, aberto, controlado vs sorafenib, foi prematuramente interrompido por questões de segurança e razões de futilidade (Cheng A *et al.*, 2011).

2) O alaninato de brivanib, um VEGFR e FGFR inibidor da tirosina-quinase, oral, foi avaliado em dois estudos de fase II em primeira linha, e em doentes de segunda linha, com tumor avançado. A mediana global da sobrevivência foi de 10 meses no grupo de primeira linha e de 9,8 meses no grupo tratado em segunda linha, com eventos adversos manejáveis (Park JW *et al.*, 2011). Está actualmente a ser testado em três ensaios de fase III, em doentes com CHC: em primeira linha *versus* sorafenib, em segunda linha *versus* placebo, e em combinação com quimioembolização.

3) O bevacizumab, um anticorpo monoclonal recombinante humanizado dirigido contra o VEGF, emergiu como um importante agente terapêutico em várias doenças malignas e foi aprovado para o tratamento do cancro colorretal, cancro do pulmão de não pequenas células, e carcinoma da mama. Foi avaliado como agente único (Siegel AB *et al.*, 2008) e em combinação com erlotinib (Thomas MB *et al.*, 2009) e quimioterapia (Zhu AX *et al.*, 2006). Como terapêutica única apresentou respostas objectivas de 10%, com tempo médio para progressão de 6,5 meses. O tratamento de combinação de bevacizumab com agentes EGFR atingiu uma mediana de sobrevivência de 15 meses (Thomas MB *et al.*, 2009). As associações de bevacizumab com quimioterapia, nomeadamente gemcitabina, oxaliplatina, ou regimes baseados em capecitabina, obtiveram respostas objectivas de 10-20%, com mediana de sobrevivência de 9-10 meses (Zhu AX *et al.*, 2006). Não estão a decorrer estudos de fase III com este medicamento.

4) O linifanib (um inibidor oral da tirosina-cinase, dirigido ao VEGF e ao PDGF) e o ramucirumab (um anticorpo monoclonal contra VEGFR2) estão actualmente a ser testados em estudos de fase III em primeira e segunda linha, respectivamente (Spratlin JL *et al.*, 2010). Outros novos anti-angiogénicos, tais como vatalanib, axitinib e cediranib estão numa fase muito inicial de investigação. Outras moléculas, tais como inibidores c-MET, inibidores de MEK, TGF-beta e JAK2 estão a ser testadas em estudos clínicos iniciais (Villanueva A, Llovet JM, 2011).

## 1.12. Outras terapêuticas sistêmicas

Vários tratamentos sistêmicos, incluindo quimioterapia, compostos hormonais, imunoterapia e outros, mostraram resultados inconclusivos ou negativos. Esses medicamentos não são actualmente recomendados para o tratamento do CHC.

### 1.12.1. Quimioterapia

O problema da utilização de quimioterapia no CHC decorre da coexistência de duas doenças. A cirrose pode alterar o metabolismo dos fármacos e aumentar a sua toxicidade. Além disso, algumas complicações relacionadas com a quimioterapia, nomeadamente infecções sistêmicas, são particularmente graves em doentes cirróticos. Por outro lado, o CHC demonstrou ser resistente à quimioterapia mais comum, tendo estes medicamentos demonstrado uma resposta anti-tumoral bastante modesta, quando utilizados isoladamente (Llovet JM, Bruix J, 2003; Yeo W *et al.*, 2005; Taieb J, Barbare JC, Rougier P, 2006; Gish RG *et al.*, 2007).

A doxorubicina sistémica foi avaliada em mais de 1000 doentes, em ensaios clínicos com taxa de resposta objectiva de cerca de 10%. Num ensaio com 446 doentes, um inibidor da timidilato-sintetase, nolatrexed, foi comparado com a doxorubicina sistémica, com resultados negativos (sobrevivência mediana 5 meses versus 7,5 meses, respectivamente) e as taxas de resposta para o braço de doxorubicina, de 4 %. (Gish RG *et al.*, 2007).

Outras terapêuticas sistêmicas, utilizando gemcitabina, oxaliplatina, cisplatina e capecitabina, individualmente ou em combinação, em estudos não controlados, mostraram respostas heterogéneas, que vão de 0 a 18% (Taieb J, *et al.* 2006).

A quimioterapia sistémica associando dois ou mais medicamentos foi testada em RCTs recentes. Um ensaio de grandes dimensões comparou quimioterapia combinada incluindo cisplatina, interferão alfa2b, doxorubicina e 5-fluorouracilo (regime PIAF)

com doxorrubicina, mostrando taxas de resposta objectiva de 20,9% e 10,5%, respectivamente (Yeo W *et al.*, 2005). A sobrevivência média dos grupos PIAF e doxorrubicina não foi significativamente diferente: 8,67 meses e 6,83 meses, respectivamente. A PIAF foi associada a uma taxa significativamente mais elevada de mielotoxicidade, em comparação com a doxorrubicina. A mortalidade relacionada com o tratamento foi de 9% no braço PIAF, como resultado da reactivação do VHB e insuficiência hepática.

Um segundo ensaio, realizado na Ásia, comparou a eficácia do regime Folfox (5-fluorouracilo, ácido folínico e oxaliplatina) com doxorrubicina, em 371 doentes com CHC avançado, Child-Pugh A/B, metastático ou não operável (BCLC B/C). Houve uma tendência não significativa de melhoria da sobrevivência no grupo Folfox (sobrevivência mediana de 6,4 contra 4,9 meses;  $p = 0,07$ ), associada a um maior tempo para progressão (2,9 contra 1,7 meses) (Qin S *et al.*, 2010).

A quimioterapia para o CHC em doentes não-cirróticos é uma área pouco explorada (Edeline J *et al.*, 2009). Considerando as evidências disponíveis, a quimioterapia sistémica não é recomendada para tratamento do CHC, nem como regime de controlo para qualquer ensaio, devido aos efeitos tóxicos conhecidos. Estão a decorrer estudos de fase III, combinando quimioterapia e sorafenib.

### 1.12.2. Compostos hormonais

Os compostos hormonais não demonstraram benefícios de sobrevivência no CHC. Uma meta-análise de sete RCTs, composta por 898 doentes, comparou o tamoxifeno com tratamento conservador e não encontrou efeitos anti-tumorais, nem benefícios de sobrevivência com o tamoxifeno (Llovet JM, Bruix.J, 2003). Dois grandes RCTs foram posteriormente publicados (Chow PK *et al.*, 2002; Barbare JC *et al.*, 2005), mostrando resultados negativos, em termos de sobrevivência, com tamoxifeno. Assim, este tratamento não é recomendado no CHC.

A terapêutica anti-androgénica também não está recomendada (Grimaldi C *et al.*, 1998).

### 1.12.3. Imunoterapia

O CHC é um tumor maligno tipicamente associado a inflamação. Alguns estudos têm demonstrado uma correlação entre resposta imune a tumores e evolução dos doentes (Greten TF, Manns MP, Korangy F, 2006). Ensaios de fase I-II com terapêutica imune foram executados em centros credenciados, mas os resultados não foram confirmados por investigadores independentes (Greten TF, Manns MP, Korangy F, 2008). O conceito de imunoterapia requer novas investigações de fase II e III.

### 1.12.4. Outros tratamentos

Um grande RCT comparou seocalcitol (uma molécula antiproliferativa semelhante à vitamina D) com placebo em 746 doentes e não foram objectivadas diferenças na sobrevivência global (9,6 meses com seocalcitol vs 9,2 meses com placebo) (Beaugrand M *et al.*, 2003). Foram também reportados resultados negativos com um inibidor da tubulina (T-67) num grande RCT, multicêntrico (Posey J *et al.*, 2005).

## 2. ESTUDO METABOLÓMICO COM ESPECTROSCOPIA DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE PROTÃO (RMN de <sup>1</sup>H) EM TUMORES MALIGNOS

### 2.1. Conceitos

Em termos gerais, designa-se por metabolismo o conjunto de reações químicas que ocorrem numa célula, a partir de nutrientes captados do meio ambiente, sendo a energia e os componentes básicos (amino ácidos, nucleotídeos, lipídios, etc.) utilizados para realização dos processos essenciais, incluindo a síntese de novas moléculas, com destruição e remoção concomitante de outras substâncias.

Esses componentes básicos e os intermediários bioquímicos gerados durante a sua produção e utilização são designados coletivamente por metabolitos. Os seus níveis traduzem os efeitos da regulação dos genes e pós-transcricional, das interações de vias e também de perturbações ambientais. Esta síntese a jusante de diversos sinais faz com que os metabolitos proporcionem leituras moleculares directas do *status* das células, reflectindo um fenótipo fisiológico (Assfalg M et al, 2008; O'Connell TM, 2012).

Metabolómica foi o termo introduzido por Fien *et al.* (Fien O *et al.*, 2000; Raamsdonk L M *et al.*, 2001), que designa o estudo sistemático de substâncias de baixo peso molecular em células, tecidos e/ou organismos inteiros, influenciadas por vários fatores, incluindo genética, dieta, estilo de vida e intervenções farmacêuticas.

Steve Oliver, da Universidade de Manchester, utilizou o termo metabolómica para descrever “o conjunto completo de metabolitos/intermediários de baixo peso molecular, dependentes do contexto e da fisiologia, estado de desenvolvimento ou patológico da célula, tecido, órgão ou organismo” (Oliver SG 2002).

Estas substâncias podem, direta ou indiretamente interagir com alvos moleculares e, assim, influenciar o risco e as complicações associadas a várias doenças, incluindo tumores malignos. Uma vez que a interação entre metabolitos e alvos específicos é dinâmica, o conhecimento sobre genética, fatores de susceptibilidade, oportunidade e

grau de exposição a um agente (medicamento ou ingrediente alimentar) é fundamental para a compreensão do metaboloma e seu uso potencial para a previsão e prevenção de alterações fenotípicas precoces. O futuro da metabolómica assenta na sua capacidade de monitorizar mudanças subtis no metaboloma, que ocorrem antes da detecção de uma mudança fenotípica grosseira, refletindo uma doença (Kim YS *et al.*, 2008).

As alterações metabólicas estão entre as primeiras respostas celulares a mudanças fisiológicas ou do meio ambiente e, portanto, a metabolómica é potencialmente capaz de diagnosticar uma doença ou avaliar a eficácia de uma terapêutica numa fase muito precoce.

A metabolómica é um campo emergente, focado na obtenção de perfis abrangentes de metabolitos numa amostra, seja tecidual ou de fluidos biológicos circulantes. A sua capacidade para medir de forma altamente rentável fenótipos de todo o sistema confere-lhe um potencial enorme no campo da oncologia, para compreender o que efectivamente acontece nas células tumorais (Vermeersch KA e Styczynski MP, 2013).

## **2.2. Alterações do metabolismo celular nos tumores malignos**

Apesar da reprogramação do metabolismo energético só recentemente ser reconhecida como uma marca emergente de malignidade, a alteração do metabolismo dos tumores malignos foi identificada pela primeira vez há quase um século, quando Warburg descobriu que as células tumorais utilizam sobretudo a glicólise anaeróbia para produzir energia, em vez da fosforilação oxidativa, mesmo na presença de oxigénio. Esse fenómeno é conhecido como efeito de Warburg, ou glicólise aeróbica (Warburg O *et al.* 1924; Warburg O, 1956).

Ao longo dos anos têm sido identificadas muitas mutações que apoiam o efeito Warburg. A AKT1 (uma serina/treonina-quinase), o factor indutor de hipoxia (HIF) e o p53 (uma proteína supressora tumoral), em conjunto, causam aumento do fluxo de glicose através da glicólise e da sub-regulação de fluxo através do ciclo do ácido

tricarboxílico (TCA), apoiando assim o efeito Warburg e a carcinogénese. (Elstrom RL, *et al.* 2004; Isaacs JS, *et al.* 2005).

As mutações com perda da função da enzima succinato desidrogenase (SDH) e fumarato hidratase (FH) mitocondriais também apoiam o efeito Warburg pela via da acumulação de succinato e fumarato, metabólitos que inibem as prolin hidroxilases (PHD), uma família de enzimas que promovem a degradação do HIF (Selak MA, *et al.* 2005; MacKenzie ED, *et al.* 2007). Assim, as mudanças na SDH e FH levam à acumulação de HIF, que por sua vez suporta a carcinogénese e o efeito Warburg.

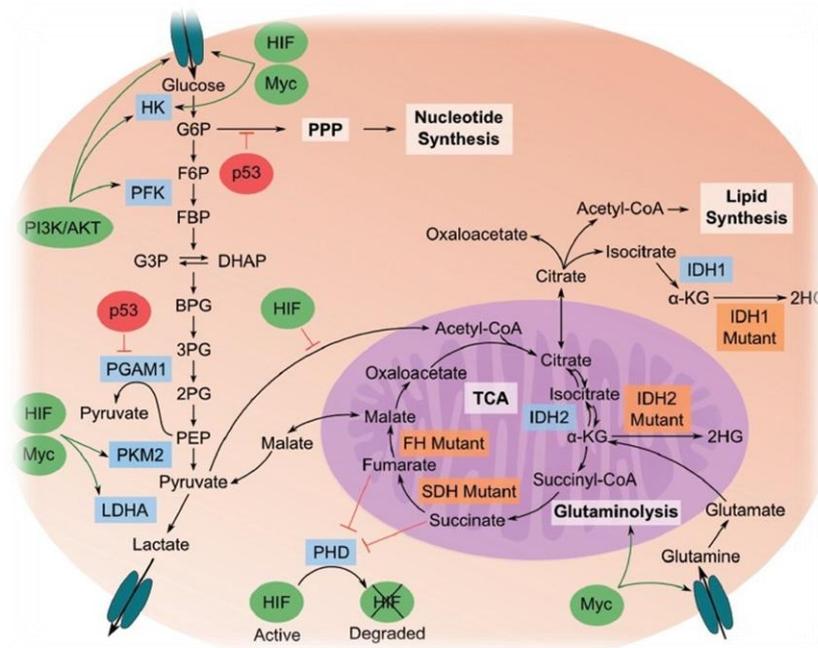
Outra importante via do metabolismo que está alterada nos tumores é a glutaminólise, uma fonte-chave de energia e de precursores anapleróticos para o ciclo do TCA (DeBerardinis RJ, *et al.* 2007). Myc, um factor de transcrição oncogénico, interage com HIF para regular várias enzimas do metabolismo da glicose e desempenha um papel importante na glutaminólise (Dang CV *et al.* 2008; Dang CV, 2010). Além de estimular o transportador de glutamina, Myc, indiretamente, regula a glutaminase (GLS), uma enzima mitocondrial que converte a glutamina em glutamato, através da repressão transcricional dos microRNAs que reprimem a GLS (Gao P, *et al.* 2009).

A piruvato quinase (PK) é outra assinatura tumoral comum, com implicações metabólicas (Figura 1.7). A PK catalisa a fosfoenolpiruvato (PEP), conduzindo à sua conversão em piruvato, um passo limitante da taxa da glicólise. Acredita-se que durante a carcinogénese exista uma mudança na expressão das isoformas PK, da isoenzima M1 da piruvatoquinase para a menos ativa e limitante, isoenzima M2 (PKM2) (Vander Heiden MG *et al.* 2009), levando, potencialmente, a uma acumulação de intermediários glicolíticos a montante. Outras alterações do metabolismo existentes no cancro vão evitar tal acumulação (que levaria à diminuição da regulação da glicólise), canalizando esses intermediários para a produção de níveis mais elevados de produtos finais dessas vias, como o fosfato de nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADPH), ribose 5-fosfato, e ácidos nucleicos (Vander Heiden MG, *et al.* 2009; Jiang P *et al.* 2011).

Além disso, existe uma via alternativa para a fermentação do piruvato, recentemente descoberta, que converte PEP em piruvato através da fosforilação directa da

fosfoglicerato mutase 1 (PGAM1), sem a produção de trifosfato de adenosina (ATP). Ao desvincular a geração de energia a partir da glicólise, a produção de piruvato a partir de PEP continua, independentemente da regulação do ATP, ou da dependência de PKM2. Esta produção contínua de piruvato, juntamente com a glutaminólise, justifica os níveis caracteristicamente elevados de ácido láctico existentes nos tumores.

As células tumorais captam mais glutamina, que vai alimentar o ciclo do TCA, levando a uma produção de mais citrato, sendo este transportado para o citosol por proteínas de transporte de citrato (CTP). Por sua vez o citrato citosólico é convertido em acetil CoA que alimenta a síntese de ácidos gordos e de colesterol (Figura 1.8).



**Figura 1.8** – Alterações do metabolismo celular nas células tumorais. (Adaptado de: Vermeersch KA and Styczynski MP; 2013)

### 2.3. Tecnologia analítica

Devido à significativa diversidade química dos metabolitos, actualmente não existe um método analítico que permita medir a concentração de todos eles. As duas tecnologias metabolómicas dominantes são a ressonância magnética nuclear de protão (RMN) e a espectrometria de massa (EM) acoplada a uma técnica de separação.

A metabolómica envolve algumas etapas metodológicas, nomeadamente: 1) análise directa de tecidos e biofluidos, ou extracção de metabólitos, a partir de tecidos ou de células; 2) métodos de quantificação das mudanças metabólicas observadas; 3) metodologia de análise de dados (Nagrath D *et al.*, 2011).

A EM fornece informações semi-quantitativas, com elevada sensibilidade, permitindo a análise de metabólitos pouco abundantes. Muitas técnicas baseadas em EM exigem extensa preparação das amostras e geralmente apenas podem avaliar subconjuntos específicos de metabolitos. Podem ser divididas em técnicas de injeção directa, incluindo EM de infusão directa (Lin L *et al.*, 2010) e EM com análise directa em tempo real (DART-EM) (Zhou M *et al.*, 2010) e técnicas de acoplamento de separação, incluindo EM com cromatografia gasosa, com cromatografia líquida e EM com electroforese capilar.

A RMN fornece informação quantitativa e estrutural e permite determinar uma grande variedade de metabolitos, com pouca ou nenhuma preparação da amostra. Uma limitação da RMN é a sua baixa sensibilidade e, assim, os limites de detecção de metabolitos são mais elevados. Além disso, nas misturas complexas a interpretação dos espectros e a identificação específica dos metabólitos pode ser difícil.

Outra tecnologia emergente, a RMN hiperpolarizada, tem sido utilizada para caracterizar o metabolismo dos tumores malignos traçando os níveis de metabolitos *in vivo* (Marin-Valencia I, *et al.* 2012), com potenciais aplicações no diagnóstico clínico e no tratamento de neoplasias (Kurhanewicz J, *et al.* 2011).

## 2.4. Estudos metabolómicos com RMN $^1\text{H}$ de HRMAS em tumores

A RMN possibilita a análise da composição química de tecidos biológicos, permitindo a observação do perfil metabólico tumoral. Este método pode ser efectuado em extratos de tecidos, tendo sido utilizado no estudo de vários tumores malignos, nomeadamente cerebrais, da mama, do cólon e do pulmão. Os métodos de extração utilizados podem, no entanto, causar perda ou modificação química de componentes celulares, limitando a informação sobre os verdadeiros acontecimentos metabólicos que ocorrem *in vivo* (Duarte IF *et al.*, 2010).

A espectroscopia com RMN  $^1\text{H}$  de *High-resolution magic angle spinning* (HRMAS) tem a vantagem de permitir a caracterização directa de tecidos intactos, possibilitando a deteção simultânea de lipídeos e pequenos metabolitos, com uma resolução comparável à da RM de líquidos. Fornece uma imagem mais realista e próxima dos perfis metabólicos, sendo cada vez mais utilizada para analisar células e tecidos, com particular ênfase em estudos de tumores malignos (Sitter B *et al.*, 2009). Com efeito, esta técnica mostrou ser muito importante para complementar e corroborar estudos de espectroscopia por RMN não invasiva *in vivo* (habitualmente caracterizados por má resolução), permitindo também obter a quantificação de dados (Swanson MG *et al.*, 2003; Tugnoli V *et al.*, 2006; Mountford C *et al.*, 2006; Thomas MA *et al.*, 2009; Wilson M, 2009).

Muita da investigação realizada baseia-se na diferenciação metabólica entre tecido tumoral e tecido envolvente, tentando encontrar possíveis biomarcadores indicativos da presença e/ou grau de diferenciação de vários tipos de tumores (mama, cérebro, próstata, cervical, colo-rectal, hepático, renal, gástrico). Mais do que apresentar dados individuais de metabolitos, têm sido aplicados métodos estatísticos de análise multivariada para estudar variações nos perfis completos, tentando encontrar correlações entre os achados metabólicos e histológicos ou clínicos, tendo como objectivo facilitar o diagnóstico e/ou ajudar na definição do prognóstico. Por exemplo, o fenótipo metabólico do cancro da mama mostrou ser potencialmente útil para prever o grau histológico, estado hormonal e invasão ganglionar (Sitter B *et al.*, 2006; Bathen TF *et al.*, 2007) e o perfil metabólico dos oligodendrogliomas revelou uma boa

correlação com o grau de malignidade e também com o prognóstico dos doentes (Erb G *et al.*, 2008).

Relativamente ao cancro do pulmão, existem também alguns trabalhos baseados na análise de extratos de tecidos tumorais e, recentemente, foi publicado o resultado da análise directa de HRMAS em tecidos de carcinoma de células escamosas e adenocarcinomas pulmonares. (Rocha C M *et al.*, 2010). O estudo, realizado no nosso país, mostrou, pela primeira vez, a diferença metabólica entre tumor pulmonar e tecido adjacente, não envolvido, fornecendo uma caracterização da composição metabólica do tecido pulmonar humano. Foram incluídas amostras emparelhadas de 12 tumores do pulmão. Duas delas foram analisadas com vista a servirem de assinatura e avaliação de estabilidade; as restantes 10 foram estudadas por métodos quimiométricos, sobretudo *principal component analysis* (PCA) e *hierarchical cluster analysis* (HCA). O objectivo foi investigar o potencial da metabólica baseada na RMN, na caracterização do fenótipo metabólico do cancro do pulmão, para obter conhecimento bioquímico e encontrar eventuais marcadores de malignidade, com potencial valor diagnóstico. Atendendo ao número limitado de amostras em cada sub-grupo de doentes, apenas foi investigado o perfil metabólico geral do cancro do pulmão, comparando-o com o tecido não tumoral. Como é realçado no estudo, o próximo passo (com mais amostras de cada tipo histológico) deverá ser no sentido de comparar os perfis metabólicos dos diversos tipos de tumor, tentando identificar diferenças no seu metabolismo que possam ser utilizadas para melhorar a acuidade de diagnóstico/prognóstico.

Posteriormente, o mesmo grupo publicou outro trabalho onde este objectivo foi conseguido. Foram analisadas por RMN  $^1\text{H}$  de HRMAS amostras emparelhadas de 24 tumores pulmonares, e os seus perfis espectrais submetidos a PCA e *Partial Least Squares Regression Discriminant Analysis* (PLS-DA). Esta última análise permitiu a discriminação entre tumor e parênquima adjacente com uma sensibilidade de 95% e especificidade de 100%. Foi ainda possível discriminar adenocarcinomas de tumores carcinoides e carcinomas epidermóides, existindo diferenças nos níveis de metabólitos entre estes tipos histológicos, sugerindo que esta técnica possa ajudar no diagnóstico diferencial dos carcinomas bronco-pulmonares (Iola F. Duarte *et al.*, 2010).

## 2.5. Estudos metabólicos com espectroscopia de RMN $^1\text{H}$ no CHC

### 2.5.1. Em tecidos

Um estudo feito em carcinomas hepatocelulares (Yang Y *et al.* 2007) visou caracterizar, com RMN  $^1\text{H}$  de HRMAS, o metaboloma de tumores de baixo e alto grau, comparando o tecido tumoral com o tecido adjacente, não envolvido, tendo como objectivos explorar o potencial deste método na caracterização bioquímica do CHC humano, desenvolver métodos de classificação das amostras, com vista a uma graduação dos CHC e compreender os efeitos de factores patológicos concorrentes (tais como cirrose), nas características metabólicas do CHC.

Foram obtidas 31 amostras, de 17 doentes, sendo o tecido adjacente, não envolvido, recolhido de 14 doentes e utilizado como controlo negativo. Uma parte da amostra foi para análise espectroscópica e outra para exame anátomo-patológico (fixada em formalina a 10%). As amostras de tecido para espectroscopia (15-25 mg) foram lavadas com  $\text{D}_2\text{O}$  para remover o sangue e poderem fornecer sinal para serem examinadas por RMN, colocando cada amostra num rotor de 4 mm.

Em análise multivariada verificaram-se diferenças metabólicas claras entre o tumor e o tecido envolvente, não tumoral, traduzidas por aumento dos ácidos biliares, colina, fosforiletanolamina, fosfocolina, glicerofosfocolina, glutamato, glutamina, glicina, alanina e leucina e diminuição dos níveis de lipídios, glicose e glicogénio. Foi também possível neste estudo separar, com base no metaboloma, tumores de alto e de baixo grau. Os resultados indicaram que as alterações dominantes na bioquímica dos CHC eram alterações do metabolismo energético e do ciclo TCA. A necrose acompanhou-se de elevação drástica nos níveis de lipídeos, tendo a cirrose provocado aumento significativo dos níveis de lactato, fosfocolina/glicerofosfocolina nos tumores de baixo grau. Os autores concluíram que a espectroscopia por RMN constitui uma ferramenta poderosa, pois fornece uma informação metabólica detalhada, importante para o desenvolvimento de novos métodos de diagnóstico do CHC e provavelmente também com impacto na avaliação de resultados à terapêutica.

Recentemente, foi publicado um outro trabalho (Solinas A *et al.* 2013) que teve como objectivo avaliar alterações metabólicas associadas ao CHC (oncogénese e progressão tumoral). Foram comparados os perfis obtidos por espectroscopia por RMN com HRMAS em 51 biópsias (14 nódulos primários, 14 recorrências tumorais e 23 espécimens cirróticos). O diagnóstico de CHC foi baseado em duas técnicas de imagem concordantes, sendo confirmado por histologia em 20 casos. A espectroscopia foi realizada com um espectrómetro Bruker AVANCE II 600 e os espectros de prótons unidimensionais foram adquiridos utilizando pulsos de supressão de água (noesygppr) e *spin-echo CPMG sequences*. Os sinais foram atribuídos por BBIREFCODE e confirmados por HSQC. A *orthogonal projection to latent structure* (OPLS-DA) mostrou uma diferença clara entre tumores e tecido hepático não tumoral. A OPLS-DA de nódulos primários e recorrentes também mostrou uma diferença significativa.

A relação entre o perfil metabólico e a dimensão do CHC foi avaliada comparando os espectros obtidos em tumores com menos de 2 cm (n = 15) e mais de 2 cm (n = 11). A análise univariada da maior parte dos metabólitos mostrou que: (1) o aumento de colina, TMAO (Trimethylamine *N*-oxide) e a diminuição de ácidos gordos saturados diferenciava o CHC do tecido circundante; (2) o aumento de lactato e mio-inositol diferenciava tumores recorrentes de CHCs primários; e (3) a diminuição de ácidos gordos saturados caracterizava grandes nódulos de CHC.

### 2.5.2. Em biofluidos

Os estudos metabolómicos podem também ser realizados em fluidos biológicos, nomeadamente em sangue e/ou urina.

Foi efectuado um trabalho com o objectivo de investigar a diferença metabólica urinária entre doentes com CHC (n=20) e controlos normais (n=20). O metaboloma endógeno urinário foi determinado usando a derivatização química, seguido por cromatografia gasosa/espectrometria de massa (CG/EM). Após análise por CG/EM foram detectados 103 metabólitos, dos quais 66 foram anotados como compostos conhecidos. Os metabólitos foram significativamente diferentes entre os grupos com

CHC e os controlos. Foi construído um modelo de diagnóstico com uma combinação de 18 metabólitos, usando análise de PCA e curvas ROC. A estatística multivariada do modelo de diagnóstico mostrou uma separação entre os dois grupos, com uma área sob a curva de 0,9275 (Wu H *et al.* 2009).

A fim de identificar o risco de cancro, foi realizado com espectroscopia de RMN <sup>1</sup>H, o perfil metabólico de amostras de soro de doentes com carcinoma hepatocelular (n=40) e com cirrose por VHC (n=22). A análise estatística multivariada mostrou uma separação distinta dos dois grupos, indicando uma diferença metabólica entre eles, com base em sinais de lípidos e outros metabólitos individuais. A análise univariada mostrou que três metabólitos (colina, valina e creatinina) estavam significativamente alterados no CHC. Um modelo PLS-DA com base nestes três metabólitos mostrou sensibilidade de 80%, especificidade de 71% e uma área sob a curva de 0,83, superando a AFP. A robustez do modelo foi testada usando validação cruzada Monte-Carlo (MCCV). Este estudo mostrou que perfis de metabólitos podem vir a proporcionar uma abordagem alternativa para o rastreio de CHC em doentes com VHC, muitos dos quais têm alto risco de desenvolver CHC (Siwei Wei *et al.*, 2012).

## **2.6. Conclusões e perspectivas**

A metabolómica é uma grande promessa para o avanço da compreensão, diagnóstico e tratamento do cancro. Esta abordagem já foi utilizada para descobrir e confirmar mecanismos da carcinogénese e proliferação celular, para identificar candidatos a biomarcadores para diagnóstico em amostras de biofluidos e biópsias, e mesmo como contributo para o estadiamento de tumores e avaliação da eficácia de tratamentos.

No entanto, algumas questões devem ainda ser clarificadas, antes da metabolómica ter um impacto clínico mais amplo e directo.

A aquisição de amostras e a sua preparação, por exemplo, devem ser rigorosamente padronizadas, a fim de produzir resultados que sejam suficientemente reprodutíveis para aplicação clínica, uma vez que são possíveis rápidas e acentuadas alterações intracelulares na concentração de metabólitos após as biópsias. Além disso, os

metabólitos devem ser quimicamente identificados, verificados e validados, a fim de verem a sua adopção generalizada como meio de diagnóstico clínico (mesmo que metabólitos quimicamente não identificados consigam de forma reprodutível distinguir entre as classes experimentais), exigindo grandes avanços no desenvolvimento de bibliotecas de metabólitos padrão, ou identificação química *de novo* de metabólitos desconhecidos (ambas áreas activas de pesquisa) (Hummel J *et al.* 2007; Kind T e Fiehn O, 2007). Finalmente, devem ser realizados estudos clínicos mais amplos para fornecer uma validação adequada dos biomarcadores encontrados.

As investigações em metabolómica dos tumores malignos são muito promissoras e constituem desafios significativos. Um objectivo óbvio é o de traduzir as medições metabolómicas numa compreensão biológica mais profunda de determinada condição patológica, permitindo, em última análise, uma melhor concepção e desenvolvimento de medicamentos.

Uma abordagem cada vez mais habitual consiste na integração de vários campos da "ómica" (Benjamin DI, *et al.* 2012; Casado-Vela J, *et al.* 2011). A integração, por exemplo, dos dados da transcriptómica e da metabolómica permitiu uma análise mais profunda das vias quimiosensíveis (Cavill R, *et al.* 2011) no cancro da mama (Borgan E, *et al.* 2010) e poderá fornecer maior validação e compreensão das descobertas (e, portanto, potenciais aplicações clínicas).

Outra meta importante será a identificação de biomarcadores especificamente dirigidos ao diagnóstico precoce. Detectar tumores em estágio inicial, onde as taxas de sobrevivência e a eficácia do tratamento são muito maiores, terá certamente um enorme impacto no prognóstico. Continua em aberto, no entanto, se as alterações metabólicas serão suficientemente significativas como indicadores precoces, de forma a poderem ser detectadas através de amostras não-invasivas de biofluidos, ou apenas em biópsias dirigidas.

A interpretação das alterações detectadas em biofluidos, no diagnóstico de neoplasias pode revelar-se particularmente difícil. Embora a análise de sangue ou urina possa detectar substâncias que distingam amostras cancerosas de não-cancerosas, os metabólitos detectados são muitas vezes "genéricos", associados ao cancro, podendo

não distinguir, por exemplo, entre cancro do rim e cancro do fígado. O ponto comum do metabolismo disfuncional existente em todos os tipos de cancro poderá, neste caso, vir a ser um obstáculo para a interpretação e diagnóstico, sendo necessária mais investigação para avaliar a potencial utilidade desses testes não-invasivos. Não obstante os desafios, a metabolómica é um campo muito promissor com vista a ajudar a diminuir o peso e o impacto de todos os tipos de cancro na sociedade.

A análise integrada da metabolómica e outras "ómicas" poderá proporcionar formas mais sensíveis para detectar mudanças relacionadas com a doença e descobrir novos biomarcadores. O conhecimento destas características multivariantes é fundamental para o estabelecimento de modelos metabolómicos preditivos e validados para a prevenção do cancro. Compreender o metaboloma irá não só fornecer *insights* sobre os locais críticos da regulação na promoção da saúde, mas também poderá ajudar na identificação de biomarcadores intermediários ou substitutos de cancro, permitindo o estabelecimento de abordagens preventivas ou terapêuticas para a saúde. Embora desvendar o metaboloma não seja uma tarefa simples, as implicações sociais serão enormes.

## 3. MARCADORES DE RASTREIO E DIAGNÓSTICO

### 3.1. Introdução

Rastreio é a aplicação, uma única vez, de um teste numa população de indivíduos que estão em risco para uma doença específica, enquanto a vigilância consiste na repetição seriada de um teste a fim de diagnosticar uma doença precocemente. Para o CHC a designação adequada é vigilância, porque o teste é repetido o número de vezes necessárias para monitorizar doentes em risco.

Têm sido propostos vários critérios para determinar se uma doença é elegível para um programa de vigilância: (a) a doença deve ser um importante problema de saúde, (b) deve existir uma população-alvo bem definida, (c) o tratamento da doença em fase assintomática deve apresentar vantagens relativamente ao tratamento após a existência de sintomas, (d) deve haver um teste acessível e que proporcione benefícios que justifiquem o seu custo, (e) o teste deve ser aceite pela população-alvo e pelos profissionais de saúde, (f) devem existir procedimentos de diagnóstico padronizados, (g) os testes de rastreio devem ter um nível aceitável de precisão e (h) deve existir redução da mortalidade, devida à doença, na população submetida a triagem.

Todos estes requisitos são preenchidos no caso do CHC. Trata-se de uma doença frequente, cuja incidência tem vindo a aumentar nos últimos anos, na maioria dos países ocidentais. A população-alvo é constituída, sobretudo, por doentes que têm cirrose hepática compensada, especialmente cirrose devida ao VHC, VHB e/ou álcool.

O objetivo de um programa de vigilância é a diminuição da mortalidade. Num estudo realizado na China, cerca de 20.000 pessoas foram randomizadas para vigilância com alfa-fetoproteína (AFP) e ecografia abdominal de 6 em 6 meses, ou nenhuma vigilância. Os doentes que fizeram vigilância tiveram uma redução de 37% na mortalidade (Zhang BH *et al.*, 2004). Esta descoberta é a melhor prova de que a vigilância reduz a mortalidade devida ao CHC. Em contraste, se a vigilância não for realizada e o

diagnóstico for tardio, as opções de tratamento são mais limitadas e/ou menos bem sucedidas.

Os testes de vigilância incluem exames serológicos e radiológicos. A maior parte dos biomarcadores relacionados com o CHC são consequência da inflamação crónica ou da malignidade e, de acordo com as suas características biológicas, podem dividir-se em três grupos: proteína onco-fetal, proteína de *stress* e grupos de modificações pós-translacionais. A eficácia dos marcadores biológicos existentes é ainda bastante limitada.

Marcadores tumorais existentes no soro, tais como a AFP e a des-gammaprotrombina (DGP), são frequentemente usados na vigilância, mas a sua importância tem vindo a decair porque existem exames radiológicos bastante sensíveis.

Mesmo que a presença destes marcadores por vezes se sobreponha no CHC, um estudo de combinação de pelo menos dois ou até três pode ter alguma lógica para aumentar a sensibilidade e especificidade na obtenção do diagnóstico. No entanto, estes biomarcadores tradicionais não refletem características biológicas do tumor, nem fornecem informações sobre o seu comportamento, não permitindo que o médico possa prever com precisão o prognóstico dos doentes (Mann CD *et al.* 2007).

Na era das terapêuticas moleculares para o CHC a avaliação destes novos agentes também requer novas ferramentas. Conceitos bem estabelecidos em oncologia podem rapidamente deixar de ser válidos, existindo muito espaço para tentar melhorar a eficácia dos biomarcadores tradicionais e para o aparecimento de novos marcadores, alvo de esforços no sentido da sua identificação.

Avanços recentes em genómica e proteómica poderão fornecer novas ferramentas para melhorar o diagnóstico e ajudar a definir o prognóstico deste tipo de tumor.

Biomarcadores derivados de *microarray expression-profiling data* podem ter elevadas taxas de falsos positivos, devido a múltiplas hipóteses testadas, quando se trabalha com grande número de genes e combinações de genes. Uma assinatura de biomarcador preditivo, ou determinado conjunto de genes, identificados a partir de

um certo número de amostras (conjunto de treinamento) devem ser validados com dados de amostras independentes (conjunto de teste/validação) (Ivanovska I *et al.*, 2011). Alcançar este objetivo pode ser um desafio, porque conjuntos de dados independentes, especialmente os provenientes de amostras clínicas tratadas de um modo semelhante, são escassos e requerem um investimento de tempo significativo.

Uma solução para esta limitação é o aparecimento de novos biomarcadores serológicos com elevada precisão de diagnóstico.

## **3.2. Biomarcadores tumorais**

### **3.2.1. Alfa-fetoproteína**

A alfa-fetoproteína (AFP) é o marcador tumoral clássico mais frequentemente utilizado no CHC. Bergstrand e Czar descobriram a AFP em 1956, efectuando a sua separação electroforética, a partir de fetoproteína humana existente no soro (Bergstrand CG e Czar B, 1956). Tatarinov, em 1964, e Abelev, em 1968, apresentaram os primeiros relatos sobre o uso da AFP como marcador de diagnóstico para o CHC.

A AFP é uma glicoproteína com um peso molecular de cerca de 70 kDa, sintetizada nas células da endoderme do saco vitelino durante o desenvolvimento fetal precoce e, posteriormente, em hepatócitos embrionários (Yamashita K *et al.*, 1993). Atinge uma concentração máxima no soro de 3 g/L entre as semanas 12 a 16 da vida fetal, mantendo estes valores nos 18 meses que se seguem e diminuindo posteriormente (Debruyne EN e Delanghe JR, 2008).

O gene humano da AFP tem sido associado ao cromossoma 4 (4T11-q13), que faz parte da superfamília de genes albuminóides. Além da AFP, este gene codifica várias proteínas incluindo a albumina e proteínas de ligação da vitamina D (Koteish A e Thuluvath PJ, 2002). A AFP funciona, presumivelmente, como uma molécula de transporte para vários ligantes, tais como bilirrubina e ácidos gordos, retinóides, esteróides, metais pesados, corantes flavonóides, fitoestrógenios, dioxina, e vários medicamentos (Mizejewski GJ, 2001).

Além de ter actividade imunossupressora, a AFP tem um papel na regulação da proliferação celular (O'Neill G *et al.*, 1982). No adulto a sua síntese é reprimida, detectando-se aumento quando há regeneração hepática e hepatocarcinogénese. Apesar de existir alguma incerteza sobre o papel biológico da AFP, o seu aumento é interpretado sobretudo como marcador tumoral do CHC.

Numerosos estudos demonstraram que os níveis séricos mais elevados de AFP estão associados a doenças hepáticas, nomeadamente hepatites virais, cirrose hepática, tumores do fígado (CHC e hepatoblastoma, mas também metástases, em 5% a 10% dos casos) e aos tumores malignos mais prevalentes do tracto digestivo (pâncreas - 24%, estômago - 15%, cólon - 3% e vesícula biliar). A baixa especificidade da AFP para o diagnóstico é um problema clínico no CHC, sendo a AFP fucosilada (AFP-L3) um marcador aparentemente mais específico (Li D, Mallory T, Satomura S, 2001).

Mais recentemente, Marrero e colaboradores publicaram um estudo onde propõem um novo *cut-off* (10,9 ng/ml) para a AFP, que lhe confere uma sensibilidade superior à da AFP-L3 e à da des-gama-carboxiprotrombina (DCP) (Marrero JA *et al.*, 2009). Estes dados sugerem baixa significância da AFP-L3 e da DCP como marcadores de detecção precoce do CHC, sendo necessária investigação adicional, em ensaios clínicos, para avaliar o real valor destes marcadores.

O valor preditivo positivo (VPP) da AFP é significativamente menor nos doentes com CHC de etiologia viral relativamente aos que têm etiologia não viral (70% vs 94%, respectivamente,  $p < 0,05$ ) (Soresi M *et al.*, 2003).

Foi confirmado em numerosas investigações o aumento da concentração da AFP no soro, em paralelo com o aumento das dimensões do tumor (Abelev GI *et al.*, 1963; Nomura F *et al.*, 1989; Margarit C *et al.*, 2002; Forner A *et al.*, 2009).

A especificidade da AFP varia entre 76% e 96%, sendo melhorada com a elevação do valor de *cut-off*, o que, por sua vez, diminui a sensibilidade. (Gambarin-Gelwan M *et al.* 2000; Kokudo N e Makuuchi M, 2009) (Quadro 1.6).

**Quadro 1.6** – Sensibilidade e especificidade da AFP consoante os valores de *cut off*

	<b>Cut-off mg/L</b>	<b>Sensibilidade %</b>	<b>Especificidade %</b>
Gambarin-Gelwan M. <i>et al.</i> (2000) e Kokudo N. <i>et al.</i> (2009)	20	55-60	88-90
Kokudo N. <i>et al.</i> (2009)	50	47	96,0
Gambarin-Gelwan M. <i>et al.</i> (2000)	100	31,2	98,8
Gambarin-Gelwan M. <i>et al.</i> (2000)	200	22,4	99,4
Gambarin-Gelwan M. <i>et al.</i> (2000)	400	17,1	99,4

### 3.2.2. DCP (PIVKA - II)

A DCP foi identificada como um biomarcador de CHC em 1984. É uma protrombina proteica anormal, induzida pelo antagonista II (PIVKA-II) ou pela ausência de vitamina K e representa um produto anormal da carboxilação hepática durante a formação de trombogénio, que atua como um mitógeno autólogo para as linhas celulares de CHC (Ikoma J *et al.*, 2002; Suzuki M *et al.*, 2005).

São detectados níveis elevados deste marcador sobretudo em casos avançados, com invasão da veia porta (Hagiwara S *et al.*, 2006). A DCP será sobretudo um biomarcador de mau prognóstico, sendo preditiva de rápida progressão do tumor (Suehiro T *et al.*, 1994).

Tem sido reportado que cerca de 30% dos CHC negativos para a AFP são DCP positivos. Este subgrupo de doentes apresenta mais frequentemente tumores com margens distintas, nódulos de tamanho superior a 3 cm, multinodulares e pouco ou moderadamente diferenciados (Okuda H *et al.*, 2001). A determinação simultânea da concentração sérica da DCP e a sua expressão tecidual tem valor sinérgico para predizer o prognóstico (Toyoda H *et al.*, 2006). No pequeno CHC, a determinação de

ambos os marcadores tumorais poderá também ser mais adequada, uma vez que a DCP é mais específica do que a AFP (Marrero JA *et al.*, 2003).

Curiosamente, a DCP tem uma função biológica no crescimento do CHC. Suzuki *et al.* relataram que actua como um factor de crescimento, tanto de forma autócrina como parácrina (Suzuki M *et al.*, 2005). A DCP é um tipo de factor de crescimento endotelial vascular que possui potente atividade migratória e mitogénica (Fujikawa T *et al.*, 2007) e estimula a proliferação celular em linhas de CHC, através da ativação da *Met-Januskinase* um transdutor de sinal e ativador de transcrição com três vias de sinalização. Além disso, pode induzir tanto a proliferação como a migração das células endoteliais da veia umbilical humana.

Assim, existem várias razões para considerar a DCP como um marcador tumoral importante na prática clínica. Além do valor diagnóstico da DCP como biomarcador ser comparável ao da AFP, Grazi *et al.* mostraram que a AFP e DCP não estão correlacionadas, de modo que a sua combinação pode melhorar significativamente a detecção do CHC, com sensibilidade de 74,2% e especificidade de 87,2% (Quadro 1.7) (Carr BI *et al.*, 2007; Sterling RK *et al.*, 2009).

**Quadro 1.7** – Valor diagnóstico de alguns biomarcadores séricos no CHC.

	<b>Sensibilidade %</b>	<b>Especificidade %</b>
AFP-L3	61,60	92,00
DCP	72,70	90,00
AFP	67,70	71,00
AFP-L3+DCP	84,80	97,80
AFP-L3+AFP	73,70	86,60
DCP+AFP	84,80	90,20

### 3.2.3. Glipicano-3

O Glipicano-3 (GPC-3) é uma proteína onco-fetal e uma heparina proteoglicano de sulfato que é ancorada à membrana plasmática através da glicosil-fosfatidil-inositol (Filmus J e Selleck SB, 2001). Em situação normal, o GPC-3 está envolvido na regulação da proliferação e sobrevivência celular durante o desenvolvimento embrionário e desempenha um papel crucial como supressor tumoral. Tem comportamento diferente nos diversos tipos de tumor maligno, sendo reprimido no cancro da mama, cancro do ovário e no adenocarcinoma de pulmão (Filmus J e Capurro M., 2008.) e regulado positivamente no CHC (Sung YK *et al.*, 2003).

Normalmente, o GPC-3 não existe nos hepatócitos saudáveis, nem em hepatócitos não malignos, podendo ser detectado em cerca de 50% e 33% dos doentes com CHC seronegativos para a AFP e DCP, respectivamente.

A especificidade do GPC-3 é de 100% (Nakatsura T *et al.*, 2003). Dados recentes referem o potencial valor da determinação simultânea do GPC-3 e da AFP, que poderá ter um impacto significativo no aumento da sensibilidade de detecção do CHC, sem qualquer redução na especificidade (Capurro M *et al.*, 2003).

Outro estudo mostrou o potencial valor diagnóstico de um par de novas proteínas membranosas: proteína de Golgi 73 (GP73) e mucina 1 (MUC - 1). A GP73 é uma proteína existente no aparelho de Golgi, que é regulada positivamente nos hepatócitos de doentes com hepatite aguda (Kladney RD *et al.*, 2002), na cirrose (Iftikhar R *et al.*, 2004) e no soro de doentes com CHC relacionado com o VHB e o VHC (Marrero JA *et al.*, 2005). Resultados promissores foram publicados por Marrero *et al.*, relatando uma maior sensibilidade (69%) e especificidade (75%) em comparação com a AFP, para discriminar CHC em doentes cirróticos.

MUC-1 é uma proteína de membrana que é expressa em muitas células epiteliais, mas parece haver um aumento da sua expressão em doentes com cancro da mama (Croce MV *et al.*, 2003), doenças pulmonares inflamatórias (Tokiya R *et al.*, 2004) e CHC (Gad A *et al.*, 2005, Moriyama M *et al.*, 2004). Alguns estudos referem o seu valor no diagnóstico de doentes com CHC. Moriyama *et al.* relataram a expressão de MUC-1 em

células de CHC e no soro de doentes com CHC, relacionado com o VHC. Gad *et al.*, em 2005 relataram especificidade de 99 % e sensibilidade de 87 % para a combinação de MUC- 1, DCP e AFP em doentes japoneses e egípcios com CHC.

#### 3.2.4. Outros biomarcadores

Vários outros biomarcadores estão a surgir para a avaliação diagnóstica do CHC. Hussein *et al.* (2008) reportaram o potencial valor do antigénio do carcinoma de células escamosas (SCCA), que representa uma família de proteases da serina de elevado peso molecular, no diagnóstico do CHC (sensibilidade: 77,6%, especificidade: 84%)

As proteínas de choque térmico (HSPs) são potenciais marcadores tumorais para o diagnóstico do CHC, de acordo com resultados obtidos de análises proteómicas de CHCs (Looi KS *et al.*, 2008). Sendo moléculas geradas pelas células de forma mais ou menos generalizada, o seu aumento pode ser provocado por situações de *stress* nomeadamente por carcinogénios. As HSP70 poderão vir a ser utilizadas para diferenciação entre CHC inicial, lesões pré-cancerosas e fígado não tumoral, o que na prática clínica é um grande desafio para os patologistas devido à histologia muito diferenciada, com poucas atipias do CHC inicial (Chuma M *et al.*, 2003). São necessários mais estudos moleculares com HSP70.

Os micro ARNs (miARN) como futuros biomarcadores do CHC estão a ter actualmente grande atenção. Perfis de miARN foram comparados em 25 doentes com CHC, em biópsias de tumor e tecido não tumoral, tendo-se verificado um aumento da expressão de três miARNs e diminuição da expressão de quatro (Murakami Y *et al.*, 2006). O aumento significativo de miARN-18 e do miARN-20 em correlação com uma maior indiferenciação tumoral sugere que a alteração da expressão do miARN contribua para a perda da diferenciação hepatocitária.

### 3.3. Osteopontina

A osteopontina (OPN) é uma glicoproteína fosforilada ligadora de cálcio que é capaz de se ligar às integrinas da superfície celular. É expressa no rim e osso de tecidos normais (Wuthrich *et al.*, 1998), está também presente nos fluidos corporais, sendo abundante no osso e noutros tecidos mineralizados (Denhardt *et al.*, 1998). A sua expressão está aumentada em vários tecidos, num grande número de patologias, nomeadamente tumores malignos, respostas imunes e inflamatórias (Weber *et al.* 1996; Giachelli *et al.*, 2000), remodelação vascular (Ramos *et al.*, 1999), doenças renais, lactação, calcificação e remodelação de tecidos mineralizados, bem como em algumas reacções de resposta ao *stress*. Apesar desta diversidade de expressão tecidular a sua função permanece obscura em muitos destes contextos.

Em tumores humanos, a OPN foi identificada pela primeira vez por Brown *et al.*, em 1994, em vários carcinomas. Estes autores encontraram níveis substancialmente mais altos de ARN mensageiro (ARNm) da OPN em 14 tumores malignos analisados (6 do cólon, 3 da mama, 2 do pulmão, 1 do estômago, 1 do endométrio e 1 da tireoide), quando comparados com o respectivo tecido normal. Em contraste, dois tipos de tumores benignos (adenomas do cólon em doentes com polipose familiar e um leiomioma uterino) apresentavam níveis de ARNm idênticos aos encontrados nos tecidos normais correspondentes. Viu-se que nos tumores as áreas positivas para OPN se encontravam no limite da extensão tumoral e em áreas próximas de necrose.

Foi identificada positividade para o ARNm e para a proteína OPN em vários tipos de tumores malignos, nomeadamente do pulmão (Chambers *et al.* 1996), da mama (Tuck *et al.* 1998), do esófago (Casson *et al.* 1997), do estômago (Ue *et al.* 1998) e lesões pré-malignas e malignas da cavidade bucal (Devoll *et al.* 1999), cancro da próstata (Thalman *et al.*, 1999) e gliomas (Saitoh *et al.* 1995). Utilizando imunohistoquímica, a proteína OPN foi identificada apenas nos macrófagos, em alguns tumores e noutros também nas células tumorais. De igual forma o ARNm da OPN foi encontrado em células tumorais e também em macrófagos existentes em tecidos tumorais (Tuck *et al.*, 1998, Casson *et al.*, 1997).

No sangue, a OPN foi também inicialmente detectada numa grande variedade de tumores, nomeadamente do fígado (Sengers *et al.* 1989), do pulmão (Chambers *et al.* 1996), da mama (Tuck *et al.* 1997) e da próstata (Tozawa *et al.* 1999).

A OPN é expressa em vários tipos de células, nomeadamente em células epiteliais malignas, e acredita-se estar envolvida em muitas funções fisiológicas celulares, designadamente regulação da migração, invasão e metastização de células tumorais, bem como na sua sobrevivência (Shevde LA, *et al.* 2010).

### 3.3.1. Osteopontina como potencial marcador de diagnóstico no CHC

A expressão elevada de ARNm da OPN tem sido associada a mau prognóstico em doentes com CHC (Pan HW *et al.* 2003), mas o papel da OPN no CHC quer como marcador de diagnóstico, quer de prognóstico, não está claramente definido nos estudos existentes, havendo resultados discrepantes nos diversos trabalhos publicados, sobretudo sobre a sua utilidade como biomarcador de diagnóstico.

Kim J *et al.* (2006) tendo como objectivo estudar a utilidade da OPN plasmática como marcador tumoral no CHC, determinaram os seus níveis plasmáticos (por ELISA), e também da AFP e PIVKA II num grupo de 62 doentes com CHC (69% VHB, 10% VHC, 3% álcool), 60 com doença hepática crónica (83% VHB, 3% VHC, 10% álcool) e 60 controlos saudáveis. Para determinar a origem da OPN plasmática analisaram imunohistoquimicamente 285 amostras teciduais de CHC. Detectaram níveis plasmáticos de OPN significativamente mais altos nos doentes com CHC (mediana 954 ng/mL, 168–5.742) do que na doença hepática crónica (381 ng/mL, 29–1.688) e nos controlos saudáveis (155 ng/mL, 10–766). No grupo do CHC os valores eram significativamente mais elevados à medida que aumentava a classe de Child-Pugh e o estágio tumoral. A sensibilidade e especificidade da OPN no CHC foram 87% e 82%, respectivamente (para um *cut off* de 617,6 ng/mL). A OPN teve uma maior área debaixo da curva (0,898) que a AFP (0,745) ou PIVKA II (0,578), o que sugere uma maior acuidade de diagnóstico. A imunohistoquímica mostrou expressão de OPN em

92 de 285 tumores (32,3%), sendo encontrada em hepatócitos malignos e macrófagos que invadiam o tumor, mas não em hepatócitos normais, nem nas células de Kupffer.

Num outro estudo (Bessa SS *et al.*, 2010) foi investigada a utilidade clínica da OPN como biomarcador de CHC em doentes de alto risco, comparando-a com a AFP e avaliando a relação com as características clinico-patológicas dos doentes. Foram determinados os níveis plasmáticos da OPN e da AFP em 60 doentes com cirrose hepática relacionada com o VHC (30 com CHC, 30 sem CHC) e 20 controlos saudáveis. Verificou-se que os níveis de OPN eram significativamente mais elevados em doentes com CHC do que nos cirróticos sem CHC e nos controlos. Nos doentes com CHC, os níveis plasmáticos de OPN eram significativamente mais elevados nos estádios B e C de Child-Pugh, nos tumores de maiores dimensões e em tumores de alto grau. A sensibilidade e especificidade da OPN para um *cut off* de 9,3 ng/mL, foi de, respectivamente, 88.3% e 85.6%. A OPN teve também neste estudo uma maior área debaixo da curva (0,918) que a AFP (0,712). Os autores concluíram que a OPN parece ser um biomarcador de diagnóstico promissor no CHC (pelo menos no relacionado com o VHC), podendo ainda servir como factor de prognóstico adverso.

Num estudo posterior (Abu El Makarem MA *et al.* 2011) os níveis plasmáticos de OPN foram significativamente mais altos em 113 doentes com CHC, relacionado com o VHC, do que em 120 controlos saudáveis e em 120 indivíduos com cirrose hepática por VHC. Contrariamente ao referido nos 2 estudos anteriores, neste os níveis de OPN não variaram significativamente com o grau de deterioração da função hepática aferido pela de classe Child-Pugh ( $p < 0,9$ ). A eficácia da OPN foi também aqui superior à da AFP em termos de AUC, sensibilidade, especificidade, VPP e VPN e no diagnóstico de estádios precoces ou tardios de CHC (0,88 vs 0,56,  $P = 0,0001$ , 0,991 vs 0,899;  $P = 0,01$ ; respectivamente). A OPN comportou-se como um marcador potencial de diagnóstico do CHC, especialmente no grupo de alto risco, ultrapassando os biomarcadores tumorais tradicionais, como a AFP, parecendo ter também valor no prognóstico.

Shang S *et al.* (2012) publicaram um estudo que teve por objectivo identificar um biomarcador que permitisse melhorar a performance da AFP na vigilância do CHC em doentes com cirrose. Elaboraram perfis proteómicos do plasma de doentes com

cirrose ou CHC e selecionaram candidatos a biomarcadores, em coortes de duas regiões geograficamente distintas (EUA e Tailândia), para incluir CHC de diferentes etiologias (VHC e VHB). O perfil de espectrometria de massa de plasma altamente fracionado feito em 18 cirroses e 17 CHCs identificou que a OPN estava significativamente hiperregulada no CHC, relativamente aos controlos cirróticos. Os níveis de OPN foram posteriormente avaliados em 312 amostras plasmáticas de 131 CHC, 76 cirroses, 52 doentes com hepatites C (HCC) e B crónicas (HBC) e 53 controlos saudáveis, das 2 coortes independentes. Os níveis de OPN plasmática estavam significativamente aumentados nos doentes com CHC, comparados com cirróticos com VHB e VHC e controlos saudáveis em ambas as coortes. A OPN só, ou em combinação com a AFP, teve uma melhor área debaixo da curva relativamente à AFP isolada, comparando CHC com cirrose, também em ambas as coortes. O desempenho global da OPN foi superior ao da AFP na comparação entre cirrose e os seguintes grupos: CHC relacionado com VHC, CHC relacionado com VHB e CHC em estágio inicial. A OPN também teve boa sensibilidade em CHC com AFP negativa. Num estudo piloto prospectivo que incluiu 22 doentes que desenvolveram CHC durante o follow-up, verificou-se que a OPN já estava aumentada 1 ano antes do diagnóstico.

Foi ainda efectuado um outro estudo (Mona Salem *et al.*, 2013) no qual participaram 70 indivíduos, divididos em três grupos: grupo I com 30 doentes com CHC por VHC (comprovado pela histopatologia ou CT espiral combinada com AFP elevada), grupo II englobando 30 doentes com infecção pelo VHC e grupo III com 10 indivíduos saudáveis (controlo). Os níveis de osteopontina foram significativamente mais altos nos doentes dos grupos I e II, em comparação ao grupo controle ( $P = 0,005$ ). Houve correlação significativa entre os níveis de OPN e de AFP. A sensibilidade e especificidade da OPN para detecção do CHC foram de, respectivamente, 73% e 54%, para um *cut-off* de 128,5 ng / mL. Os níveis plasmáticos de OPN estavam diretamente relacionados com o número de tumores, mas não com o tamanho do tumor.

Para avaliar o papel da OPN e da sub-fração L3 da AFP (AFP-L3) no diagnóstico do CHC, Sawsan Said Hafez *et al.* (2013) estudaram 120 doentes com CHC em diferentes estádios, 140 indivíduos com doença hepática crónica e 140 controlos saudáveis. Verificaram que os níveis da AFP, da AFP-L3 e da OPN eram significativamente mais

elevados nos doentes com CHC, que existia uma correlação entre a AFP e a relação AFP-L3/AFP nos doentes com CHC e que havia variações significativas da OPN nos diversos estádios do CHC. Os melhores pontos de *cut off* revelaram 100% de sensibilidade e 85% de especificidade para a AFP-L3 e 100% de sensibilidade e de especificidade para a OPN. Estes resultados além de apontarem para o valor da AFP-L3 e da OPN como potenciais marcadores de diagnóstico do CHC mostram, no caso da OPN, que esta possa ter também valor prognóstico, atendendo à diferença significativa de valores nos diversos estádios do tumor.

**Quadro 1.8** – Sensibilidade e especificidade da OPN consoante os valores de *cut off*.

	<b><i>Cut-off</i></b> <b>ng/mL</b>	<b>Sensibilidade</b> <b>%</b>	<b>Especificidade</b> <b>%</b>
Kim J <i>et al.</i> , 2006	617,6	87	82
Bessa SS <i>et al.</i> , 2010	9,3	88,3	85,6
Shang S <i>et al.</i> , em 2012	91	74	66
Mona Salem <i>et al.</i> , 2013	128,5	73	54
Sawsan Said Hafez <i>et al.</i> , 2013	2	100	100

É notória, nestes trabalhos a heterogeneidade dos valores de melhor *cut-off* mencionados nos vários estudos existentes, não sendo clara a razão para esta diferença, podendo ter a ver com diferentes métodos de análise e/ou condições diversas de colheita das amostras.

Existem dois trabalhos publicados em que a utilidade da OPN como marcador de diagnóstico no CHC é posta em causa.

Um deles (Khalil A *et al.*, 2013), proveniente do Egipto, englobou 80 indivíduos distribuídos em 3 grupos: doentes com lesões focais hepáticas em cirrose por VHC

(n=40), doentes com cirrose hepática (n=20) e controlos saudáveis (n=20). Os níveis séricos de OPN e AFP dos participantes foram determinados e foram comparados os três grupos. A capacidade discriminatória da OPN plasmática para o CHC foi menor do que a da AFP e estes marcadores não se correlacionaram um com o outro. Nem o sexo nem a idade dos doentes mostrou uma associação significativa com o nível de OPN.

No outro estudo, também egípcio, publicado já este ano (Habel-Hamid M *et al.*, 2014), os níveis séricos de AFP e OPN foram detectados por ELISA em 29 doentes com CHC devido ao VHC, em 29 doentes com infecção crónica por VHC (alguns com e outros sem cirrose) e em 30 indivíduos saudáveis. A precisão diagnóstica de cada marcador foi avaliada utilizando a análise ROC, relatando a área sob a curva (AUC) e o seu intervalo de confiança de 95% (CI). O nível médio da OPN sérica em doentes com CHC (67,8 ng/mL) não foi significativamente diferente dos doentes com infecção crónica por VHC (71,7 ng/mL), embora ambos fossem significativamente maiores do que o grupo controlo (11,6 ng mL<sup>-1</sup>) ( $p < 0,001$ ). Quando os doentes com CHC foram comparados com o grupo sem CHC, a AUC para OPN e AFP foram 0,46 e 0,68, respectivamente. Com base na análise ROC, não houve valores de corte satisfatórios para OPN que consigam distinguir doentes com e sem CHC.

Existem duas meta-análises sobre o papel da OPN no CHC, uma delas (Chuan-Hai Zhang *et al.*, 2011) avaliando apenas o significado prognóstico da sua elevação e outra (Cheng J *et al.*, 2014) debruçando-se sobre o significado deste marcador no diagnóstico e também no prognóstico do CHC.

A primeira engloba sete estudos (1.158 doentes) e foi realizada para avaliar a associação entre OPN, sobrevivência global (OS) e sobrevivência livre de doença (DFS) em doentes com CHC. A correlação entre OPN e invasão vascular tumoral ou outros parâmetros relacionados com a invasão tumoral também foi avaliada. Os resultados indicaram que a elevada expressão de OPN é indicadora de baixa OS (HR: 1,37; IC 95%: 1,21-1,55) e DFS (HR: 1,62; IC 95%: 1,24-2,11) do CHC. A sobre-expressão da OPN tende a estar associada com a presença de invasão vascular tumoral (OR: 1,93; IC 95%: 0,97-3,84) e grau avançado do tumor (OR: 1,74; IC 95%: 0,95-3,18). Este estudo, favorece a tese de que a sobre-expressão da OPN indica um mau prognóstico para

doentes com CHC, podendo ter também potencial valor preditivo para invasão e metástases no CHC.

A outra meta-análise é relativa a oito estudos (4 de prognóstico e 4 de diagnóstico, 1.399 doentes) e foi realizada para estimar a associação entre elevação da OPN no plasma/soro e OS e DFS em doentes com CHC e avaliar a precisão da OPN e AFP plasmáticas no diagnóstico de CHC. A elevação da OPN no plasma/soro foi associada significativamente com más OS (HR: 1,96; IC 95%: 1,47-2,61,  $P < 0,00001$ ) e DFS (HR: 1,80; IC 95%: 1,43-2,26;  $P < 0,00001$ ). As estimativas para a OPN e AFP no diagnóstico de CHC nos estudos incluídos nesta meta-análise foram os seguintes: sensibilidade 88% (IC 95%: 84-91) *versus* 68% (IC 95%: 63-73); especificidade 87% (IC 95%: 83-90%) *versus* 97% (IC 95%: 94-99%); *odds ratio* de diagnóstico 62,87 (IC 95%: 10,90-362,60) *versus* 49,09 (IC 95%: 11,36-212,10); AUC 0,91 (IC 95%: 0,85-0,97) *versus* 0,68 (95% CI, 0,45-1,03). Os dados actuais indicam que a OPN tem uma importante capacidade de previsão para estimar a sobrevivência no CHC e que a OPN plasmática parece ter uma acuidade de diagnóstico semelhante à da AFP, embora o valor diagnóstico da OPN no CHC inicial ou AFP negativo continue a necessitar avaliação por estudos posteriores.

### 3.3.2. Osteopontina noutras patologias hepáticas

Além do seu papel no CHC a OPN tem sido apontada como uma proteína com várias outras funções, estando implicada a nível hepático, na inflamação e fibrose de várias etiologias. Estudos recentes têm destacado o seu papel em doenças inflamatórias do fígado, como doenças hepáticas alcoólicas e não alcoólicas e hepatite mediada por células T (Apte UM *et al.*, 2005; Banerjee A *et al.*, 2006; Banerjee A *et al.*, 2008; Sahai A *et al.*, 2004; Kiefer FW *et al.*, 2011; Kiefer FW *et al.*, 2010; Diao H *et al.*, 2004; Mimura S *et al.*, 2004; Kon S *et al.*, 2008).

O nível de OPN sérica parece estar relacionado com a inflamação hepática e fibrose em bebedores alcoólicos excessivos, estando o nível de expressão hepática da OPN fortemente correlacionado com a acumulação de neutrófilos hepáticos, o fator pró-

fibrogénico TGF-beta e a fibrose hepática (Patouraux S *et al.*, 2012). No estudo feito por estes autores o nível sérico de OPN foi um factor independente preciso na estimativa de fibrose hepática significativa.

Embora a origem celular do aumento da expressão do OPN hepática não tenha sido determinada com precisão, o aumento da expressão do gene da OPN tem sido relatado em macrófagos, células de Kupffer, células estreladas, células epiteliais biliares e nas células inflamatórias das áreas necróticas nos modelos de fibrose do fígado de roedores (Kawashima R *et al.*, 1999; Sahai A *et al.*, 2004; Lorena D *et al.*, 2006). A observação de que a inflamação do fígado foi associada a níveis elevados de OPN no soro é a favor de um papel de OPN na inflamação hepática. Em roedores, modelos de doenças hepáticas alcoólicas, a acumulação de neutrófilos no fígado foi mediada pela OPN (Apte UM *et al.*, 2005; Banerjee A *et al.*, 2006; Banerjee A *et al.*, 2008), que também facilitou a infiltração e acumulação de macrófagos nos locais de lesão durante as etapas iniciais da intoxicação com tetracloreto de carbono (Lorena D *et al.*, 2006).

O recrutamento e ativação de células inflamatórias e imunológicas pela OPN pode aumentar a inflamação hepática, o que por sua vez, poderá ativar as células estreladas e a fibrogénese. De acordo com este mecanismo, a inativação do gene da OPN induz diminuição da inflamação hepática e, conseqüentemente, da fibrose em ratos alimentados com uma dieta com deficiência de metionina e de colina (Sahai A *et al.*, 2004; Syn WK *et al.*, 2011).

Tem sido sugerido que a OPN possui propriedades fibrogénicas. A expressão da OPN mostrou-se aumentada em células estreladas hepáticas ativadas (Kawashima R *et al.*, 1999; Lee SH *et al.*, 2004; De Minicis S *et al.*, 2007) e foi necessária para diferenciação de miofibroblastos (Lenga Y *et al.*, 2008). A OPN foi regulada pela via "hedgehog" e a intoxicação promoveu respostas pró-fibrogénicas (Syn WK *et al.*, 2011).

O aumento da expressão de OPN foi encontrado no fígado de doentes com cirrose alcoólica, mas também com cirrose por NASH, cirrose biliar primária, hepatite auto-

imune e colangite esclerosante primária, o que sugere que a indução de uma resposta da OPN é desencadeada pela lesão crónica do fígado (Syn WK *et al.*, 2011).

O excesso de peso foi um factor de risco independente para fibrose e cirrose em doentes com DHA (Naveau S *et al.*, 1997; Raynard B *et al.*, 2002). Mais recentemente, Naveau *et al.* demonstraram que a inflamação do tecido adiposo se correlaciona com a gravidade das alterações patológicas no fígado (Naveau S *et al.*, 2010). O aumento da produção de OPN no tecido adiposo pode resultar da activação de macrófagos do tecido adiposo por LPS e citocinas, tais como TNF-alfa e IL-6. Esta última encontrava-se fortemente aumentada no soro e no tecido adiposo de grandes alcoólicos (Lucey MR *et al.*, 2009; Naveau S *et al.*, 2010).

Patouraux S *et al.*, em 2012, demonstraram que o nível de OPN sérica é um factor independente que estima significativamente a fibrose em duas coortes independentes de doentes com DHA. Visto que a OPN circulante pode aumentar em indivíduos obesos e que a obesidade está também associada a uma maior propensão para fibrose e progressão de doenças crónicas do fígado, analisaram 60 doentes alcoólicos com IMC disponível, para determinar uma associação independente de OPN e fibrose. Nestes doentes (39% com fibrose significativa,  $\geq 2$ ) a OPN sérica correlacionava-se com fibrose hepática ( $r = 0,49$ ;  $P < 0,001$ ;  $N = 60$ ), mas não com o IMC ( $r_s = 0,128$ ;  $P = 0,328$ ;  $N = 60$ ). O nível de OPN sérica poderá, assim, ser considerado como um fator independente para estimar fibrose hepática significativa.

Nos alcoólicos os níveis circulantes de OPN parecem estimar com alguma precisão a existência de fibrose significativa. Nestes doentes a OPN hepática também se correlaciona com a OPN sérica e com a inflamação hepática, infiltração de neutrófilos, fibrose e expressão de TGF-beta. A infiltração do parênquima hepático por neutrófilos é uma característica proeminente da hepatite alcoólica (Gao B *et al.*, 2011). A sobre-regulação de OPN no fígado pode contribuir para esta infiltração e para a gravidade da hepatite alcoólica. Múltiplos fatores, incluindo LPS, IL-6 e TNF-alfa estimulam as células do parênquima e não parenquimatosas para produzir esta quimiocina.

Os níveis circulantes de OPN também estão alterados em doentes com complicações hepáticas relacionadas com o VHC e o VHB, podendo um valor elevado ser um excelente indicador de cirrose em doentes com hepatite B (Zhao L *et al.*, 2008). Dados semelhantes foram descritos para a infecção crónica pelo VHC, verificando-se que a OPN sérica se correlaciona com o grau de fibrose hepática (Huang W *et al.*, 2010).

## **Capítulo 2**

### **OBJECTIVOS GERAIS E METODOLOGIA**



## 1. OBJECTIVOS GERAIS

Nos países ocidentais (Europa e EUA) tem havido uma incidência crescente de CHCs diagnosticados, que parece estar relacionada, sobretudo, com a infecção pelo vírus da hepatite C (VHC). Na Europa, com base em estimativas, em 2008 terá havido cerca de 65.000 casos de CHC, com 60.240 casos fatais e nos EUA 21.000, tendo falecido 18.400 doentes. Consequentemente, embora o CHC não esteja entre os 10 tumores mais frequentes, constitui a 7ª causa de morte por cancro. Calcula-se que no ano de 2020 o número de casos atinja os 78.000 e os 27.000, respectivamente na Europa e nos EUA (IARC, 2011).

Perante este panorama de aumento do número de tumores que são diagnosticados e da manutenção de um prognóstico tão sombrio numa entidade clínica tão complexa quanto interessante pretendemos, partindo da nossa experiência clínica, contribuir para melhorar o conhecimento médico acerca do CHC, especialmente no que se refere ao seu estadiamento e terapêutica e ao diagnóstico precoce, que pressupõe vigilância de indivíduos em risco e capacidade de detecção e caracterização de nódulos hepáticos.

Nesse sentido planeámos um trabalho constituído por três partes:

- 1 – Estudo clínico de doentes com CHC;
- 2 – Estudo bioquímico (metabolómico) do CHC, com espectroscopia de RMN-<sup>1</sup>H RMAS;
- 3 – Estudo de marcadores de rastreio e diagnóstico do CHC, testando o papel da OPN;

A primeira parte visa conhecer a realidade actual do CHC entre nós, caracterizando clinicamente a nossa população de doentes com este tumor.

No nosso país, embora os poucos dados existentes apontem para um aumento do número de internamentos e da mortalidade devidos ao CHC (Marinho R *et al.*, 2007), muito pouco se sabe sobre as características demográficas dos doentes e menos ainda sobre qual é a percentagem de casos diagnosticados em rastreio, qual o estágio do

CHC aquando do diagnóstico, quais os tratamentos que são instituídos para cada estágio e qual é a evolução dos nossos doentes.

À semelhança do que acontece com muitas outras doenças, também aqui nos baseamos em dados referentes a outros países que muito provavelmente não correspondem àquilo que é a nossa realidade.

Assim, o objectivo principal desta fase do estudo é conhecer as características clínicas dos doentes com CHC da região centro de Portugal, utilizando uma casuística do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra (Hospitais da Universidade de Coimbra).

A segunda parte da tese envolve a caracterização bioquímica do CHC, avaliando com espectroscopia de RMN-<sup>1</sup>H RMAS o perfil metabólico do fígado humano não tumoral e do CHC, visando detectar e caracterizar eventuais alterações metabólicas existentes no CHC, a partir das quais novos conhecimentos bioquímicos, assim como marcadores de malignidade com potencial valor diagnóstico possam vir a surgir.

Na terceira componente do nosso trabalho procurámos avaliar o valor da osteopontina (OPN) como marcador de diagnóstico precoce do CHC, baseando-nos no conhecimento recente, à data do início do estudo, que mostrava que a OPN tinha potenciais vantagens relativamente à AFP no diagnóstico do CHC, de acordo com os resultados de dois grandes estudos (Kim J *et al.*, 2006; Shang S *et al.*, 2012), que incluíram sobretudo doentes com doença hepática crónica por VHB ou por VHC. Contudo, estes dados, embora apontando para um papel promissor, aconselhavam a sua confirmação.

Além disso, não existindo dados em doentes com patologia hepática alcoólica, os mais frequentes entre nós, pensamos estar plenamente justificada a realização dum estudo nos nossos doentes, com os seguintes objectivos:

1º Avaliar a utilidade da OPN plasmática no diagnóstico do CHC no contexto de cirrose alcoólica, comparando-a com a AFP;

2º Averiguar se o aumento da OPN é devido ao tumor ou à doença de base;

3º Verificar se existe alguma relação entre os níveis de OPN plasmática e a actividade ou a gravidade da doença hepática.

## **2. METODOLOGIA**

### **2.1. Estudo clínico de doentes com CHC**

Foi feita uma análise retro-prospectiva de doentes com CHC, seguidos no Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra (Hospitais da Universidade de Coimbra), coligindo dados epidemiológicos, métodos de diagnóstico utilizados, estadiamento dos casos, tipos de tratamento utilizados e seu resultado.

O diagnóstico de CHC foi efectuado de acordo com as recomendações da Associação Europeia para o Estudo do Fígado (EASL) e o estadiamento segundo o sistema do grupo Barcelona Clinic Liver Cancer (BCLC), de acordo também com as mesmas recomendações.

Foi construído para este fim um *software* de registo de dados, constituindo também uma base que servirá para o registo futuro dos doentes com CHC, permitindo a sua monitorização.

### **2.2. Estudo bioquímico (metabolómico) do carcinoma hepatocelular com espectroscopia de ressonância magnética nuclear de protão (RMN de $^1\text{H}$ )**

Foi feita a análise das características bioquímicas de lesões de CHC e do tecido adjacente, não atingido (utilizado como controlo negativo), em fragmentos de tecido hepático. Esta análise metabolómica foi efectuada utilizando a espectroscopia de ressonância magnética nuclear de protão (RMN de  $^1\text{H}$ ).

As amostras para exame anátomo-patológico foram processadas segundo o protocolo habitual, quer do tumor, quer do tecido envolvente.

Os espectros de RMN foram adquiridos a 277K no Departamento de Química da Universidade de Aveiro, num Espectrómetro Bruker Avance DRX-500, operando a 500,13 MHz para observação de  $^1\text{H}$ . Para os tecidos foi utilizada uma sonda HRMAS de 4 mm, rodando o rotor contendo a amostra no ângulo mágico ( $54,7^\circ$  em relação ao campo magnético) com uma taxa de rotação de 4 kHz; nos extractos usou-se uma sonda BBI de lípidos.

Foram analisadas amostras de tecido hepático com CHC e também extractos aquosos e lípidicos desses tecidos e amostras de tecido envolvente e seus extractos.

Foi adquirido um espectro normal 1D para cada um dos extratos aquosos e lipídicos e, para os tecidos foram registados espectros 1D normal (isto é, sem edição) e editado por tempos de relaxação T<sub>2</sub>, usando a experiência de *Carr-Purcell-Meiboom-Gill* (CPMG).

Todos os espectros adquiridos foram processados multiplicando o FID (*Free Induction Decay*) por uma linha exponencial 0,3 Hz, ampliando a função antes da transformação de Fourier. Depois disso, todos os espectros foram manualmente faseados e a linha de base corrigida, com o auxílio de uma função polinomial ( $a + Bx + Cx^2 + Dx^3 + Ex^4$ ), usando o programa TopSpin versão 3,2 (Bruker). Os espectros de RMN foram internamente referenciados para o desvio químico de TSP (trimetilsililpropionato) a 0,00 ppm para os extractos aquosos e tecidos, e para o desvio químico do clorofórmio a 7,26 ppm, para os extractos de lípidos. As regiões de interferência da água (4,60-5,10 ppm) foram removidas para evitar qualquer distorção de base causada pela supressão de água (extractos aquosos e tecidos). Da mesma forma, a região contendo a ressonância do clorofórmio (7-7,7 ppm) foi excluída dos espectros de lípidos. Este procedimento foi feito em AMIX, versão 3.914 (Bruker).

Após o processamento, os dados foram organizados em matrizes. Os espectros foram alinhados utilizando o *Segment-Wise Peak Alignment Algorithm* (RSPA) e normalizados

usando o método *Probability Quotient Normalisation* (PQN), em versão MATLAB 7.9.0 (Mathworks Inc.).

A atribuição de picos de espectroscopia foi realizada com o apoio da *Bruker Bioreference 2.0.0 NMR Spectra Database (Bruker BioSpin)*, *Biological Magnetic Resonance Data Bank and in Human Metabolome Data Base* e por comparação com as atribuições de sinais relatadas na literatura (Duarte De 2005, Vinaixa 2010, Bharti 2012).

Os dados obtidos foram tratados de acordo com os métodos que se descrevem no capítulo próprio.

### **2.3. Marcadores de rastreio e diagnóstico do CHC: o papel da OPN**

O estudo foi feito em doentes do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra (Hospitais da Universidade de Coimbra), seguidos em Consulta de Doença Hepática e de Pré-Transplante Hepático.

Em todos os indivíduos, o sangue foi recolhido num tubo de plástico contendo ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) e as amostras de plasma foram armazenadas a  $-80^{\circ}\text{C}$  até à determinação da OPN e da AFP, sendo as análises efectuadas no Serviço de Patologia Clínica do mesmo hospital.

O diagnóstico de CHC foi efectuado seguindo as recomendações da *European Association for the Study of the Liver* (EASL) e o estadiamento realizado segundo o sistema do grupo *Barcelona Clinic Liver Cancer* (BCLC), de acordo também com as referidas recomendações. O diagnóstico de cirrose foi estabelecido com base em dados clínicos, testes de função hepática, exames de imagem (ecografia e/ou TC abdominal), elastografia hepática transitória (Fibroscan<sup>®</sup>), com confirmação histológica nos casos de dúvida.

Todos os doentes incluídos tinham consumo de álcool comprovadamente superior a 60 g/dia durante mais de 10 anos, tendo sido excluídas outras causas de doença hepática (VHB, VHC, doenças autoimunes e metabólicas).

Para estratificar a gravidade da doença hepática utilizámos a classificação de Child-Pugh, sendo os doentes divididos nas classes A, B e C e foi também calculada a pontuação do *Model for End-stage Liver Disease* (MELD)

Foram incluídos doentes com cirrose hepática alcoólica (Grupo I) e doentes com cirrose e CHC (Grupo II). Em todos foram determinados os valores de OPN e AFP plasmática e ainda os seguintes parâmetros: hemoglobina (Hb, g/dL), volume globular médio (VGM, fL), plaquetas (Plaq,  $\times 10^9/L$ ), INR, creatinemia (Cr, mg/dL), albuminemia (g/dL), actividade sérica da aspartato aminotransferase (AST, U/L) e da alanina aminotransferase (ALT, U/L), fosfatase alcalina (FA, U/L), gama glutamiltransferase (GGT, U/L) séricas e bilirrubinemia total (Brb, mg/dL).

No Grupo I todos os doentes tinham indicação para vigilância, de acordo com as recomendações actuais: cirróticos na classe A ou B de Child-Pugh, sendo apenas incluídos doentes da classe C que estavam em lista para transplante hepático (*EASL-EORTC Clinical Practice Guidelines, 2012*).

Os níveis plasmáticos de OPN foram obtidos utilizando um kit comercial *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) (*Human osteopontin assay kit, Immuno-Biological Laboratories Co., Ltd Ref. IBL (JP 27158), Gunma, Japan*).

Os níveis séricos de AFP foram obtidos utilizando um kit comercial (*IMMULITE 2000 AFP, Siemens Healthcare Diagnostics, Tarrytown, NY*), sendo a técnica de doseamento utilizada, a quimioluminescência.

Os métodos de análise estatística utilizados são descritos no capítulo do trabalho.

## **Capítulo 3**

### **CARCINOMA HEPATOCELULAR: ESTUDO CLÍNICO**



## 1. INTRODUÇÃO E OBJECTIVOS

Apesar de actualmente o carcinoma hepatocelular (CHC) ser detectado mais precocemente do que no início dos anos 90, devido aos programas de vigilância e à melhoria das técnicas de diagnóstico, dados relativamente recentes indicam que, na Europa, a taxa global de sobrevivência aos 5 anos é de apenas 8,6% (Berrino F *et al.* 2007; Verdecchia A *et al.* 2007).

Nos países ocidentais a esmagadora maioria (70 a 90%) dos casos surge em cirrose, que é o factor de risco mais importante, sendo a incidência mais elevada na etiologia viral (El-Serag HB, Rudolph KL, 2007). Globalmente, calcula-se que cerca de 1/3 dos doentes com cirrose vão desenvolver CHC ao longo da sua vida (Sangiovanni A *et al.*, 2006).

Em áreas de baixa prevalência de infecção por VHB e VHC o álcool é um factor de risco importante, tendo sido definida uma relação causal, pela IARC, desde 1988 (IARC, 1988). Em Portugal, acredita-se que a maioria dos doentes com CHC tem cirrose alcoólica e/ou associada ao VHC.

As recomendações actuais para o diagnóstico das lesões nodulares hepáticas, detectadas em ecografia de rastreio em fígado cirrótico, contemplam a hipótese de se prescindir do critério histopatológico perante um comportamento dinâmico típico do tumor em exames imagiológicos (TC espiral com contraste ou RM com gadolínio), feitos com equipamento adequado, por radiologistas treinados. O padrão típico (lesão hipervasculares em fase arterial e rápido *wash out* em fase venosa/tardia) tem uma especificidade de 100% para nódulos entre 0,5 e 2 cm, mas uma sensibilidade de apenas 30%, acentuando a importância de outros exames, nomeadamente histológicos, nestes casos (*EASL-EORTC Clinical Practice Guidelines*, 2012).

A decisão da terapêutica a efectuar tem que ter em conta não só o estágio do tumor, mas igualmente a função hepática e o estado geral do doente e deve ser tomada por uma equipa multidisciplinar. Não existindo evidência resultante de estudos

aleatorizados, têm sido obtidos consensos e publicadas recomendações, com o intuito de padronizar a definição da terapêutica e do prognóstico em cada caso.

As orientações actuais da EASL/EORTC e da AASLD recomendam a classificação do *Barcelona Clinic Liver Cancer* (BCLC), que inclui variáveis com implicações no prognóstico (função hepática, estado do tumor e *performance status*) e outras que também influenciam a escolha do tratamento (bilirrubina, hipertensão portal, presença de sintomas ECOG). Esta classificação propõe 5 estádios (0, A, B, C e D), de acordo com as variáveis pré-estabelecidas e aconselha uma terapêutica para cada um deles, fornecendo também informações sobre o prognóstico. Tem sido validada externamente em diferentes contextos clínicos e é um sistema em evolução, que liga a fase do tumor com a estratégia de tratamento de uma forma dinâmica, permitindo a integração de novos avanços.

A classificação BCLC inicial, de 1999 (Llovet JM *et al.* 1999), foi actualizada com a incorporação da fase 0 (CHC muito inicial) e com a quimioembolização como tratamento adequado do CHC em estágio intermédio, em 2003 (Llovet JM, Burroughs A, Bruix J, 2003), posteriormente modificada em 2008 (Llovet JM *et al.*, 2008) para incorporar o sorafenib, como opção de tratamento de primeira linha em tumores avançados.

O tratamento com intuito curativo está indicado nos estádios inicial e muito inicial e, consoante os casos, pode consistir na ressecção cirúrgica, na transplantação hepática ou na destruição percutânea. Os métodos não curativos compreendem a quimioembolização transarterial no estágio intermédio, a terapêutica sistémica com sorafenib no estágio avançado e o tratamento de suporte no estágio terminal.

O sorafenib é a única terapêutica sistémica aprovada para o tratamento do CHC em estágio avançado da classificação BCLC.

É um inibidor de múltiplas cinases, que ao inactivar alvos moleculares presentes nas células neoplásicas e na vasculatura tumoral, evidencia propriedades antiproliferativas e antiangiogénicas, que lhe conferem a capacidade de aumentar a sobrevivência global dos doentes. A eficácia do sorafenib foi testada no estudo SHARP (*Sorafenib HCC*

*Assessment Randomized Protocol*) (Llovet JM *et al.* 2008) e confirmada no estudo Ásia-Pacífico (AP) (Cheng A *et al.*, 2008). Nestes estudos multicêntricos, de fase III, em dupla ocultação, controlados com placebo, foram admitidos doentes com CHC e cirrose hepática, a maioria em estágio A de Child-Pugh. Nos grupos que receberam sorafenib (400 mg, duas vezes ao dia), verificou-se um aumento estatisticamente significativo da sobrevivência global e do tempo de progressão sintomática. Estes dados justificaram o fim antecipado do estudo SHARP, para que todos os doentes fossem tratados com sorafenib, ainda que a taxa de resposta parcial, avaliada pelos critérios RECIST (*Response Evaluation Criteria in Solid Tumors*), tenha sido de 2 % no estudo SHARP e 3,3 % no estudo AP, não havendo registo de resposta completa ao sorafenib nesses ensaios. A resposta tumoral, inicialmente avaliada pela diferença dimensional da lesão tumoral (RECIST), deve ser efectuada segundo a mRECIST (*modified Response Evaluation Criteria in Solid Tumors*), que avalia a necrose tumoral induzida pelo fármaco, ao mostrar ausência de captação de contraste pelas áreas necrosadas, não viáveis, por método imagiológico dinâmico (TC ou RM).

Outras terapêuticas, como a radioembolização, não estão ainda padronizadas, podendo adequar-se a alguns doentes em estágio intermédio. Na verdade, tem sido particularmente relevante o reconhecimento de que os doentes com CHC intermédio constituem um grupo heterogéneo, com prognóstico diverso. Por isso, recentemente um painel de especialistas (Bolondi L *et al.* 2012) propôs uma subclassificação, tentando também adequar e alargar as opções terapêuticas, com base nas provas disponíveis e na opinião de peritos.

No nosso país, embora os poucos dados existentes apontem para um aumento do número de internamentos e da mortalidade devidos ao CHC (Marinho R *et al.*, 2007), muito pouco se sabe sobre as características demográficas dos nossos doentes e menos ainda sobre qual é a percentagem de casos diagnosticados em rastreio, qual o estágio do CHC aquando do diagnóstico, quais os tratamentos que são instituídos para cada estágio e qual é a evolução dos doentes.

Assim, o objectivo deste estudo é conhecer as características dos doentes com CHC da região centro de Portugal, mais concretamente de doentes com este diagnóstico

seguidos no Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra (Hospitais da Universidade de Coimbra), com particular atenção à epidemiologia, etiologia, associação de factores de risco, diagnóstico, estadiamento, terapêutica efectuada e prognóstico.

## **2. DOENTES E MÉTODOS**

### **2.1. Desenho do estudo e características dos doentes**

Foi feita uma análise retro-prospectiva de doentes com CHC, seguidos no Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra (Hospitais da Universidade de Coimbra), coligindo dados epidemiológicos, métodos de diagnóstico utilizados, estadiamento dos casos, tipos de tratamento utilizados e seu resultado.

O diagnóstico de CHC foi efectuado de acordo com as recomendações da Associação Europeia para o Estudo do Fígado (EASL) e o estadiamento segundo o sistema do grupo *Barcelona Clinic Liver Cancer* (BCLC), de acordo também com as mesmas recomendações.

Foi construído para este fim um *software* de registo de dados, constituindo também uma base que servirá para o registo futuro dos doentes com CHC, permitindo a sua monitorização. A plataforma desenvolvida pelo Centro de Informática e Sistemas da Universidade de Coimbra (CISUC) permite a inserção, edição e consulta dos dados clínicos dos doentes, sendo possível registar a informação relativa a todo o seguimento do doente, acompanhando o seu comportamento ao longo da doença. O sistema possibilita a análise da sobrevivência global mediante factores pré-definidos: sexo, álcool, cirrose, estágio do tumor, tratamentos efectuados, entre outros. A distribuição dos doentes segundo determinados factores de risco, idade e etiologia também se encontra contemplada. O acesso é feito remotamente, estando disponível em qualquer dispositivo com acesso à *web* e, portanto, rapidamente acessível em qualquer computador, telemóvel ou *tablet*. O sistema disponibiliza uma base de

informação bem estruturada, que poderá servir de apoio a estudos futuros e demais investigações na área.

## **2.2. Análise estatística**

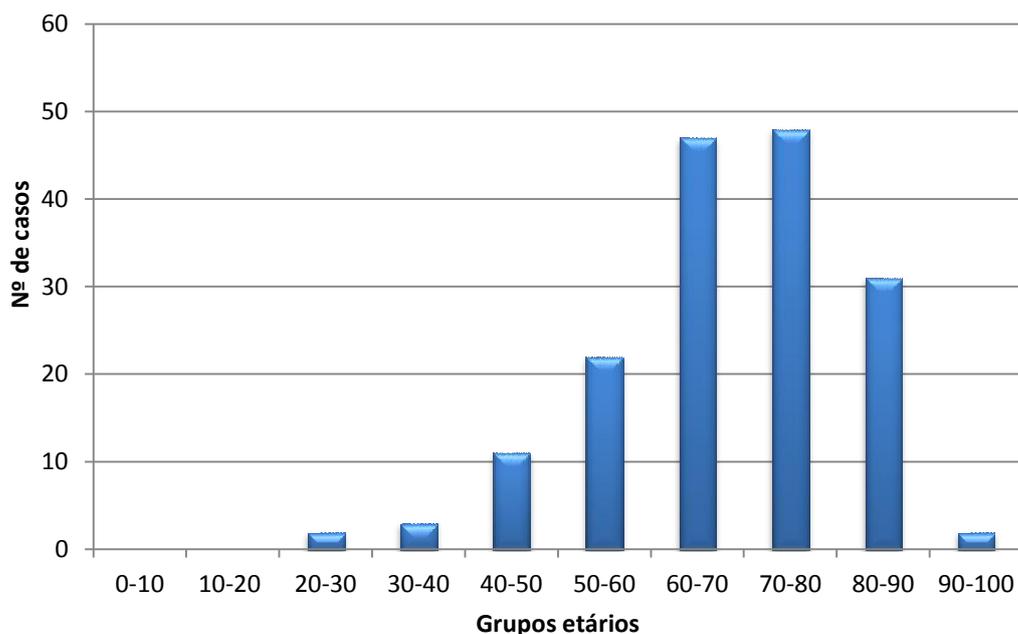
Foram utilizados os testes de Kolmogorov-Smirnov para determinação da normalidade de distribuição dos doentes quanto à sobrevivência, de Mann-Whitney para avaliar as diferenças entre variáveis sem distribuição normal e t-Student para variáveis contínuas de distribuição normal. A sobrevivência foi estimada pelo método de Kaplan-Meier.

Os doentes foram distribuídos por dois grupos segundo o algoritmo k-means, que é um método de agrupamento por partição, calculando as diferenças entre sujeitos através de métricas de distância que consideram os valores das suas variáveis independentes. Para este estudo foram usadas 19 variáveis: *performance status*, encefalopatia, ascite, INR, albuminemia, bilirrubinemia total, ALT, AST, GGT, fosfatase alcalina, ceratininemia, AFP, hemoglobina, VGM, leucócitos, plaquetas, número de nódulos e sua maior dimensão.

## **3. RESULTADOS**

### **3.1. Dados gerais**

Entre 1 de Janeiro de 2008 e 31 de Dezembro de 2013 foram seguidos no Serviço de Medicina Interna dos HUC (CHUC) 165 doentes (H:133; M:32) com CHC, com idades entre os 20 e os 93 anos (média de 64,7 anos), aquando do diagnóstico. A distribuição por grupos etários pode observar-se na Figura 3.1.



**Figura 3.1** - Distribuição dos doentes por grupos etários.

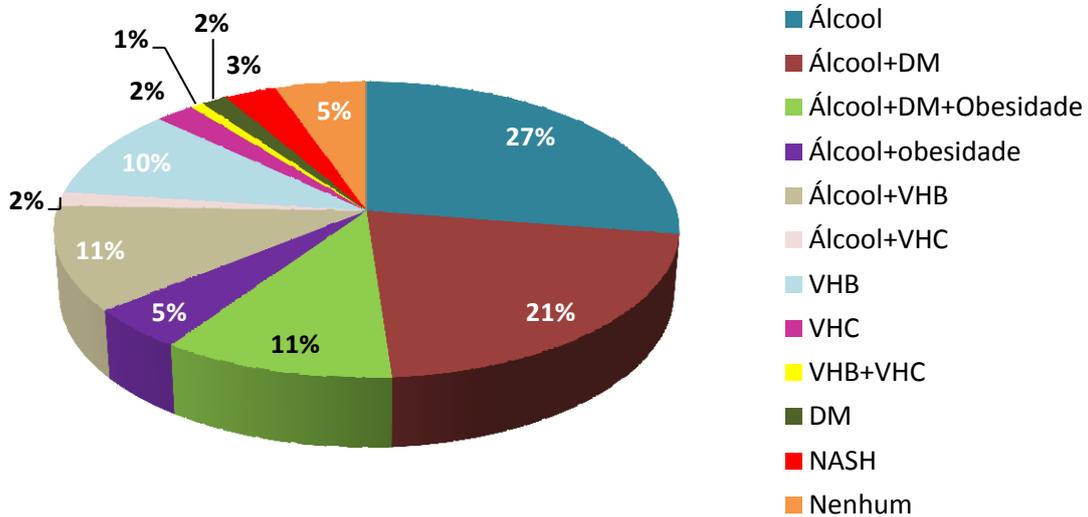
### 3.2. Factores de risco

A grande maioria dos doentes (90,3%) tinha cirrose hepática. Cento e vinte e dois indivíduos (73,9%) referiam ingestão excessiva de álcool (consumo igual ou superior a 60g/dia nos homens e 40 g/dia nas mulheres, durante mais de 10 anos), sendo 111 homens (83,4% do total) e 11 mulheres (34,4% do total).

Outros potenciais factores de risco detectados foram: infecção anterior por VHB (23,7%), infecção anterior por VHC (6,9%), infecção por VIH (1,5%), diabetes mellitus tipo 2 (36,6%), obesidade de grau II ou superior (13,7%) e tabagismo (38,9%). Estes factores estavam com frequência associados, sobretudo ao consumo de álcool ou entre si (Figura 3.2).

O álcool, isoladamente ou associado à diabetes mellitus tipo 2, à obesidade ou a ambas, foi responsável por 59% dos factores de risco detectados nos nossos doentes. Os vírus hepatotrópicos foram detectados em 26% dos casos, existindo em metade deles, ingestão excessiva de álcool. Em 3% dos doentes a NASH (aparentemente sem

cirrose) foi o único factor detectado e em 2% apenas havia diabetes mellitus tipo 2. Em 5% dos indivíduos com CHC não detectámos nenhum factor de risco.

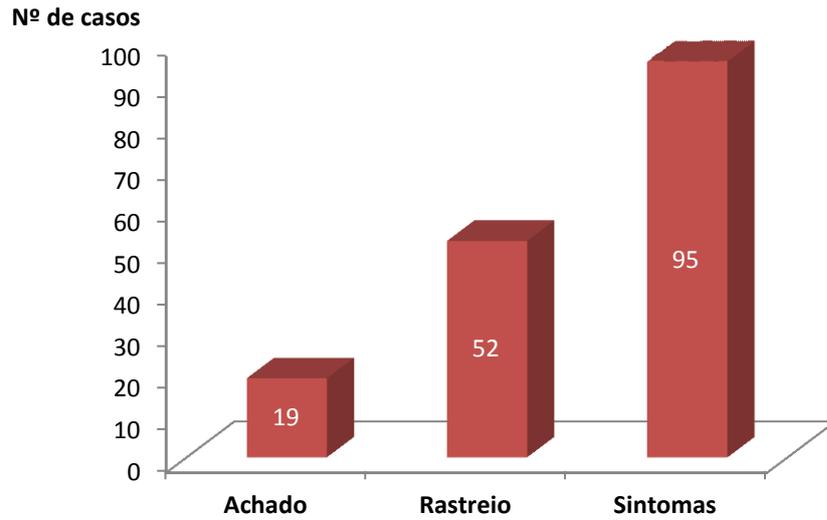


**Figura 3.2** - Principais factores de risco identificados nos nossos doentes.

Nos nossos doentes verificou-se com grande frequência a associação de diversos factores de risco, com possibilidade de efeito sumativo ou sinérgico entre eles. Merecem destaque as associações do consumo excessivo de álcool à diabetes mellitus (21% dos casos), à obesidade (5%), ou a ambas (11%), ao VHC (11%) e ao VHB (2%).

### 3.3. Formas de apresentação clínica

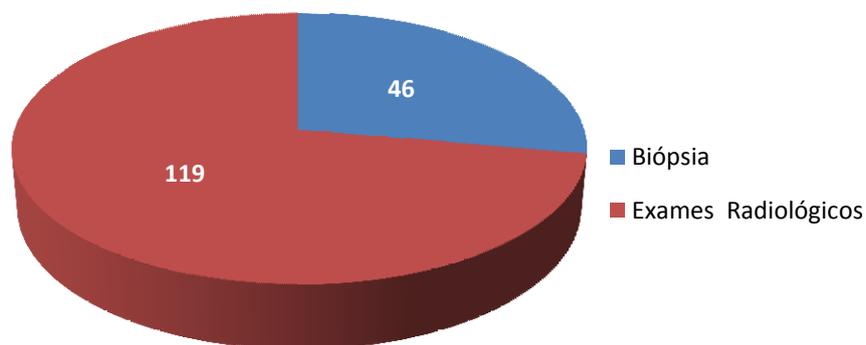
O diagnóstico foi efectuado na maioria dos doentes após o aparecimento de sintomas (57,6%), sendo detectado em rastreio em 31,5%. Nos restantes foi um achado ocasional em exames radiológicos efectuados por outro motivo (11,5%) (Figura 3.3).



**Figura 3.3** - Formas de apresentação clínica aquando do diagnóstico.

### 3.4. Exames efectuados para obtenção do diagnóstico

A maioria dos diagnósticos foram efectuados por CT e/ou RM (72,1%), sendo os restantes 27,9% feitos histopatologicamente (Figura 3.4).



**Figura 3.4** - Exames complementares realizados para obtenção do diagnóstico.

### 3.5. Distribuição dos doentes pelos estádios BCLC

Quando foi efectuado o diagnóstico, 32,7% dos indivíduos encontravam-se no estágio C (avanzado) da classificação BCLC, 23,6% no estágio B (intermédio), 22,4% no estágio D (terminal) e 19,4% nos estádios 0 e A (inicial e muito inicial) (Figura 3.5).

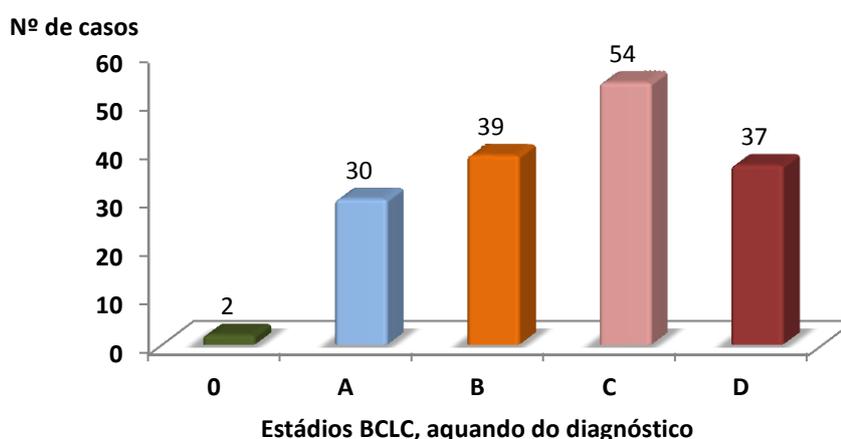
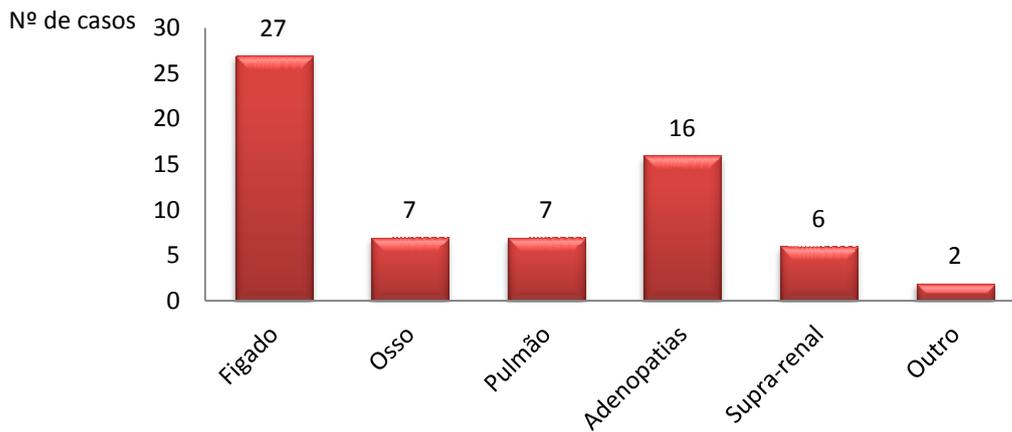


Figura 3.5 - Estadiamento BCLC aquando do diagnóstico.

### 3.6. Metástases e sua localização

Dos 54 doentes diagnosticados no estágio avanzado (C), 24 tinham trombose da veia porta e 35 tinham metástases, a maioria (n=27) intra-hepáticas. Foram detectadas também metástases ganglionares (n=16), ósseas (n=7), pulmonares (n=7) e da suprarenal (n=6) (Figura 3.6).

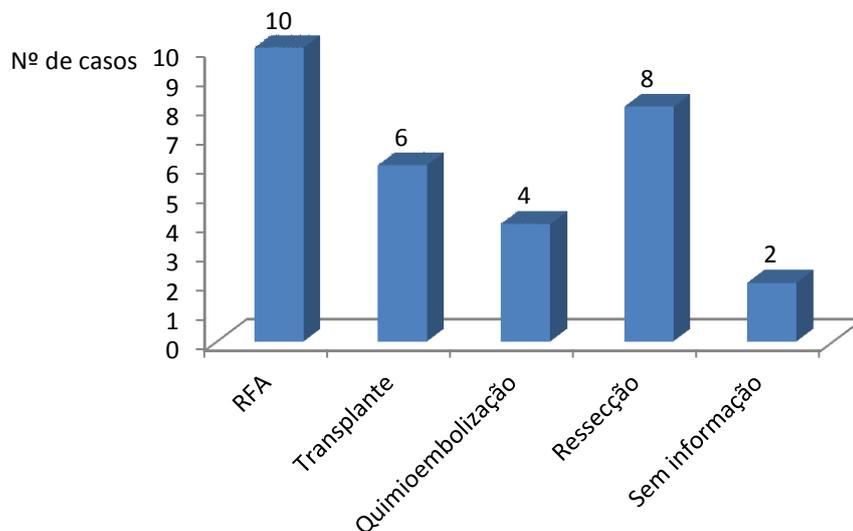


**Figura 3.6** - Localização das metástases.

### 3.7. Tratamentos efectuados

#### 3.7.1. Estádio A

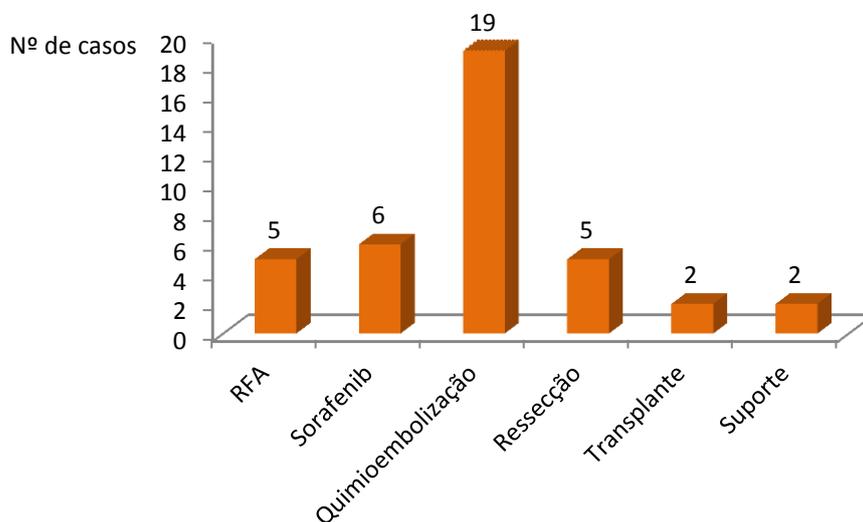
Na Figura 3.7 podemos ver os tipos de tratamento efectuados pelos doentes no estágio A. A ablação por radiofrequência (RFA) foi a terapêutica mais frequente (34,5%), seguida da ressecção cirúrgica (27,6%). O transplante hepático foi feito em 20,7% dos indivíduos e foi realizada também quimioembolização em alguns casos (13,8%).



**Figura 3.7** - Primeiro tratamento efectuado no estágio A.

### 3.7.2. Estádio B

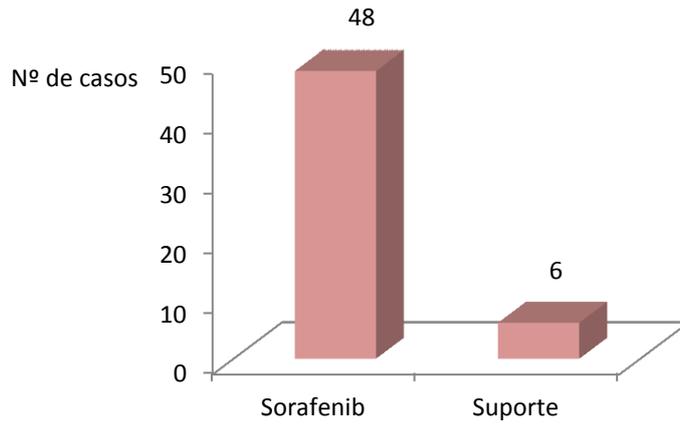
A quimioembolização foi o tratamento mais frequentemente realizado neste estágio (48,7%), embora tenha sido efectuada também terapêutica potencialmente curativa (transplante e ressecção hepática) e outras modalidades paliativas (sorafenib e tratamento de suporte) (Figura 3.8).



**Figura 3.8** - Primeiro tratamento efectuado no estágio B.

### 3.7.3. Estádio C

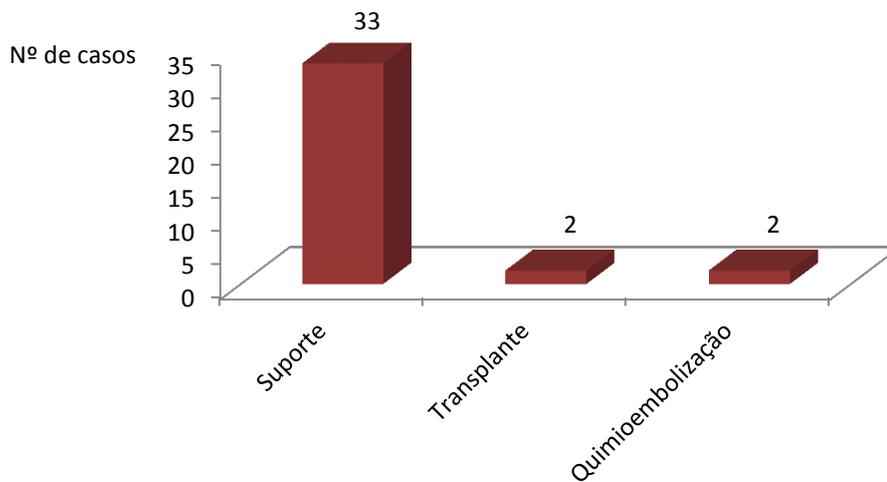
O primeiro tratamento efectuado no estágio C foi com sorafenib, na maioria dos casos (88,9%). Houve 11,1% de doentes que não reuniam condições para outro tratamento, excepto de suporte (Figura 3.9).



**Figura 3.9** - Primeiro tratamento efectuado no estágio C.

### 3.7.4. Estádio D

A maioria dos doentes em estágio terminal fez apenas terapêutica de suporte. Dois indivíduos foram tratados com transplante hepático pois, apesar de estarem no estágio D, devido à gravidade da insuficiência hepática (Child-Pugh C), tinham tumores com dimensões dentro dos critérios de Milão (Figura 3.10).



**Figura 3.10** - Primeiro tratamento efectuado no estágio D.

### 3.8. Tratamento de doentes em estágio avançado com sorafenib

#### 3.8.1. Casuística

Iniciaram terapêutica com sorafenib 48 doentes (38 H, 10 M), com média de idades de  $60,7 \pm 12,6$  anos (20 – 77). Na Figura 3.11 pode ver-se a distribuição dos doentes por grupos etários, tendo a maioria mais de 50 anos, com predomínio da sétima década da vida.

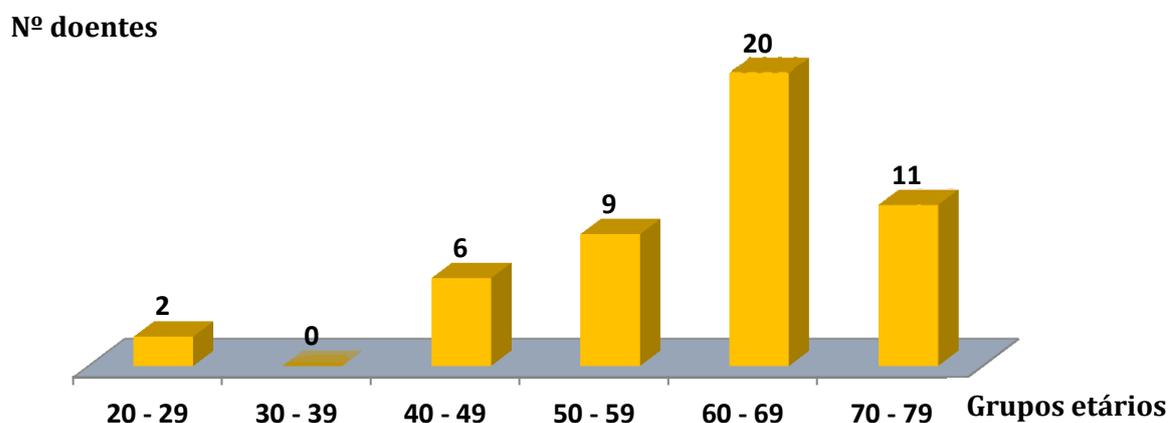
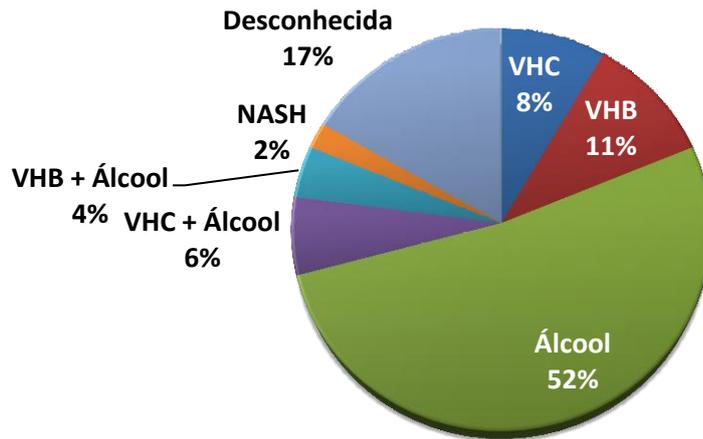


Figura 3.11 - Distribuição dos doentes por grupos etários.

O álcool foi o factor de risco mais frequentemente detectado, isoladamente (52% dos doentes), ou associado ao VHB (11%) ou ao VHC (8%). Em 17% dos indivíduos não foi detectado nenhum factor de risco (Figura 3.12).

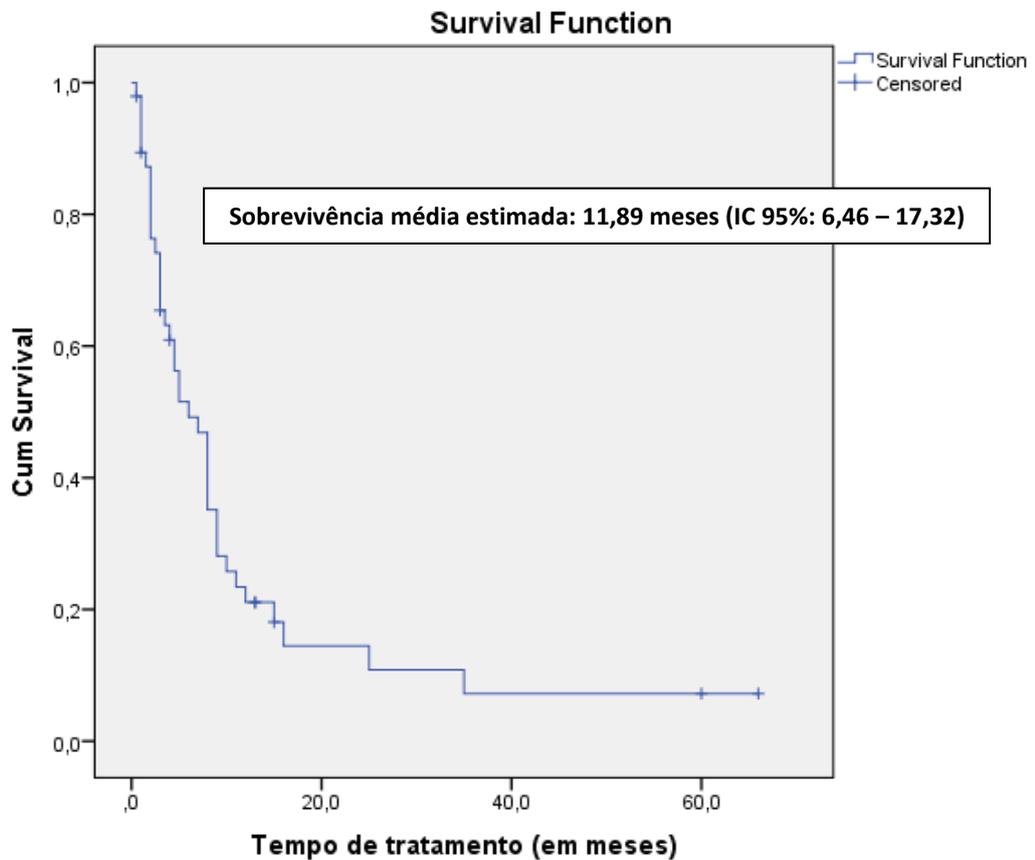
Tinham cirrose 39 (81,2%) doentes, 82% dos quais pertenciam à classe A de Child-Pugh e 18% à classe B. Quando iniciaram tratamento com sorafenib todos os doentes se encontravam no estágio avançado (estádio C) da classificação BCLC.

O tempo médio de tratamento foi de  $9,1 \pm 13,1$  meses, variando entre 0,5 e 66 meses.



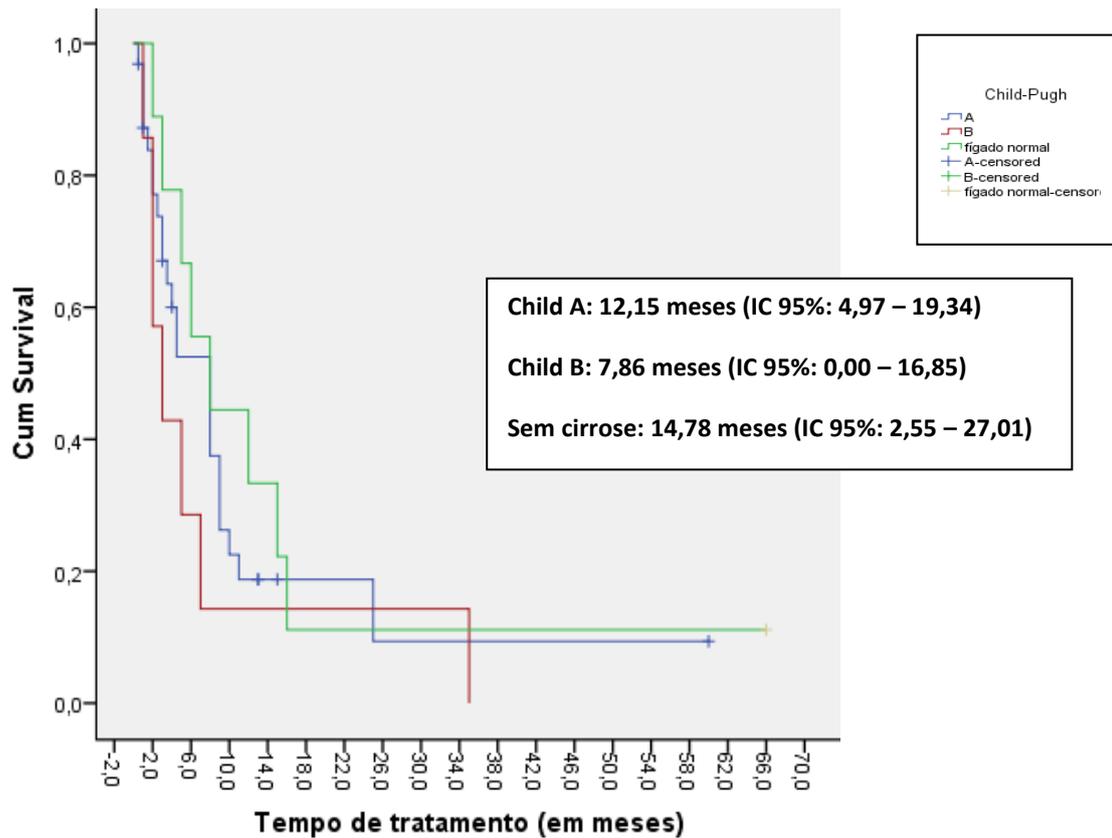
**Figura 3.12** - Factores de risco dos doentes com CHC tratados com sorafenib.

A sobrevivência média estimada dos nossos doentes foi de 11,89 meses, com um intervalo de confiança a 95% de 6,46 a 17,32 (Figura 3.13).



**Figura 3.13** - Sobrevivência dos doentes e sobrevivência média estimada.

Quando avaliámos a sobrevivência de acordo com a função hepática verificámos que a sobrevivência média era de 14,78 meses (IC 95%: 2,55 – 27,01) nos doentes sem cirrose, de 12,15 meses (IC 95%: 4,97 – 19,34) nos indivíduos incluídos na classe A de Child-Pugh e de 7,86 meses (IC 95%: 0,00 – 16,85) nos doentes na classe B (Figura 3.14).



**Figura 3.14** - Sobrevivência de acordo com a função hepática dos doentes.

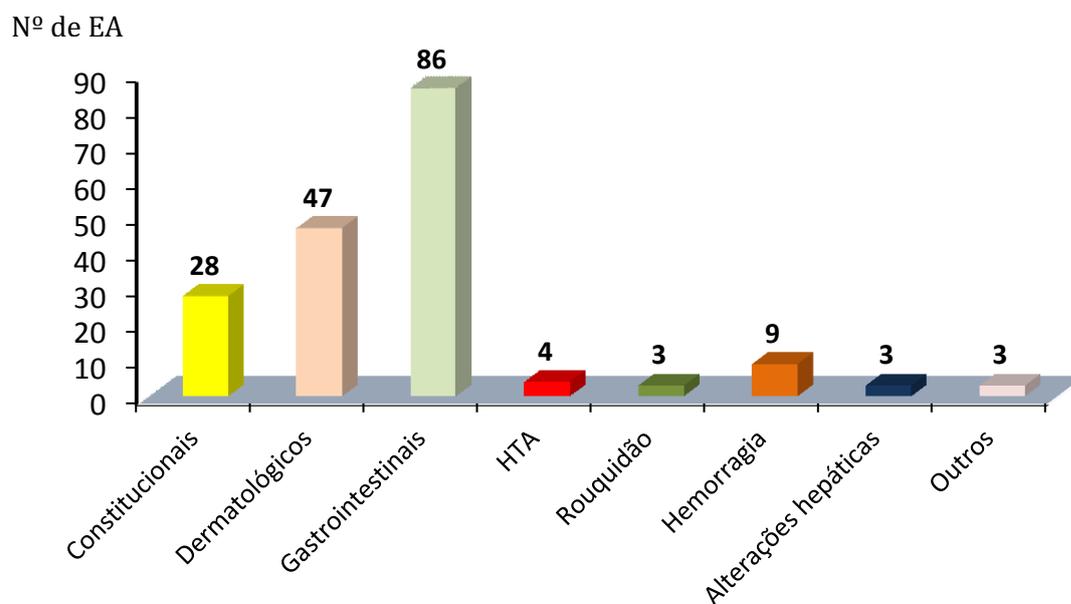
Surgiram efeitos secundários na grande maioria dos doentes (45 dos 48 indivíduos tratados) (Figura 3.15), sendo o número médio de efeitos adversos por doente de  $3,8 \pm 2,1$  (entre 0 e 7).

Os mais frequentes foram os gastrointestinais (n=86), ocupando os efeitos dermatológicos o segundo lugar em frequência (n=47), e em terceiro situaram-se as queixas constitucionais (n=28). Muito menos habituais foram outros efeitos

secundários nomeadamente, a hemorragia (n=9), a hipertensão arterial (n=4), a rouquidão (n=3) e o agravamento das alterações analíticas hepáticas (n=3). (Figura 3.16).



**Figura 3.15** - Incidência de efeitos secundários nos doentes tratados com sorafenib.



**Figura 3.16** - Efeitos adversos (EA) atribuídos à terapêutica com sorafenib.

Quando estratificamos os efeitos adversos por grupos e por gravidade, de acordo com o *Common Terminology Criteria for Adverse Events* (CTCAE) Versão 4.0 de 2010, verificamos que apesar de muito frequentes, estes efeitos eram na maioria dos casos de grau 1 ou 2, sendo raros os efeitos de grau 3 e ainda mais raros os de grau 4. Nos sintomas constitucionais e dermatológicos não tivemos nenhum efeito adverso de grau 3 nem de grau 4.

Os efeitos gastrointestinais ainda que muito frequentes, foram também na maioria das vezes de pouca gravidade, tendo havido 3 casos com efeitos adversos de grau 3. Os casos de hipertensão arterial (HTA) não foram muito frequentes, mas quando ocorreram foram de grau 3 (n=3) ou de grau 4 (n=1). Também a disfunção hepática, embora pouco frequente (n=4) foi a maioria das vezes de grau 3 (n=3). Dos 9 casos de hemorragia reportados, 2 foram de grau 3 (Quadro 3.1).

**Quadro 3.1** - Efeitos adversos de acordo com a gravidade.

Efeitos adversos	Sorafenib (N = 48)		
	Todos os graus	Grau 3	Grau 4
Incidência global	96%		
Sintomas constitucionais	28	0	0
Efeitos dermatológicos	47	0	0
Outros	3	0	0
Efeitos gastrointestinais	86	3	0
Alterações da voz	3	0	0
HTA	4	3	1
Disfunção hepática	4	3	0
Hemorragia	9	2	0

A fadiga foi o sintoma constitucional mais frequente, sendo referida por 19 doentes (39,6%); 9 dos 48 doentes (18,7%) emagreceram durante o tratamento com sorafenib (Quadro 3.2).

**Quadro 3.2** - Efeitos adversos constitucionais.

Efeitos adversos	Sorafenib (N =48)		
	Todos os graus	Grau 3	Grau 4
Sintomas constitucionais			
Fadiga	19	0	0
Emagrecimento	9	0	0

Dos efeitos adversos dermatológicos referidos, a reacção cutânea mão-pé (n=19; 39,6%) foi a mais habitual, sendo também frequente a menção de pele seca (n=10; 20,8%) (Quadro 3.3).

**Quadro 3.3** - Efeitos adversos dermatológicos.

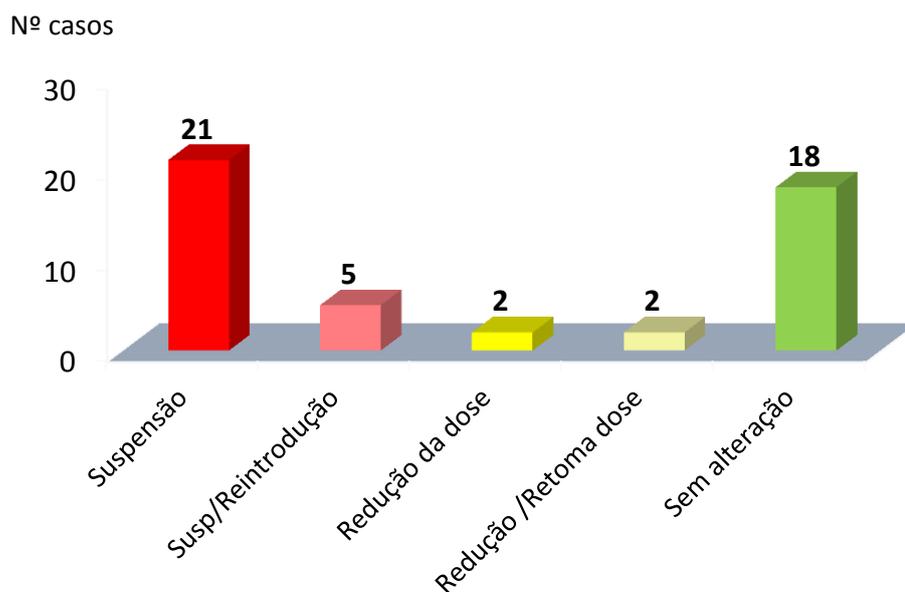
Efeitos adversos	Sorafenib (N =48 )		
	Todos os graus	Grau 3	Grau 4
Efeitos dermatológicos			
Alopecia	4	0	0
Pele seca	10	0	0
Reacção cutânea mão-pé	19	0	0
Prurido	5	0	0
Rash ou descamação	6	0	0

A diarreia foi o efeito secundário gastrointestinal mais frequentemente referido (n=21; 43,7%), sendo num caso de grau 3. As náuseas (n=17;35,4%); a anorexia (n=15;31,2%), os vômitos (n=14;29,2%) e a dor abdominal sem outra causa que a justificasse (n=14;29,2%) também foram frequentes (Quadro 3.4).

**Quadro 3.4** - Efeitos adversos gastrointestinais.

Efeitos adversos	Sorafenib (N =48 )		
	Todos os graus	Grau 3	Grau 4
Efeitos gastrointestinais			
Anorexia	15	0	0
Diarreia	21	1	0
Nauseas	17	2	0
Obstipação	5	0	0
Vômitos	14	2	0
Dor abdominal, sem outra causa	14	0	0

Vinte e sete (56,2%) dos nossos doentes mantiveram o tratamento com sorafenib; destes, 18 (37,5%) efectuaram sempre a dose total recomendada (400mg, 2 id), em 5 (10,4%) houve suspensão temporária por efeitos adversos, em 2 (4,2%) houve redução temporária, com retoma posterior da dose terapêutica, e em 2 (4,2%) houve redução permanente da dose. Vinte e um doentes (43,8%) suspenderam definitivamente a medicação por efeitos secundários e/ou progressão da doença (Figura 3.17; Quadro 3.5).



**Figura 3.17** - Ajustes da terapêutica com sorafenib.

**Quadro 3.5** - Causas de suspensão definitiva da terapêutica com sorafenib.

Causas	Nº Casos
Diarreia	1
Vómitos e diarreia	3
Hemorragia digestiva	1
Trombocitopenia	1
HTA	1
Sintomas constitucionais / Progressão da doença	14

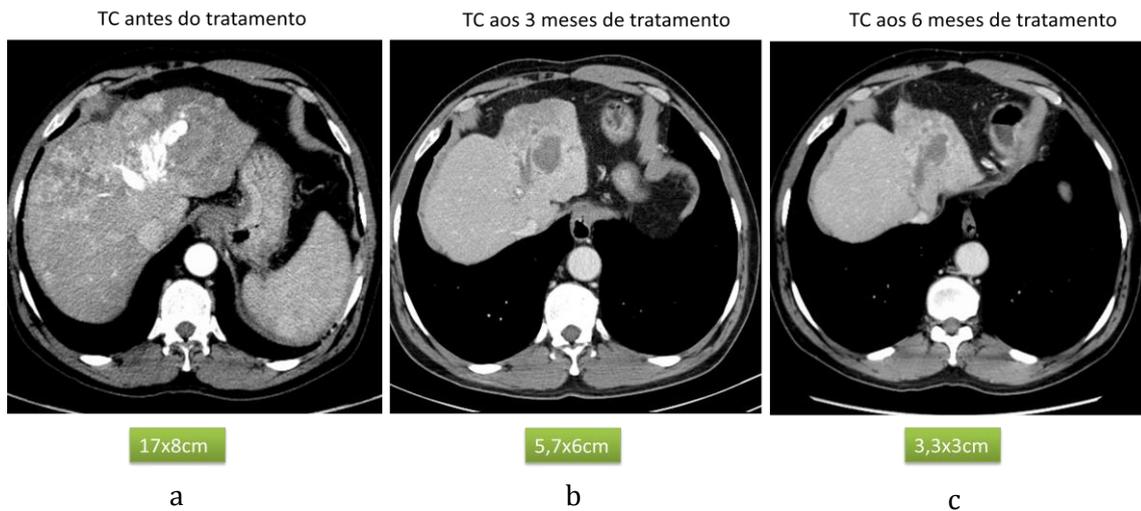
### 3.8.2. Um caso clínico

Homem de raça negra, nascido na Guiné, residente em Portugal desde os 18 anos, com 60 anos de idade, cirrose hepática (Child-Pugh A), alcoolismo crónico, infecção crónica por VHB (ADN-VHB negativo) e anti-VHC positivo com ARN indetectável; recorreu ao Serviço de Urgência por dor no hipocôndrio direito, com dois meses de evolução e agravamento recente. Referia abstinência alcoólica desde o início da sintomatologia e perda de mais de 10% do peso corporal no último ano.

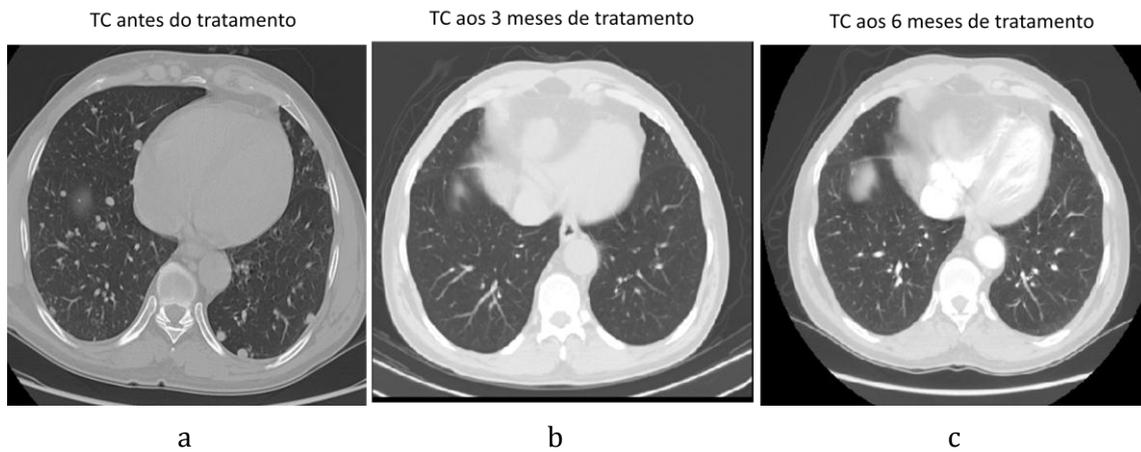
A TC revelou massa hipervascular ocupando a quase totalidade do lobo esquerdo hepático (segmentos VIII e V) com 17 x 8,0 cm, sofrendo *wash out* em fase tardia, com múltiplos vasos ectasiados e *shunts* porto-sistémicos no seu interior (Figura 3.18a); metastização intra-hepática difusa e pulmonar maciça, com nódulos incontáveis em todos os lobos (Figura 3.19a); metástase na suprarrenal esquerda com 12 x 8,0 cm (Figura 3.20a); trombose da veia cava inferior com extensão à aurícula direita.

O valor da AFP era de 479 ng/ml e a biopsia hepática revelou CHC moderadamente diferenciado (G2) em fígado cirrótico. Por se encontrar no estágio avançado (C) da classificação BCLC e não ter contra-indicações, iniciou sorafenib (400 mg, duas vezes ao dia).

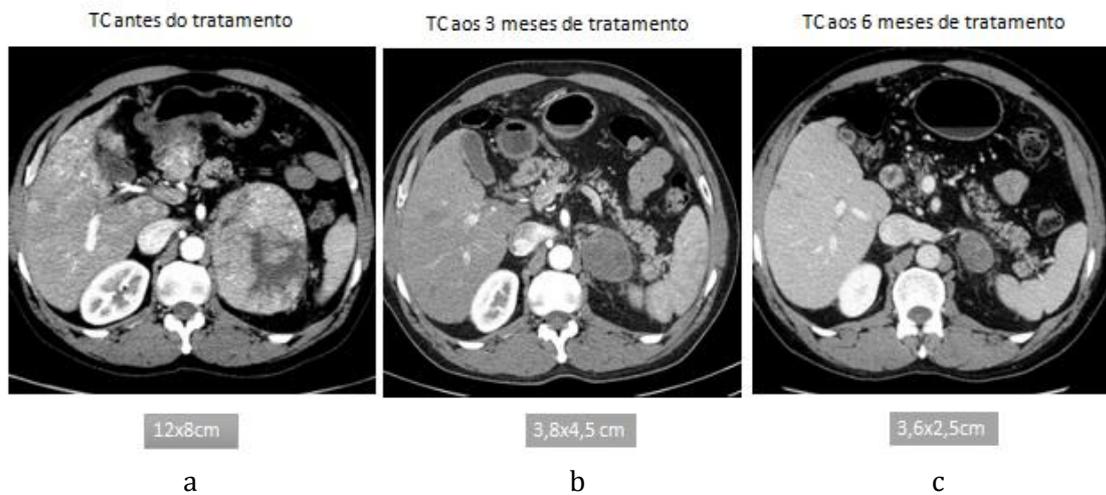
O controlo por TC ao terceiro mês mostrou resolução completa das lesões secundárias pulmonares (Figura 3.19b), redução significativa da dimensão da lesão hepática primária (5,7 x 6,0 cm) e da sua perfusão (não captava contraste) (Figura 3.18b); redução do número e dimensão das lesões satélites intra-hepáticas (hipodensas em ambas as fases), redução significativa da lesão suprarrenal esquerda (36 x 25 mm) (Figura 3.20b), que captava contraste na fase venosa. O trombo da veia cava inferior apresentava marcada redução dimensional da infiltração tumoral e da sua extensão, já sem atingimento da aurícula direita. Apresentava de novo um trombo, sem realce, em toda a veia hepática esquerda e medindo 1 cm de maior eixo no lúmen da veia cava inferior. Aos seis meses, a AFP normalizou (3,7 ng/ml) e mantinha-se uma resposta favorável ao tratamento (Figuras 3.18c, 3.19c e 3,20c), sendo a medicação bem tolerada.



**Figura 3.18** - TC abdominal: evolução do CHC (lesão hepática primária) com o tratamento.



**Figura 3.19** - TC torácica: evolução das lesões metastáticas pulmonares com o tratamento.



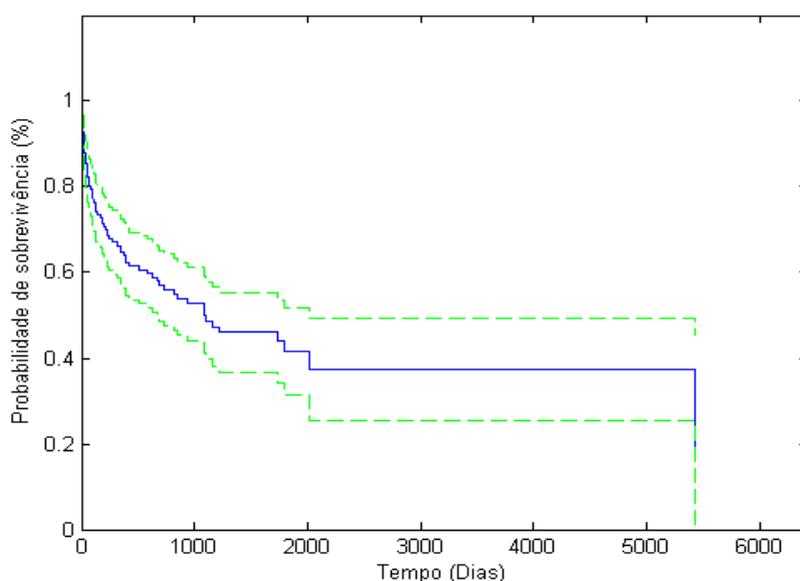
**Figura 3.20** - TC abdominal: evolução da lesão da suprarenal com o tratamento.

Após um ano de terapêutica o doente apresentava fígado com atrofia do lobo esquerdo e nódulo hipodenso no segmento III (2,4 cm), nódulos secundários hipodensos, estáveis em número e dimensões (o maior no segmento V, com 11 mm) e nódulo na suprarrenal esquerda com 30 x 21 mm. Mantinha a trombose na veia hepática esquerda, com extensão à veia cava inferior, com redução da sua extensão e trombo no ramo esquerdo da veia porta com redução dimensional.

Completo em Julho de 2014, dois anos de tratamento, encontrando-se clinicamente bem, referindo apenas secura da pele, com hipertensão arterial, que entretanto surgiu, controlada com enalapril 10 mg id. Analiticamente, tem apenas elevação da GGT (cerca de 6xN) e aguarda TC para controlo evolutivo das lesões.

### 3.9. Sobrevivência global dos doentes com CHC

A sobrevivência global mediana dos nossos doentes foi de 364 dias, com um desvio absoluto na mediana de 337 dias. Na Figura 3.21 pode observar-se a probabilidade de sobrevivência dos doentes, de acordo com a curva de Kaplan-Meier. A probabilidade de sobrevivência a 1 ano foi de 63,9% e aos 3 anos de 48,2%.



**Figura 3.21** - Curva de sobrevivência global dos doentes com CHC.

### 3.10 Sobrevivência por estágio BCLC

O quadro 3.6 e a figura 3.22 mostram os dados da sobrevivência nos diferentes estádios BCLC, que adiante se explicitarão.

**Quadro 3.6.** Sobrevivência dos doentes por estágio BCLC.

Estádio	Mediana (dias)	Desvio absoluto (dias)
0	587	264.5
A	1084	585
B	790	514
C	150	123
D	57	52

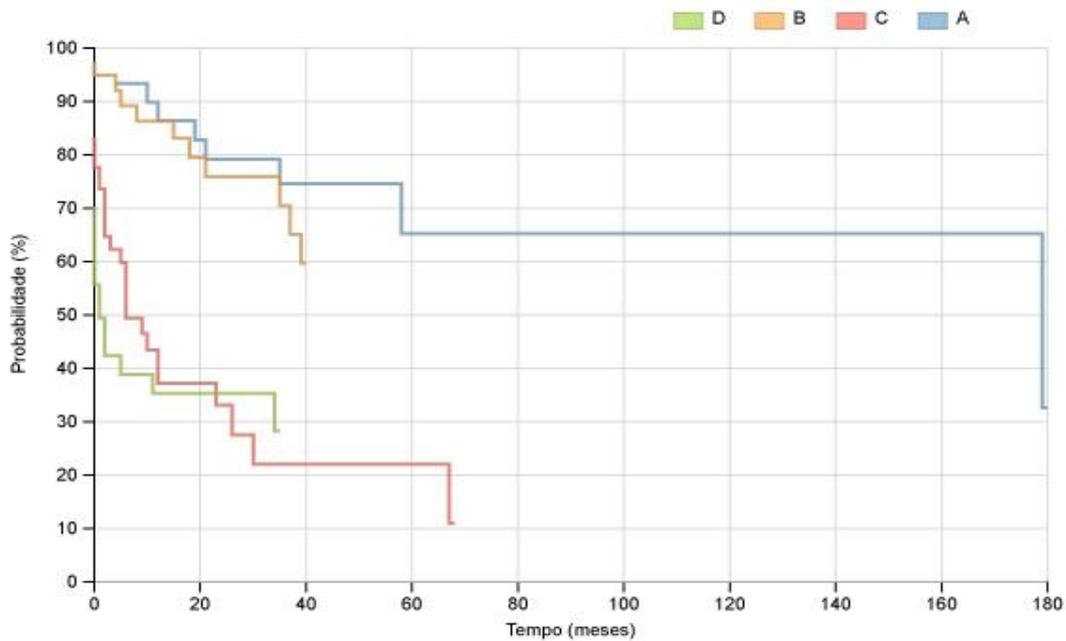
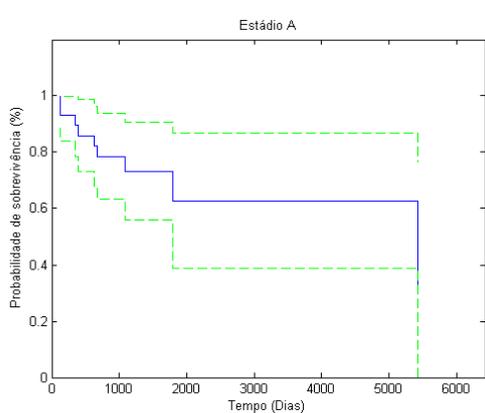


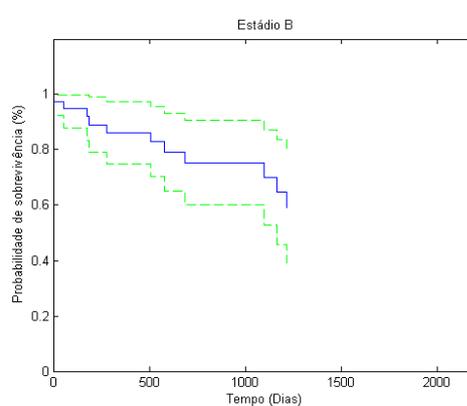
Figura 3.22 - Probabilidades de sobrevivência de acordo com os estádios BCLC.

O estágio 0 (muito inicial) continha apenas 2 doentes, sendo a mediana de sobrevivência de 587 dias e o desvio absoluto de 264,5 dias.

A probabilidade de sobrevivência dos doentes que se encontravam no estágio A, aquando do diagnóstico, pode ser observada nas Figuras 3.22 e 3.23, sendo a probabilidade a 1 ano de 89,9% e a 5 anos de 65,2%. A sobrevivência mediana foi de 1084 dias e o desvio absoluto de 585 dias .



**Figura 3.23** - Probabilidade de sobrevivência no estágio A.

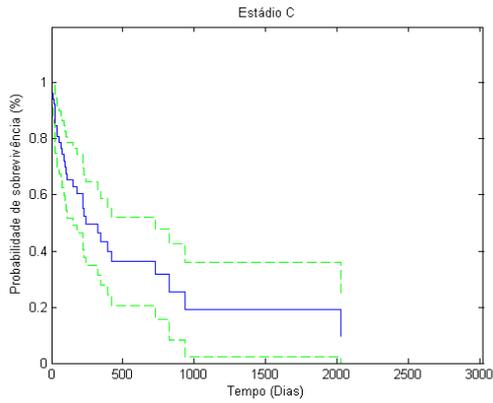


**Figura 3.24** - Probabilidade de sobrevivência no estágio B.

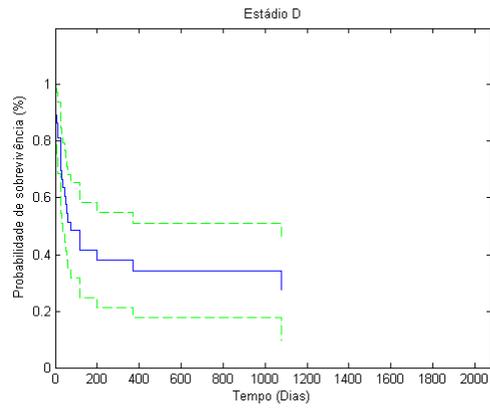
Os doentes no estágio B (Figuras 3.22 e 3.24) tiveram uma sobrevivência mediana de 790 dias, com um desvio absoluto de 514 (probabilidade de sobrevivência a 1 ano de 86,4%, aos 3 anos de 70,5%).

Para os doentes em estágio C (Figuras 3.22 e 3.25) a sobrevivência mediana foi de 150 dias e o desvio de 123 (probabilidade de sobrevivência a 1 ano de 43,4% e aos 5 anos de 22%).

Doentes em estágio terminal (D) (Figuras 3.22 e 3.26) tiveram sobrevivência mediana de 57 dias e desvio absoluto de 52, sendo a probabilidade de sobrevivência a 1 ano de 33,3%.



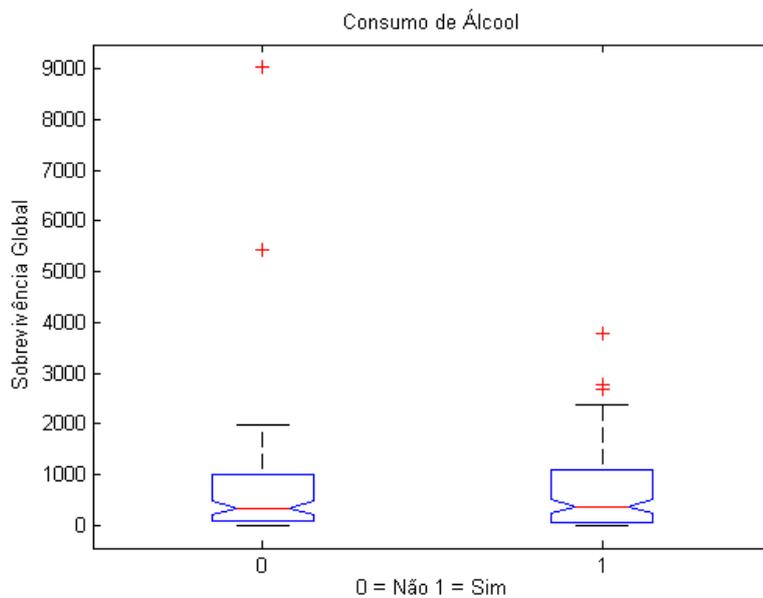
**Figura 3.25** - Probabilidade de sobrevivência no estádio C.



**Figura 3.26** - Probabilidade de sobrevivência no estádio D.

### 3.11. Sobrevivência global dos doentes alcoólicos *versus* não alcoólicos

A sobrevivência dos doentes não seguia a distribuição normal, segundo o teste de Kolmogorov-Smirnov ( $p = 6,2394^{-9}$ ), pelo que foi utilizado o teste de Mann-Whitney, que não mostrou diferenças significativas na sobrevivência dos doentes com ou sem alcoolismo ( $p = 0.9482$ ) (Figura 3.27).



**Figura 3.27** - Box-plot da sobrevivência global respeitante aos doentes com (1) e sem (0) consumo excessivo de álcool.

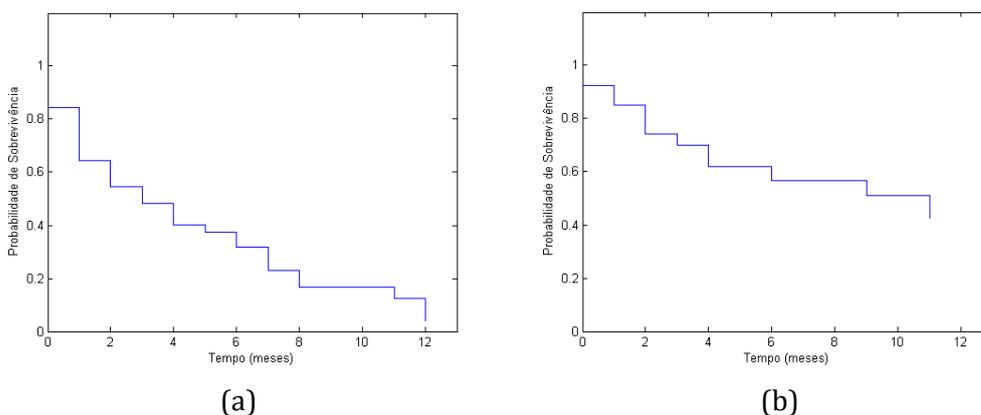
### 3.12. Agrupamento dos doentes de acordo com a sobrevivência

Os 165 doentes presentes na base de dados foram analisados e agrupados em dois grupos, segundo o algoritmo k-means, com sobrevivências globais estatisticamente diferentes:  $p = 8,1165^{-11}$  segundo o teste de Mann-Whitney. A sobrevivência média e o desvio-padrão dos grupos encontrados são mostrados no Quadro 3.7.

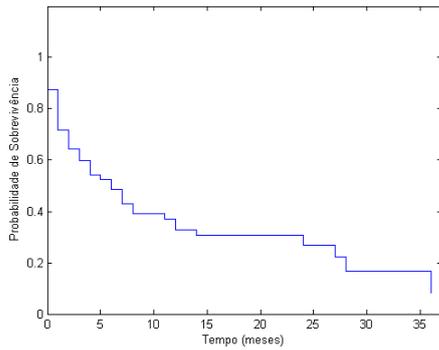
**Quadro 3.7** - Sobrevivência global para cada um dos grupos (k-means).

	Sobrevivência média (dias)	Desvio-padrão (dias)
Grupo 1	312,7	464,8
Grupo 2	1096,4	1252,3

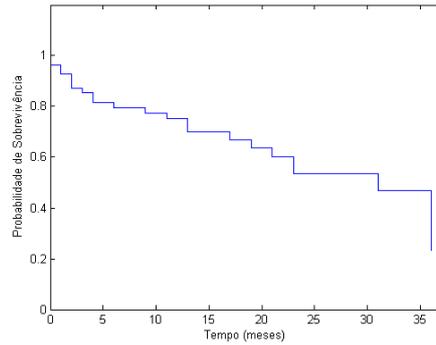
Verificam-se diferenças pronunciadas na sobrevivência destes doentes nos primeiros 1-3 anos de *follow-up*, como se é possível verificar nas Figuras 3.28 e 3.29.



**Figura 3.28** - Comparação da sobrevivência global dos doentes do grupo 1 (a) e grupo 2 (b) no primeiro ano.



(a)



(b)

**Figura 3.29** - Comparação da sobrevivência global dos doentes do grupo 1 (a) e grupo 2 (b) nos primeiros 3 anos.

É interessante examinar a distribuição dos estádios do tumor, aquando do diagnóstico, nos dois grupos encontrados. O grupo 1 contém 78 doentes e inclui praticamente todos os do estágio D. O grupo 2, com 87 doentes, contém maioritariamente os do estágio A e B. O estágio C encontra-se repartido pelos dois grupos (Quadros 3.8 e 3.9).

**Quadro 3.8** - Divisão por estádios para o Grupo 1.

Estádio do tumor	Número de Casos	Percentagem (%)
0	1	1,30
A	1	1,30
B	6	7,79
C	33	42,86
D	36	46,75

**Quadro 3.9** - Divisão por estádios para o Grupo 2.

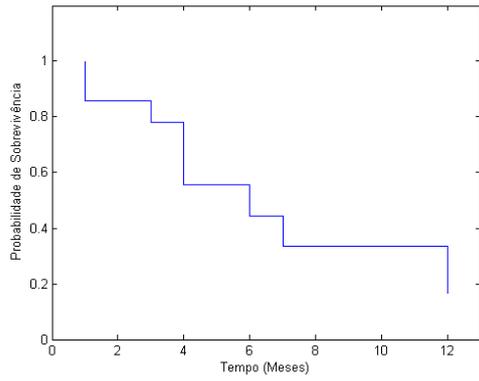
<b>Estádio do tumor</b>	<b>Número de Casos</b>	<b>Percentagem (%)</b>
0	1	1,20
A	28	33,73
B	33	39,76
C	20	24,10
D	1	1,20

### **3.13. Heterogeneidade do estágio avançado (C)**

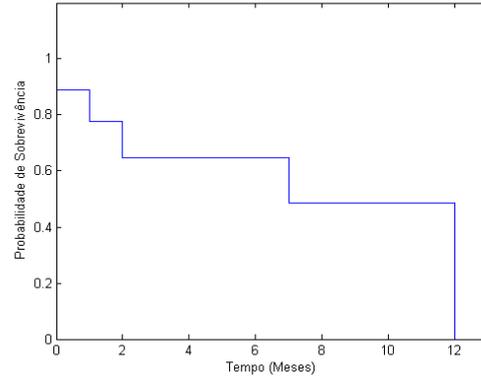
Os doentes no estágio C presentes em ambos os grupos foram igualmente sujeitos a análise estatística. A distribuição da sobrevivência global foi novamente avaliada, não seguindo a distribuição normal, segundo o teste de Kolmogorov-Smirnov ( $p=2,6409^{-9}$ ). O teste de Mann-Whitney voltou a ser aplicado a estes dois grupos. Ao nível de significância de  $p=0,05\%$ , não se registam diferenças significativas ( $p=0,1550$ ). No entanto, os gráficos de Kaplan-Meier a 1 anos e 3 anos de sobrevivência sugerem que existe heterogeneidade destes grupos de doentes, que, estando no mesmo estágio, apresentam sobrevivências globais distintas (Figuras 3.30 e 3.31).

As 19 variáveis usadas nesta análise foram examinadas para tentar compreender quais as que permitiam diferenciar estes 2 grupos, sendo utilizados os testes de Kolmogorov-Smirnov e Mann-Whitney ou T-student, considerando apenas os doentes do estágio C.

Verificou-se pelo estudo estatístico (não apresentado) que as variáveis mais discriminativas entre o grupo 1 e o grupo 2 são a PS, a ascite, a albumina e o número de nódulos.

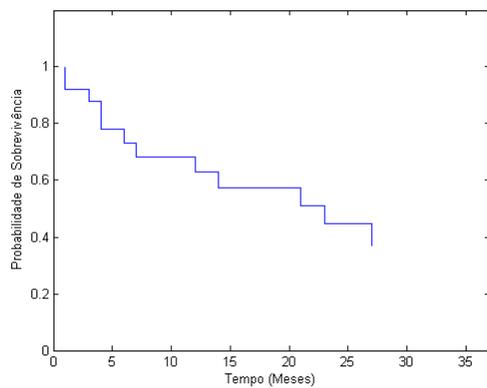


(a)

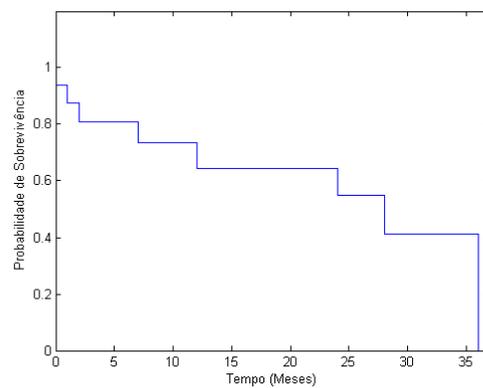


(b)

**Figura 3.30** - Comparação da sobrevivência global dos doentes no estágio C do grupo 1 (a) e grupo 2 (b) no primeiro ano.



(a)



(b)

**Figura 3.31** - Comparação da sobrevivência global dos doentes no estágio C do grupo 1 (a) e grupo 2 (b) nos primeiros 3 anos.

## 4. DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

A incidência de CHC aumenta progressivamente com o avanço da idade em todas as populações, atingindo um pico por volta dos 70 anos (El-Serag HB, Mason AC, 1999). Na nossa população a idade média, aquando do diagnóstico, era de 64,7 anos e a maioria dos casos (57,6%) ocorreu entre os 60 e os 80 anos.

Houve um claro predomínio do sexo masculino, com uma relação homem/mulher de 4:1. Em praticamente todas as populações, os homens têm maiores taxas de CHC do que as mulheres, com rácios que variam entre 2:1 e 4:1. Esta diferença pode ser parcialmente atribuída a diferenças na exposição a factores de risco, como o consumo de álcool e o tabagismo. No entanto, observa-se uma disparidade semelhante em camundongos a quem foi dado um carcinogéneo químico, a dietilnitrosamina (DEN) (Naugler WE *et al.*, 2007). Os autores deste estudo atribuíram estas diferenças à interleucina-6 (IL-6), que desempenha um papel na fisiopatologia do CHC. A administração de DEN causou aumentos maiores nas concentrações de IL-6 no soro dos machos do que nas fêmeas, tendo proposto que a inibição da produção de IL-6 pelas células de Kupffer induzida pelos estrogénios reduza o risco de CHC em mulheres. Nakagawa *et al.* (2009) realizaram um estudo de coorte retrospectivo em 330 doentes com hepatite C crónica para testar se esta hipótese é aplicável ao CHC humano. Apesar das doentes do sexo feminino apresentarem uma correlação negativa fraca entre níveis séricos de IL-6 e os níveis de estradiol, o menor risco de CHC em mulheres não parece ser totalmente explicado pela inibição da produção de IL-6 mediada pelos estrogénios.

Nos nossos doentes, a grande maioria dos CHCs (90,3%), ocorreram em doentes com cirrose hepática, à semelhança do que é descrito para os outros países ocidentais (El-Serag HB, Rudolph KL, 2007).

O alcoolismo crónico foi o factor de risco mais frequente, presente em 73,9% dos indivíduos, sendo mais relevante no sexo masculino (83,4% dos homens) do que no sexo feminino (34,4% do total de mulheres).

Como é conhecido, o uso prolongado e excessivo de álcool (sobretudo a ingestão diária igual ou superior a 40 a 60 g por dia) é um factor de risco de CHC muito importante, estando descrito um efeito sinérgico quando associado ao VHC e, de forma menos marcada, à infecção pelo VHB (Donato F *et al.*, 2002), mas também quando co-existem diabetes, obesidade, ou tabaco (Wang LY *et al.*, 2003; Yuan JM *et al.*, 2004; Marrero *et al.*, 2005; Singal AK *et al.*, 2007; Chuang SC *et al.*, 2009).

Marrero *et al.* (2005) consideram o álcool, o tabaco e a obesidade como factores de risco independentes para a ocorrência de CHC, interagindo de forma sinérgica e aumentando claramente a probabilidade de ocorrência do tumor quando em associação, o que poderá levar a uma estratificação dos alcoólicos em maior ou menor probabilidade de ter CHC, consoante a existência ou não destes outros factores de risco.

Na nossa série tem grande relevo a associação do álcool com a diabetes mellitus tipo 2 (21%), com diabetes e obesidade de grau II ou superior (11%) e com a obesidade grave (5%). O tabagismo foi documentado em 38,9% dos nossos doentes. Ainda de salientar é o facto de em 2% e 3% dos doentes os únicos factores de risco detectados serem, respectivamente, a diabetes mellitus tipo 2 e a NASH (sem cirrose).

O fígado gordo não alcoólico tem sido claramente identificado como um factor de risco de CHC. É uma patologia existente em pelo menos 20% da população dos países desenvolvidos e está relacionada com obesidade, resistência à insulina e síndrome metabólica. Em algumas pessoas a esteatose hepática causa alterações necro-inflamatórias (esteato-hepatite não alcoólica), que podem posteriormente progredir para fibrose e cirrose e, eventualmente, para CHC. A esteato-hepatite não alcoólica afecta 2 a 3% da população adulta e 20% deste sub-grupo pode desenvolver cirrose.

Em estudos populacionais realizados nos Estados Unidos, Escandinávia, Taiwan e Japão o CHC ocorreu 1,5 a 2 vezes mais frequentemente em obesos do que em não obesos (Calle EE *et al.*, 2003; Moller H *et al.*, 1994; Wolk A *et al.*, 2001). Nos Estados Unidos foram reportadas taxas de mortalidade por CHC cinco vezes maiores em homens com índices de massa corporal (IMC) muito elevados (35-40 kg/m<sup>2</sup>), quando comparados com aqueles que tinham IMC normal (El-Serag HB, Rudolph KL, 2007). Em diabéticos

tipo 2, alguns estudos caso-controlo e de coorte apontam também para uma probabilidade dupla de desenvolvimento de CHC, relativamente a indivíduos sem diabetes (El-Serag HB *et al.* 2004; El-Serag HB *et al.* 2006). A doença gorda não alcoólica, que existe em cerca de 90% dos obesos e em até 70% dos diabéticos tipo 2, tem sido proposta como possível factor de risco para CHC nestes doentes (Neuschwander-Tetri BA, Caldwell SH, 2003).

O risco da obesidade e da diabetes para o desenvolvimento de CHC parece no entanto, ser conferido por duas ordens de factores: o risco de NASH e o potencial carcinogénico destas entidades (Burgianesi E, 2007; Siegel AB, Zhu AX, 2009).

Os mecanismos exactos que conduzem ao desenvolvimento de CHC em doentes com NASH permanecem obscuros. Surgindo o tumor também em situações onde ainda não existe cirrose, pensa-se que factores relacionados com o desenvolvimento da própria NASH, tais como resistência à insulina, stress oxidativo e citocinas inflamatórias, sejam susceptíveis de contribuir para a carcinogénese hepática, sendo necessários e urgentes estudos adicionais para melhor clarificação destes mecanismos (Starley BQ *et al.*, 2010; Hashimoto E, Tokushige K, 2012).

Está descrito que nos países europeus a infecção crónica pelo VHC (60-70%), a cirrose hepática alcoólica (cerca de 20% dos casos) e a infecção pelo VHB (10-15%), constituem os principais factores de risco de CHC (Llovet JM, Burroughs A, Bruix J, 2003). Na nossa casuística o impacto da infecção viral crónica é muito menor, tendo sido detectados vírus hepatotrópicos em 26% dos casos (VHB: 21%; VHC: 4%; VHB e VHC: 1%), existindo em metade deles, concomitantemente, ingestão abusiva de álcool. Dois doentes deste grupo tinham também SIDA.

Na verdade, sabendo que a doença hepática alcoólica é a causa de 80% das cirroses em Portugal, seria de esperar que a cirrose alcoólica fosse o principal factor de risco para o CHC entre nós. Não o confirmar teria certamente a ver com enviesamento relacionado com a referenciação dos doentes, ou com subdiagnóstico da patologia alcoólica, ou ainda com especificidade da consulta de encaminhamento (dedicada preferencialmente a hepatites virais, por exemplo), o que não é o nosso caso.

Apesar das recomendações existentes para rastreio periódico dos doentes com maior risco de desenvolverem CHC, que na nossa série são mais de 90%, apenas 31,5% dos doentes foram, efectivamente, diagnosticados desta forma. Na maioria (57,6%) foi a existência de sintomatologia relacionada com o tumor que motivou o estudo complementar e 11,5% dos casos foram detectados ocasionalmente, em exames complementares feitos por outros motivos.

Estes dados revelam que a vigilância não está a ser eficaz. As razões para este facto poderão ser várias, desde a falta de sensibilização dos clínicos que prestam cuidados de saúde primários para a importância de vigiar os doentes em maior risco, à falta de qualidade de alguns exames ecográficos, que não sendo realizados ou interpretados da forma mais adequada podem conduzir a um atraso no diagnóstico ou, ainda, à ausência de procura de cuidados de saúde pelos indivíduos que têm maior risco para contrair este tipo de tumor e que são, entre nós, os cirróticos alcoólicos.

A consequência da maior parte dos tumores ser diagnosticada em fase sintomática é que apenas uma pequena percentagem tem condições para ser submetida a tratamentos potencialmente curativos (na nossa série apenas 19,4% se encontravam no estágio 0 ou A da classificação BCLC).

Os tumores em estágio terminal (D), que correspondem a 22,4% dos nossos casos, têm muito mau prognóstico (sobrevivência mediana de 57 dias nos nossos doentes), sendo habitualmente apenas candidatos a terapêutica de suporte, excepto se tiverem tumores pequenos em doença hepática grave (classe C de Child-Pugh), situação em que, se não tiverem contra-indicações, são candidatos a transplante hepático, que tem a vantagem de tratar simultaneamente o tumor e a cirrose.

O estado intermédio (BCLC estágio B), que engloba 23,6% dos nossos doentes, é habitualmente considerado bastante heterógeno, de tal forma que um grupo de especialistas propôs uma subclassificação deste estágio, de B1 a B4, tentando alargar as opções terapêuticas (Bolondi L *et al.*, 2012). A sobrevivência mediana foi de 790 dias na nossa série, semelhante à que é descrita com quimioembolização (mediana de 19-20 meses), de acordo com dados de um RCT e meta-análise reunidos (Llovet JM, Bruix J, 2003).

Estavam em estágio avançado, aquando do diagnóstico, 32,7% dos nossos doentes (n=54), sendo a sobrevivência mediana neste estágio de 150 dias. No entanto, conseguimos separar os nossos doentes em dois grupos com probabilidade de sobrevivência significativamente diferente, utilizando um conjunto de variáveis clínicas e laboratoriais. Após análise estatística verificou-se que as variáveis mais discriminativas entre esses dois grupos eram a PS, a ascite, a albumina e o número de nódulos. Uma outra razão possível para explicar a diferença para sobrevivência dos dois grupos seria a terapêutica efectuada, mas não se verificou relação estatisticamente significativa nesse aspecto.

Este é, sem dúvida, um dos achados mais interessantes da análise da nossa série e vem ao encontro da prática clínica, em que encontramos doentes em estado avançado que podem ser tratados com sorafenib e disso beneficiam, enquanto outros, sobretudo os que se encontram no estágio B de Child-Pugh, ou não têm já condições para qualquer tratamento ou dele pouco ou nada beneficiam. Com os dados objectivos que agora encontramos, podemos sugerir a subdivisão do estágio avançado, à semelhança do que se fez com o intermédio, podendo considerar-se um estágio C1 e outro C2, neste caso quase-D. Obviamente que esta hipótese necessita validação em séries com números maiores.

A terapêutica-padrão para os doentes em estágio avançado que tenham uma função hepática adequada é o sorafenib, sendo também candidatos a este tipo de tratamento indivíduos que progridam após tratamentos loco-regionais, ou que não possam ser submetidos a estes métodos terapêuticos.

Relatámos aqui a nossa experiência de tratamento com sorafenib (que fazemos desde Maio de 2008, alguns meses após a sua aprovação pela EMA e pela FDA) em 48 doentes em estágio avançado.

Embora os efeitos adversos sejam frequentes (sobretudo gastrointestinais, dermatológicos e constitucionais), tendo surgido em 92% dos nossos doentes (80% nos doentes que tomaram sorafenib no estudo SHARP, embora ocorrendo também em 52 % dos doentes a tomar placebo), são habitualmente de grau 1 ou 2. Efeitos secundários mais graves (grau 3 ou 4) foram raros, quer na nossa série, quer no estudo

SHARP. A maior parte dos indivíduos (56,2%) mantiveram a terapêutica, ainda que alguns tenham tido necessidade de ajustamentos da dosagem; os restantes suspenderam definitivamente a terapêutica, sobretudo devido a progressão da doença.

Nos nossos doentes o tempo de tratamento oscilou entre meio mês e 66 meses, sendo a sobrevivência média estimada de 11,89 meses (IC 95%: 6,46 – 17,32).

Quando começámos a tratar doentes com sorafenib incluímos alguns em classe B de Child-Pugh, estratégia que entretanto abandonámos porque nos apercebemos de que estes doentes não têm benefício com a terapêutica, mas sofrem com os efeitos adversos. Curiosamente verificamos agora, com a subdivisão clara que encontramos no estágio C, que as variáveis com maior significado envolvem as três vertentes da classificação BCLC, realçando-se o papel da gravidade da doença de base (ascite, albuminemia). Isto é, já tínhamos verificado que era questionável o uso de sorafenib em doentes na classe B de Child-Pugh e os dados que agora encontramos vêm dar-nos razão.

O caso por nós descrito constitui uma raridade, quer em termos de eficácia, quer de tolerância ao sorafenib, mas demonstra que alguns tumores (desconhecemos por que motivos) respondem claramente a esta terapêutica, embora também saibamos que outros não evidenciam qualquer benefício.

Neste doente com CHC em estágio avançado (BCLC), com metastização intra-hepática difusa, pulmonar maciça e da suprarrenal esquerda, com invasão e trombose da veia cava inferior que se estendia e projectava na câmara da aurícula direita houve resposta completa de acordo com os critérios mRECIST. O doente apresentava vários factores de risco para CHC (alcoolismo crónico, infecção crónica VHB, contacto prévio com VHC e cirrose hepática). Neste contexto, a biópsia hepática, não era necessária, mas confirmou o diagnóstico, num doente com *performance status* 0 e extensa disseminação tumoral. Foi introduzido sorafenib, e após 3 meses, não existia tumor viável, pois a lesão primária e as secundárias não captavam contraste na fase arterial, as lesões pulmonares tinham desaparecido, e a metástase na suprarrenal anteriormente hipervascular, não captava contraste. O trombo na veia cava inferior

reduziu em extensão, deixando de se projectar ao nível da câmara direita e posteriormente observou-se trombose na veia hepática esquerda e do ramo esquerdo da veia porta. Apesar da invasão vascular ser um factor de mau prognóstico, na terapêutica com sorafenib pode ser uma vantagem, uma vez que, ao condicionar um ambiente hepático hipoxémico facilita a apoptose/necrose induzida pelo fármaco. Os casos de resposta parcial ou completa ao sorafenib são raros e os mecanismos envolvidos na resposta são ainda desconhecidos. Existirão, com certeza, factores ligados com o tumor e/ou com o hospedeiro que vão influenciar e condicionar o tipo de resposta.

Havendo alguma variabilidade de resposta a este tipo de tratamento e não existindo à partida indicadores que nos permitam saber quais são os doentes que respondem a esta terapêutica, dever-se-á propô-la nos casos em que exista função hepática preservada e não haja contra-indicações. Se houver progressão da doença, não parece justificar-se a manutenção deste tipo de tratamento.

Perante este estudo clínico ficamos com a noção clara de que muito há a fazer para melhorar os resultados agora identificados e de que é urgente que sejam efectivamente implementadas medidas visando alterar esta realidade tão dramática.

Assim, os doentes com indicação para rastreio seriado têm que ser convenientemente identificados, tendo aqui os médicos de Medicina Geral e Familiar um papel muito importante, cabendo-nos a nós esclarecê-los para que eles o possam cumprir.

A vigilância deve ser efectuada de acordo com o que está estabelecido pelas recomendações internacionais, com ecografias semestrais feitas por radiologistas experientes e com equipamento adequado.

É fundamental que, quando é detectado um nódulo num doente com cirrose, o diagnóstico seja feito atempadamente, o que poderá passar pela existência de canais de referência para centros especializados onde existam equipas multidisciplinares, treinadas para diagnosticar e tratar adequadamente este tipo de doentes.

Só assim será possível diagnosticar e tratar os doentes com CHC em fases mais precoces, com tratamentos potencialmente curativos.

Paralelamente terá que haver um maior investimento na procura de métodos mais eficazes e menos invasivos para diagnosticar mais precocemente estes tumores, e uma maior investigação em modalidades terapêuticas mais eficazes. Parece-nos particularmente importante no campo da terapêutica a procura de tratamentos adjuvantes para diminuir a recorrência após terapêuticas potencialmente curativas, a combinação de terapêuticas para melhorar a sua eficácia e a investigação de novas terapêuticas sistémicas mais eficazes do que as actualmente existentes.

Também é fundamental actuar no campo da prevenção primária, educando para a saúde, combatendo a ingestão de álcool, promovendo hábitos de vida saudável, com alimentação equilibrada e com exercício físico, tratando adequadamente as situações metabólicas, nomeadamente a diabetes, combatendo assim aqueles que são os principais factores de risco para o aparecimento de CHC na nossa população (o alcoolismo, a diabetes e a obesidade).

É importante também implementar medidas para prevenir a transmissão das hepatites virais, a vacinação da hepatite B (recém-nascidos e grupos de risco) e também o tratamento das hepatites B e C, evitando, se possível, a evolução para cirrose.

## **Capítulo 4**

### **ESTUDO BIOQUÍMICO (METABOLÓMICO) DO CARCINOMA HEPATOCELULAR COM ESPECTROSCOPIA DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE PROTÃO (RMN de $^1\text{H}$ )**



## 1. INTRODUÇÃO

A metabolómica, um termo introduzido por Fien *et al.* em 2001, consiste na avaliação global e validação de pequenas moléculas de produtos bioquímicos endógenos (metabolitos) existentes num sistema biológico. Os metabolitos são os intermediários e os produtos do metabolismo e no contexto do metaboloma, são definidos como qualquer molécula com menos de 1 kDa de tamanho (Bentley R, 1999).

A metabonómica é definida como "a medição quantitativa da resposta metabólica multiparamétrica dinâmica de sistemas vivos a estímulos fisiopatológicos, ou a modificações genéticas". A palavra tem origem no grego "meta", que significa mudança e "nomos", que significa um conjunto de regras ou de leis (Crockford DJ *et al.*, 2008).

Tem havido alguma controvérsia sobre a diferença entre metabolómica e metabonómica. Embora ainda não haja acordo absoluto, há um consenso crescente considerando que a metabolómica coloca maior ênfase no perfil metabólico abrangente (independentemente das espécies investigadas), enquanto a metabonómica é usada para descrever alterações metabólicas várias (mas não necessariamente abrangentes) causadas por uma perturbação biológica. Na prática, quando se aplica à investigação de doenças humanas, existe um elevado grau de sobreposição entre ambos os termos, sendo frequentemente utilizados como sinónimos (Robertson DG, 2005).

Trata-se de uma área científica recente e fascinante, focada na obtenção de perfis abrangentes de metabolitos numa amostra, tecidual ou de fluídos biológicos circulantes. A sua capacidade para medir fenótipos de todo o sistema, de forma altamente rentável, confere-lhe um potencial enorme no campo da oncologia, no sentido de compreender o que efectivamente acontece nas células tumorais (Vermeersch KA e Styczynski MP, 2013).

As alterações metabólicas estão entre as primeiras respostas celulares a mudanças fisiológicas ou do meio ambiente e, portanto, o estudo do perfil de metabolitos – a metabolómica – é capaz de diagnosticar uma doença, ou avaliar a eficácia de uma terapêutica, em fases muito precoces.

A metabolómica envolve algumas etapas metodológicas, nomeadamente: 1) análise directa de tecidos e biofluidos ou extracção de metabolitos a partir de tecidos ou de células; 2) quantificação das mudanças metabólicas observadas; 3) metodologia de análise de dados (Nagrath D *et al.*, 2011).

As duas tecnologias metabolómicas dominantes são a ressonância magnética nuclear de protão (RMN) e a espectrometria de massa (EM) acoplada a uma técnica de separação.

A espectroscopia de RMN de  $^1\text{H}$  com *High-Resolution Magic Angle Spinning* (HRMAS) tem a vantagem de permitir a caracterização directa de tecidos intactos, possibilitando a deteção simultânea de lipídeos e pequenos metabolitos, com uma resolução comparável à da RMN de líquidos. Fornece uma imagem mais realista e próxima dos perfis metabólicos, sendo cada vez mais utilizada para analisar células e tecidos, com particular ênfase para estudos em tumores malignos (Sitter B *et al.*, 2009).

A RMN de alta resolução e a RMN de  $^1\text{H}$  por HRMAS têm sido usadas para traçar o perfil metabólico de tumores em fluídos biológicos e em amostras de tecidos, estas particularmente valiosas, porque permitem a análise em paralelo com outras técnicas (Duarte IF e Gil AM, 2012; Beckonert O *et al.*, 2010), nomeadamente histopatológicas.

Muita da investigação é baseada na diferenciação metabólica entre tecido tumoral e tecido envolvente, tentando encontrar possíveis biomarcadores indicativos da presença e/ou grau de diferenciação de vários tipos de tumores (mama, cérebro, próstata, cervical, colo-rectal, hepático, renal, gástrico). Por exemplo, o fenótipo metabólico do cancro da mama mostrou ser potencialmente útil para predizer o grau histológico, estado hormonal e invasão ganglionar (Sitter B *et al.*, 2006; Bathen TF *et al.*, 2007) e o perfil metabólico dos oligodendrogliomas revelou uma boa correlação

com o grau de malignidade e também com o prognóstico dos doentes (Erb G *et al.*, 2008).

No âmbito do diagnóstico do CHC, os pequenos nódulos hepáticos constituem um desafio importante, porque são frequentemente difíceis de caracterizar, quer imagiológica, quer histopatologicamente. A distinção entre nódulos displásicos e CHC em fase inicial é um problema difícil, mesmo para os hepatopatologistas experientes, mas é de primordial importância, pois tem implicações relevantes no que respeita à conduta a tomar. Enquanto as lesões displásicas devem ser vigiadas através de estudos imagiológicos regulares, pois cerca de 1/3 vão transformar-se em CHC, os tumores em fase inicial devem ser tratados agressivamente com terapêuticas potencialmente curativas.

Técnicas como a espectroscopia de RMN de  $^1\text{H}$  por HRMAS abrem perspectivas extremamente interessantes e inovadoras no sentido de uma melhor compreensão da bioquímica e caracterização dos tecidos tumorais hepáticos, com vista a contribuir para um rastreio mais fácil e para o desenvolvimento de novos meios de diagnóstico e de estabelecimento do prognóstico do CHC, bem como de tratamento e avaliação da eficácia de terapêuticas instituídas.

Além de poderem ser realizados em tecidos (em fragmentos de dimensões muito menores que os utilizados para diagnóstico anátomo-patológico), estes métodos metabolómicos podem ser complementados com a análise de extractos aquosos e lipídicos desses tecidos, existindo ainda alguns estudos efectuados em fluidos biológicos, nomeadamente no sangue (Siwei Wei *et al.*, 2012) e urina (Wu H *et al.* 2009).

Quando surgiu a ideia de realizarmos este estudo, existia, do nosso conhecimento, um único trabalho (Yang Y *et al.* 2007) efectuado em fígados humanos com CHC, onde foi avaliado por espectroscopia de RMN de  $^1\text{H}$  por HRMAS o metaboloma de CHCs de baixo e alto grau. Nesse estudo foi comparado o tecido tumoral com o tecido adjacente não envolvido, visando explorar o potencial da RMN de  $^1\text{H}$  por HRMAS na caracterização bioquímica do CHC, desenvolver métodos de classificação das amostras, com vista a uma graduação dos CHCs e compreender os efeitos de factores patológicos

concorrentes (tais como cirrose) para as características metabólicas do CHC. Foram obtidas 31 amostras, de 17 tumores e recolhido tecido adjacente, não envolvido, de 14 doentes, que foi utilizado como controlo negativo. Em análise multivariada, os autores observaram diferenças metabólicas claras entre o tumor e o tecido envolvente não tumoral, traduzidas pelo aumento de ácidos biliares, colina, fosforiletanolamina, fosfocolina, glicerofosfocolina, glutamato, glutamina, glicina, alanina e leucina e diminuição dos níveis de lipídeos, glicose e glicogénio. Neste estudo foi também possível separar, com base no metaboloma, tumores de alto e de baixo grau. Os resultados indicam que as alterações bioquímicas dominantes são do metabolismo energético e do ciclo de Krebs, a necrose acompanhou-se de elevação drástica dos níveis de lipídeos e a cirrose provocou aumento significativo de lactato e fosfocolina/glicerofosfocolina nos tumores de baixo grau.

Com base nestes resultados e nas perspectivas que abriam considerámos importante realizar um estudo, ainda que preliminar, nos nossos doentes, aproveitando a oportunidade de obter colaboração de equipas com experiência nestas técnicas.

## **2. OBJECTIVOS**

Pretendemos detectar e caracterizar alterações metabólicas existentes no CHC, por comparação com o tecido adjacente, criando novos conhecimentos bioquímicos, e procurando encontrar marcadores de malignidade com potencial valor diagnóstico, através da avaliação com espectroscopia de RMN de  $^1\text{H}$  do perfil metabólico do fígado humano (amostras de fígado com CHC e fígado envolvente, sem lesão tumoral).

Além dos resultados imediatos, pretendemos também criar os meios necessários para prosseguir e aprofundar estes estudos e tentar obter condições de os tornar úteis e aplicáveis à prática clínica.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Caracterização dos doentes

Foram incluídos 8 doentes (2 mulheres e 6 homens), com idade média de 67±8,9 anos (57-78 anos), cujas características principais estão descritas no Quadro 4.1.

**Quadro 4.1** - Dados clínicos e anátomo-patológicos dos doentes estudados

Idade	Sexo	Álcool (>60 g/dia)	IMC (Kg/m <sup>2</sup> )	Outros factores de risco	Estádio BCLC	Diagnóstico histo-patológico	Tumor residual
75	M	N	>25	DM tipo 2 HTA hiperuricémia	A	Carcinoma hepatocelular moderadamente diferenciado (G2) com 90% de neoplasia viável, em fígado gordo não cirrótico.	R0
78	F	N	<25	Dislipidemia	A	Carcinoma com áreas de morfologia hepatocelular e outras que sugerem diferenciação colangiocelular: carcinoma composto hepatocelular - colangiocarcinoma com predomínio do primeiro. Fígado sem estigmas de doença hepática crónica.	R0 (margem de segurança de 2mm).
58	F	N	<25	Hepatite B crónica	A	Carcinoma hepatocelular pouco diferenciado (G3) com 2,3cm, necrose, invasão vascular e fibrose (cerca de 1/3 da neoplasia). Hepatite crónica B com atividade ligeira e fibrose septal não cirrótica (F2).	R0
57	M	S	>25	Dislipidemia HTA	A	Carcinoma hepatocelular moderadamente diferenciado (G2) com 5,5cm de eixo maior e com invasão microvascular. Fígado com estigmas de doença hepática crónica com fibrose septal não cirrótica.	R0
73	M	N	>25	DM tipo 2 Dislipidemia	A	Carcinoma hepatocelular moderadamente diferenciado (G2) de células claras, com nódulos satélites, sem invasão vascular. Fígado não cirrótico.	R0
69	M	S	<25		A	Carcinoma hepatocelular moderadamente diferenciado (G2) do segmento hepático V com 5cm, sem invasão vascular e com nódulo satélite. Doença hepática crónica com fibrose septal, não cirrótica (F3)	R0
61	M	N	>25	DM tipo 2 dislipidemia, HTA	A	Carcinoma hepatocelular moderadamente diferenciado (G2) com 3cm, sem invasão vascular e desenvolvido em fígado não cirrótico (F1).	R0
59	M	S	<25	DM tipo 2, HTA, dislipidemia	C	Carcinoma pouco diferenciado, de morfologia compatível com carcinoma hepatocelular, pouco diferenciado (G3), de perfil imunohistoquímico inespecífico. Fígado cirrótico.	NA

Três dos 8 doentes eram alcoólicos, 4 tinham excesso de peso, 4 tinham diabetes mellitus tipo 2 e uma doente tinha hepatite B crónica (sem cirrose). A maioria (n=7) encontrava-se no estágio A (inicial) da classificação BCLC, estando um doente no estágio C (avançado).

Histologicamente, a maioria dos tumores (n=5) era moderadamente diferenciada (G2), havia 2 tumores pouco diferenciados (G3) e um tinha características mistas; o fígado envolvente era normal em 3 casos, tinha esteatose num, fibrose septal em três e cirrose num.

### **3.2. Manuseamento dos tecidos**

Os fragmentos de tecido hepático e o parênquima adjacente não envolvido foram obtidos a partir de peças de ressecção cirúrgica de doentes com o diagnóstico pré-operatório de CHC em sete doentes. No outro indivíduo, a biópsia do tumor e tecido envolvente foram efectuadas com controlo por TC abdominal.

Em todos os casos as amostras para exame anátomo-patológico, quer do tumor, quer do tecido envolvente, foram processadas de acordo com o protocolo habitual.

O protocolo de armazenamento e recolha das biópsias para espectroscopia foi o seguinte:

- Preparação e identificação de recipientes para colocação do material, com o nome da biópsia a recolher;
- Preparação de um recipiente com azoto líquido (Dewar), onde se colocaram as amostras o mais rapidamente possível após a colheita, não podendo ultrapassar os 30 minutos, para não se degradarem;
- Depois de terminado o processo de recolha colocaram-se as amostras, devidamente identificadas, num congelador a -80°C, até ao momento de serem estudadas.

### 3.3. Preparação das amostras

#### 3.3.1. Tecidos intactos

As amostras congeladas de tecidos foram lavadas com algumas gotas de solução salina de D<sub>2</sub>O (0,9%) e cerca de 40 mg de tecido frio descongelado foram acondicionadas em rotores HRMAS de 50  $\mu$ L, ficando as amostras com uma geometria cilíndrica. Dez microlitros de solução salina D<sub>2</sub>O, contendo 0,25% de sal sódico de propionato de 3 - (trimetilsilil) (TSP)-d<sub>4</sub>, foram também adicionados para proporcionar um sinal de *lock* (D<sub>2</sub>O) e de referência de desvio químico (TSP), sendo o processo de otimização de resolução realizado para cada amostra antes de começar a aquisição espectral. O conteúdo total do rotor pesava em média, 52 $\pm$ 6 mg.

#### 3.3.2. Extração (aquosa e lipídica) de metabólitos dos tecidos

Antes da extração, os tecidos ( $\pm$  50 mg) foram homogeneizados num *potter* de vidro (1200 rpm, durante 1 min) contendo 125  $\mu$  L de PBS (solução de tampão fosfato). A extração dos metabólitos foi executada de acordo com o método de dois passos, descrito por Wu *et al.* (2008), utilizando uma mistura de solventes água/metanol/clorofórmio. Após a homogeneização do tecido, 300  $\mu$  L de água e 400  $\mu$  L de metanol foram adicionados ao homogeneizado, e a mistura agitada (em vortex), 1 minuto. Em seguida, 400  $\mu$  L de clorofórmio e 175  $\mu$  L de água foram adicionados e a mistura novamente agitada num vortex, durante 1 minuto. As amostras foram mantidas em gelo durante 10 minutos para partição e foram centrifugadas durante 5 minutos, a 8000 rpm (Eppendorf MiniSpin) para remover a proteína precipitada e os restos de tecido. As camadas polares (superiores) e não-polares (inferiores) foram cuidadosamente removidas para frascos limpos e secos num concentrador centrífugo (fase lipídica) ou liofilizadas (fase aquosa).

### 3.3.3. Secção experimental

Os espectros de RMN foram adquiridos a 277K no Departamento de Química da Universidade de Aveiro, num Espectrómetro Bruker Avance DRX-500, operando a 500,13 MHz para observação de  $^1\text{H}$ . Para os tecidos foi utilizada uma sonda HRMAS de 4 mm, rodando o rotor contendo a amostra no ângulo mágico ( $54,7^\circ$  em relação ao campo magnético) com uma taxa de rotação de 4 kHz; nos extractos usou-se uma sonda BBI de líquidos.

Foram analisados por espectroscopia amostras de tecido hepático com CHC e extractos aquosos e lipídicos desses tecidos (n=8) e amostras de tecido envolvente e seus extractos (n=8), que serviram de controlo.

Foi adquirido um espectro normal 1D para cada um dos extratos aquosos e lipídicos e, para os tecidos foram registados espectros 1D normal (isto é, sem edição) e editado por tempos de relaxação T<sub>2</sub>, usando a experiência de *Carr-Purcell-Meiboom-Gill* (CPMG).

### 3.3.4. Processamento dos espectros de RMN de $^1\text{H}$

Todos os espectros adquiridos foram processados multiplicando o FID (*Free Induction Decay*) por uma linha exponencial 0,3 Hz, ampliando a função antes da transformação de Fourier. Depois disso, todos os espectros foram manualmente faseados e a linha de base corrigida, com o auxílio de uma função polinomial ( $a + Bx + Cx^2 + Dx^3 + Ex^4$ ), usando o programa TopSpin versão 3,2 (Bruker). Os espectros de RMN foram internamente referenciados para o desvio químico de TSP (trimetilsililpropionato) a 0,00 ppm para os extractos aquosos e tecidos, e para o desvio químico do clorofórmio a 7,26 ppm, para os extractos de lípidos. As regiões de interferência da água (4,60-5,10 ppm) foram removidas para evitar qualquer distorção de base causada pela supressão de água (extractos aquosos e tecidos). Da mesma forma, a região contendo a ressonância do clorofórmio (7-7,7 ppm) foi excluída dos espectros de lípidos. Este procedimento foi feito em AMIX, versão 3.914 (Bruker).

Após o processamento, os dados foram organizados em matrizes. Os espectros foram alinhados utilizando o *Segment-Wise Peak Alignment Algorithm* (RSPA) e normalizados usando o método *Probability Quotient Normalisation* (PQN), em versão MATLAB 7.9.0 (Mathworks Inc.).

A atribuição de picos de espectroscopia foi realizada com o apoio da *Bruker Biorecode 2.0.0 NMR Spectra Database* (Bruker BioSpin), *Biological Magnetic Resonance Data Bank* and in *Human Metabolome Data Base* e por comparação com as atribuições de sinais relatadas na literatura (Duarte De 2005, Vinaixa 2010, Bharti 2012).

### 3.3.5. Quimiometria

A análise multivariada de dados normalizados dos conjuntos de resultados da RMN foi realizada usando o *software* SIMCA-P 11,5 (Umetrics).

Todas as variáveis foram ajustadas por *scaling* centrado, *Unit Variance* (UV) ou Pareto antes da análise multivariada. A análise de componentes principais (PCA) um método não supervisionado foi efectuada em primeiro lugar, para detectar valores atípicos ou separação de grupos de amostra, com base na variabilidade do sinal de RMN. Em seguida, foi realizada uma *Partial Least Squares Discriminant Analysis* (PLS-DA), um método supervisionado para encontrar um modelo ideal para discriminar entre as duas classes. A qualidade destes modelos é explicada por  $R^2$  (qualidade de ajuste) e valores de  $Q^2$  (qualidade de previsão) (Li 2014).

Quando se observou qualquer tendência de separação em *scores plot* entre as duas classes, a validade do modelo foi avaliada pelo método *Monte Carlo Cross Validation* (MCCV), usando o software "in house".

Após o processo MCCV, os metabólitos foram identificados a partir de PLS-DA, coloridos, consoante a *Variable Importance in the Projection* (VIP). Metabólitos com altos valores de VIP ( $> 1,0$ ) são considerados importantes, enquanto os que têm valores mais próximos de zero têm uma capacidade discriminatória mínima.

Picos relevantes de RMN de dados definidos presentes nos extratos aquosos foram integrados no AMIX e analisados por testes univariados, como o teste de normalidade de Shapiro-Wilk e o teste t de Student, ou o teste de Wilcoxon (respectivamente, para dados normalmente ou não normalmente distribuídos), em software de estatística. A distribuição dos dados entre os dois grupos foi comparada usando *box-plots*.

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Composição metabólica do tecido tumoral hepático

Conseguiram obter-se espectros de RMN de boa qualidade para o tecido e para extratos aquosos e lipídicos, como pode observar-se na Figura 4.1 (espectro médio 1D de RMN  $^1\text{H}$  de extractos aquosos), na Figura 4.2 (espectro médio 1D RMN  $^1\text{H}$  de extractos lipídicos) e na Figura 4.3 (espectro RMN de HRMAS do tecido hepático), onde se visualiza o perfil metabólico do tumor e do tecido envolvente (controlo). A análise destes espectros mostra claramente diferenças metabólicas entre tumor e controlo não tumoral.

### 4.2. Diferenças metabólicas entre tumor e tecido não tumoral

Para verificar a importância destas observações e pesquisar outras fontes de variabilidade dos dados com eventual utilidade, foram obtidos modelos PCA e PLS-DA para cada determinação 1D RMN  $^1\text{H}$ . Foi avaliado o efeito do processo de *scaling* nos espectros e no modelo correspondente.

As parcelas de pontuação obtidas por PLS-DA dos extratos aquosos com *scaling* centrado sugerem que controlos e o tumores podem ser agrupados em dois grupos diferentes, como pode observar-se na Figura 4.4 a.

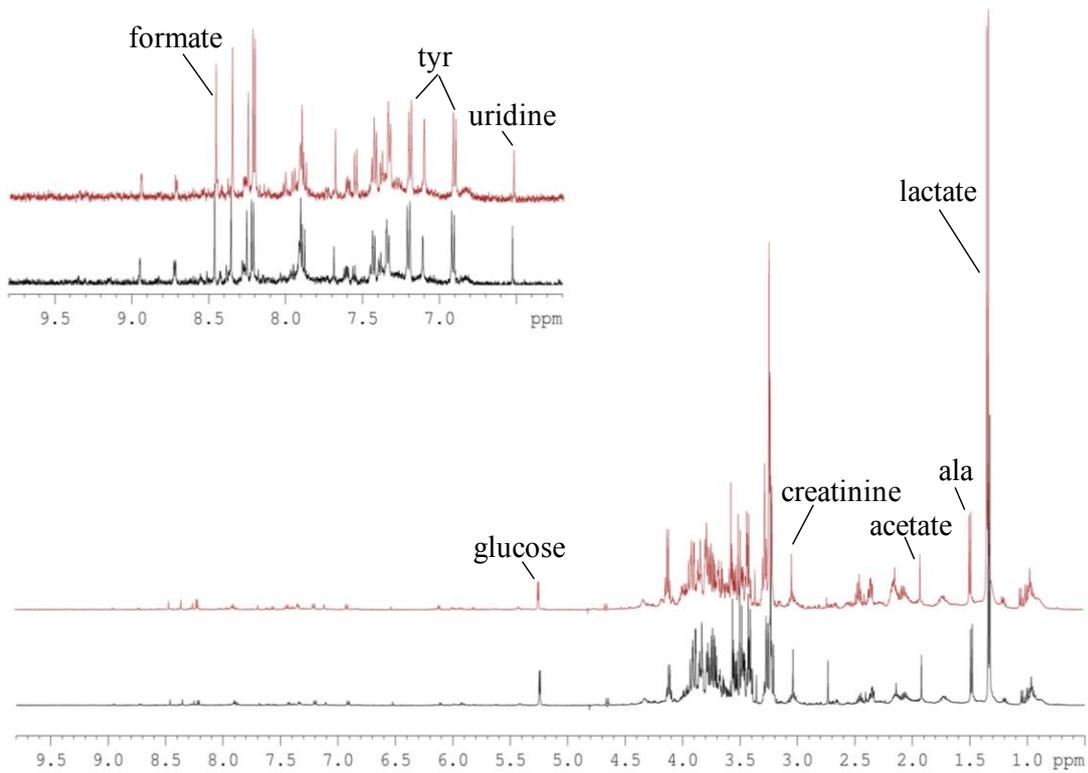


Figura 4.1 - Extracto aquoso—espectro médio do tumor (vermelho) *versus* controlo (preto).

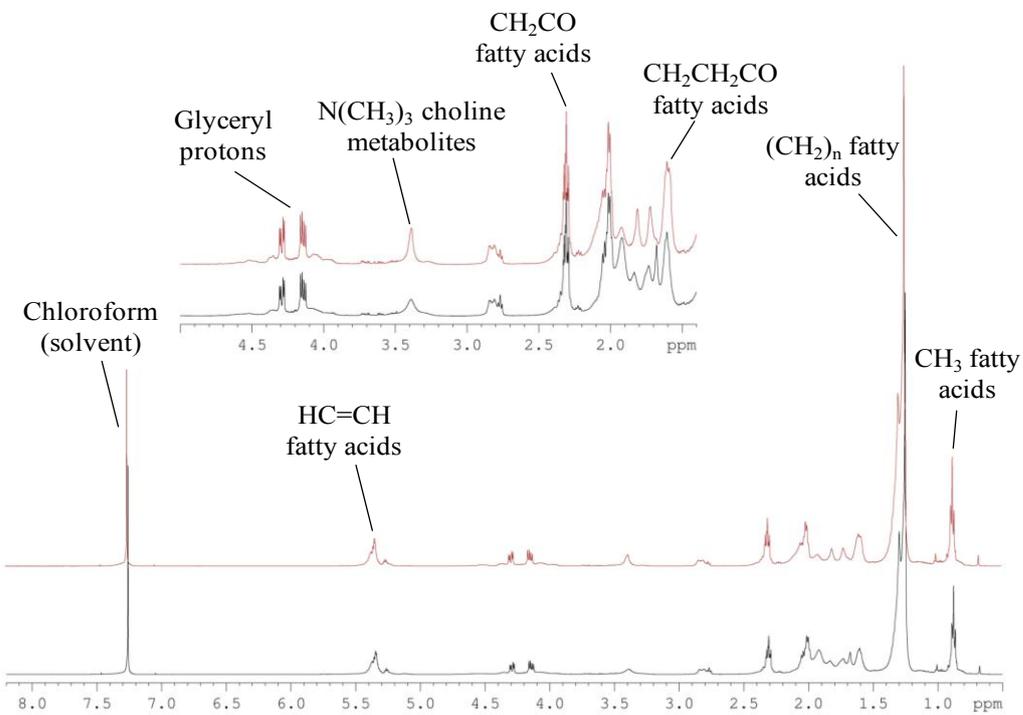
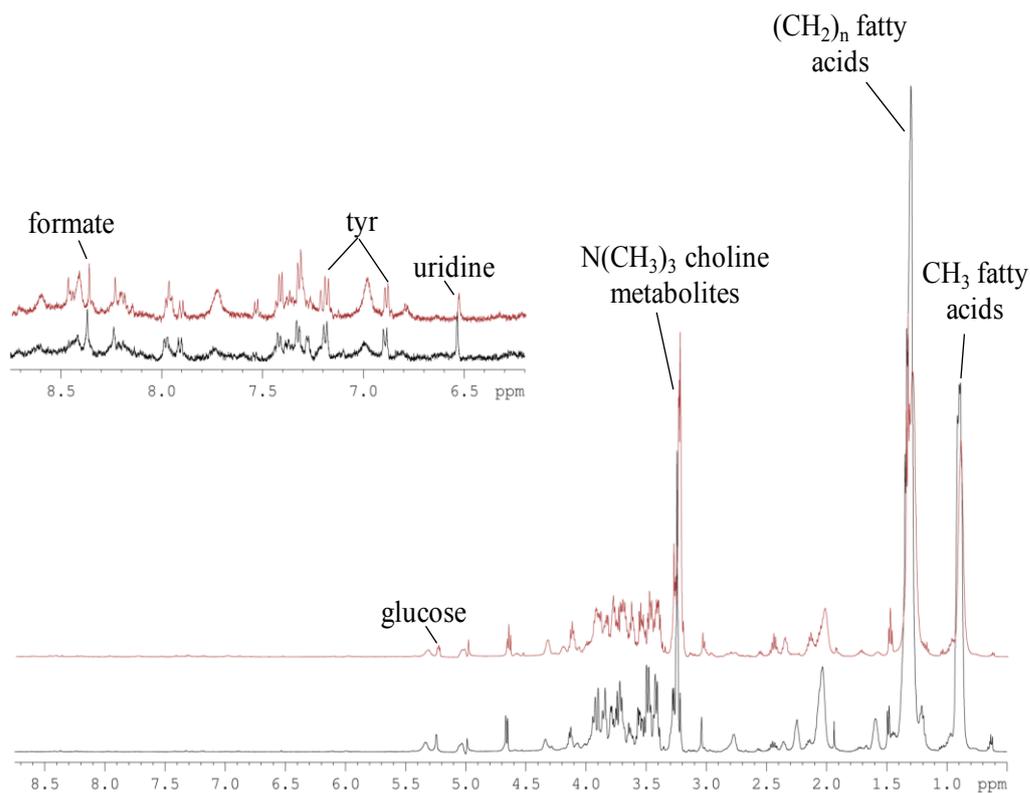
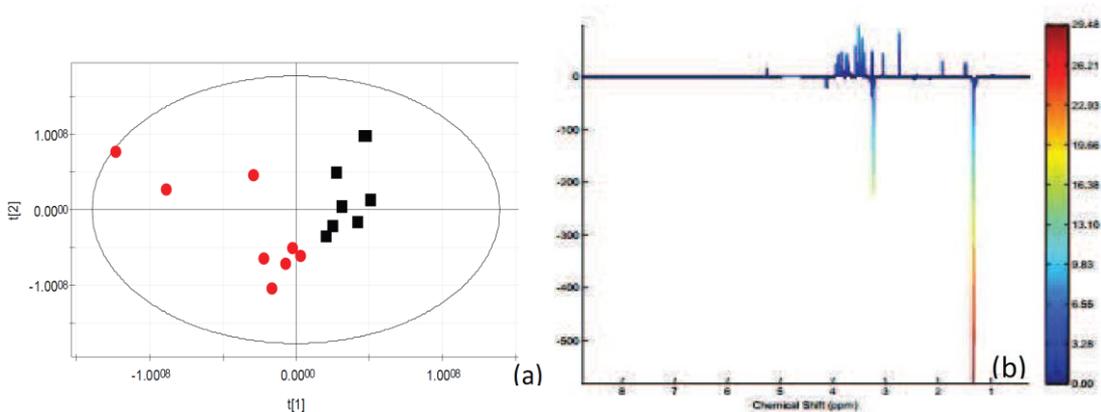


Figura 4.2 - Extracto lipídico – espectro médio do tumor (vermelho) *versus* controlo (preto).

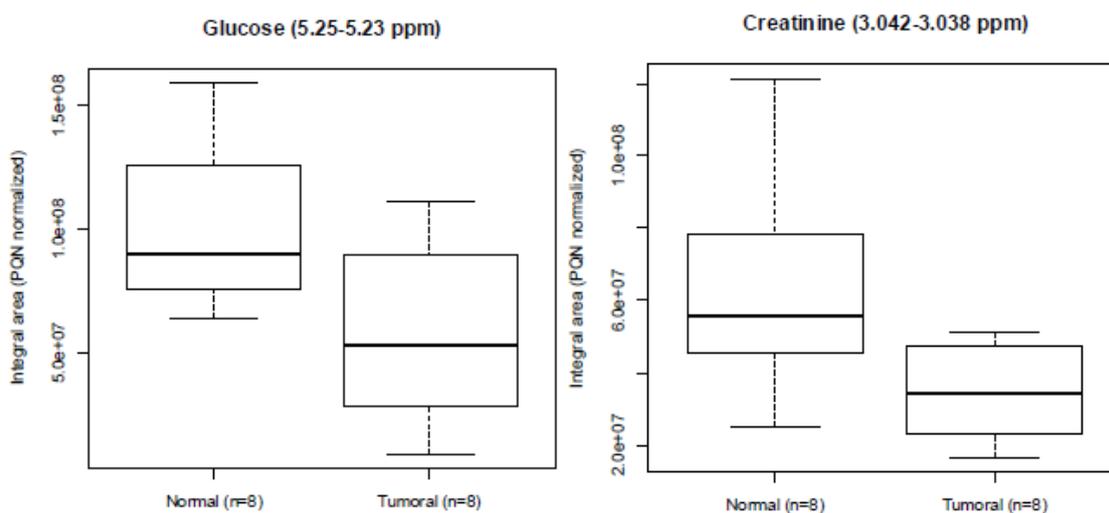


**Figura 4.3** – RMN  $^1\text{H}$  HRMAS do tecido hepático – espectro médio do tumor (vermelho) *versus* controlo (preto).

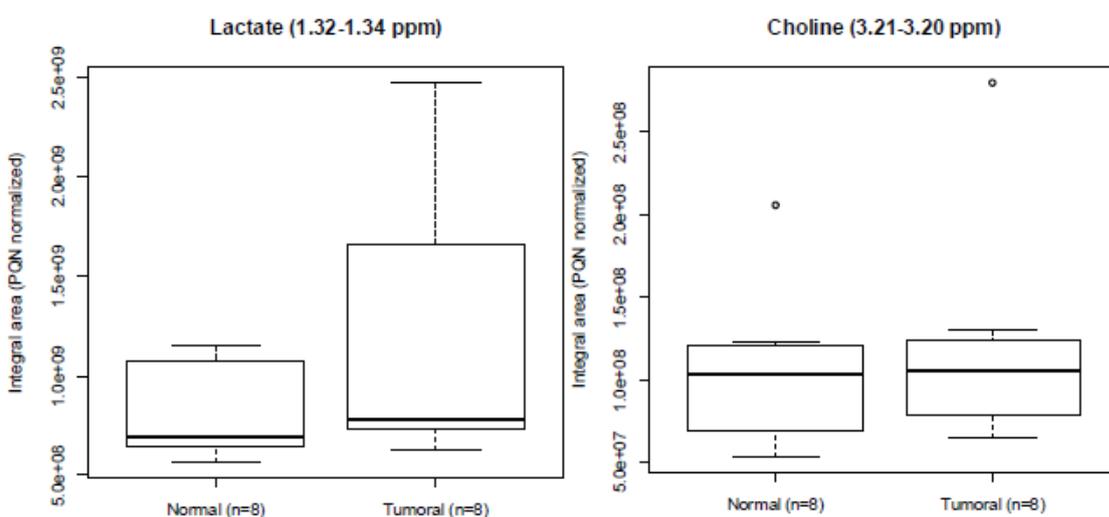


**Figura 4.4** - Modelo PLS-DA obtido por espectro RMN  $^1\text{H}$  de extractos aquosos. *Scores scatter plot* (a) representativos da distribuição de dados entre controlos (a preto, n=8) e tumores (a vermelho, n=8). Este modelo caracteriza-se pelos seguintes parâmetros:  $R^2\text{X}=0.753$ ,  $R^2\text{Y}=0.74$ ,  $Q^2=0.544$ . PLS-DA LV1 colorido pelo VIP (b).

Após validação deste modelo por MCCV (não apresentado) nos extractos aquosos, os metabolitos com elevado VIP foram integrados no Amix e analisados, utilizando ferramentas para análise univariada. Os integrais obtidos também foram usados para construir *box-plots*, que permitem uma fácil visualização das disparidades de metabolitos entre o grupo controlo e o grupo com tumor (Figuras 4.5a e 4.5b).



**Figura 4.5 a** - *Box-plots* ilustrando a variação da glicose ( $p= 0.029$ ) e creatinina ( $p= 0.032$ ), nos controlos e nas amostras com tumor (extractos aquosos).

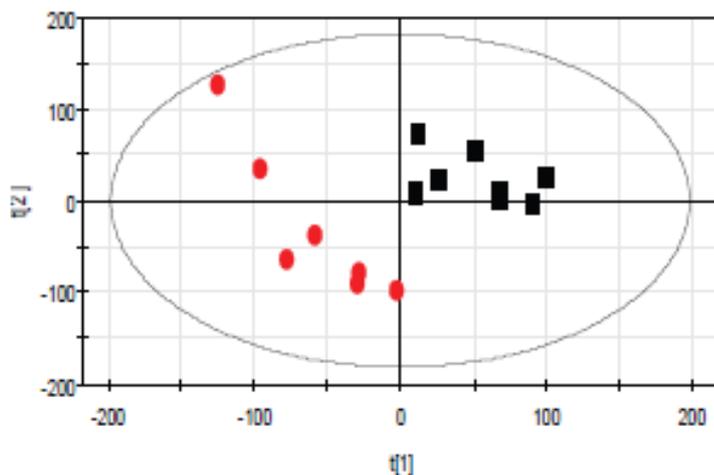


**Figura 4.5 b** - *Box-plots* ilustrando a variação do lactato ( $p=0.161$ ) e da colina ( $p= 0.798$ ), nos controlos e nas amostras com tumor (extractos aquosos).

Assim, podem observar-se as variações nos níveis de compostos que revelaram maior poder de discriminação, nomeadamente da glicose, creatinina, lactato e colina. Dos metabolitos representados apenas a glicose e a creatinina mostraram diferenças estatisticamente significativas entre os dois grupos ( $p < 0.05$ ).

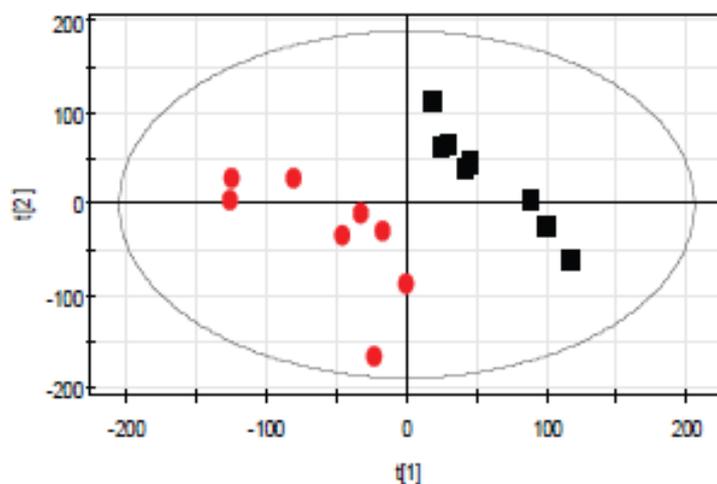
Foram também obtidos modelos PCA e PLS-DA para espectros lipídicos e para CPMG do tecido hepático intacto.

Para os extratos hepáticos de lipídios, os *score plots* PLS-DA, estabelecidos com os dados da RMN escalados com UV, revelam de novo uma aparente separação entre os dois grupos. Foi detectado um *outlier* (possivelmente com características clínicas diferentes) que foi removido, tendo o modelo PLS-DA sido refeito (Figura 4.6).



**Figura 4.6.** Modelo PLS-DA obtido com espectro standard RMN  $^1\text{H}$  de extractos lipídicos. (a) *Scores scatter plot* representativo dos dados da distribuição entre controlos (preto,  $n=8$ ) e grupo com tumor hepático (vermelho,  $n=7$ ). Este modelo caracteriza-se pelos seguintes parâmetros:  $R^2X=0.466$ ,  $R^2Y=0.948$ ,  $Q^2=0.145$ .

Também os *scores plot* PLS-DA, estabelecidos com os dados da RMN escalados com UV, de espectros CPMG do tecido hepático intacto revelam uma aparente separação entre os dois grupos (Figura 4.7).



**Figura 4.7.** Modelo PLS-DA obtido para espectro CPMG (tecido hepático). (a) *Scores scatter plot* representativos dos dados da distribuição entre controlos (preto, n=8) e grupo com tumor hepático (vermelho, n=8). Este modelo caracteriza-se pelos seguintes parâmetros  $R^2X=0.402$ ,  $R^2Y=0.976$ ,  $Q^2=0.688$ .

## 5. DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

Apesar da separação aparente entre os grupos, que observámos nos espectros aquosos e também nos espectros para lipídios e CPMG de tecido intacto, estes modelos apenas foram validados por MCCV para os espectros aquosos (não mostrado), o que indica que nos tecidos e extractos lipídicos não existem diferenças estatisticamente significativas. A justificação para este facto prende-se muito provavelmente com o pequeno número de amostras observadas e com a grande

heterogeneidade dos doentes incluídos, quer em termos de factores de risco, quer em termos das características anátomo-patológicas dos tumores.

Ainda assim, os resultados preliminares (com as 2 x 8 amostras) do nosso estudo indicam que:

1 - Nos nossos doentes com CHC conseguimos obter espectros de RMN  $^1\text{H}$  de boa qualidade, quer para o tecido intacto, quer para extractos aquosos e lipídicos; no tecido hepático e nos extractos lipídicos identificam-se vários ácidos gordos;

2 - Esta tecnologia deverá permitir diferenciar o grupo com tumor do grupo controlo (em tecido intacto, em extractos lipídicos e sobretudo em aquosos);

3 - Nos extratos aquosos registam-se claramente diferenças na glicose e creatinina; existe ainda um aumento de colina e lactato nos tumores, relativamente aos controlos, embora não seja estatisticamente significativo.

Cotejando os nossos dados com os da literatura, nomeadamente com o estudo de Yang Y *et al.* (2007), constatamos que verificaram diferenças metabolómicas entre tumores (n=17) e tecido envolvente (n=14), não tumoral, que se traduziam por aumento dos ácidos biliares, colina, fosforiletanolamina, fosfocolina, glicerofosfocolina, glutamato, glutamina, glicina, alanina e leucina e diminuição dos níveis de lipídeos, glicose e glicogénio.

A diminuição da creatinina que observámos nos nossos CHCs, relativamente aos controlos, não foi referida no estudo anteriormente mencionado, nem noutro trabalho mais recente (Solinas A *et al.* 2013), onde o aumento de colina, TMAO e a diminuição de ácidos gordos saturados diferenciava o CHC do tecido circundante; o aumento de lactato e mio-inositol diferenciava tumores recorrentes de CHCs primários; e a diminuição de ácidos gordos saturados caracterizava grandes nódulos de CHC.

Os picos de ácidos gordos observados nos nossos espectros também não são referidos na literatura, mencionando-se até diminuição do seu teor nos tumores, relativamente ao tecido controlo. A justificação para este facto poderá estar na elevada percentagem

de casos com diabetes mellitus, excesso de peso e dislipidemia existentes no nosso grupo de doentes.

Siwei W *et al.* (2012) avaliaram, por espectroscopia com RMN-HRMAS, o perfil metabólico de amostras de soro de doentes com CHC (n=40) e com cirrose por VHC (n=22). Neste trabalho, a análise estatística multivariada mostrou uma separação distinta dos dois grupos, indicando uma diferença metabólica entre eles, com base em sinais de lípidos e outros metabólitos individuais. A análise univariada mostrou que três metabólitos (colina, valina e creatinina) estavam significativamente alterados no CHC, havendo aumento relativo de valina e colina e diminuição da creatinina nos doentes com CHC, de forma semelhante ao que foi observado nos nossos doentes.

No nosso estudo, a espectroscopia de RMN de HRMAS revelou algumas informações sobre a atividade metabólica do CHC humano. Apesar do número relativamente pequeno de amostras estudadas, estes resultados mostram o enorme potencial da abordagem metabolómica para fornecer uma visão única da composição bioquímica dos tecidos, como complemento às informações morfológicas obtidas por histopatologia, identificando assim as assinaturas metabólicas que deverão ser exploradas como potenciais biomarcadores de malignidade.

Para além do potencial interesse no diagnóstico, a metabolómica pode também dar um contributo importante na previsão e avaliação da resposta a terapêuticas moleculares do CHC.

Os dados agora obtidos permitem prosseguir o nosso estudo, envolvendo um número mais elevado de doentes, com o objetivo de aprofundar o conhecimento do metaboloma do CHC e de destrinçar mais pormenorizadamente o tumor do tecido envolvente, o que significará também contribuir para o diagnóstico diferencial entre CHC e nódulo displásico. Além disso, pretendemos também usar esta tecnologia para verificar se existem diferenças metabolómicas relacionadas com características clínicas (nomeadamente com a existência de cirrose, síndrome metabólica e outros factores de risco) e morfológicas dos tumores.

## **AGRADECIMENTO**

Agradece-se ao grupo de Metabolómica do Departamento de Química da Universidade de Aveiro e Laboratório Associado CICECO, pela possibilidade de realizar este trabalho. Agradece-se ainda à Fundação para a Ciência e a Tecnologia (FCT) (Pest-C/CTM/LA0011/2013), e ao "European Regional Development Fund through the Competitive Factors Thematic Operational Programme" pelo financiamento. Agradece-se aos investigadores que ajudaram na preparação de amostras, aquisição e análise de dados: Ana M. Gil, Brian Goodfellow, João Rodrigues, Cláudia Rocha, Sara Pereira, Letícia Costa. Ana Gil agradece à Rede Nacional de RMN Portuguesa (RNRMN), apoiada com recursos da FCT, e a M. Spraul, Bruker BioSpin, Alemanha (por fornecer o acesso a bases de dados espectrais).

## **Capítulo 5**

### **MARCADORES DE RASTREIO E DIAGNÓSTICO DO CHC: O PAPEL DA OSTEOPONTINA**



## 1. INTRODUÇÃO E OBJECTIVOS

O número de casos de CHC diagnosticados tem aumentado recentemente na maioria dos países tradicionalmente considerados de baixa incidência (Bosch FX *et al.*, 2004; Fattovich G *et al.*, 2004; Sherman M, 2005), nos quais Portugal se inclui.

O CHC é um tumor com prognóstico muito sombrio, cuja taxa de mortalidade (cerca de 47.000 mortes/ano, na Europa, de acordo com dados da OMS) está próxima da taxa de incidência. O prognóstico é particularmente mau quando o tumor é diagnosticado após o aparecimento de sintomatologia, sendo muito importante que a sua detecção ocorra em fases precoces, em que possam realizar-se terapêuticas potencialmente curativas. Embora seja hoje detectado mais precocemente do que no início dos anos 90, devido à vigilância e à melhoria das técnicas de diagnóstico, ainda assim dados recentes indicam que, na Europa, a taxa global de sobrevivência aos 5 anos é de apenas 8,6% (Berrino F *et al.*, 2007; Verdecchia A *et al.* 2007).

Este tumor surge sobretudo em doentes com cirrose, cujo predomínio etiológico varia consoante os locais do globo, com o VHB a ser a principal causa na maioria dos países da Ásia e da África sub-sahariana, o VHC a dominar nos EUA, Japão e na maioria dos países europeus e o álcool a destacar-se, quer isoladamente, quer como co-factor etiológico associado ao VHC, em países de grande consumo alcoólico, como o nosso. Em Portugal a grande maioria dos casos de cirrose hepática é devida ao álcool, como foi demonstrado num estudo publicado este ano, referente a 81.543 internamentos por essa causa ocorridos entre 1993 e 2008, em que em 84% a etiologia é alcoólica (Marinho R *et al.*, 2014). No que diz respeito à doença de base nos casos de CHC, o nosso grupo mostrou que a cirrose alcoólica é a causa mais frequente de CHC na nossa região (Correia L *et al.*, 2011, dados não publicados).

A vigilância do CHC recomendada actualmente consiste na realização de ecografias semestrais aos doentes em maior risco. Este método possui uma sensibilidade de cerca de 60% (Bolondi L, 2003; Kim CK *et al.*, 2001), embora a existência de cirrose dificulte a identificação ecográfica de lesões nodulares hepáticas (Colombo M, 2007).

Marcadores serológicos, de que é paradigma a AFP, ainda que sejam muito simples de executar, não têm mostrado eficácia que permita serem utilizados isoladamente. A associação da determinação da AFP à ecografia aumenta significativamente os custos e o número de falsos positivos, não parecendo ter vantagem na prática, pelo que as actuais recomendações não a aconselham (AASLD Practice Guideline. 2011; EASL-EORTC Clinical Practice Guidelines, 2012).

Alguns outros biomarcadores têm sido testados, nomeadamente a des-gammacarboxiprotrombina (DCP) também designada PIVKA2, a fracção L3 da AFP (AFP-L3), o glipicano-3 (GPC-3) e a osteopontina (OPN). Destes, a OPN mostrou ter potenciais vantagens relativamente à AFP no diagnóstico do CHC, de acordo com os resultados de dois grandes estudos (Kim J *et al.*, 2006; Shang S *et al.*, 2012), que incluíram sobretudo doentes com doença hepática crónica por VHB ou por VHC.

Kim J *et al.* (2006), tendo como objectivo estudar a utilidade da OPN plasmática como marcador tumoral no CHC, determinaram os seus níveis plasmáticos (por ELISA), bem como os de AFP e de PIVKA II, num grupo de 62 doentes com CHC (69% VHB, 10% VHC, 3% álcool), 60 com doença hepática crónica sem tumor (83% VHB, 3% VHC, 10% álcool) e 60 controlos saudáveis. Para determinar a origem da OPN plasmática analisaram imunohistoquimicamente 285 amostras tecidulares de CHC. Detectaram níveis plasmáticos de OPN significativamente mais altos ( $p < 0,001$ ) nos doentes com CHC (mediana: 954 ng/mL, intervalo 168–5.742) do que na doença hepática crónica (381 ng/mL, 29–1.688) e nos controlos saudáveis (155 ng/mL, 10–766). No grupo de doentes com CHC os valores eram significativamente mais elevados à medida que aumentava a classe de Child-Pugh e o estágio tumoral. A sensibilidade e especificidade da OPN no CHC foram de 87% e 82%, respectivamente, para um *cut-off* de 617,6 ng/mL. A OPN teve uma área abaixo da curva (0,898) melhor que a da AFP (0,745) ou de PIVKA II (0,578), o que sugere uma maior acuidade de diagnóstico. A imunohistoquímica mostrou expressão de OPN em 92 de 285 tumores (32,3%), sendo encontrada em hepatócitos malignos e macrófagos que invadem o tumor, mas não em hepatócitos normais, nem nas células de Kupffer.

Particularmente impressionante é o estudo de Shang S *et al.* (2012), publicado na revista *Hepatology* com o título "Identification of osteopontin as a novel marker for early hepatocellular carcinoma", em que foram elaborados perfis proteómicos do plasma de doentes com cirrose, com e sem CHC e seleccionados candidatos a biomarcadores, em coortes de duas regiões geograficamente distintas (EUA e Tailândia), para incluir CHC de diferentes etiologias (VHC e VHB). O perfil de espectrometria de massa do plasma altamente fracionado, determinado em 18 cirroses e 17 CHCs, mostrou que a OPN estava significativamente hiper-regulada no CHC, relativamente aos controlos cirróticos. Os níveis de OPN foram posteriormente avaliados em 312 amostras plasmáticas de 131 doentes com CHC, 76 com cirrose, 52 com hepatites B e C crónicas e 53 controlos saudáveis, pertencentes às duas coortes independentes. A OPN teve uma sensibilidade superior à da AFP para o diagnóstico de CHC em todos os grupos estudados, sendo também boa em doentes com CHC e AFP negativa. Num estudo piloto prospectivo que incluiu 22 doentes que desenvolveram CHC durante o follow-up, verificou-se que a OPN já estava aumentada um ano antes do diagnóstico, sugerindo assim um potencial valor predictivo para a ocorrência do tumor.

Contudo, sabe-se que a OPN se relaciona com outros tumores e diversas situações patológicas, o que poderá representar uma forte limitação ao seu uso como marcador de CHC. Existem vários estudos que apontam para o seu papel na tumorigénese e na formação de metástases e tem sido detectada expressão de OPN em vários tipos de carcinomas em seres humanos. Trata-se de um atraente potencial marcador tumoral, porque existe na matriz extra-celular mas é também segregada nos fluídos orgânicos, incluindo o plasma (Kim J. *et al.*, 2006).

A OPN tem expressão fisiológica no osso e no rim, mas pode ser detectada em vários órgãos em condições patológicas, sendo a sua expressão hepática encontrada pela primeira vez em células de Kupffer, macrófagos e células estreladas em áreas necróticas e inflamatórias de ratos com intoxicação por tetracloreto de carbono (Kawashima R *et al.*, 1999). Posteriormente, comprovou-se o aumento da sua expressão no fígado de doentes com cirrose alcoólica ou causada por NASH, com cirrose biliar primária, hepatite auto-imune e colangite esclerosante primária, o que

sugere que a indução de uma resposta da OPN pode ser desencadeada pela lesão crónica do fígado (Syn WK *et al.*, 2011).

Nos alcoólicos os níveis circulantes de OPN parecem estimar com alguma precisão a existência de fibrose significativa e nestes doentes a expressão hepática correlaciona-se com os valores séricos e com a inflamação, a infiltração de neutrófilos (característica proeminente da hepatite alcoólica) e a expressão de TGF-beta (Gao B *et al.*, 2011).

Os níveis circulantes de OPN também estão alterados em doentes com complicações hepáticas relacionadas com o VHC e o VHB. Valores elevados foram um excelente indicador de cirrose em doentes com hepatite B (Zhao L *et al.*, 2008) e na hepatite crónica C correlacionaram-se com a fibrose hepática, conforme referimos (Huang W *et al.*, 2010).

No entanto, os dados já referidos, apontavam para um papel promissor no diagnóstico de CHC, ao mesmo tempo que aconselhavam a sua confirmação. Além disso, eram escassos os dados em doentes com patologia hepática alcoólica, os mais frequentes entre nós. Assim, estava plenamente justificada a importância de realizar um estudo nos nossos doentes, com os seguintes objectivos:

1º Avaliar a utilidade da OPN plasmática no diagnóstico do CHC no contexto de cirrose alcoólica, comparando-a com a AFP;

2º Averiguar se o aumento da OPN é devido ao tumor ou à doença de base;

3º Verificar se existe alguma relação entre os níveis de OPN plasmática e a actividade ou a gravidade da doença hepática.

Do nosso conhecimento esta seria a primeira investigação em doentes com cirrose alcoólica, com e sem CHC (apenas no trabalho de Kim J *et al.* que incluía 62 doentes com CHC, 2 eram cirróticos alcoólicos), sendo esta a etiologia mais frequentemente encontrada nos nossos doentes com CHC.

## 2. DOENTES E MÉTODOS

### 2.1. Desenho do estudo e características dos doentes

O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, sendo efectuado, após obtenção de consentimento informado, em doentes do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra (Hospitais da Universidade de Coimbra), seguidos em Consulta de Doença Hepática e de Pré-Transplante Hepático.

Em todos os indivíduos, o sangue foi recolhido num tubo de plástico contendo ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) e as amostras de plasma foram armazenadas a  $-80^{\circ}\text{C}$  até à determinação da OPN e da AFP, sendo as análises efectuadas no Serviço de Patologia Clínica do mesmo hospital.

O diagnóstico de CHC foi efectuado seguindo as recomendações da *European Association for the Study of the Liver* (EASL) e o estadiamento realizado segundo o sistema do grupo *Barcelona Clinic Liver Cancer* (BCLC), de acordo também com as referidas recomendações. A classificação BCLC tem em conta a função hepática (avaliada pelo *score* de Child-Pugh), as características do tumor (número e dimensões dos nódulos, eventual presença de invasão vascular e de disseminação extra-hepática) e também o estado físico do doente, através da escala de *performance status* de Zubrod.

O diagnóstico de cirrose foi estabelecido com base em dados clínicos, testes de função hepática, exames de imagem (ecografia e/ou TC abdominal), elastografia hepática transitória (Fibroscan®), com confirmação histológica nos casos de dúvida. Todos os doentes incluídos tinham consumo de álcool comprovadamente superior a 60 g/dia durante mais de 10 anos, tendo sido excluídas outras causas de doença hepática (VHB, VHC, doenças autoimunes e metabólicas).

Para estratificar a gravidade da doença hepática utilizámos a classificação de Child-Pugh, sendo os doentes divididos nas classes A, B e C e foi também calculada a pontuação do *Model for End-stage Liver Disease* (MELD)

Foram incluídos 90 doentes, 45 (44 H, 1 M) com cirrose hepática alcoólica (Grupo I) e 45 homens, com cirrose e CHC (Grupo II). Em todos foram determinados os valores de OPN e AFP plasmática e ainda os seguintes parâmetros: hemoglobina (Hb, g/dL), volume globular médio (VGM, fL), plaquetas (Plaq,  $\times 10^9/L$ ), INR, creatinemia (Cr, mg/dL), albuminemia (g/dL), actividade sérica da aspartato aminotransferase (AST, U/L) e da alanina aminotransferase (ALT, U/L), fosfatase alcalina (FA, U/L), gama glutamiltransferase (GGT, U/L) séricas e bilirrubinemia total (Brb, mg/dL).

No Grupo I todos os doentes tinham indicação para vigilância, de acordo com as recomendações actuais: cirróticos na classe A ou B de Child-Pugh, sendo apenas incluídos doentes da classe C que estavam em lista para transplante hepático (*EASL-EORTC Clinical Practice Guidelines, 2012*).

## **2.2. Determinação dos níveis plasmáticos de OPN**

Os níveis plasmáticos de OPN foram obtidos utilizando um kit comercial *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) (*Human osteopontin assay kit, Immuno-Biological Laboratories Co., Ltd Ref. IBL (JP 27158), Gunma, Japan*), sendo os procedimentos efectuados de acordo com as instruções do fabricante. Sumariamente, realizou-se uma técnica ELISA (sandwich), em poço revestido por anticorpo anti-osteopontina humana (IgG de coelho), que se liga à porção N-terminal da osteopontina. Após lavagem, utilização de anticorpo marcado (IgG rato – HRP), que se liga à porção da osteopontina destacada após clivagem pela trombina. Por reacção da peroxidase com o cromogéneo (TMB) há produção de cor, cuja intensidade é directamente proporcional à concentração da osteopontina presente na amostra. A quantificação resulta da comparação da intensidade da cor com uma curva de calibração em que se relaciona a concentração dos calibradores com a intensidade da cor produzida. Foi medida a concentração total de ambas as formas, fosforilada e não fosforilada, de OPN do

plasma. Todas as determinações foram realizadas em duplicado, pela mesma profissional, com vasta experiência na realização deste tipo de técnica.

### **2.3. Determinação dos níveis séricos de AFP**

Os níveis séricos de AFP foram obtidos utilizando um kit comercial (*IMMULITE 2000 AFP, Siemens Healthcare Diagnostics, Tarrytown, NY*), sendo a técnica de doseamento utilizada, a quimioluminescência. Utilizou-se como fase sólida uma esfera revestida de poliestireno, com um anticorpo monoclonal específico para a AFP. A amostra de soro do doente e uma matriz soro/tampão são introduzidos no Tubo de Reacção que contém a esfera e são incubados durante cerca de 30 minutos, a 37°C, agitando. Durante este tempo a AFP contida na amostra liga-se ao anticorpo monoclonal anti-AFP existente na esfera, sendo a amostra não ligada, removida por lavagem centrífuga. Um anticorpo anti-AFP policlonal marcado com fosfatase alcalina é introduzido no Tubo de Reacção e incubado durante mais 30 minutos. Adiciona-se então o substrato e o Tubo de Reacção é incubado durante mais 5 minutos. O substrato quimioluminescente, um éster de fosfato de adamantil dioxetano, sofre hidrólise em presença de fosfatase alcalina, produzindo um intermediário instável. A produção contínua deste intermediário resulta numa emissão mantida de luz, proporcionando uma janela para múltiplas leituras. O complexo ligado, medido pelo luminómetro, é proporcional à concentração de AFP na amostra, que é obtida utilizando uma curva de calibração mestra, no analisador IMMULITE.

### **2.4. Análise Estatística**

As variáveis contínuas foram analisadas para a sua distribuição e os dados expressos em média ( $\pm$  desvio padrão) quando paramétricos, e mediana (intervalo) quando não paramétricos. Os testes *t* de Student e U de Mann-Whitney foram usados para comparar variáveis contínuas em dois grupos com distribuição normal e não normal, respectivamente. O teste do qui-quadrado foi usado para comparar variáveis nominais

em dois grupos. O coeficiente de Spearman foi empregue para a associação de variáveis ordinais. Na avaliação do valor diagnóstico de OPN e AFP foram obtidas curvas ROC (*Receiver Operating Characteristic*) com os respectivos índices área abaixo da curva (AUC) e intervalos de confiança e determinado o ponto de corte com maior sensibilidade e especificidade. A significância estatística foi assumida com um risco de 5% de erro do tipo 1. O estudo estatístico foi realizado usando o *software* SPSS (versão 20.0; SPSS Inc., Chicago, IL, EUA).

### 3. RESULTADOS

Dos 90 doentes incluídos no estudo, a grande maioria era do sexo masculino (89; 98,89%), existindo apenas 1 mulher, no grupo I. A idade média dos doentes era significativamente inferior ( $p=0,003$ ) no Grupo I ( $58,68 \pm 10,76$  anos) em relação ao Grupo II ( $64,64 \pm 7,73$ ).

A distribuição pelas classes de Child-Pugh era ligeiramente diferente entre os grupos ( $p=0,052$ ): no grupo I, 44,4% pertenciam à classe A, 17,8% à classe B e 37,8% à classe C, enquanto no grupo II, 45,6% estavam na classe A, 35,6% na classe B, e 17,8% na classe C. O *score* MELD era de  $14,04 \pm 5,56$  nos doentes do grupo I e de  $12,71 \pm 4,25$  nos do grupo II, não havendo diferença estatisticamente significativa ( $p=0,205$ ).

O estadiamento BCLC dos doentes com CHC (Grupo II) permitiu agrupar os doentes da seguinte forma: 4,4% no estágio 0, 42,2% no estágio A, 24,4% no estágio B, 15,6% no estágio C e 13,3% no estágio D. (Quadro 5.1).

A distribuição dos parâmetros analíticos pelos 2 grupos é a mencionada no Quadro 5.2.

**Quadro 5.1 - Características gerais dos doentes**

	<b>Grupo I (Cirrose)</b>	<b>Grupo II (Cirrose e CHC)</b>	<b>p</b>
N (%)	45 (50,0%)	45 (50,0%)	
Idade	58,68 ± 10,76	64,64 ± 7,73	0,003
Sexo (F/M)	(1/49)	(0/50)	
Score Child Pugh	20 (44,4%)	21 (45,6%)	0,052
A	8 (17,8%)	16 (35,6%)	
B	17 (37,8%)	8 (17,8%)	
C			
MELD	14,04 ± 5,56	12,71 ± 4,25	0,205
Estádio BCLC			
O		2 (4,4%)	
A		19 (42,2%)	
B		11 (24,4%)	
C		7 (15,6%)	
D		6 (13,3%)	

**Quadro 5.2 - Parâmetros analíticos dos 2 grupos.**

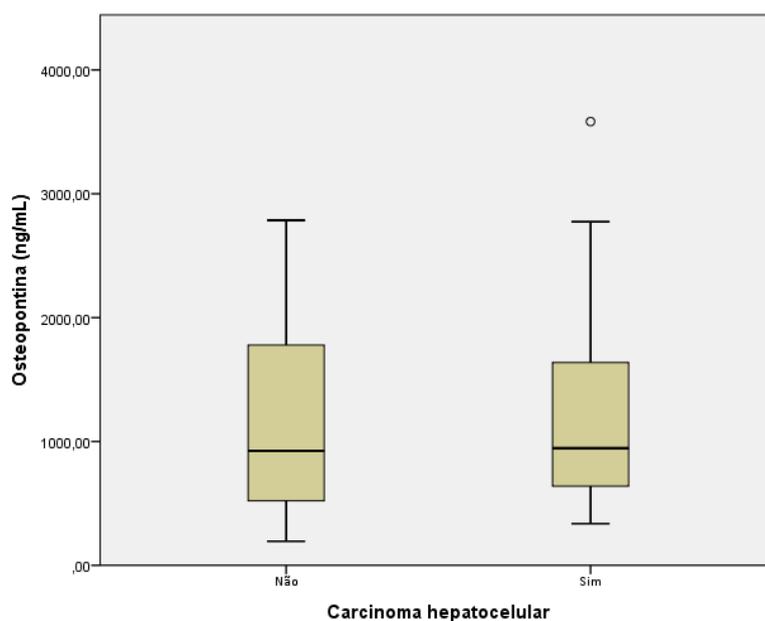
	<b>Grupo I</b>	<b>Grupo II</b>	<b>p</b>
Hemoglobina (g/dL)	13,10 (4,60-17,00)	13,10 (7,30-16,60)	0,821
VGM (fL)	96,72 ± 9,36	97,49 ± 6,00	0,643
Plaquetas (x10 <sup>9</sup> /L)	104,00 (30,00-380,00)	100,00 (31,00-685,00)	0,942
INR	1,40 (1,06-3,38)	1,32 (1,00-2,46)	0,024
Albumina (g/dL)	3,5 (1,90-4,90)	3,50 (2,10-4,90)	0,897
AST (U/L)	40,00 (15,00-236,00)	59,00 (21,00-271,00)	<0,001
ALT (U/L)	28,00 (13,00-151,00)	41,00 (8,0-343,00)	0,003
FA (U/L)	100,00 (56,00-254,00)	150,00 (51,00-1719,00)	<0,001
GGT (U/L)	59,00 (16,00-1443,00)	199,00 (27,00-1489,00)	<0,001
Bilirrubina (mg/dL)	1,50 (0,50-9,0)	1,60 (0,40-7,70)	0,977

A mediana da AFP no Grupo I era de 3,00 (0,90-17,00) ng/mL e no Grupo II de 11 (1,30-431272,00) ng/mL, sendo a diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,001$ ). Relativamente à OPN, a mediana era de 923,80 (193,80-2786,20) e de 946,30 (337,10-3583,00), respectivamente para os Grupos I e II, não existindo diferenças com significado estatístico entre ambos ( $p = 0,826$ ) (Quadro 5.3; Figura 5.1).

Quando comparámos mediana e intervalo da OPN entre o Grupo I: 923,80 (193,80-2786,20) e os estádios precoces (0 e A) do Grupo II: 797,80 (393,20-2775,10) verificámos não existir também diferença com significado estatístico ( $p = 0,353$ ) (U de Mann-Whitney).

**Quadro 5.3** – Alfabetoproteína sérica e osteopontina plasmática nos dois grupos.

	<b>Grupo I (Cirrose)</b>	<b>Grupo II (Cirrose e CHC)</b>	<b>p</b>
AFP (ng/mL)	3,00 (0,90-17,00)	11,00 (1,30-431272,00)	<0,001
OPN (ng/mL)	923,80 (193,80-2786,20)	946,30 (337,10-3583,00)	0,826

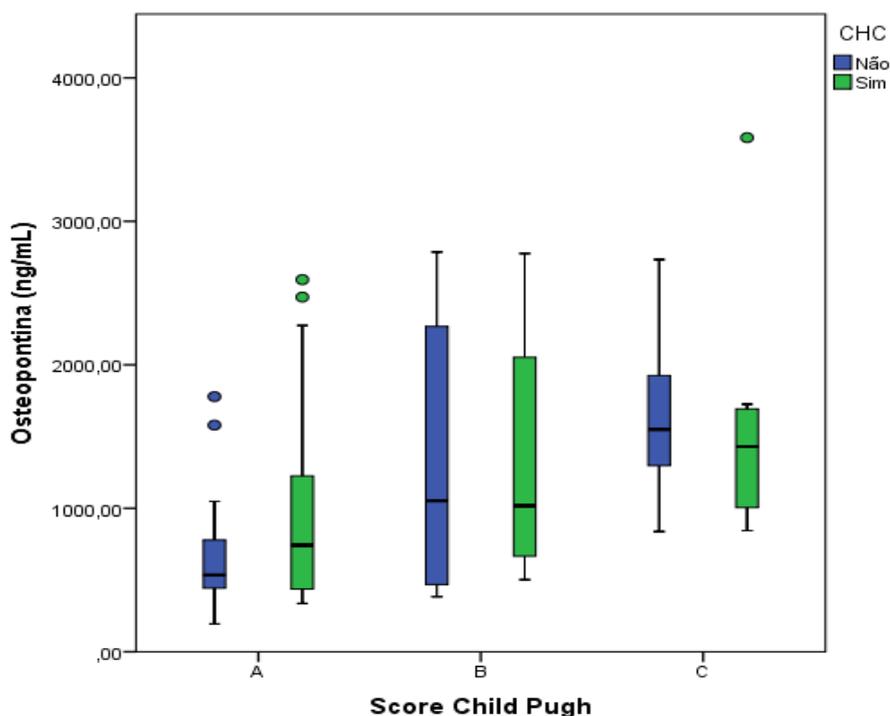


**Figura 5.1** - Diagrama de extremos e quartis dos valores plasmáticos da osteopontina de acordo com a presença ou ausência de CHC.

Quando analisámos os valores médios da OPN em relação com a gravidade da cirrose hepática, verificámos que estavam correlacionados no sentido directo com o *Score de Child-Pugh* ( $\rho= 0,533$ ;  $p < 0,001$ ), quer nos doentes que apenas tinham cirrose (Grupo I), quer nos que também tinham CHC (Grupo II) ( $\rho=0,644$ ;  $p<0,001$  vs  $\rho=0,392$ ;  $p=0,008$ ). (Quadro 5.4 e Figura 5.2).

**Quadro 5.4** - Relação entre os valores plasmáticos da osteopontina e a gravidade da cirrose hepática.

OPN (ng/mL)	Grupo I (Cirrose)	Grupo II (Cirrose e CHC)
<i>Score Child Pugh</i>		
A	534,95 (193,80-1778,60)	742,30 (337,10-2593,80)
B	1051,85 (384,20-2786,20)	1017,80 (502,40-2775,10)
C	1549,70 (838,40-2734,00)	1430,15 (844,00-3583,00)



**Figura 5.2** - Diagrama de extremos e quartis dos valores plasmáticos de osteopontina (OPN) de acordo com o *Score Child Pugh* e presença ou ausência de CHC.

No que respeita à AFP, os seus níveis séricos não apresentaram correlação com o *score* de Child-Pugh ( $\rho = 0,001$ ;  $p = 0,990$ ). (Quadro 5.5).

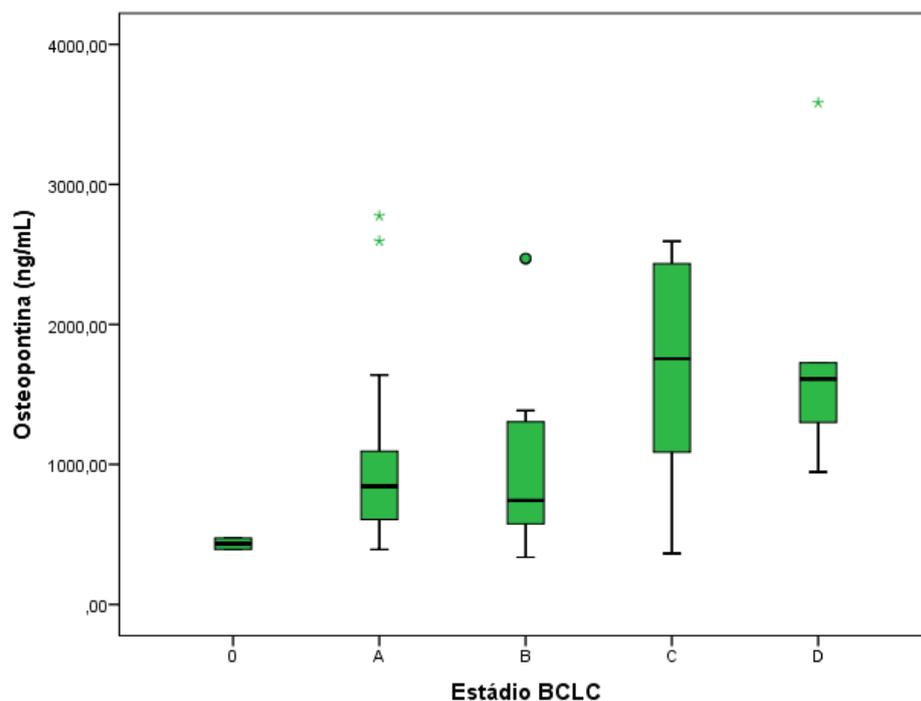
**Quadro 5.5** - Relação entre os valores séricos da alfafetoproteína e a gravidade da cirrose hepática.

AFP (ng/mL)	Grupo I (Cirrose)	Grupo II (Cirrose e CHC)
Score Child Pugh		
A	2,50 (1,10-13,00)	10,00 (1,30-2159,00)
B	3,40 (1,10-5,60)	14,00 (1,60-431272,00)
C	3,10 (0,90-17,00)	12,45 (1,40-8251,00)

Tanto a OPN ( $\rho = 0,428$ ;  $p = 0,003$ ) como a AFP ( $\rho = 0,522$ ;  $p < 0,001$ ) apresentavam uma correlação no sentido directo com o estágio BCLC (Quadro 5.6; Figura 5.3).

**Quadro 5.6** - Valores de osteopontina e alfafetoproteína, de acordo com o estágio BCLC.

(Grupo II) Cirrose e CHC	OPN (ng/mL)	AFP (ng/mL)
Estádio BCLC		
0	434,25 (394,40-474,10)	6,15 (5,90-6,40)
A	844,00 (393,20-2775,10)	3,20 (1,30-242,00)
B	742,30 (337,10-2472,00)	31,00 (2,80-431272,00)
C	1754,70 (363,80-2593,80)	225,00 (8,70-7392,00)
D	1609,75 (946,30-3583,00)	255,00 (3,30-8251,00)

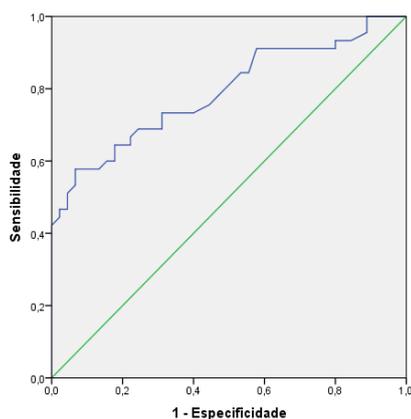


**Figura 5.3** - Diagrama de extremos e quartis dos valores plasmáticos de osteopontina de acordo com o estágio BCLC.

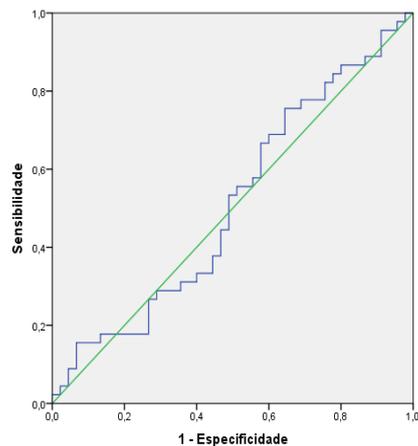
Na avaliação do valor diagnóstico da OPN e da AFP foram obtidas curvas ROC (*Receiver Operating Characteristic*) com os respectivos índices: área abaixo da curva e intervalos de confiança. (Quadro 5.7; Figura 5.4).

**Quadro 5.7** - Valores de área abaixo da curva, erro padrão e intervalo de confiança para alfafetoproteína (AFP) e osteopontina (OPN).

Marcador	Área abaixo da curva (AUC)	Erro padrão	Intervalo de confiança
AFP	0,791	0,048	0,697-0,885
OPN	0,511	0,062	0,390 - 0,631



(a)



(b)

**Figura 5.4** - Curvas ROC para a AFP (a) e a OPN (b).

A análise da área abaixo da curva ROC para a AFP permite para um valor de corte de 8,2 ng/mL, obter uma sensibilidade de 57,8% e uma especificidade de 93,3%, valores sobreponíveis aos obtidos para o valor de corte correspondente ao valor de referência do nosso laboratório (8,6 ng/mL), a que corresponde uma sensibilidade de 55,6% e uma especificidade de 93,3%. O aumento do valor de corte para valores de AFP de 23,5 ng/mL permite aumentar a especificidade para 100%, mas com uma perda de sensibilidade para 42,2%.

A análise da curva ROC para a OPN não permite estabelecer um valor de corte capaz de distinguir doentes com e sem CHC (Grupo I vs Grupo II), não sendo obtidos valores adequados para se poder estimar sensibilidades e especificidades.

#### 4. DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

Na maioria dos estudos publicados (Kim J *et al.*, 2006; Bessa SS *et al.*, 2010; Abu El Makarem MA *et al.* 2011; Shang S *et al.* 2012; Mona Salem *et al.*, 2013; Sawsan Said Hafez *et al.* 2013) a OPN mostrou ter vantagens relativamente à AFP no diagnóstico do CHC em doentes com cirrose por VHB e também por VHC, sendo que num dos trabalhos o benefício maior ocorreu quando associada à AFP (Shang S *et al.* 2012).

No entanto, outras publicações, que surgiram posteriormente ao início do nosso trabalho, não confirmaram essa utilidade neste contexto (Khalil A *et al.*, 2013; H Abdel-Hamid M *et al.*, 2014) e não existem até ao momento dados publicados sobre o valor da OPN no diagnóstico do CHC em doentes com cirrose hepática alcoólica.

No nosso estudo a OPN plasmática não foi significativamente diferente entre doentes com cirrose e CHC, e doentes apenas com cirrose, com uma área abaixo da curva de 0,51 (IC a 95%: 0,39-0,63), não evidenciando, portanto, qualquer poder como marcador de diagnóstico de CHC.

A amplitude de valores da OPN e até as unidades variam nos diversos estudos, muito provavelmente em relação com os diferentes *kits* utilizados. No trabalho de Kim J *et al.* onde foram utilizados *kits* com a mesma referência dos nossos, os valores de OPN encontrados foram da mesma ordem de grandeza dos que obtivemos (mediana no grupo com CHC de 946,3 ng/mL e de 964 ng/mL, respectivamente, nos nossos doentes e nos de Kim J *et al.*).

Um dos aspectos mais relevantes do nosso estudo, foi a constatação duma correlação significativa da OPN com indicadores de gravidade da cirrose (*score* de Child-Pugh) em ambos os grupos que avaliámos. Este facto vem de encontro aos achados de que a OPN é uma proteína com várias funções, implicada na inflamação e fibrose hepáticas de várias etiologias. Alguns estudos têm destacado o seu papel em doenças inflamatórias do fígado, como as doenças hepáticas alcoólica e não alcoólica e a hepatite mediada por células T (Apte UM *et al.*, 2005; Banerjee A *et al.*, 2006; Banerjee

A *et al.*, 2008; Sahai A *et al.*, 2004; Kiefer FW *et al.*, 2011; Kiefer FW *et al.*, 2010; Diao H *et al.*, 2004; Mimura S *et al.*, 2004; Kon S *et al.*, 2008).

A diferença dos resultados da OPN entre o grupo com doença hepática crónica (DHC) do estudo de Kim J *et al* (mediana: 381ng/mL; valores limite: 29-1688) e o nosso (mediana: 946,30 ng/mL; valores limite: 337,10-3583,00) poderá ter a ver com o facto de aqueles autores terem apenas 50% de cirroses no grupo da DHC, enquanto no nosso caso todos os doentes eram cirróticos (e portanto com maior gravidade da doença de base). Não pode, obviamente, excluir-se que a causa da DHC possa ter também influência, devendo realçar-se que no nosso estudo todas as cirroses eram de causa alcoólica, enquanto no de Kim J *et al.* apenas 10% tinham essa etiologia.

No Grupo II verificámos a existência de uma correlação directa da OPN com o estágio BCLC do CHC e que os nossos doentes com tumores iniciais, nos estádios 0 e A (que correspondiam a 46,6% do total do Grupo II), tinham valores médios mais baixos que os doentes do Grupo I. Estes dados apontam também no sentido de que, nos doentes com cirrose alcoólica, o valor da OPN esteja relacionado sobretudo com a gravidade da cirrose, de alguma forma mascarando a subida que poderá ocorrer devida ao CHC.

Como já foi demonstrado, nos doentes alcoólicos a OPN hepática correlaciona-se com a sérica, com a inflamação hepática, a infiltração por neutrófilos (hepatite alcoólica), com a fibrose e a expressão de TGF-beta. (Gao B *et al.*, 2011). No entanto, nos nossos doentes não podemos provar que a inflamação contribua significativamente para os valores de OPN encontrados, porque nenhum deles tinha alterações clínicas ou analíticas sugestivas de hepatite alcoólica ou de outro processo inflamatório agudo. Contudo, também não o poderemos excluir, uma vez que não temos dados histológicos da mesma altura em que foram feitas as colheitas para doseamento da OPN, pelo que este será um assunto em aberto, merecendo melhor caracterização na doença hepática alcoólica.

Segundo a literatura, a especificidade da AFP varia entre 76% e 96 %, sendo melhorada com a elevação do valor de *cut-off*, o que, por sua vez, diminui a sensibilidade. (Gambarin-Gelwan M *et al.* 2000; Kokudo N e Makuuchi M, 2009). O desempenho da AFP na nossa população foi semelhante, com uma área abaixo da curva de 0,791 (IC a

95%: 0,697-0,885), sensibilidade e especificidade de, respectivamente, 55,6% e 93,3% para um valor de corte de 8,6 ng/mL (referência normal do laboratório). Aumentando o valor de corte para 23,5 ng/mL consegue-se uma especificidade de 100%, mas uma descida da sensibilidade para apenas 42,2%. Ou seja, confirma-se a relação dos valores da AFP com a presença do CHC, mas igualmente a sua pouca utilidade para o diagnóstico e, sobretudo para o rastreio em programas de vigilância.

Foi confirmada em numerosas investigações a correlação positiva entre os valores séricos da AFP e as dimensões do tumor (Abelev GI *et al.*, 1963; Nomura F *et al.*, 1989; Margarit C *et al.*, 2002; Forner A *et al.*, 2009). No mesmo sentido, verificámos a mesma correlação nos nossos doentes, quando comparámos os valores da AFP no soro com o estágio BCLC do tumor. Por outro lado, nos nossos doentes os valores da AFP não foram influenciados pela gravidade da cirrose hepática, avaliada pelo *score* de Child-Pugh, em nenhum dos grupos estudados.

Em suma, os resultados deste estudo mostram que:

- A OPN não é um marcador adequado para o diagnóstico de CHC em doentes com cirrose hepática de etiologia alcoólica;
- Na cirrose alcoólica os valores da OPN são tanto mais altos quanto mais grave for a doença, independentemente da presença de CHC;
- Nos doentes com CHC em estádios precoces (estádio 0 e A da classificação BCLC) o valor da OPN é inferior ao dos doentes sem tumor, o que reforça a ideia de ser a gravidade da cirrose que se relaciona com aumento da OPN, na população que estudámos;
- A AFP confirma nos nossos doentes o desempenho evidenciado noutros estudos, não sendo o marcador ideal, mas ainda assim claramente superior à OPN;

Estes resultados confirmam, globalmente, a inutilidade dos marcadores tumorais estudados no diagnóstico precoce do CHC e reforçam a importância dos métodos radiológicos na vigilância dos grupos de risco, exigindo, contudo, que as ecografias sejam feitas por radiologistas treinados e com equipamento adequado.

Finalmente, salientamos que é fundamental que se continue a investigação na procura de novos biomarcadores, particularmente importantes nos casos em que a AFP é negativa.

## **Capítulo 6**

### **CONCLUSÕES**



## CONCLUSÕES

1. Quando em 3 de Dezembro de 1988, apresentámos a comunicação “Hepatoma. Uma entidade rara?”, em Coimbra, poucos se atreveriam a prever o crescendo da incidência do CHC em Portugal, que posteriormente se veio a verificar. Das várias razões que se podem invocar para que isso tenha acontecido, a nossa casuística permite confirmar a maior sobrevivência dos doentes com cirrose hepática (a idade média dos nossos doentes é de 64,7 anos) e a extraordinária evolução e maior disponibilidade dos métodos de imagem, que permitem diagnosticar mais facilmente este tumor (o diagnóstico foi feito deste modo em 72,1% dos nossos doentes). Contudo, uma das mensagens dessa nossa primeira comunicação era sobre a importância do rastreio e do diagnóstico precoce, que ainda hoje não foi posta em prática, como se constata ao verificar que apenas 31,5% dos nossos doentes foram diagnosticados em rastreio e unicamente 19,4% dos tumores estavam em estádios iniciais.

Assim, a primeira conclusão dos nossos trabalhos é de que ainda não atingimos o objectivo há muito traçado no que respeita à necessidade de diagnosticar precocemente o CHC, devendo insistir-se na importância da vigilância dos doentes em risco junto dos médicos e em especial dos especialistas em MGF.

2. É polémica a metodologia de rastreio do CHC. Se alguns autores ainda defendem a utilização da AFP, associada à ecografia, as últimas recomendações das associações hepatológicas europeia (EASL) e americana (AASLD) aconselham apenas a realização de ecografia cada 6 meses. Na nossa prática clínica defendemos essa metodologia, desde que a ecografia seja realizada por um radiologista experiente e com equipamento adequado. Contudo, admitimos que se possa considerar o possível interesse da determinação da AFP em certos casos ou contextos.

Concluimos, perante os resultados do nosso estudo que a AFP tem pouco interesse, quer na vigilância, quer no diagnóstico, pelo que desaconselhamos o seu uso por rotina no rastreio, restringindo-o à monitorização da terapêutica em doentes onde o seu valor seja inicialmente elevado.

**3.** Na sequência da desvalorização da AFP, outros marcadores serológicos têm sido experimentados. Dos referidos na literatura, apostámos na osteopontina (OPN), baseados em dois artigos publicados por grupos importantes em revistas de referência mundial (Kim J *et al.*, 2006; Shang S *et al.*, 2012). Quisemos sobretudo saber qual o comportamento deste marcador em doentes com cirrose alcoólica, aspecto ainda não estudado.

Os nossos resultados permitem concluir com absoluta clareza que a OPN não tem qualquer utilidade no diagnóstico do CHC enxertado em cirrose alcoólica, mas poderá ter algum interesse como factor de prognóstico, uma vez que se correlaciona sobretudo com a gravidade da doença de base.

**4.** As limitações apontadas aos programas de vigilância do CHC em doentes de risco fazem com que seja muito importante ter uma estratégia de diagnóstico precoce, uma vez que só assim será possível propor terapêuticas com intenção curativa. Infelizmente estamos longe de atingir esse objectivo, como o demonstram os nossos resultados, ao confirmar o diagnóstico demasiado tardio na maioria dos doentes (23,6% no estágio intermédio, 32,7% no estágio avançado e 22,4% no estágio terminal). Por isso, pese embora a polémica acerca da validade dos programas de vigilância, parece-nos essencial colocar em prática um plano aplicado aos doentes em risco, cumprindo as recomendações internacionais.

Em linha com alguns dados da literatura, os nossos resultados mostram claramente que é significativamente maior a sobrevivência dos doentes em estádios precoces

(probabilidade de sobrevivência aos 5 anos de 65,2% no estágio A), o que está fortemente relacionado com a eficácia da terapêutica nessas fases.

É fundamental que, quando é detectado um nódulo num doente com cirrose, o diagnóstico seja feito atempadamente, devendo existir de canais de referência para centros especializados onde existam equipas multidisciplinares, treinadas para diagnosticar e tratar adequadamente este tipo de doentes. Estas equipas que assumem particular importância numa entidade clínica tão complexa como é o CHC, que associa na maioria das vezes duas doenças graves, devem reunir periodicamente e ter capacidade para resolver questões que se prendem com eventuais dificuldades de diagnóstico, com a escolha da modalidade terapêutica mais adequada a cada doente em concreto, com a concretização do tratamento decidido pelo grupo e com a monitorização da eficácia à terapêutica instituída, discutindo outras caso a anterior não tenha sido eficaz.

**5.** Uma limitação importante dos actuais meios de diagnóstico, imagiológicos e mesmo histológicos, é a dificuldade de destringir entre pequenos tumores e nódulos displásicos, quando as dimensões são inferiores a 2 cm. Foi a pensar também nessa eventualidade que apostámos na realização dum estudo metabólico, com a caracterização bioquímica de nódulos tumorais e do tecido circundante, sem tumor.

Conseguimos obter espectros de RMN  $^1\text{H}$  de boa qualidade, quer para o tecido intacto, quer para extractos aquosos e lipídicos; no tecido hepático e nos extractos lipídicos identificaram-se vários ácidos gordos; nos extratos aquosos registaram-se claramente diferenças na glicose e creatinina (diminuídas nos tumores), havendo ainda um aumento de colina e lactato nos tumores, relativamente aos controlos, embora não estatisticamente significativo. Esta tecnologia deverá permitir diferenciar o grupo com tumor do grupo controlo (em tecido intacto, em extractos lipídicos e sobretudo em aquosos).

Concluimos, apesar dos resultados serem preliminares, pela sua dimensão, que há uma clara utilidade potencial da metabólica, entreabrindo uma porta que pode

levar a formas simples e eficazes de diagnóstico precoce, bem como de previsão e monitorização dos resultados de terapêuticas moleculares, ainda que com a limitação da acessibilidade actual da tecnologia que empregámos.

**6.** A esmagadora maioria dos CHCs surge em doentes com cirrose hepática, o que também se verifica na nossa casuística. Os factores etiológicos de ambas as patologias são os mesmos e, na nossa série, o consumo excessivo de álcool foi o factor de risco mais frequente, presente em 73,9% dos indivíduos. Além disso, teve grande relevo a associação do álcool a outros factores de risco, a que cada vez se dá maior importância: diabetes mellitus tipo 2 (21%), diabetes e obesidade de grau II ou superior (11%) e obesidade grave (5%).

O papel do álcool é ainda mais relevante se tivermos em conta a percentagem de casos com etiologia viral em que este surge como factor associado. Apesar do grande destaque que tem vindo a ser dado às infecções crónicas pelo VHB e pelo VHC, este último principalmente no ocidente, o seu peso é relativamente pequeno nos nossos doentes. Contudo, isso não impede que se considere a profilaxia e o tratamento adequado das hepatites virais B e C como sendo medidas imprescindíveis na luta contra o CHC.

Concluindo, afirmamos, com base naquela que é a maior casuística de CHC portuguesa até agora analisada, que em Portugal (pelo menos na região centro do país), a cirrose alcoólica continua a ser, de longe, o principal factor causal de CHC, estando o consumo alcoólico associado frequentemente à diabetes mellitus e à obesidade. Consequentemente, devem intensificar-se as medidas de combate ao consumo excessivo de álcool e promover-se hábitos de vida saudável, com alimentação equilibrada e exercício físico, e tratar adequadamente as situações metabólicas, nomeadamente a diabetes mellitus tipo 2 (a metformina parece ser mais eficaz do que as sulfonilureias ou a insulina na redução do risco de CHC, nestes doentes).

**7.** O fígado gordo e a esteatohepatite não-alcoólica são hoje, e serão certamente cada vez mais, uma causa importante de hepatopatia, assumindo já em Portugal o segundo lugar, logo após a doença hepática alcoólica. Na nossa série a NASH estava presente como único factor em 3% dos doentes, mas acreditamos que se encontra frequentemente associada a outros factores tradicionalmente tidos como mais relevantes, nomeadamente o álcool.

Concluimos que a obesidade e a diabetes mellitus tipo 2 são factores que, quer directamente, através da insulino-resistência, quer pelas lesões hepáticas crónicas que provocam, são importantes na génese da doença hepática subjacente ao CHC, assumindo já um papel significativo, cada vez mais relevante no futuro.

**8.** A classificação proposta pelo BCLC é hoje a referência internacional para o estadiamento dos doentes com CHC. Contudo é alvo de algumas críticas, como aliás acontece com qualquer outra classificação em medicina, tendo que se ter sempre presente que, sendo muito importantes para orientação geral, nunca poderão substituir a discussão e decisão multidisciplinar.

Como referimos, foi já proposta e tem sido aceite a subdivisão do estágio intermédio, cuja utilidade podemos também verificar na nossa casuística. Mas o que de mais significativo encontramos e que não tinha ainda sido referido na literatura foi uma heterogeneidade importante também nos doentes em estágio avançado, sugerindo que se equacione também a sua subdivisão.

A conclusão mais importante que retiramos da análise da classificação BCLC dos nossos doentes é que haverá dois grupos principais no estágio C, distintos em função de um conjunto de variáveis, de que se desatacam, pelo seu significado estatístico, a PS, a ascite, a albuminemia e o número de nódulos. Propomos, por isso, que se considere um estágio C1, mais próximo do intermédio (Child Pugh A e PS 0 ou 1) e um estágio C2, mais próximo do terminal (Child Pugh B e PS 1 ou 2).

**9.** O papel do sorafenib no tratamento do CHC foi bem demonstrado no estudo SHARP e desde então tem sido indicado nos doentes no estágio avançado, nos que progrediram apesar de outras terapêuticas, ou nos que não têm possibilidade de efectuar tratamentos loco-regionais.

Na nossa experiência os resultados foram sobreponíveis aos da literatura, havendo, nos extremos, casos em que nenhuma resposta se observou e a sobrevivência foi muito curta e outros, mais raros, com resposta excepcionalmente boa. Os piores resultados obtiveram-se nos doentes da classe B de Child-Pugh, pelo que deixamos de os incluir nesta terapêutica. Não temos ainda experiência relevante na utilização do sorafenib em associação a outras terapêuticas, ou na sua falência, não havendo também evidência científica que permita considerar essas indicações na rotina clínica.

Concluimos que o sorafenib pode ser uma terapêutica útil em doentes do estágio C, defendendo que seja reservada para aqueles que se encontram na classe A de Child-Pugh; a resposta deve ser avaliada aos 3 meses por método imagiológico (preferencialmente RM com contraste), propondo-se a suspensão em caso de progressão da doença, ou se surgirem efeitos secundários não controláveis.

**10.** A sobrevivência dos nossos doentes esteve claramente relacionada com o estágio aquando do diagnóstico, sendo a probabilidade de sobrevivência global de 63,9% a 1 ano e de 42,3% aos 5 anos. Para os doentes no estágio A essa probabilidade era de 89,9% a 1 ano e de 65,2% aos 5 anos, mas para os estádios B, C e D a probabilidade a 1 ano era de, respectivamente, 86,3%, 43,4% e 33,3%. Estes resultados reforçam a importância de um diagnóstico e tratamento atempados.

Não encontramos qualquer diferença estatisticamente significativa quando comparámos a sobrevivência entre doentes com diferentes factores de risco ou etiologias, designadamente entre alcoólicos e não alcoólicos.

## **BIBLIOGRAFIA**



## BIBLIOGRAFIA

- Abelev GI, Perova SD, Khramkova NI, Postnikova ZA, Irlin IS. Production of embryonal alpha-globulin by transplantable mouse hepatoma. *Transplantation*. 1963;1:174-80
- Abelev GI. Production of embryonal serum alpha-globulin by hepatomas: review of experimental and clinical data. *Cancer Res*. 1968;28(7):1344-1350
- Abou-Alfa GK, Johnson P, Knox JJ, Capanu M, Davidenko I, Lacava J, *et al*. Doxorubicin plus sorafenib vs doxorubicin alone in patients with advanced hepatocellular carcinoma: a randomized trial. *JAMA* 2010;304:2154–2160
- Abou-Alfa GK, Schwartz L, Ricci S, Amadori D, Santoro A, Figer A, *et al*. Phase II study of sorafenib in patients with advanced hepatocellular carcinoma. *J Clin Oncol* 2006;24:4293–4300
- Abulkhair A, Limongelli P, Healey AJ, Damrah O, Tait P, Jackson J, *et al*. Preoperative portal vein embolization for major liver resection: a metaanalysis. *Ann Surg* 2008;247:49–57
- Adami HO, Hsing AW, McLaughlin JK, *et al*. Alcoholism and liver cirrhosis in the etiology of primary liver cancer. *Int J Cancer* 1992; 51, 898-902
- Amin J, Dore GJ, O’Connell DL, *et al* Cancer incidence in people with hepatitis B or C infection-A large community-based linkage study. *J Hepatology* 2006; 45, 197-203
- Apte UM, Banerjee A, McRee R, Wellberg E, Ramaiah SK Role of osteopontin in hepatic neutrophil infiltration during alcoholic steatohepatitis. *Toxicol Appl Pharmacol* 2005;207: 25–38
- Arii S, Tanaka S, Mitsunori Y, Nakamura N, Kudo A, Noguchi N, *et al*. Surgical strategies for hepatocellular carcinoma with special reference to anatomical hepatic resection and intraoperative contrast-enhanced ultrasonography *Oncology* 2010;78: 125–130
- Arii S, Yamaoka Y, Futagawa S, Inoue K, Kobayashi K, Kojiro M, *et al*. Results of surgical and nonsurgical treatment for small-sized hepatocellular carcinomas: a retrospective and nationwide survey in Japan. The Liver Cancer Study Group of Japan. *Hepatology* 2000;32:1224–1229
- Assfalg M, Bertini I, Colangiuli D, Luchinat C, Schäfer H, Schütz B, *et al*. Evidence of different metabolic phenotypes in humans. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2008; 105: 1420–4. [PMCID: PMC2234159] [PubMed: 18230739]
- Banerjee A, Apte UM, Smith R, Ramaiah SK Higher neutrophil infiltration mediated by osteopontin is a likely contributing factor to the increased susceptibility of females to alcoholic liver disease. *J Pathol* 2006; 208: 473–485

- Banerjee A, Lee JH, Ramaiah SK Interaction of osteopontin with neutrophil alpha(4)beta(1) and alpha(9)beta(1) integrins in a rodent model of alcoholic liver disease. *Toxicol Appl Pharmacol* 2008; 233: 238–246
- Barbare JC, Bouché O, Bonnetain F, Raoul JL, Rougier P, Abergel A, *et al.* Randomized controlled trial of tamoxifen in advanced hepatocellular carcinoma. *J Clin Oncol* 2005;23:4338–4346
- Bathen TF, Jensen LR, Sitter B, Fjosne HE, Halgunset J, Axelson DE, Gribbestad IS, Lundgren S MR-determined metabolic phenotype of breast cancer in prediction of lymphatic spread, grade, and hormone status. *Breast Cancer Res Treat* 2007; 104:181–189
- Beaugrand M, Sala M, Degos F, Sherman M, Bolondi L, Evans T, *et al.* Treatment of advanced hepatocellular carcinoma by seocalcitol: an international randomized double-blind placebo-controlled study in 747 patients. *J Hepatol* 2003;42:17A
- Beckonert O, Coen M, Keun HC, Wang Y, Ebbels TM, Holmes E, *et al.* High-resolution magic-angle-spinning NMR spectroscopy for metabolic profiling of intact tissues. *Nat Protoc.* 2010;5:1019–32. [PubMed: 20539278]
- Bekaii-Saab T, Markowitz J, Prescott N, Sadee W, Heerema N, Wei L, *et al.* A multi-institutional phase II study of the efficacy and tolerability of lapatinib in patients with advanced hepatocellular carcinomas. *Clin Cancer Res* 2009;15:5895–5901
- Belghiti J, Hiramatsu K, Benoist S, Massault P, Sauvanet A, Farges O. Seven hundred forty-seven hepatectomies in the 1990s: an update to evaluate the actual risk of liver resection. *J Am Coll Surg* 2000;191:38–46
- Belghiti J, Panis Y, Farges O, Benhamou JP, Fekete F. Intrahepatic recurrence after resection of hepatocellular carcinoma complicating cirrhosis. *Ann Surg* 1991;214:114–117
- Benjamin DI, Cravatt BF, Nomura DK. Global profiling strategies for mapping dysregulated metabolic pathways in cancer. *Cell Metab.* 2012;16:565–77. [PMCID: PMC3539740] [PubMed: 23063552]
- Ben-Josef E, Normolle D, Ensminger WD, Walker S, Tatro D, Ten Haken RK, *et al.* Phase II trial of high-dose conformal radiation therapy with concurrent hepatic artery floxuridine for unresectable intrahepatic malignancies. *J Clin Oncol* 2005;23:8739–8747
- Bentley R, "Secondary metabolite biosynthesis: the first century", *Crit. Rev. Biotechnol* 1999, 19 (1): 1–40
- Bergstrand CG, Czar B. Demonstration of a new protein fraction in serum from the human fetus. *Scand J Clin Lab Invest.* 1956;8(2):174

- Berrino F, De Angelis R, Sant M, et al; EUROCARE Working group. Survival for eight major cancers and all cancers combined for European adults diagnosed in 1995-99: results of the EUROCARE- 4 study. *Lancet Oncol* 2007;8(9):773–783
- Bessa SS, Elwan NM, Suliman GA. *et al.* Clinical significance of plasma osteopontin level in Egyptian patients with hepatitis C virus-related hepatocellular carcinoma. *Arch. Med. Res.* 2010, 41(7): 541-547
- Bismuth H, Chiche L, Adam R, Castaing D, Diamond T, Dennison A. Liver resection versus transplantation for hepatocellular carcinoma in cirrhosis. *Ann Surg* 1993;218:145–151
- Bismuth H, Majno PE, Adam R. Liver transplantation for hepatocellular carcinoma. *Semin Liver Dis* 1999;19:311–322
- Blachier M, Leleu H, Radosavljevic M, Valla C D, Roudot-Thoraval F. THE BURDEN OF LIVER DISEASE IN EUROPE A REVIEW OF AVAILABLE EPIDEMIOLOGICAL DATA. European Association for the Study of Liver Diseases, 2013
- Blumberg RS, Chopra S, Ibrahim R, *et al.* Primary hepatocellular carcinoma in idiopathic hemochromatosis: occurrence in non-cirrhotic patients. *Gastroenterology* 1988; 95, 1399-1402
- Bolondi L, Burroughs A, Dufour JF, Galle PL, Mazzaferro V, Piscaglia F, Raoul JL, Sangro B. Heterogeneity of Patients with Intermediate (BCLC B) Hepatocellular Carcinoma: Proposal for a Subclassification to Facilitate Treatment Decisions. *Semin Liver Dis* 2012;32:348–359
- Bolondi L, Gaiani S, Celli N, Golfieri R, Grigioni WF, Leoni S, *et al.* Characterization of small nodules in cirrhosis by assessment of vascularity: the problem of hypovascular hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2005;42:27–34
- Bolondi L. Screening for hepatocellular carcinoma in cirrhosis. *J Hepatol* 2003; 39:1076–1084.
- Borgan E, Sitter B, Lingjærde OC, Johnsen H, Lundgren S, Bathen TF, *et al.* Merging transcriptomics and metabolomics: Advances in breast cancer profiling. *BMC Cancer.* 2010;10:628. [PMCID: PMC2996395] [PubMed: 21080935]
- Bosch FX, Ribes J, Diaz M, Cleries R. Primary liver cancer: worldwide incidence and trends. *Gastroenterology* 2004;127:S5-S16
- Bosetti C, Boffetta P, Lucchini F, Negri E, La Vecchia C. Trends in mortality from hepatocellular carcinoma in Europe, 1980–2004. *Hepatology* 2008;48:137–145
- Boucher E, Corbinais S, Rolland Y, Bourguet P, Guyader D, Boudjema K, *et al.* Adjuvant intra-arterial injection of iodine-131-labeled lipiodol after resection of hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2003;38:1237–1241

- Bouza C, López-Cuadrado T, Alcázar R, Saz-Parkinson Z, Amate JM. Metaanalysis of percutaneous radiofrequency ablation versus ethanol injection in hepatocellular carcinoma. *BMC Gastroenterol* 2009;9:31
- Boyault S, Rickman DS, de Reyniès A, Balabaud C, Rebouissou S, Jeannot E, *et al.* Transcriptome classification of HCC is related to gene alterations and to new therapeutic targets. *Hepatology* 2007;45:42–52
- Breuhahn K, Longerich T, Schirmacher P. Dysregulation of growth factor signaling in human hepatocellular carcinoma. *Oncogene* 2006;25:3787–3800
- Brown DB, Gould JE, Gervais DA, Goldberg SN, Murthy R, Millward SF, *et al.* Society of Interventional Radiology Technology Assessment Committee and the International Working Group on Image-Guided Tumor Ablation. Imageguided tumor ablation: standardization of terminology and reporting criteria. *J Vasc Interv Radiol* 2009;20:S377–S390
- Browns Jr RS. Live donors in liver transplantation. *Gastroenterology* 2008;134:1802–1813
- Bruix J, Castells A, Bosch J, Feu F, Fuster J, Garcia-Pagan JC. Surgical resection of hepatocellular carcinoma in cirrhotic patients: prognostic value of preoperative portal pressure. *Gastroenterology* 1996;111:1018–1022
- Bruix J, Llovet JM, Castells A, Montana X, Bru C, Ayuso MC, *et al.* Transarterial embolization versus symptomatic treatment in patients with advanced hepatocellular carcinoma: results of a randomized, controlled trial in a single institution. *Hepatology* 1998;27:1578–1583
- Bruix J, Llovet JM. Prognostic prediction and treatment strategy in hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2002;35:519–524
- Bruix J, Sala M, Llovet JM. Chemoembolization for hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 2004;127:S179–S188
- Bruix J, Sherman M. Management of hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2005; 42: 1208-1236
- Brunello F, Veltri A, Carucci P, Pagano E, Ciccone G, Moretto P, *et al.* Radiofrequency ablation versus ethanol injection for early hepatocellular carcinoma: a randomized controlled trial. *Scand J Gastroenterol* 2008;43:727–735
- Buchmann I, Ganten TM, Haberkorn U. [18F]-FDG-PET in the diagnostics of gastrointestinal tumors. *Z Gastroenterol* 2008;46:367-375
- Bugianesi E. Non-alcoholic steatohepatitis and cancer. *Clin Liver Dis* 2007;11:191-207, x-xi

- Burrel M, Llovet JM, Ayuso C, Iglesias C, Sala M, Miquel R, *et al.* MRI angiography is superior to helical CT for detection of HCC prior to liver transplantation: an explant correlation. *Hepatology* 2003; 38:1034–1042
- Burrel M, Reig M, Forner A, Barrufet M, Rodríguez de Lope C, Tremosini S, *et al.* Survival of patients with hepatocellular carcinoma treated by transarterial chemoembolization (TACE) using DC beads. Implications for clinical practice and trial design. *J Hepatol*, 2012;56:1330–1335
- Cabibbo G, Enea M, Attanasio M, Bruix J, Craxì A, Cammà C. A meta-analysis of survival rates of untreated patients in randomized clinical trials of hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2010;51:1274–1283
- Calle EE, Rodriguez C, Walker-Thurmond K, Thun MJ. Overweight, obesity, and mortality from cancer in a prospectively studied cohort of U.S. adults. *N Engl J Med* 2003;348:1625-38
- Calvisi DF, Ladu S, Gorden A, Farina M, Conner EA, Lee JS, *et al.* Ubiquitous activation of Ras and Jak/Stat pathways in human HCC. *Gastroenterology* 2006;130:1117–1128
- Capurro M, Wanless IR, Sherman M, Deboer G, Shi W, Miyoshi E, *et al.* Glypican-3: a novel serum and histochemical marker for hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 2003;125:89–97
- Carr BI, Kanke F, Wise M, Satomura S. Clinical evaluation of lens culinaris agglutinin-reactive alpha-fetoprotein and des-gamma-carboxy prothrombin in histologically proven hepatocellular carcinoma in the United States. *Dig Dis Sci.* 2007;52(3):776-82
- Casado-Vela J, Cebrián A, Gómez del Pulgar MT, Lacal JC. Approaches for the study of cancer: Towards the integration of genomics, proteomics and metabolomics. *Clin Transl Oncol.* 2011;13:617–28. [PubMed: 21865133]
- Cavill R, Kamburov A, Ellis JK, Athersuch TJ, Blagrove MS, Herwig R, *et al.* Consensus-phenotype integration of transcriptomic and metabolomic data implies a role for metabolism in the chemosensitivity of tumour cells. *PLoS Comput Biol.* 2011;7:e1001113.[PMCID: PMC3068923] [PubMed: 21483477]
- Chang MH, You SL, Chen CJ, Liu CJ, Lee CM, Lin SM, *et al.* Taiwan Hepatoma Study Group. Decreased incidence of hepatocellular carcinoma in hepatitis B vaccinees: a 20-year follow-up study. *J Natl Cancer Inst* 2009;101: 1348–1355
- Chen CJ, Yang HI, Su J, Jen CL, You SL, Lu SN, *et al.* REVEAL-HBV Study Group. Risk of hepatocellular carcinoma across a biological gradient of serum hepatitis B virus DNA level. *JAMA* 2006;295:65–73

- Chen MS, Li JQ, Zheng Y, Guo RP, Liang HH, Zhang YQ, *et al.* A prospective randomized trial comparing percutaneous local ablative therapy and partial hepatectomy for small hepatocellular carcinoma. *Ann Surg* 2006;243:321–328
- Cheng A, Kang Y, Lin D, Park J, Kudo M, Qin S, *et al.* Phase III trial of sunitinib (Su) versus sorafenib (So) in advanced hepatocellular carcinoma (HCC). *J Clin Oncol* 2011;29. Abstract 4000
- Cheng AL, Kang YK, Chen Z, Tsao CJ, Qin S, Kim JS, *et al.* Efficacy and safety of sorafenib in patients in the Asia-Pacific region with advanced hepatocellular carcinoma: a phase III randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet Oncol* 2009;10:25–34
- Cheng JC, Wu JK, Huang CM, Huang DY, Cheng SH, Lin YM, *et al.* Radiation-induced liver disease after radiotherapy for hepatocellular carcinoma: clinical manifestation and dosimetric description. *Radiother Oncol* 2002;63:41–45
- Cheng, JiWen PhD; Wang, WanLi MM; Sun, CaiHong MAS; Li, MuXing MM; Wang, Bo; Lv, Yi. Meta-Analysis of the Prognostic and Diagnostic Significance of Serum/Plasma Osteopontin in Hepatocellular Carcinoma. *Journal of Clinical Gastroenterology* doi: 10.1097/MCG.000000000000018
- Chevret S, Trinchet JC, Mathieu D, Rached AA, Beaugrand M, Chastang C. A new prognostic classification for predicting survival in patients with hepatocellular carcinoma. *Groupe d'Etude et de Traitement du Carcinome Hépatocellulaire. J Hepatol* 1999;31:133–141
- Chiang DY, Villanueva A, Hoshida Y, Peix J, Newell P, Minguez B, *et al.* Focal gains of VEGFA and molecular classification of hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* 2008;68:6779–6788
- Cho YK, Kim JK, Kim MY, Rhim H, Han JK. Systematic review of randomized trials for hepatocellular carcinoma treated with percutaneous ablation therapies. *Hepatology* 2009;49:453–459
- Chow PK, Tai BC, Tan CK, Machin D, Win KM, Johnson PJ, *et al.* Asian-Pacific Hepatocellular Carcinoma Trials Group. High-dose tamoxifen in the treatment of inoperable hepatocellular carcinoma: a multicenter randomized controlled trial. *Hepatology* 2002;36:1221–1226
- Chuang SC, La Vecchia C, Boffetta P. Liver cancer: Descriptive epidemiology and risk factors other than HBV and HCV infection. *Cancer Letters* 2009; 286, 9-14
- Chuan-Hai Zhang, Ge-Liang Xu, Wei-Dong Jia, Yong-Sheng Ge, Jian-Sheng Li, Jin-Liang Ma, Wei-Hua Ren. Prognostic significance of osteopontin in hepatocellular carcinoma: a meta-analysis. *Int. J. Cancer*: 2012;130, 2685–2692

- Chuma M, Sakamoto M, Yamazaki K, Ohta T, Ohki M, Asaka M, *et al.* Expression profiling in multistage hepatocarcinogenesis: identification of HSP70 as a molecular marker of early hepato-cellular carcinoma. *Hepatology*. 2003;37(1):198-207
- Cláudia M. Rocha, António S. Barros, Ana M. Gil, Brian J. Goodfellow, Eberhard Humpfer, Manfred Spraul, Isabel M. Carreira, Joana B. Melo, João Bernardo, Ana Gomes, Vitor Sousa, Lina Carvalho, and Iola F. Duarte. Metabolic Profiling of Human Lung Cancer Tissue by <sup>1</sup>H High Resolution Magic Angle Spinning (HRMAS) NMR Spectroscopy. *Journal of Proteome Research* 2010; 9, 319–332
- Clavien PA, Lesurtel M, Bossuyt PM, Gores GJ, Langer B, Perrier A, *et al.* Recommendations for liver transplantation for hepatocellular carcinoma: an international consensus conference report. *Lancet Oncol* 2012;13:e11–e22
- Clavien PA, Petrowsky H, DeOliveira ML, Graf R. Strategies for safer liver surgery and partial liver transplantation. *N Engl J Med* 2007;356:1545–1559
- Colli A, Fraquelli M, Casazza G, Massironi S, Colucci A, Conte D, *et al.* Accuracy of ultrasonography, spiral CT, magnetic resonance, and alphafetoprotein in diagnosing hepatocellular carcinoma: a systematic review. *Am J Gastroenterol* 2006;101: 513–523
- Colnot S, Decaens T, Niwa-Kawakita M, Godard C, Hamard G, Kahn A, *et al.* Liver-targeted disruption of Apc in mice activates beta-catenin signaling and leads to hepatocellular carcinomas. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101:17216–17221
- Colombat M, Paradis V, Bièche I, Dargère D, Laurendeau I, Belghiti J, *et al.* Quantitative RT-PCR in cirrhotic nodules reveals gene expression changes associated with liver carcinogenesis. *J Pathol* 2003;201:260–267
- Colombo M: Screening. *Hepatology Research* 2007, 37(Suppl 2):S146-S15
- Corrao G, Bagnardi V, Zambon A, *et al.* A meta-analysis of alcohol consumption and the risk of 15 diseases. *Prev Med* 2004; 38, 613-619
- Croce MV, Isla-Larrain MT, Demichelis SO, Gori JR, Price MR, Segal Eiras A. Tissue and serum MUC1 mucin detection in breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat.* 2003;81(3):195-207
- Crockford DJ, Maher AD, Ahmadi KR, *et al.* "1H NMR and UPLC-MS (E) statistical heterospectroscopy: characterization of drug metabolites (xenometabolome) in epidemiological studies", *Anal. Chem* 2008, 80 (18): 6835–6844.
- Cronin 2nd DC, Millis JM. Living donor liver transplantation: the ethics and the practice. *Hepatology* 2008;47:11–13
- Croome KP, Yamashita MH. Laparoscopic vs open hepatic resection for benign and malignant tumors: an updated meta-analysis. *Arch Surg* 2010;145:1109–1118

- Cucchetti A, Piscaglia F, Caturelli E, Benvegnù L, Vivarelli M, Ercolani G, *et al.* Comparison of recurrence of hepatocellular carcinoma after resection in patients with cirrhosis to its occurrence in a surveilled cirrhotic population. *Ann Surg Oncol* 2009; 16:413–422
- D’Amico G, Garcia-Tsao G, Pagliaro L. Natural history and prognostic indicators of survival in cirrhosis: a systematic review of 118 studies. *J Hepatol* 2006;44:217–231
- Daniele G, Cost N, Lorusso V, Costa-Maia J, Pache I, Pirisi M. Methodological assessment of HCC literature. *Ann Oncol* 2013; 24 (Suppl 2): ii6-ii14.
- Dang CV, Kim JW, Gao P, Yustein J. The interplay between MYC and HIF in cancer. *Nat Rev Cancer*. 2008;8:51–6.[PubMed: 18046334]
- Dang CV. Rethinking the Warburg effect with Myc micromanaging glutamine metabolism. *Cancer Res*. 2010;70:859–62.[PMCID: PMC2818441] [PubMed: 20086171]
- De La Coste A, Romagnolo B, Billuart P, Renard CA, Buendia MA, Soubrane O, *et al.* Somatic mutations of the beta-catenin gene are frequent in mouse and human hepatocellular carcinomas. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:8847–8851
- De Minicis S, Seki E, Uchinami H, Kluwe J, Zhang Y, *et al.* Gene expression profiles during hepatic stellate cell activation in culture and in vivo. *Gastroenterology* 2007; 132: 1937–1946
- DeBerardinis RJ, Mancuso A, Daikhin E, Nissim I, Yudkoff M, Wehrli S, *et al.* Beyond aerobic glycolysis: Transformed cells can engage in glutamine metabolism that exceeds the requirement for protein and nucleotide synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*.2007; 104: 19345–50. [PMCID: PMC2148292] [PubMed: 18032601]
- Debruyne EN, Delanghe JR. Diagnosing and monitoring hepatocellular carcinoma with alpha-fetoprotein: new aspects and applications. *Clin Chim Acta*. 2008;395(1-2):19-26
- Decaens T, Luciani A, Itti E, Hulin A, Hurtova M, Laurent A, *et al.* Pilot study of sirolimus in cirrhotic patients with advanced hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 2008;48:S13
- Decaens T, Roudot-Thoraval F, Bresson-Hadni S, Meyer C, Gugenheim J, Durand F, *et al.* Impact of pretransplantation transarterial chemoembolization on survival and recurrence after liver transplantation for hepatocellular carcinoma. *Liver Transpl* 2005;11:767–775
- Di Bisceglie AM, Shiffman ML, Everson GT, *et al.* Prolonged therapy of advanced chronic hepatitis C with low-dose peginterferon. *N Engl J Med* 2008;359: 2429-41
- Di Tommaso L, Destro A, Seok JY, Balladore E, Terracciano L, Sangiovanni A, *et al.* The application of markers (HSP70 GPC3 and GS) in liver biopsies is useful for detection of hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 2009;50:746–754

- Di Tommaso L, Franchi G, Park YN, Fiamengo B, Destro A, Morengi E, *et al.* Diagnostic value of HSP70, glypican 3, and glutamine synthetase in hepatocellular nodules in cirrhosis. *Hepatology* 2007; 45: 725–734.
- Diao H, Kon S, Iwabuchi K, Kimura C, Morimoto J, *et al.* Osteopontin as a mediator of NKT cell function in T cell-mediated liver diseases. *Immunity* 2004; 21: 539–550
- Donato F, Gelatti U, Limina RM, *et al.* Southern Europe as an example of interaction between various environmental factors: a systematic review of the epidemiologic evidence. *Oncogene* 2006; 25, 3756-3770
- Donato F, Tagger A, Gelatti U, *et al.* Alcohol and hepatocellular carcinoma: the effect of lifetime intake and hepatitis virus infections in men and women. *Am J Epidemiol* 2002;155:323-331
- Duarte IF, Gil AM. Metabolic signatures of cancer unveiled by NMR spectroscopy of human biofluids. *Prog Nucl Magn Reson Spectrosc.* 2012;62:51–74. [PubMed: 22364616]
- Duarte IF, Rocha CM, Barros AS, Gil AM, Goodfellow BJ, Carreira IM, Bernardo J, Gomes A, Sousa V, Carvalho L. Can nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy reveal different metabolic signatures for lung tumours? *Virchows Archiv* 2010;457:715-725
- Dufour JF, Hoppe H, Heim MH, Helbling B, Maurhofer O, Szucs-Farkas Z, *et al.* Continuous administration of sorafenib in combination with transarterial chemoembolization in patients with hepatocellular carcinoma: results of a phase I study. *Oncologist* 2010;15:1198–1220
- Durnez A, Verslype C, Nevens F, Fevery J, Aerts R, Pirenne J, *et al.* The clinicopathological and prognostic relevance of cytokeratin 7 and 19 expression in hepatocellular carcinoma. A possible progenitor cell origin. *Histopathology* 2006;49: 138– 151
- EASL-EORTC Clinical Practice Guidelines: Management of hepatocellular carcinoma. *Journal of Hepatology* 2012; 56:908-943
- Edeline J, Raoul JL, Vauleon E, Guillygomac’h A, Boudjema K, Boucher E. Systemic chemotherapy for hepatocellular carcinoma in non-cirrhotic liver: a retrospective study. *World J Gastroenterol* 2009;15:713–716
- Edge SB, Byrd DR, Compton CC, Fritz AG, Greene FL, Trotti A, editors. *AJCC Cancer Staging Handbook*. 7th ed. New York: Springer; 2010
- Elmberg M, Hultcrantz R, Ekblom A, *et al.* Cancer risk in patients with hereditary hemochromatosis and in their first-degree relatives. *Gastroenterology* 2003; 125, 1733-41

- El-Serag HB, Hampel H, Javadi F. The association between diabetes and hepatocellular carcinoma: a systematic review of epidemiologic evidence. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2006;4:369-380
- El-Serag HB, Mason AC. Rising incidence of hepatocellular carcinoma in the United States. *N Engl J Med* 1999; 340:745–750
- El-Serag HB, Rudolph KL. Hepatocellular carcinoma: epidemiology and molecular carcinogenesis. *Gastroenterology* 2007;132:2557–2576
- El-Serag HB, Rudolph KL. Hepatocellular carcinoma: epidemiology and molecular carcinogenesis. *Gastroenterology* 2007;132:2557–2576
- El-Serag HB, Tran T, Everhart JE. Diabetes increases the risk of chronic liver disease and hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 2004;126:460-468
- Elstrom RL, Bauer DE, Buzzai M, Karnauskas R, Harris MH, Plas DR, *et al.* Akt stimulates aerobic glycolysis in cancer cells. *Cancer Res.* 2004; 64: 3892–9. [PubMed: 15172999]
- ELTR – European Liver Transplant Registry. <[www.eltr.org/](http://www.eltr.org/)>; 2011
- Erb G, Elbayed K, Piotto M, Raya J, Neuville A, Mohr M, Maitrot D, Kehrl P, Namer IJ Toward improved grading of malignancy in oligodendrogliomas using metabolomics. *MagnReson Med* 2008; 59:959–965
- Faivre S, Raymond E, Boucher E, Douillard J, Lim HY, Kim JS, *et al.* Safety and efficacy of sunitinib in patients with advanced hepatocellular carcinoma: an open-label, multicentre, phase II study. *Lancet Oncol* 2009;10:794–800
- Farazi PA, DePinho RA. Hepatocellular carcinoma pathogenesis: from genes to environment. *Nat Rev Cancer* 2006;6:674–687
- Farges O, Belghiti J, Kianmanesh R, Regimbeau JM, Santoro R, Vilgrain V, *et al.* Portal vein embolization before right hepatectomy: prospective clinical trial. *Ann Surg* 2003;237:208–217
- Fattovich G, Llovet JM. Risk factors for hepatocellular carcinoma in HCV-cirrhosis: What we know and what is missing. *J Hepatol* 2006;44:1013-1016
- Fattovich G, Stroffolini T, Zagni I, Donato F. Hepatocellular carcinoma in cirrhosis: incidence and risk factors. *Gastroenterology* 2004;127:S35-50
- Fiehn O, Kopka J, Dormann P, Altmann T, Trethewey R.N, Willmitzer L. Metaboliteprofiling for plant functional genomics, *Nat. Biotechnol.* 2000; 18 1157–1161
- Filmus J, Capurro M. The role of glypican-3 in the regulation of body size and cancer. *Cell Cycle.* 2008;7(18):2787-90

- Filmus J, Selleck SB. Glypicans: proteoglycans with a surprise. *J Clin Invest.* 2001;108(4):497-501
- Fisher RA, Kulik LM, Freise CE, Lok AS, Shearon TH, Brown Jr RS, *et al.* A2ALL Study Group. Hepatocellular carcinoma recurrence and death following living and deceased donor liver transplantation. *Am J Transplant* 2007;7:1601–1608
- Flaherty KT, Puzanov I, Kim KB, Ribas A, McArthur GA, Sosman JA, *et al.* Inhibition of mutated, activated BRAF in metastatic melanoma. *N Engl J Med* 2010;363:809–819
- Forner A, Reig M, Bruix J. Alpha-fetoprotein for hepatocellular carcinoma diagnosis: the demise of a brilliant star. *Gastroenterology.* 2009;137(1):26-9
- Forner A, Vilana R, Ayuso C, Bianchi L, Solé M, Ayuso JR, *et al.* Diagnosis of hepatic nodules 20 mm or smaller in cirrhosis: prospective validation of the noninvasive diagnostic criteria for hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2008;47:97–104
- Freeman Jr RB, Wiesner RH, Harper A, McDiarmid SV, Lake J, Edwards E, *et al.* UNOS/OPTN Liver Disease Severity Score, UNOS/OPTN Liver and Intestine, and UNOS/OPTN Pediatric Transplantation Committees. The new liver allocation system: moving toward evidence-based transplantation policy. *Liver Transpl* 2002;8:851–858
- Fujikawa T, Shiraha H, Ueda N, Takaoka N, Nakanishi Y, Matsuo N, *et al.* Des-gamma-carboxyl prothrombin-promoted vascular endothelial cell proliferation and migration. *J Biol Chem.* 2007;282(12):8741-8
- Gad A, Tanaka E, Matsumoto A, Wahab MA, Serwah Ael H, Attia F, *et al.* Assessment of KL-6 as a tumor marker in patients with hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol.* 2005;11(42):6607- 12
- Gambarin-Gelwan M, Wolf DC, Shapiro R, Schwartz ME, Min AD. Sensitivity of commonly available screening tests in detecting hepatocellular carcinoma in cirrhotic patients undergoing liver transplantation. *Am J Gastroenterol.* 2000;95(6):1535-8
- Gandini S, Botteri E, Iodice S, *et al.* Tobacco smoking and cancer: A Meta analysis. *Int J Cancer* 2008; 122, 155-164
- Gao B, Bataller R Alcoholic liver disease: pathogenesis and new therapeutic targets. *Gastroenterology* 2011; 141: 1572–1585
- Gao P, Tchernyshyov I, Chang TC, Lee YS, Kita K, Ochi T, *et al.* c-Myc suppression of miR-23a/b enhances mitochondrial glutaminase expression and glutamine metabolism. *Nature.* 2009;458:762–5. [PMCID: PMC2729443] [PubMed: 19219026]
- Germani G, Gurusamy K, Garcovich M, Toso C, Fede G, Hemming A, *et al.* Which matters most: number of tumors, size of the largest tumor, or total tumor volume? *Liver Transpl* 2011;17:S58–S66

- Germani G, Pleguezuelo M, Gurusamy K, Meyer T, Isgro G, Burroughs AK. Clinical outcomes of radiofrequency ablation, percutaneous alcohol and acetic acid injection for hepatocellular carcinoma: a meta-analysis. *J Hepatol* 2010;52:380–388
- Ghobrial RM, Freise CE, Trotter JF, Tong L, Ojo AO, Fair JH, *et al.* A2ALL Study Group. Donor morbidity after living donation for liver transplantation. *Gastroenterology* 2008;135:468–476
- Gish RG, Porta C, Lazar L, Ruff P, Feld R, Croitoru A, *et al.* Phase III randomized controlled trial comparing the survival of patients with unresectable hepatocellular carcinoma treated with nolatrexed or doxorubicin. *J Clin Oncol* 2007;25:3069–3075
- Gish RG, Porta C, Lazar L, Ruff P, Feld R, Croitoru A, *et al.* Phase III randomized controlled trial comparing the survival of patients with unresectable hepatocellular carcinoma treated with nolatrexed or doxorubicin. *J Clin Oncol* 2007;25:3069–3075
- Gomaa AI, Khan SA, Toledano MB *et al.* Hepatocellular carcinoma: Epidemiology, risk factors and pathogenesis. *World J Gastroenterol* 2008;14:4300-4308
- Greten TF, Manns MP, Korangy F. Immunotherapy of HCC. *Rev Recent Clin Trials* 2008;3:31–39
- Greten TF, Manns MP, Korangy F. Immunotherapy of hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 2006;45:868–878
- Grimaldi C, Bleiberg H, Gay F, Messner M, Rougier P, Kok TC. Evaluation of antiandrogen therapy in unresectable hepatocellular carcinoma: results of a European Organization for Research and Treatment of Cancer multicentric double-blind trial. *J Clin Oncol* 1998;16:411–417
- Group d'Etude et de Traitement du Carcinome Hépatocellulaire. A comparison of lipiodol chemoembolization and conservative treatment for unresectable hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med* 1995;332: 1256–1261
- Guo Y, Zhang Y, Klein R, Nijm GM, Sahakian AV, Omary RA, *et al.* Irreversible electroporation therapy in the liver: longitudinal efficacy studies in a rat model of hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* 2010;70:1555–1563
- Hagiwara S, Kudo M, Kawasaki T, Nagashima M, Minami Y, Chung H, *et al.* Prognostic factors for portal venous invasion in patients with hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol.* 2006;41(12):1214-9
- Hassan MM, Spitz MR, Thomas MB, *et al.* Effect of different types of smoking and synergism with Hepatitis C virus on risk of hepatocellular carcinoma in American men and women: Case-control study. *Int J Cancer* 2008; 123, 1883-1891
- He YX, Guo QY. Clinical applications and advances of positron emission tomography with fluorine-18-fluorodeoxyglucose (18F-FDG) in the diagnosis of liver neoplasms. *Postgrad Med J* 2008;84:246-251

- Hilgard P, Hamami M, Fouly AE, Scherag A, Müller S, Ertle J, *et al.* Radioembolization with yttrium-90 glass microspheres in hepatocellular carcinoma: European experience on safety and long-term survival. *Hepatology* 2010;52:1741–1749
- Hollebecque A, Cattan S, Romano O, Sergent G, Mourad A, Louvet A, *et al.* Safety and efficacy of sorafenib in hepatocellular carcinoma: the impact of the Child–Pugh score. *Aliment Pharmacol Ther* 2011;34:1193–1201
- Huang J, Yan L, Cheng Z, Wu H, Du L, Wang J, *et al.* A randomized trial comparing radiofrequency ablation and surgical resection for HCC conforming to the Milan criteria. *Ann Surg* 2010;252:903–912
- Huang W, Zhu G, Huang M, Lou G, Liu Y, *et al.* Plasma osteopontin concentration correlates with the severity of hepatic fibrosis and inflammation in HCV-infected subjects. *Clin Chim Acta* 2010;411: 675–678
- Hummel J, Selbig J, Walther D, Kopka J. The Golm Metabolome Database: a database for GC-MS based metabolite profiling. In: Nielsen J, Jewett M, editors. *Metabolomics*. 1 ed. Leipzig Germany: Springer Berlin Heidelberg; 2007. pp. 75–95
- Huo TI, Huang YH, Wu JC, Lee PC, Chang FY, Lee SD, *et al.* Comparison of percutaneous acetic acid injection and percutaneous ethanol injection for hepatocellular carcinoma in cirrhotic patients: a prospective study. *Scand J Gastroenterol* 2003;38:770–778
- Hussein MM, Ibrahim AA, Abdella HM, Montasser IF, Hassan MI. Evaluation of serum squamous cell carcinoma antigen as a novel biomarker for diagnosis of hepatocellular carcinoma in Egyptian patients. *Indian J Cancer*. 2008;45(4):167-172
- IARC. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans, Volume 44, Alcohol drinking. 1988. Lyon: IARC Press
- Iftikhar R, Kladney RD, Havlioglu N, Schmitt-Graff A, Gusmirovic I, Solomon H, *et al.* Disease- and cell-specific expression of GP73 in human liver disease. *Am J Gastroenterol*. 2004;99(6):1087-95
- Ikai I, Aii S, Kojiro M, Ichida T, Makuuchi M, Matsuyama Y, *et al.* Reevaluation of prognostic factors for survival after liver resection in patients with hepatocellular carcinoma in a Japanese nationwide survey. *Cancer* 2004;101:796–802
- Ikoma J, Kaito M, Ishihara T, Nakagawa N, Kamei A, Fujita N, *et al.* Early diagnosis of hepatocellular carcinoma using a sensitive assay for serum des-gamma-carboxy prothrombin: a prospective study. *Hepato gastroenterology*. 2002;49(43):235-8
- Imamura H, Matsuyama Y, Tanaka E, Ohkubo T, Hasegawa K, Miyagawa S, *et al.* Risk factors contributing to early and late phase intrahepatic recurrence of hepatocellular carcinoma after hepatectomy. *J Hepatol* 2003;38:200–207

- Imamura J, Tateishi R, Shiina S, Goto E, Sato T, Ohki T, *et al.* Neoplastic seeding after radiofrequency ablation for hepatocellular carcinoma. *Am J Gastroenterol* 2008;103:3057–3062
- International Consensus Group for Hepatocellular Neoplasia. Pathologic diagnosis of early hepatocellular carcinoma: a report of the international consensus group for hepatocellular neoplasia. *Hepatology* 2009;49:658–664
- Iola F. Duarte & Cláudia M. Rocha & António S. Barros & Ana M. Gil & Brian J. Goodfellow & Isabel M. Carreira & João Bernardo & Ana Gomes & Vitor Sousa & Lina Carvalho. Can nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy reveal different metabolic signatures for lung tumours? *Virchows Arch* 2010; 457, 6, 715-725
- Isaacs JS, Jung YJ, Mole DR, Lee S, Torres-Cabala C, Chung YL, *et al.* HIF overexpression correlates with biallelic loss of fumarate hydratase in renal cancer: Novel role of fumarate in regulation of HIF stability. *Cancer Cell*. 2005;8:143–53. [PubMed: 16098467]
- Ishizawa T, Hasegawa K, Aoki T, Takahashi M, Inoue Y, Sano K, *et al.* Neither multiple tumors nor portal hypertension are surgical contraindications for hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 2008;134:1908–1916
- Ito Y, Takeda T, Sakon M, Tsujimoto M, Higashiyama S, Noda K, *et al.* Expression and clinical significance of erb-B receptor family in hepatocellular carcinoma. *Br J Cancer* 2001;84:1377–1383
- Ivanovska I, Zhang C, Liu AM, Wong KF, Lee NP, Lewis P, *et al.* Gene signatures derived from a c-MET-driven liver cancer mouse model predict survival of patients with hepatocellular carcinoma. *PLoS One*. 2011;6(9):e24582
- Iwatsuki S, Esquivel CO, Gordon RD, Shaw Jr BW, Starzl TE, Shade RR, *et al.* Liver transplantation for fulminant hepatic failure. *Semin Liver Dis* 1985;5:325–328.
- Iwatsuki S, Starzl TE, Sheahan DG, Yokoyama I, Demetris AJ, Todo S, *et al.* Hepatic resection versus transplantation for hepatocellular carcinoma. *Ann Surg* 1991;214:221–228
- Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 2011;61:69–90
- Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Murray T, *et al.* Cancer statistics, 2008. *CA Cancer J Clin* 2008;58:71–96
- Jiang P, Du W, Wang X, Mancuso A, Gao X, Wu M, *et al.* p53 regulates biosynthesis through direct inactivation of glucose-6-phosphate dehydrogenase. *Nat Cell Biol*. 2011;13:310–6. [PMCID: PMC3110666] [PubMed: 21336310]

- Jonas S, Bechstein WO, Steinmüller T, Herrmann M, Radke C, Berg T, *et al.* Vascular invasion and histopathologic grading determine outcome after liver transplantation for hepatocellular carcinoma in cirrhosis. *Hepatology* 2001;33:1080–1086
- Kamath PS, Wiesner RH, Malinchoc M, Kremers W, Therneau TM, Kosberg CL, *et al.* A model to predict survival in patients with end-stage liver disease. *Hepatology* 2001;33:464–470
- Kathleen A. Vermeersch, Mark P. Styczynski *J Carcinog.*2013; 12: 9.Published online 2013 June 18. doi: [10.4103/1477-3163.113622](https://doi.org/10.4103/1477-3163.113622)
- Kawashima R, Mochida S, Matsui A, YouLuTu ZY, Ishikawa K, *et al.* Expression of osteopontin in Kupffer cells and hepatic macrophages and Stellate cells in rat liver after carbon tetrachloride intoxication: a possible factor for macrophage migration into hepatic necrotic areas. *Biochem Biophys Res Commun* 1999;256: 527–531
- Kew MC. Hepatic iron overload and hepatocellular carcinoma. *Cancer Letters* 2009; 286, 38-43
- Khalil A, Elgedawy J, Faramawi MF, Elfert A, Salama I, Abbass A, Elsaid H, Elsebaai H. Plasma osteopontin level as a diagnostic marker of hepatocellular carcinoma in patients with radiological evidence of focal hepatic lesions. *Tumori* 2013; 99(1):100-107
- Khan KN, Yatsushashi H, Yamasaki K, Yamasaki M, Inoue O, Koga M, *et al.* Prospective analysis of risk factors for early intrahepatic recurrence of hepatocellular carcinoma following ethanol injection. *J Hepatol* 2000;32:269–278
- Kiefer FW, Neschen S, Pfau B, Legerer B, Neuhofer A, *et al.* Osteopontin deficiency protects against obesity-induced hepatic steatosis and attenuates glucose production in mice. *Diabetologia* 2011; 54: 2132–2142
- Kiefer FW, Zeyda M, Gollinger K, Pfau B, Neuhofer A, *et al.* Neutralization of osteopontin inhibits obesity-induced inflammation and insulin resistance. *Diabetes* 2010; 59: 935–946
- Kim CK, Lim JH, Lee WJ. Detection of hepatocellular carcinomas and dysplastic nodules in cirrhotic liver: accuracy of ultrasonography in transplant patients. *J Ultrasound Med* 2001;20:99–104
- Kim H, Choi GH, Na DC, Ahn EY, Kim GI, Lee JE, *et al.* Human hepatocellular carcinomas with “Stemness”-related marker expression: keratin 19 expression and a poor prognosis. *Hepatology* 2011;54:1707–1717
- Kim J, Ki SS, Lee SD, Han CJ, Kim YC, Park SH, *et al.* Elevated Plasma Osteopontin Levels in Patients with Hepatocellular Carcinoma. *Am J Gastroenterol* 2006;101:2051–2059
- Kim JE, Ryoo BY, Ryu MH, Chang HM, Suh DJ, Lee HC, *et al.* Sorafenib for hepatocellular carcinoma according to Child–Pugh class of liver function. *Cancer Chemother Pharmacol* 2011;68:1285–1290

- Kim Y S, Maruvada P and Milner J .A: Metabolomics in biomarker discovery:future uses for cancer prevention. *Future Oncology* 2008; 4 (1):93-102
- Kim YK, Lee KW, Cho SY, Han SS, Kim SH, Kim SK, Park SJ. Usefulness 18F-FDG positron emission tomography/computed tomography for detecting recurrence of hepatocellular carcinoma in posttransplant patients. *Liver Transpl* 2010; 16:767-772.
- Kind T, Fiehn O. Seven Golden Rules for heuristic filtering of molecular formulas obtained by accurate mass spectrometry. *BMC Bioinformatics*. 2007;8:105. [PMCID: PMC1851972] [PubMed: 17389044]
- Kitai S, Kudo M, Minami Y, Haji S, Osaki Y, Oka H, *et al*. Validation of a new prognostic staging system for hepatocellular carcinoma: a comparison of the biomarker-combined Japan Integrated Staging Score, the conventional Japan Integrated Staging Score and the BALAD Score. *Oncology* 2008;75:S83–S90
- Kladney RD, Cui X, Bulla GA, Brunt EM, Fimmel CJ. Expression of GP73, a resident Golgi membrane protein, in viral and nonviral liver disease. *Hepatology*. 2002;35(6):1431-40
- Koeberle D, Montemurro M, Samaras P, Majno P, Simcock M, Limacher A, *et al*. Continuous sunitinib treatment in patients with advanced hepatocellular carcinoma: a Swiss Group for Clinical Cancer Research (SAKK) and Swiss Association for the Study of the Liver (SASL) multicenter phase II trial (SAKK 77/06). *Oncologist* 2010;15:285–292
- Kokudo N, Makuuchi M. Evidence-based clinical practice guidelines for hepatocellular carcinoma in Japan: the J-HCC guidelines. *J Gastroenterol*. 2009;44(Suppl 19):119-21
- Komorizono Y, Oketani M, Sako K, Yamasaki N, Shibatou T, Maeda M, *et al*. Risk factors for local recurrence of small hepatocellular carcinoma tumors after a single session, single application of percutaneous radiofrequency ablation. *Cancer* 2003;97:1253–1262
- Kon S, Ikesue M, Kimura C, Aoki M, Nakayama Y, *et al*. Syndecan-4 protects against osteopontin-mediated acute hepatic injury by masking functional domains of osteopontin. *J Exp Med* 2008; 205: 25–33
- Kornberg A, Küpper B, ThrumK, Katenkamp K, Steenbeck J, Sappeler A, *et al*. Increased 18F-FDG uptake of hepatocellular carcinoma on positron emission tomography independently predicts tumor recurrence in liver transplant patients. *Transplant Proc* 2009;41:2561-2563
- Koteish A, Thuluvath PJ. Screening for hepatocellular carcinoma. *J Vasc Interv Radiol*. 2002;13(9 Pt 2):S185-90
- Kowdley KV. Iron, hemochromatosis, and hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 2004; 127, S79-86

- Kuang M, Lu MD, Xie XY, Xu HX, Xu ZF, Liu GJ, *et al.* Percutaneous ethanol ablation of early-stage hepatocellular carcinoma by using a multi-pronged needle with single treatment session and high-dose ethanol injection. *Radiology* 2009;253:552–561
- Kudo M. Review of 4th Single Topic Conference on HCC. Hepatocellular carcinoma: international consensus and controversies. *Hepatol Res* 2007;37: S83–S87
- Kuker RA, Mesoloras G, Gulec SA. Optimization of FDG-PET/CT imaging protocol for evaluation of patients with primary and metastatic liver disease. *Int Semin Surg Oncol* 2007;10:4-117
- Kulik L, Abecassis M. Living donor liver transplantation for hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 2004;127:S277–S282
- Kulik LM, Carr BI, Mulcahy MF, Lewandowski RJ, Atassi B, Ryu RK, *et al.* Safety and efficacy of 90Y radiotherapy for hepatocellular carcinoma with and without portal vein thrombosis. *Hepatology* 2008;47:71–81
- Kulik ML. Advancements in hepatocellular carcinoma. *Curr Opin Gastroenterol* 2007; 23:268-274
- Lambrecht M, Haustermans K. Clinical evidence on PET-CT for radiation therapy planning in gastro-intestinal tumors. *Radiother Oncol* 2010;96:339-346
- Lammer J, Malagari K, Vogl T, Pilleul F, Denys A, Watkinson A, *et al.* Prospective randomised study of doxorubicin-eluting-bead embolization in the treatment of hepatocellular carcinoma: results of the PRECISION V study. *Cardiovasc Intervent Radiol* 2010;33: 41–52
- Lang H, Sotiropoulos GC, Dömland M, Frühauf NR, Paul A, Hüsing J, *et al.* Liver resection for hepatocellular carcinoma in non-cirrhotic liver without underlying viral hepatitis. *Br J Surg* 2005;92:198–202
- Lau WY, Leung TW, Ho SK, Chan M, Machin D, Lau J, *et al.* Adjuvant intraarterial iodine-131-labelled lipiodol for resectable hepatocellular carcinoma: a prospective randomised trial. *Lancet* 1999;353:797–801
- Lee SH, Seo GS, Park YN, Yoo TM, Sohn DH Effects and regulation of osteopontin in rat hepatic stellate cells. *Biochem Pharmacol* 2004; 68: 2367–2378
- Lee YC, Cohet C, Yang YC, *et al.* Meta-analysis of epidemiologic studies on cigarette smoking and liver cancer. *Int J Epidemiol* 2009; 38, 1497-1511
- Lencioni R, Allgaier HP, Cioni D, Olschewski M, Deibert P, Crocetti L, *et al.* Small hepatocellular carcinoma in cirrhosis: randomized comparison of radio-frequency thermal ablation versus percutaneous ethanol injection. *Radiology* 2003;228:235–240

- Lencioni R, Bartolozzi C, Caramella D, Paolicchi A, Carrai M, Maltinti G, *et al.* Treatment of small hepatocellular carcinoma with percutaneous ethanol injection. Analysis of prognostic factors in 105 Western patients. *Cancer* 1995;76:1737–1746
- Lencioni R, Cioni D, Crocetti L, Franchini C, Pina CD, Lera J, *et al.* Early-stage hepatocellular carcinoma in cirrhosis: long-term results of percutaneous image-guided radiofrequency ablation. *Radiology* 2005;234:961–996
- Lencioni R, Cioni D, Della Pina C, Crocetti L, Bartolozzi C. Imaging diagnosis. *Semin Liver Dis* 2005;25: 162–170
- Lencioni R, Llovet JM. Percutaneous ethanol injection in hepatocellular carcinoma: alive or dead. *J Hepatol* 2005;43:377–380
- Lencioni R. Loco-regional treatment of hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2010;52:762–773
- Lenga Y, Koh A, Perera AS, McCulloch CA, Sodek J, *et al.* Osteopontin expression is required for myofibroblast differentiation. *Circ Res* 2008; 102: 319–327
- Leung TW, Tang AM, Zee B, Lau WY, Lai PB, Leung KL, *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;94:1760–1769
- Li D, Mallory T, Satomura S. AFP-L3: a new generation of tumor marker for hepatocellular carcinoma. *Clin Chim Acta.* 2001;313(1-2):15-19
- Liaw YF, Sung JJ, Chow WC, *et al.* Lamivudine for patients with chronic hepatitis B and advanced liver disease. *N Engl J Med* 2004;351:1521-1531
- Lin DY, Liaw YF, Lee TY, Lai CM. Hepatic arterial embolization in patients with unresectable hepatocellular carcinoma – a randomized controlled trial. *Gastroenterology* 1988;94:453–456
- Lin L, Yu Q, Yan X, Hang W, Zheng J, Xing J, *et al.* Direct infusion mass spectrometry or liquid chromatography mass spectrometry for human metabolomics? A serum metabolomic study of kidney cancer. *Analyst.* 2010;135:2970–2978
- Lin SM, Lin CJ, Lin CC, Hsu CW, Chen YC. Radiofrequency ablation improves prognosis compared with ethanol injection for hepatocellular carcinoma  $\leq 4$  cm. *Gastroenterology* 2004;127:1714–1723
- Lin SM, Lin CJ, Lin CC, Hsu CW, Chen YC. Randomised controlled trial comparing percutaneous radiofrequency thermal ablation, percutaneous ethanol injection, and percutaneous acetic acid injection to treat hepatocellular carcinoma of 3 cm or less. *Gut* 2005;54:1151–1156
- Lin WY, Tsai SC, Hung GU. Value of delayed  $^{18}\text{F}$ -FDG-PET imaging in the detection of hepatocellular carcinoma. *Nucl Med Commun* 2005;26:315-321

- Livraghi T, Bolondi L, Lazzaroni S, Marin G, Morabito A, Rapaccini GL, *et al.* Percutaneous ethanol injection in the treatment of hepatocellular carcinoma in cirrhosis. A study on 207 patients. *Cancer* 1992;15:925–929
- Livraghi T, Giorgio A, Marin G, Salmi A, De Sio I, Bolondi L, *et al.* Hepatocellular carcinoma and cirrhosis in 746 patients: long-term results of percutaneous ethanol injection. *Radiology* 1995;197:101–108
- Livraghi T, Meloni F, Di Stasi M, Rolle E, Solbiati L, Tinelli C, *et al.* Sustained complete response and complications rates after radiofrequency ablation of very early hepatocellular carcinoma in cirrhosis: is resection still the treatment of choice? *Hepatology* 2008;47:82–89
- Llovet JM, Brú C, Bruix J. Prognosis of hepatocellular carcinoma: the BCLC staging classification. *Semin Liver Dis* 1999;19:329–338
- Llovet JM, Bruix J, Fuster J, Castells A, García-Valdecasas JC, Grande L, *et al.* Liver transplantation for treatment of small hepatocellular carcinoma: the TNM classification does not have prognostic power. *Hepatology* 1998;27:1572–1577
- Llovet JM, Bruix J. Molecular targeted therapies in hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2008;48: 1312–1327
- Llovet JM, Bruix J. Novel advancements in the management of hepatocellular carcinoma in 2008. *J Hepatol* 2008; 48:S20-S37
- Llovet JM, Bruix J. Systematic review of randomized trials for unresectable hepatocellular carcinoma: chemoembolization improves survival. *Hepatology* 2003;37:429–442
- Llovet JM, Burroughs A, Bruix J. Hepatocellular carcinoma. *Lancet* 2003;362:1907–1917
- Llovet JM, Bustamante J, Castells A, Vilana R, Ayuso Mdel C, Sala M, *et al.* Natural history of untreated nonsurgical hepatocellular carcinoma: rationale for the design and evaluation of therapeutic trials. *Hepatology* 1999;29: 62–67
- Llovet JM, Chen Y, Wurmbach E, Roayaie S, Fiel MI, Schwartz M, *et al.* A molecular signature to discriminate dysplastic nodules from early hepatocellular carcinoma in HCV cirrhosis. *Gastroenterology* 2006;131:1758–176
- Llovet JM, Di Bisceglie AM, Bruix J, Kramer BS, Lencioni R, Zhu AX, *et al.* Design and endpoints of clinical trials in hepatocellular carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 2008;100:698–711
- Llovet JM, Fuster J, Bruix J. Intention-to-treat analysis of surgical treatment for early hepatocellular carcinoma: resection versus transplantation. *Hepatology* 1999;30: 1434–1440

- Llovet JM, Mas X, Aponte JJ, Fuster J, Navasa M, Christensen E, *et al.* Cost effectiveness of adjuvant therapy for hepatocellular carcinoma during the waiting list for liver transplantation. *Gut* 2002;50:123–128
- Llovet JM, Peña C, Shan M, Lathia C, Bruix J. Biomarkers predicting outcome of patients with advanced hepatocellular carcinoma (HCC) randomized in the phase III SHARP trial. Presidential plenary session, AASLD 59th annual meeting, San Francisco. *Hepatology* 2008;48:372A
- Llovet JM, Real MI, Montana X, Planas R, Coll S, Aponte J, *et al.* Arterial embolisation or chemoembolisation versus symptomatic treatment in patients with unresectable hepatocellular carcinoma: a randomised controlled trial. *Lancet* 2002;359:1734–1739
- Llovet JM, Ricci S, Mazzaferro V, Hilgard P, Gane E, Blanc JF, *et al.* SHARP Investigators Study Group. Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med* 2008;359:378–390
- Llovet JM, Schwartz M, Mazzaferro V. Resection and liver transplantation for hepatocellular carcinoma. *Semin Liver Dis* 2005;25:181–200
- Llovet JM, Vilana R, Brú C, Bianchi L, Salmeron JM, Boix L, *et al.* Increased risk of tumor seeding after percutaneous radiofrequency ablation for single hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2001;33:1124–1129
- Llovet JM. Updated treatment approach to hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol.* 2005;40(3):225-235
- Lo CM, Fan ST, Liu CL, Chan SC, Ng IO, Wong J. Living donor versus deceased donor liver transplantation for early irresectable hepatocellular carcinoma. *Br J Surg* 2007;94:78–86
- Lo CM, Ngan H, Tso WK, Liu CL, Lam CM, Poon RT, *et al.* Randomized controlled trial of transarterial lipiodol chemoembolization for unresectable hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2002;35:1164–1171
- Lok AS. Prevention of hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 2004;127:S303–S309
- Looi KS, Nakayasu ES, Diaz RA, Tan EM, Almeida IC, Zhang JY. Using proteomic approach to identify tumor-associated anti-gens as markers in hepatocellular carcinoma. *J Proteome Res.* 2008;7(9):4004-4012
- Lopez PM, Villanueva A, Llovet JM. Systematic review: evidence-based management of hepatocellular carcinoma – an updated analysis of randomized controlled trials. *Aliment Pharmacol Ther* 2006;23:1535–1547

- Lorena D, Darby IA, Gadeau AP, Leen LL, Rittling S, *et al.* Osteopontin expression in normal and fibrotic liver. altered liver healing in osteopontin-deficient mice. *J Hepatol* 2006;44: 383–390
- Lu DS, Yu NC, Raman SS, Lassman C, Tong MJ, Britten C, *et al.* Percutaneous radiofrequency ablation of hepatocellular carcinoma as a bridge to liver transplantation. *Hepatology* 2005;41:1130–1137
- Lu DS, Yu NC, Raman SS, Limanond P, Lassman C, Murray K, *et al.* Radiofrequency ablation of hepatocellular carcinoma: treatment success as defined by histologic examination of the explanted liver. *Radiology* 2005;234:954–960
- Lucey MR, Mathurin P, Morgan TR (2009) Alcoholic hepatitis. *N Engl J Med* 2009; 360: 2758–2769
- MacKenzie ED, Selak MA, Tennant DA, Payne LJ, Crosby S, Frederiksen CM, *et al.* Cell-permeating alpha-ketoglutarate derivatives alleviate pseudohypoxia in succinate dehydrogenase-deficient cells. *Mol Cell Biol.* 2007; 27: 3282–9. [PMCID: PMC1899954][PubMed: 17325041]
- 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;12:896–898
- Majno PE, Adam R, Bismuth H, Castaing D, Ariche A, Krissat J, *et al.* Influence of preoperative transarterial lipiodol chemoembolization on resection and transplantation for hepatocellular carcinoma in patients with cirrhosis. *Ann Surg* 1997;226:688–701
- Makimoto K, Higuchi S. Alcohol consumption as a major risk factor for the rise in liver cancer mortality rates in Japanese men. *Int J Epidemiol* 1999; 28, 30-34
- Makuuchi M, Kosuge T, Takayama T, Yamazaki S, Kakazu T, Miyagawa S, *et al.* Surgery for small liver cancers. *Semin Surg Oncol* 1993;9:298–304
- Makuuchi M, Sano K. The surgical approach to HCC: our progress and results in Japan. *Liver Transpl* 2004;10:S46–S52
- Mann CD, Neal CP, Garcea G, Manson MM, Dennison AR, Berry DP. Prognostic molecular markers in hepatocellular carcinoma: a systematic review. *Eur J Cancer.* 2007;43(6):979-992
- Marcellin P, Pequignot F, Delarocque-Astagneau E, Zarski JP, Ganne N, Hillon P, *et al.* Mortality related to chronic hepatitis B and chronic hepatitis C in France: evidence for the role of HIV coinfection and alcohol consumption. *J Hepatol* 2008;48:200–207
- Margarit C, Charco R, Hidalgo E, Allende H, Castells L, Bilbao I. Liver transplantation for malignant diseases: selection and pattern of recurrence. *World J Surg.* 2002;26(2):257-63

- Marinho RT, Duarte H, Gíria J, Nunes J, Ferreira A, Velosa J. The burden of alcoholism in fifteen years of liver cirrhosis hospital admissions in Portugal. *Liver International* 2014 April 22
- Marinho RT, Gíria J, Moura MC. Rising costs and hospital admissions for hepatocellular carcinoma in Portugal (1993-2005). *World J Gastroenterol* 2007; 13(10):1522-1527
- Marin-Valencia I, Yang C, Mashimo T, Cho S, Baek H, Yang XL, *et al.* Analysis of tumor metabolism reveals mitochondrial glucose oxidation in genetically diverse human glioblastomas in the mouse brain *in vivo*. *Cell Metab.* 2012;15:827–37. [PMCID: PMC3372870][PubMed: 22682223]
- Marrero JA, Feng Z, Wang Y, Nguyen MH, Befeler AS, Roberts LR, *et al.* Alpha-fetoprotein, des-gamma carboxyprothrombin, and lectin-bound alpha-fetoprotein in early hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology.* 2009;137(1):110-118
- Marrero JA, Fontana RJ, Fu S, Conjeevaram HS, Su GL, Lok AS. Alcohol, tobacco and obesity are synergistic risk factors for hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 2005;42:218-224
- Marrero JA, Romano PR, Nikolaeva O, Steel L, Mehta A, Fimmel CJ, *et al.* GP73, a resident Golgi glycoprotein, is a novel serum marker for hepatocellular carcinoma. *J Hepatol.* 2005;43(6):1007-12
- Marrero JA, Su GL, Wei W, Emick D, Conjeevaram HS, Fontana RJ, *et al.* Des-gamma carboxyprothrombin can differentiate hepatocellular carcinoma from nonmalignant chronic liver disease in american patients. *Hepatology.* 2003;37(5):1114-21
- Mazzaferro V, Battiston C, Perrone S, Pulvirenti A, Regalia E, Romito R, *et al.* Radiofrequency ablation of small hepatocellular carcinoma in cirrhotic patients awaiting liver transplantation: a prospective study. *Ann Surg* 2004;240:900–909
- Mazzaferro V, Bhoori S, Sposito C, Bongini M, Langer M, Miceli R, *et al.* Milan criteria in liver transplantation for HCC: an evidence-based analysis, on 15 years of experience. *Liver Transpl* 2011;17:S44–S57
- Mazzaferro V, Llovet JM, Miceli R, Bhoori S, Schiavo M, Mariani L, *et al.* METRO: the METRO Investigator Study Group. Predicting survival after liver transplantation in patients with hepatocellular carcinoma beyond the Milan criteria: a retrospective, exploratory analysis. *Lancet Oncol* 2009;10:35–43
- Mazzaferro V, Regalia E, Doci R, Andreola S, Pulvirenti A, Bozzetti F, *et al.* Liver transplantation for the treatment of small hepatocellular carcinomas in patients with cirrhosis. *N Engl J Med* 1996;334:693–699
- Mazzaferro V, Romito R, Schiavo M, Mariani L, Camerini T, Bhoori S, *et al.* Prevention of hepatocellular carcinoma recurrence with alpha-interferon after liver resection in HCV cirrhosis. *Hepatology* 2006;44:1543–1554

- Mimura S, Mochida S, Inao M, Matsui A, Nagoshi S, *et al.* Massive liver necrosis after provocation of imbalance between Th1 and Th2 immune reactions in osteopontin transgenic mice. *J Gastroenterol* 2004; 39: 867–872
- Ming L, Thorgeirsson SS, Gail MH *et al.* Dominant role of hepatitis B virus and cofactor role of aflatoxin in hepatocarcinogenesis in Qidong, China. *Hepatology* 2002; 36:1214-1220
- Miyake Y, Takaki A, Iwasaki Y, Yamamoto K. Meta-analysis: interferon alpha prevents the recurrence after curative treatment of hepatitis C virus related hepatocellular carcinoma. *J Viral Hepat* 2010;17:287–292
- Mizejewski GJ. Alpha-fetoprotein structure and function: relevance to isoforms, epitopes, and conformational variants. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2001;226(5):377-408
- Mohamed Abdel-Hamid, Doha El-Sayed Ellakwa and Nesreen Nabil Omar Role of Serum Osteopontin Level as a Diagnostic Biomarker for Early Hepatocellular Carcinoma. *International Journal of Cancer Research*. 2014; 10: 37-45
- Moller H, Mellemegaard A, Lindvig K, Olsen JH. Obesity and cancer risk: a Danish record-linkage study. *Eur J Cancer* 1994;30A:344-350
- Mona Salem, Sahar Abdel Atti, Maisa El Raziky, Samar Kamal Darweesh, Marwa El Sharkawy. Clinical Significance of Plasma Osteopontin Level as a Biomarker of Hepatocellular Carcinoma. *Gastroenterology Research* • 2013;6(5):191-199
- Morgan TR, Mandayam S, Jamal MM. Alcohol and hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 2004; 127, S87-96
- Mori M, Hara M, Wada I, *et al.* Prospective study of hepatitis B and C viral infections, cigarette smoking, alcohol consumption, and other factors associated with hepatocellular carcinoma risk in Japan. *Am J Epidemiol* 2000; 151, 131-139
- Moriyama M, Matsumura H, Watanabe A, Nakamura H, Arakawa Y, Oshiro S, *et al.* Detection of serum and intrahepatic KL-6 in anti- HCV positive patients with hepatocellular carcinoma. *Hepatol Res*. 2004;30(1):24-33
- Mountford C, Lean C, Malycha P, Russell P Proton spectroscopy provides accurate pathology on biopsy and in vivo. *J Magn Reson Imaging* 2006; 24:459–477
- Murakami Y, Yasuda T, Saigo K, Urashima T, Toyoda H, Okanoue T, *et al.* Comprehensive analysis of microRNA expression patterns in hepatocellular carcinoma and non-tumorous tissues. *Onco-gene*. 2006;25(17):2537-2545
- Muto Y, Moriwaki H, Ninomiya M, Adachi S, Saito A, Takasaki KT, *et al.* Prevention of second primary tumors by an acyclic retinoid, polyprenoic acid, in patients with hepatocellular carcinoma. Hepatoma Prevention Study Group. *N Engl J Med* 1996;334:1561–1567

- N'Kontchou G, Mahamoudi A, Aout M, Ganne-Carrié N, Grando V, Coderc E, *et al.* Radiofrequency ablation of hepatocellular carcinoma: long-term results and prognostic factors in 235 Western patients with cirrhosis *Hepatology* 2009;50:1475–1483
- Nagrath D, Caneba C, Karedath T, Bellance N. Metabolomics for mitochondrial and cancer studies *Biochimica et Biophysica Acta* 2011; 1807:650–663
- Nakatsura T, Yoshitake Y, Senju S, Monji M, Komori H, Motomura Y, *et al.* Glypican-3, overexpressed specifically in human hepatocellular carcinoma, is a novel tumor marker. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003;306(1):16-25
- Nanji AA, French SW Hepatocellular carcinoma- Relationship to wine and pork consumption. *Cancer* 1985; 56, 2711-2712
- National Cancer Institute SEER Stat Fact Sheets: Liver and Intrahepatic Bile Duct. Available at: <http://seer.cancer.gov/statfacts/html/livibd.html>. Accessed August 24, 2012
- Naveau S, Cassard-Doulcier AM, Njike-Nakseu M, Bouchet-Delbos L, Barri-Ova N, *et al.* Harmful effect of adipose tissue on liver lesions in patients with alcoholic liver disease. *J Hepatol* 2010; 52: 895–902
- Naveau S, Giraud V, Borotto E, Aubert A, Capron F, *et al.* Excess weight risk factor for alcoholic liver disease. *Hepatology* 1997; 25: 108–111
- Neuschwander-Tetri BA, Caldwell SH. Nonalcoholic steatohepatitis: summary of an AASLD Single Topic Conference. *Hepatology* 2003;38:536
- Ng KK, Poon RT, Chan SC, Chok KS, Cheung TT, Tung H, *et al.* High-intensity focused ultrasound for hepatocellular carcinoma: a single-center experience. *Ann Surg* 2011;253:981–987
- Niederau C, Fischer R, Sonnenberg A, *et al.* Survival and cause of death in cirrhotic and in non-cirrhotic patients with primary hemochromatosis. *New Engl J Med* 1985; 131, 1256-1261
- Nomura F, Ohnishi K, Tanabe Y. Clinical features and prognosis of hepatocellular carcinoma with reference to serum alpha-fetoprotein levels. Analysis of 606 patients. *Cancer.* 1989 15;64 (8):1700-7
- O'Connell TM. Recent advances in metabolomics in oncology. *Bioanalysis.* 2012; 4: 431–51. [PubMed: 22394143]
- O'Neill G, Tsega E, Gold P, Murgita RA. Regulation of human lymphocyte activation by alpha-fetoprotein. Evidence for selective suppression of Ia-associated T-cell proliferation in vitro. *Oncodev Biol Med.* 1982;3(2-3):135-50

- Okita K, Matsui O, Kumada H, Tanaka K, Kaneko S, Moriwaki H, *et al.* Peretinoin Study Group. Peretinoin reduces recurrence of hepatocellular carcinoma: results of a phase II/III randomized placebo-controlled trial. *Book of Abstracts, ILCA 2010*:11A
- Okuda H, Nakanishi T, Takatsu K, Saito A, Hayashi N, Yamamoto M, *et al.* Comparison of clinicopathological features of patients with hepatocellular carcinoma seropositive for alpha-fetoprotein alone and those seropositive for des-gamma-carboxy prothrombin alone. *J Gastroenterol Hepatol.* 2001;16(11):1290-6
- Okuda K, Ohtsuki T, Obata H, Tomimatsu M, Okazaki N, Hasegawa H, *et al.* Natural history of hepatocellular carcinoma and prognosis in relation to treatment. Study of 850 patients. *Cancer* 1985;56:918–928
- Oliver, S. G. Functional genomics: lessons from yeast. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B.* 2002;357, 17–23
- Oliveri RS, Wetterslev J, Gluud C. Transarterial (chemo)embolisation for unresectable hepatocellular carcinoma. *Cochrane Database Syst Rev*2011;3:CD004787. doi:10.1002/14651858.CD004787.pub2
- Omata M, Tateishi R, Yoshida H, Shiina S. Treatment of hepatocellular carcinoma by percutaneous tumor ablation methods: ethanol injection therapy and radiofrequency ablation. *Gastroenterology* 2004;127:S159–S166
- OPTN – Organ Procurement and Transplantation Network. <[http://www.ustransplant.org/annual\\_reports/current/](http://www.ustransplant.org/annual_reports/current/)>; 2011
- Orlacchio A, Bazzocchi G, Pastorelli D, Bolacchi F, Angelico M, Almerighi C, *et al.* Percutaneous cryoablation of small hepatocellular carcinoma with US guidance and CT monitoring: initial experience. *Cardiovasc Intervent Radiol* 2008;31:587–594
- Pacella CM, Francica G, Di Lascio FM, Arienti V, Antico E, Caspani B, *et al.* Long-term outcome of cirrhotic patients with early hepatocellular carcinoma treated with ultrasound-guided percutaneous laser ablation: a retrospective analysis. *J Clin Oncol* 2009;27:2615–2621
- Park JW, Finn RS, Kim JS, Karwal M, Li RK, Ismail F, *et al.* Phase II, open-label study of brivanib as first-line therapy in patients with advanced hepatocellular carcinoma. *Clin Cancer Res* 2011;17:1973–1983
- Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin* 2005;55:74–108
- Patouraux S, Bonnafous S, Voican S, Anty R, Saint-Paul MC, Rosenthal-Allieri MA, Agostini H, Njike M, BarriOva N, Naveau S, Le Marchand-Brustely, Veillon P, Cale`s P, Perlemuter G, Tran A, Gual P. The Osteopontin Level in Liver, Adipose Tissue and Serum Is Correlated with Fibrosis in Patients with Alcoholic Liver Disease. 2012 *PLoS ONE* 7(4): e35612. doi:10.1371/journal.pone.0035612

- Pelletier G, Ducreux M, Gay F, Luboinski M, Hagege H, Dao T, *et al.* Treatment of unresectable hepatocellular carcinoma with lipiodol chemoembolization: a multicenter randomized trial. *J Hepatol* 1998;29: 129–134
- Pelletier G, Roche A, Ink O, Anciaux ML, Derhy S, Rougier P, *et al.* A randomized trial of hepatic arterial chemoembolization in patients with unresectable hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 1990;11:181–184
- Philip PA, Mahoney MR, Allmer C, Thomas J, Pitot HC, Kim G, *et al.* Phase II study of erlotinib (OSI-774) in patients with advanced hepatocellular cancer. *J Clin Oncol* 2005;23:6657–6663
- Pinto Marques H, Ribeiro V, Oliveira FJ, Costa Maia J, Barroso E. Transplantação hepática por hepatocarcinoma - Experiência nacional. *Revista Portuguesa de Cirurgia* 2007; II Série, nº1:15-24
- Poon RT, Fan ST, Lo CM, Liu CL, Lam CM, Yuen WK, *et al.* Extended hepatic resection for hepatocellular carcinoma in patients with cirrhosis: is it justified? *Ann Surg* 2002;236:602–611
- Porrett PM, Peterman H, Rosen M, Sonnad S, Soulen M, Markmann JF, *et al.* Lack of benefit of pre-transplant locoregional hepatic therapy for hepatocellular cancer in the current MELD era. *Liver Transpl* 2006;12: 665–673
- Posey J, Johnson P, Mok T, Hirmand M, Dahlberg S, Kwei L, *et al.* Results of a phase 2/3 open-label, randomized trial of T138067 versus doxorubicin in chemotherapy-naive, unresectable hepatocellular carcinoma. *J Clin Oncol* 2005;23:316
- Qin S, Bai Y, Ye S, Fan J, Lim H, Cho JY, *et al.* Phase III study of oxaliplatin plus 5-fluorouracil/leucovorin (FOLFOX4) versus doxorubicin as palliative systemic chemotherapy in advanced HCC in Asian patients. *J Clin Oncol* 2010;28:4008A
- Quian GS, Ross RK, Yu MC, *et al.* A follow up study of urinary markers of aflatoxin exposure and liver cancer risk in Shanghai, People's Republic of China. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1994; 3:3-10
- Raamsdonk L M, Teusink B, Broadhurst B., Zhang N., Hayes A, Walsh M.C, Berden J.A., Brindle K.M, Kell D.B, Rowland J.J., Westerhoff H.V., Van Dam K., Oliver S.G. A functional genomics strategy that uses metabolome data to reveal the phenotype of silent mutations, *Nat. Biotechnol.* 2001; 19 45–50
- Raimondi S, Bruno S, Mondelli MU *et al.* Hepatitis C virus genotype1b as a risk factor for hepatocellular carcinoma development. A meta-analysis. *J Hepatol* 2009;50: 1142-1154
- Raj A, McCall J, Gane E. Validation of the “Metroticket” predictor in a cohort of patients transplanted for predominantly HBV-related hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 2011;55:1063–1068

- Raoul JL, Guyader D, Bretagne JF, Heautot JF, Duvauferrier R, Bourguet P, *et al.* Prospective randomized trial of chemoembolization versus intraarterial injection of <sup>131</sup>I-labeled-iodized oil in the treatment of hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 1997;26:1156–1161
- Raoul JL, Sangro B, Forner A, Mazzaferro V, Piscaglia F, Bolondi L, *et al.* Evolving strategies for the management of intermediate-stage hepatocellular carcinoma: Available evidence and expert opinion on the use of transarterial chemoembolization. *Cancer Treat Rev* 2011;37:212–220
- Ravaioli M, Grazi GL, Piscaglia F, Trevisani F, Cescon M, Ercolani G, *et al.* Liver transplantation for hepatocellular carcinoma: results of down-staging in patients initially outside the Milan selection criteria. *Am J Transplant* 2008;8:2547–2557
- Raynard B, Balian A, Fallik D, Capron F, Bedossa P, *et al.* (2002) Risk factors of fibrosis in alcohol-induced liver disease. *Hepatology* 2002; 35: 635–638
- Riaz A, Kulik L, Lewandowski RJ, Ryu RK, Giakoumis Spear G, Mulcahy MF, *et al.* Radiologic–pathologic correlation of hepatocellular carcinoma treated with internal radiation using yttrium-90 microspheres. *Hepatology* 2009;49:1185–1193
- Rimola J, Forner A, Reig M, Vilana R, de Lope CR, Ayuso C, *et al.* Cholangiocarcinoma in cirrhosis: absence of contrast washout in delayed phases by magnetic resonance imaging avoids misdiagnosis of hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2009;50: 791–798
- Roayaie S, Blume IN, Thung SN, Guido M, Fiel MI, Hiotis S, *et al.* A system of classifying microvascular invasion to predict outcome after resection in patients with hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 2009; 137:850–855.
- Roayaie S, Llovet JM, Obeidat K, Labow D, Sposito C, Pellegrinelli A, *et al.* Hepatic resection for hepatocellular carcinoma <2 cm in diameter. *Hepatology*, 2013;57:1426-1435
- Roberts LR, Gores GJ. Hepatocellular carcinoma: molecular pathways and new therapeutic targets. *Semin Liver Dis* 2005;25:212–225
- Robertson DG, "Metabonomics in toxicology: a review", *Toxicol. Sci* 2005, 85 (2): 809–22
- Robinson DR, Wu YM, Lin SF. The protein tyrosine kinase family of the human genome. *Oncogene* 2000;19:5548–5557
- Roskams T, Kojiro M. Pathology of early hepatocellular carcinoma: conventional and molecular diagnosis. *Semin Liver Dis* 2010;30: 17–25
- Roskams T. Anatomic pathology impact on prognosis and response to therapy. *Clin Liver Dis* 2011;15:245–259

- Sahai A, Malladi P, Melin-Aldana H, Green RM, Whittington PF. Upregulation of osteopontin expression is involved in the development of nonalcoholic steatohepatitis in a dietary murine model. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2004; 287: G264–273
- Sahin F, Kannangai R, Adegbola O, Wang J, Su G, Torbenson M. mTOR and p70 S6 kinase expression in primary liver neoplasms. *Clin Cancer Res* 2004;10:8421–8425
- Sala M, Fuster J, Llovet JM, Navasa M, Solé M, Varela M, *et al.* High pathological risk of recurrence after surgical resection for hepatocellular carcinoma: an indication for salvage liver transplantation. *Liver Transpl* 2004;10:1294–1300
- Sala M, Llovet JM, Vilana R, Bianchi L, Solé M, Ayuso C, *et al.* Barcelona Clinic Liver Cancer Group. Initial response to percutaneous ablation predicts survival in patients with hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2004;40:1352–1360
- Salem R, Lewandowski RJ, Mulcahy MF, Riaz A, Ryu RK, Ibrahim S, *et al.* Radioembolization for hepatocellular carcinoma using Yttrium-90 microspheres: a comprehensive report of long-term outcomes. *Gastroenterology* 2010;138:52–64
- Samuel M, Chow PK, Chan Shih-Yen E, Machin D, Soo KC. Neoadjuvant and adjuvant therapy for surgical resection of hepatocellular carcinoma. *Cochrane Database Syst Rev* 2009;21:CD001199
- Sangiovanni A, Del Ninno E, Fasani P, De Fazio C, Ronchi G, Romeo R, *et al.* Increased survival of cirrhotic patients with a hepatocellular carcinoma detected during surveillance. *Gastroenterology* 2004;126:1005–1014
- Sangiovanni A, Prati GM, Fasani P, Ronchi G, Romeo R, Manini M, *et al.* The natural history of compensated cirrhosis due to hepatitis C virus: a 17-year cohort study of 214 patients. *Hepatology* 2006;43:1303–1310
- Sangro B, Bilbao JI, Iñarrairaegui M, Rodriguez M, Garrastachu P, Martinez-Cuesta A. Treatment of hepatocellular carcinoma by radioembolization using 90Y microspheres. *Dig Dis* 2009;27:164–169
- Santagostino E, Colombo M, Rivi M, Rumi MG, Rocino A, Linari S, *et al.* A 6-month versus a 12-month surveillance for hepatocellular carcinoma in 559 hemophiliacs infected with the hepatitis C virus. *Blood* 2003;102: 78–82
- Sarasin FP, Giostra E, Hadengue A. Cost-effectiveness of screening for detection of small hepatocellular carcinoma in western patients with Child-Pugh class A cirrhosis. *Am J Med* 1996;101:422–434
- Sarasin FP, Majno PE, Llovet JM, Bruix J, Mentha G, Hadengue A. Living donor liver transplantation for early hepatocellular carcinoma: a life expectancy and cost-effectiveness perspective. *Hepatology* 2001;33:1073–1079

- Sawsan Said Hafez, Aziza Ahmed El Sebai, Manal Mohamed Abd AL Aziz, Manal Abdel Baky Mahmoud, Mohamed Omar El Maraghy, Mohamed Omar Khalifa and Nevine Ibrahim Musa. Alfa-Fetoprotein L3 Subfraction and Osteopontin: Novel Markers for the Diagnosis of Hepatocellular Carcinoma. *J Am Sci* 2013; 9(3):322-328
- Schottenfeld D, Joseph F, Fraumeni Jr *Cancer Epidemiology and Prevention*, 2006. Third Edition. New York, NY: Oxford University Press, Inc
- Schwartz M, Dvorchik I, Roayaie S, Fiel MI, Finkelstein S, Marsh JW, *et al.* Liver transplantation for hepatocellular carcinoma: extension of indications based on molecular markers. *J Hepatol* 2008;49:581–588
- Selak MA, Armour SM, MacKenzie ED, Boulahbel H, Watson DG, Mansfield KD, *et al.* Succinate links TCA cycle dysfunction to oncogenesis by inhibiting HIF-alpha prolyl hydroxylase. *Cancer Cell*. 2005;7:77–85. [PubMed: 15652751]
- Semela D, Dufour JF. Angiogenesis and hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 2004;41:864–880
- Sersté T, Barrau V, Ozenne V, Vullierme MP, Bedossa P, Farges O, *et al.* Accuracy and disagreement of CT and MRI for the diagnosis of small hepatocellular carcinoma and dysplastic nodules: role of biopsy. *Hepatology* 2011. doi:10.1002/hep.24746
- Shang S, Plymoth A, Ge S, Feng Z, Rosen H R., Sangrajang S, *et al.*, 2012. Identification of Osteopontin as a Novel Marker for Early Hepatocellular Carcinoma. *Hepatology*, 2012;55 (2): 483-490
- Shen YC, Hsu C, Chen LT, Cheng CC, Hu FC, Cheng AL. Adjuvant interferon therapy after curative therapy for hepatocellular carcinoma (HCC): a metaregression approach. *J Hepatol* 2010;52:889–894
- Sherman M. Hepatocellular carcinoma: epidemiology, risk factors, and screening. *Semin Liver Dis* 2005;25:143-154
- Sherman M. Surveillance for hepatocellular carcinoma and early diagnosis. *Clin Liver Dis* 2007;11: 817-837
- Shi M, Guo RP, Lin XJ, Zhang YQ, Chen MS, Zhang CQ, *et al.* Partial hepatectomy with wide versus narrow resection margin for solitary hepatocellular carcinoma: a prospective randomized trial. *Ann Surg* 2007;245:36–43
- Shibata T, Iimuro Y, Yamamoto Y, Maetani Y, Ametani F, Itoh K, *et al.* Small hepatocellular carcinoma: comparison of radio-frequency ablation and percutaneous microwave coagulation therapy. *Radiology* 2002;223:331–337
- Shiina S, Teratani T, Obi S, Sato S, Tateishi R, Fujishima T, *et al.* A randomized controlled trial of radiofrequency ablation versus ethanol injection for small hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 2005;129:122–130

- Siegel AB, Cohen EI, Ocean A, Lehrer D, Goldenberg A, Knox JJ, *et al.* Phase II trial evaluating the clinical and biologic effects of bevacizumab in unresectable hepatocellular carcinoma. *J Clin Oncol* 2008;26:2992–2998
- Siegler M, Simmerling MC, Siegler JH, Cronin 2nd DC. Recipient deaths during donor surgery: a new ethical problem in living donor liver transplantation (LDLT). *Liver Transpl* 2006;12:358–360
- Silva MA, Hegab B, Hyde C, Guo B, Buckels JA, Mirza DF. Needle track seeding following biopsy of liver lesions in the diagnosis of hepatocellular cancer: a systematic review and meta-analysis. *Gut* 2008;57:1592–1596
- Simon RM, Paik S, Hayes DF. Use of archived specimens in evaluation of prognostic and predictive biomarkers. *J Natl Cancer Inst* 2009;101:1446–1452
- Simpson KJ, Finlayson ND. Clinical evaluation of liver disease Baillieres. *Clin Gastroenterol* 1995;9: 639–659
- Singal AG, Waljee AK, Shiffman M, Bacon BR, Schoenfeld PS. Meta-analysis: re-treatment of genotype I hepatitis C nonresponders and relapsers after failing interferon and ribavirin combination therapy. *Aliment Pharmacol Ther* 2010;32:969–983
- Singal AK, Anand BS . Mechanisms of synergy between alcohol and hepatitis C virus. *J Clin Gastroenterol* 2007; 41, 761-772
- Singal AK, Singh A, Jaganmohan S, *et al.* Antiviral therapy reduces risk of hepatocellular carcinoma in patients with hepatitis C virus-related cirrhosis. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2010;8:192-9.
- Sitter B, Bathen TF, Tessem M-B, Gribbestad IS Highresolution magic angle spinning (HR MAS) MR spectroscopy in metabolic characterization of human cancer. *Prog Nucl Magn Reson Spectrosc* 2009; 54:239–254
- Sitter B, Lundgren S, Bathen TF, Halgunset J, Fjosne HE, Gribbestad IS Comparison of HR MAS MR spectroscopic profiles of breast cancer tissue with clinical parameters. *NMR Biomed* 2006; 19:30–40
- Siwei Wei, Yuliana Suryani, G. A. Nagana Gowda, Nicholas Skill, Mary Maluccio and Daniel Raftery Differentiating Hepatocellular Carcinoma from Hepatitis C Using Metabolite Profiling *Metabolites* 2012, 2, 701-716; doi:10.3390/metabo2040701
- Slamon DJ, Leyland-Jones B, Shak S, Fuchs H, Paton V, Bajamonde A, *et al.* Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *N Engl J Med* 2001;344:783–792
- Solinas A, Chessa M, Culeddu N *et al.* High resolution-magic angle spinning (HR-MAS) NMR-based metabolomic fingerprinting of early and recurrent hepatocellular carcinoma *Metabolomics* DOI 10.1007/s11306-013-0601-2

- Soresi M, Magliarisi C, Campagna P, Leto G, Bonfissuto G, Riili A, *et al.* Usefulness of alpha-fetoprotein in the diagnosis of hepatocellular carcinoma. *Anticancer Res.* 2003;23(2C):1747-53
- Spratlin JL, Cohen RB, Eadens M, Gore L, Camidge DR, Diab S, *et al.* Phase I pharmacologic and biologic study of ramucirumab (IMC-1121B), a fully human immunoglobulin G1 monoclonal antibody targeting the vascular endothelial growth factor receptor-2. *J Clin Oncol* 2010;28:780–787
- Sterling RK, Jeffers L, Gordon F, Venook AP, Reddy KR, Satomura S, *et al.* Utility of Lens culinaris agglutinin-reactive fraction of alpha-fetoprotein and des-gamma-carboxy prothrombin, alone or in combination, as biomarkers for hepatocellular carcinoma. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2009;7(1):104-13
- Suehiro T, Sugimachi K, Matsumata T, Itasaka H, Taketomi A, Mae da T. Protein induced by vitamin K absence or antagonist II as a prognostic marker in hepatocellular carcinoma. Comparison with alpha-fetoprotein. *Cancer.* 1994;73(10):2464-71
- Sun CA, Wu DM, Lin CC, *et al.* Incidence and cofactors of hepatitis C virus-related hepatocellular carcinoma: a prospective study of 12,008 men in Taiwan. *Am J Epidemiol* 2003;157, 674-82
- Sung JJ, Tsoi KK, Wong VW, Li KC, Chan HL. Meta-analysis: treatment of hepatitisB infection reduces risk of hepatocellular carcinoma. *Aliment Pharmacol Ther* 2008;28:1067-77
- Sung YK, Hwang SY, Park MK, Farooq M, Han IS, Bae HI, *et al.* Glypican-3 is overexpressed in human hepatocellular carcinoma. *Cancer Sci.* 2003;94(3):259-62
- Suzuki M, Shiraha H, Fujikawa T, Takaoka N, Ueda N, Nakanishi Y, *et al.* Des-gamma-carboxy prothrombin is a potential autologous growth factor for hepatocellular carcinoma. *J Biol Chem.* 2005;280(8):6409-15
- Swanson MG, Vigneron DB, Tabatabai ZL, Males RG, Schmitt L, Carroll PR, James JK, Hurd RE, Kurhanewicz J Proton HR-MAS spectroscopy and quantitative pathologic analysis of MRI/3D-MRSI-targeted postsurgical prostate tissues. *Magn Reson Med* 2003; 50:944–954
- Syn WK, Choi SS, Liaskou E, Karaca GF, Agboola KM, *et al.* Osteopontin is induced by hedgehog pathway activation and promotes fibrosis progression in nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 2011; 53: 106–115
- Taieb J, Barbare JC, Rougier P. Medical treatments for hepatocellular carcinoma (HCC): what's next? *Ann Oncol* 2006;10:308–314
- Takami T, Kaposi-Novak P, Uchida K, Gomez-Quiroz LE, Conner EA, Factor VM, *et al.* Loss of hepatocyte growth factor/c-Met signaling pathway accelerates early stages

- of N-nitrosodiethylamine induced hepatocarcinogenesis. *Cancer Res* 2007;67:9844–9851
- Takayama T, Makuuchi M, Hirohashi S, Sakamoto M, Yamamoto J, Shimada K, *et al.* Early hepatocellular carcinoma as an entity with a high rate of surgical cure. *Hepatology* 1998; 28:1241–1246.
- Takayama T, Sekine T, Makuuchi M, Yamasaki S, Kosuge T, Yamamoto J, *et al.* Adoptive immunotherapy to lower postsurgical recurrence rates of hepatocellular carcinoma: a randomised trial. *Lancet* 2000;356:802–807
- Takayasu K, Arai S, Ikai I, Omata M, Okita K, Ichida T, *et al.* Prospective cohort study of transarterial chemoembolization for unresectable hepatocellular carcinoma in 8510 patients. *Gastroenterology* 2006;131:461–469
- Talbot JN, Fartoux L, Balogova S, Nataf V, Kerrou K, Gutman F, *et al.* Detection of hepatocellular carcinoma with PET/CT: a prospective comparison of 18F-fluorocholine and 18F-FDG in patients with cirrhosis or chronic liver disease. *J Nucl Med* 2010;51:1699-1706
- Tanaka H, Imai Y, Hiramatsu N, Ito Y, Imanaka K, Oshita M, *et al.* Declining incidence of hepatocellular carcinoma in Osaka, Japan from 1990 to 2003. *Ann Intern Med* 2008;148:820–826
- Terasaki S, Kaneko S, Kobayashi K, Nonomura A, Nakanuma Y. Histological features predicting malignant transformation of nonmalignant hepatocellular nodules: a prospective study. *Gastroenterology* 1998;115:1216–1222
- Teratani T, Yoshida H, Shiina S, Teratani T, Obi S, Yamashiki N, *et al.* Radiofrequency ablation for hepatocellular carcinoma in so-called highrisk locations. *Hepatology* 2006;43:1101–1108
- Teufel A, Weinmann A, Centner C *et al.* Hepatocellular Carcinoma in patients with autoimmune hepatitis. *World J Gastroenterol* 2009; 15:578-582
- The Cancer of the Liver Italian Program (CLIP) Investigators. A new prognostic system for hepatocellular carcinoma: a retrospective study of 435 patients. *Hepatology* 1998;28:751–755
- Thomas MA, Lipnick S, Velan SS, Liu X, Banakar S, Binesh N, Ramadan S, Ambrosio A, Raylman RR, Sayre J, DeBruhl N, Bassett L Investigation of breast cancer using twodimensional MRS. *NMR Biomed* 2009; 22: 77–91
- Thomas MB, Morris JS, Chadha R, Iwasaki M, Kaur H, Lin E, *et al.* Phase II trial of the combination of bevacizumab and erlotinib in patients who have advanced hepatocellular carcinoma. *J Clin Oncol* 2009;27:843–850

- Tokiya R, Hiratsuka J, Yoshida K, Imai S, Kajihara Y, Imajo Y. Evaluation of serum KL-6 as a predictive marker of radiation pneumonitis in patients with breast-conservation therapy. *Int J Clin Oncol*. 2004;9(6):498-502
- Torzilli G, Olivari N, Moroni E, Del Fabbro D, Gambetti A, Leoni P, *et al*. Contrast-enhanced intraoperative ultrasonography in surgery for hepatocellular carcinoma in cirrhosis. *Liver Transpl* 2004;10:S34–S38
- Toso C, Trotter J, Wei A, Bigam DL, Shah S, Lancaster J, *et al*. Total tumor volume predicts risk of recurrence following liver transplantation in patients with hepatocellular carcinoma. *Liver Transpl* 2008;8:1107–1115
- Tovar V, Alsinet C, Villanueva A, Hoshida Y, Chiang DY, Sole M, *et al*. IGF activation in a molecular subclass of hepatocellular carcinoma and preclinical efficacy of IGF-1R blockage. *J Hepatol* 2010;52:550–559
- Toyoda H, Kumada T, Kiriya S, Sone Y, Tanikawa M, Hisanaga Y, *et al*. Prognostic significance of simultaneous measurement of three tumor markers in patients with hepatocellular carcinoma. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2006;4(1):111-7
- Tremosini S, Forner A, Boix L, Rimola J, Rodríguez de Lope C, Reig M, *et al*. Biopsy diagnosis of hepatocellular carcinoma <2 cm: prospective validation of glypican 3, heat-shock protein 70 and glutamine synthetase staining in fine needle biopsy samples. *ILCA book of abstracts*; 2011
- Trevisani F, D'Intino PE, Morselli-Labate AM, Mazzella G, Accogli E, Caraceni P, *et al*. Serum alpha-fetoprotein for diagnosis of hepatocellular carcinoma in patients with chronic liver disease: influence of HbsAg and anti-HCV status. *J Hepatol* 2001;34:570–575
- Trevisani F, De NS, Rapaccini G, *et al*. Semiannual and annual surveillance of cirrhotic patients for hepatocellular carcinoma: effects on cancer stage and patient survival (Italian experience). *Am J Gastroenterol* 2002; 97:734-744
- Trotter JF, Wachs M, Everson GT, Kam I. Adult-to-adult transplantation of the right hepatic lobe from a living donor. *N Engl J Med* 2002;346:1074–1082
- Truesdale AE, Caldwell SH, Shah NL, Argo CK, Al-Osaimi AM, Schmitt TM, *et al*. Sorafenib therapy for hepatocellular carcinoma prior to liver transplant is associated with increased complications after transplant. *Transpl Int* 2011;24:991–998
- Tsao MS, Sakurada A, Cutz JC, Zhu CQ, Kamel-Reid S, Squire J, *et al*. Erlotinib in lung cancer – molecular and clinical predictors of outcome. *N Engl J Med* 2005;353:133–144
- Tugnoli V, Schenetti L, Mucci A, Parenti F, Cagnoli R, Righi V, Trincherò A, Nocetti L, Toraci C, Mavilla L, Trentini G, Zunarelli E, Tosi MR. Ex vivo HR-MAS MRS of human

- meningiomas: a comparison with in vivo 1H MR spectra. *Int J Mol Med* 2006; 18:859–869
- US Department of Health and Human Services. The Health Consequences of Smoking: A Report of the Surgeon General. Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention, National Center for Chronic Disease Prevention and Health Promotion, Office on Smoking and Health, 2004
- Vander Heiden MG, Cantley LC, Thompson CB. Understanding the Warburg effect: The metabolic requirements of cell proliferation. *Science*. 2009;324:1029–33. [PMCID: PMC2849637] [PubMed: 19460998]
- Varela M, Real MI, Burrel M, Forner A, Sala M, Brunet M, *et al.* Chemoembolization of hepatocellular carcinoma with drug eluting beads: efficacy and doxorubicin pharmacokinetics. *J Hepatol* 2007; 46:474–481.
- Vauthey JN, Lauwers GY, Esnaola NF, Do KA, Belghiti J, Mirza N, *et al.* Simplified staging for hepatocellular carcinoma. *J Clin Oncol* 2002;20:1527–1536
- Verdecchia A, Francisci S, Brenner H, *et al.*; EUROCARE-4 Working Group. Recent cancer survival in Europe: a 2000-02 period analysis of EUROCARE-4 data. *Lancet Oncol* 2007;8(9):784–796
- Vibert E, Azuolay D, Hoti E, Iacopinelli S, Samuel D, Salloum C, *et al.* Progression of alpha-fetoprotein before liver transplantation for hepatocellular carcinoma in cirrhotic patients: a critical factor. *Am J Transplant* 2010;10:127–137
- Vilana R, Bru C, Bruix J, Castells A, Sole M, Rodes J. Fine-needle aspiration biopsy of portal vein thrombus: value in detecting malignant thrombosis. *AJR Am J Roentgenol*. 1993;160:1285-1287
- Villa E, Moles A, Ferretti I, Buttafoco P, Grottola A, Del Buono M, *et al.* Natural history of inoperable hepatocellular carcinoma: estrogen receptors' status in the tumor is the strongest prognostic factor for survival *Hepatology* 2000;32:233–238
- Villanueva A, Chiang DY, Newell P, Peix J, Thung S, Alsinet C, *et al.* Pivotal role of mTOR signaling in hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 2008;135:1972–1983
- Villanueva A, Newell P, Chiang DY, Friedman SL, Llovet JM. Genomics and signaling pathways in hepatocellular carcinoma. *Semin Liver Dis* 2007;27:55–76
- Vitale A, Volk ML, Pastorelli D, Lonardi S, Farinati F, Burra P, *et al.* Use of sorafenib in patients with hepatocellular carcinoma before liver transplantation: a cost–benefit analysis while awaiting data on sorafenib safety. *Hepatology* 2010;51:165–173
- Vora SR, Zheng H, Stadler ZK, Fuchs CS, Zhu AX. Serum alpha-fetoprotein response as a surrogate for clinical outcome in patients receiving systemic therapy for advanced hepatocellular carcinoma. *Oncologist* 2009;14:717–725

- Wang LY, You SL, Lu SN, et al Risk of hepatocellular carcinoma and habits of alcohol drinking, betel quid chewing, and cigarette smoking: a cohort of 2416 HBsAg-seropositive and 9421 HBsAg-seronegative male residents in Taiwan. *Cancer Causes Control* 2003;14, 241-250
- Warburg O, Posener K, Negelein E. On the metabolism of carcinoma cells. *Biochem Z.* 1924; 152: 309–44. Warburg O. On the origin of cancer cells. *Science.* 1956; 123: 309–14. [PubMed: 13298683]
- Wilhelm SM, Adnane L, Newell P, Villanueva A, Llovet JM, Lynch M. Preclinical overview of sorafenib, a multikinase inhibitor that targets both Raf and VEGF and PDGF receptor tyrosine kinase signaling. *Mol Cancer Ther* 2008;7:3129–3140
- Wilson M, Davies NP, Grundyd RG, Peet AC A quantitative comparison of metabolite signals as detected by in vivo MRS with ex vivo 1H HR-MAS for childhood brain tumours. *NMR Biomed* 2009; 22:213–219
- Wolfort RM, Papillion PW, Turnage RH, Lillien DL, Ramaswamy MR, Zibari GB. Role of FDG-PET in the evaluation and staging of hepatocellular carcinoma with comparison of tumor size, AFP level, and histologic grade. *Int Surg* 2010;95:67-75
- Wolk A, Gridley G, Svensson M, et al. A prospective study of obesity and cancer risk (Sweden). *Cancer Causes Control* 2001; 12:13-21
- World Gastroenterology Organization, 2009 WGO Global Guideline HCC
- World Health Organization. Hepatitis B vaccines. *Weekly epidemiological record of the World Health Organization* 2009;84:405–420
- World Health Organization. Mortality Database. WHO Statistical Information System, 2008
- Wu H, Xue R, Dong L, Liu T, Deng C, Zeng H, Shen X. Metabolomic profiling of human urine in hepatocellular carcinoma patients using gas chromatography/mass spectrometry, *Anal. Chim. Acta* 2009; 648:98–104
- Wu, H. F.; Southam, A. D.; Hines, A.; Viant, M. R., High-throughput tissue extraction protocol for NMR and MS-based metabolomics. *Analytical Biochemistry* 2008, 372 (2), 204-212
- Wurmbach E, Chen YB, Khitrov G, Zhang W, Roayaie S, Schwartz M, et al. Genome-wide molecular profiles of HCV-induced dysplasia and hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2007;45:938–947
- Yamasaki S, Hasegawa H, Kinoshita H, Furukawa M, Imaoka S, Takasaki K, et al. A prospective randomized trial of the preventive effect of preoperative transcatheter arterial embolization against recurrence of hepatocellular carcinoma. *Jpn J Cancer Res* 1996;87:206–211

- Yamashita K, Taketa K, Nishi S, Fukushima K, Ohkura T. Sugar chains of human cord serum alpha-fetoprotein: characteristics of N-linked sugar chains of glycoproteins produced in human liver and hepatocellular carcinomas. *Cancer Res.* 1993;53(13):2970-2975
- Yang HI, Lu SN, Liaw YF, You SL, Sun CA, Wang LY, *et al.* Taiwan Community-Based Cancer Screening Project Group. Hepatitis B e antigen and the risk of hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med* 2002;347:168–174
- Yang Q, McDonnell SM, Khoury MJ, *et al.* Hemochromatosis-associated mortality in the United States from 1979 to 1992: an analysis of multiple-cause mortality data. *Ann Intern Med* 1998; 129, 946-953
- Yang Y., Li C., Nie X., Feng X.. Metabonomic studies of human hepatocellular carcinoma using high resolution magic angle spinning. *Journal of Proteome Research.* 2007;6,2605–2614
- Yao FY, Ferrell L, Bass NM, Watson JJ, Bacchetti P, Venook A, *et al.* Liver transplantation for hepatocellular carcinoma: expansion of the tumor size limits does not adversely impact survival. *Hepatology* 2001;33:1394–1403
- Yao FY, Kerlan Jr RK, Hirose R, Davern 3rd TJ, Bass NM, Feng S, *et al.* Excellent outcome following down-staging of hepatocellular carcinoma prior to liver transplantation: an intention-to-treat analysis. *Hepatology* 2008;48:819–827
- Yao FY, Xiao L, Bass NM, Kerlan R, Ascher NL, Roberts JP. Liver transplantation for hepatocellular carcinoma: validation of the UCSF-expanded criteria based on preoperative imaging. *Am J Transplant* 2007;7:2587–2596
- Yeh FS, Yu MC, Mo CC, *et al.* Hepatitis B virus, aflatoxins, and hepatocellular carcinoma in southern Guangxi, China. *Cancer Res* 1989; 49:2506-2509
- Yeo W, Mok TS, Zee B, Leung TW, Lai PB, Lau WY, *et al.* A randomized phase III study of doxorubicin versus cisplatin/interferon alpha-2b/doxorubicin/fluorouracil (PIAF) combination chemotherapy for unresectable hepatocellular carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 2005;97:1532–1538
- Yoshida H, Shiratori Y, Kudo M, Shiina S, Mizuta T, Kojiro M, *et al.* Effect of vitamin K2 on the recurrence of hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2011;54:532–540
- Yu MC, Yuan JM. Environmental factors and and risc for hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 2004; 127:S72-78
- Yu MW, Yeh SH, Chen PJ, Liaw YF, Lin CL, Liu CJ, *et al.* Hepatitis B virus genotype and DNA level and hepatocellular carcinoma: a prospective study in men. *J Natl Cancer Inst* 2005;97:265–272

- Yu NC, Chaudhari V, Raman SS, Lassman C, Tong MJ, Busuttil RW, *et al.* CT and MRI improve detection of hepatocellular carcinoma, compared with ultrasound alone, in patients with cirrhosis. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2011;9:161–167
- Yu NC, Lu DS, Raman SS, Dupuy DE, Simon CJ, Lassman C, *et al.* Hepatocellular carcinoma: microwave ablation with multiple straight and loop antenna clusters – pilot comparison with pathologic findings. *Radiology* 2006;239:269–275
- Yuan JM, Govindarajan S, Arakawa K, *et al.* Synergism of alcohol, diabetes, and viral hepatitis on the risk of hepatocellular carcinoma in blacks and whites in the U.S. *Cancer* 2004; 101, 1009-1017
- Zhang BH *et al.* Randomized controlled trial of screening for hepatocellular carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol* 2004;130:417–422
- Zhao L, Li T, Wang Y, Pan Y, Ning H, *et al.* Elevated plasma osteopontin level is predictive of cirrhosis in patients with hepatitis B infection. *Int J Clin Pract* 2008; 62: 1056–1062
- Zhou M, Guan W, Walker LD, Mezencev R, Benigno BB, Gray A, *et al.* Rapid mass spectrometric metabolic profiling of blood sera detects ovarian cancer with high accuracy. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2010;19:2262–2271
- Zhu AX, Blaszkowsky LS, Ryan DP, Clark JW, Muzikansky A, Horgan K, *et al.* Phase II study of gemcitabine and oxaliplatin in combination with bevacizumab in patients with advanced hepatocellular carcinoma. *J Clin Oncol* 2006;24:1898–1903
- Zhu AX, Sahani DV, Duda DG, di Tomaso E, Ancukiewicz M, Catalano OA, *et al.* Efficacy, safety, and potential biomarkers of sunitinib monotherapy in advanced hepatocellular carcinoma: a phase II study. *J Clin Oncol* 2009;27:3027–3035
- Zucman-Rossi J, Benhamouche S, Godard C, Boyault S, Grimber G, Balabaud C, *et al.* Differential effects of inactivated Axin1 and activated beta-catenin mutations in human hepatocellular carcinomas. *Oncogene* 2007;26:774–780