

CLASSIFICAÇÃO MOLECULAR DOS ADENOMAS HEPÁTICOS ATRAVÉS DE MARCADORES IMUNOISTOQUÍMICOS

ANDRÉ LUÍS DE GODOY

**Dissertação apresentada à Fundação Antônio
Prudente para obtenção do título de Mestre em
Ciências**

**Área de Concentração: Oncologia
Orientadora: Dra. Maria Dirlei Ferreira de
Souza Begnami**

**São Paulo
2016**

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca da Fundação Antônio Prudente

Godoy, André Luís

Classificação molecular dos adenomas hepáticos através de marcadores imunoistoquímicos / André Luís de Godoy – São Paulo, 2016.

77p.

Dissertação (Mestrado)-Fundação Antônio Prudente.

Curso de Pós-Graduação em Ciências - Área de concentração:
Oncologia.

Orientadora: Maria Dirlei Ferreira de Souza Begnami

Descritores: 1. ADENOMA DE CÉLULAS HEPÁTICAS.
2. IMUNO-HISTOQUÍMICA. 3. TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO
MOLECULAR/classificação. 4. HIPERPLASIA NODULAR FOCAL. 5.
CARCINOMA HEPATOCELULAR

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Dra Maria Dirlei FS Begnami grande incentivadora deste projeto, agradeço pela oportunidade oferecida, pelos ensinamentos, dedicação e sobretudo amizade, durante a realização deste trabalho.

Ao Dr. Felipe José Fernandez Coimbra, Chefe do Departamento de Cirurgia Abdominal do A C Camargo, cirurgião exemplar e modelo de liderança, agradeço pelo incentivo, e por ter me dado a oportunidade de fazer parte deste Departamento, do qual muito me honra.

Aos Amigos do Departamento de Cirurgia Abdominal, Dr Alessandro Landskron, Dr Heber Salvador, Dr Wilson Luiz, Dr Igor Farias e Dr Antonio Cury, responsáveis pela condução da maior parte dos pacientes desta casuística, agradeço pela amizade, pela ajuda mútua nos desafios do dia a dia e pelo aprendizado contínuo.

À Equipe de Transplante de Fígado do AC Camargo, que desempenha um papel excepcional na assistência de transplante pediátrico neste país, meus agradecimentos, em especial ao Dr Eduardo Carone, *in memoriam*, Dr Eduardo Antunes e Dr João Seda, pela convivência e por serem fundamentais na minha formação.

À Suely Francisco, bibliotecária do AC Camargo, agradeço por sua disponibilidade, capacidade e gentileza em ajudar, que foi de grande importância para a consolidação deste trabalho.

Agradeço à Enfermeira de pesquisa Narimã Marques, pela presteza no auxílio na coleta de dados desta casuística.

E por fim, minha família, aos meus pais, a eterna gratidão; e de forma especial agradeço à minha esposa, Eva Ivone, pelo amor, incentivo e compreensão constante.

RESUMO

Godoy AL. **Classificação molecular dos adenomas hepáticos através de marcadores imunoistoquímicos**. São Paulo; 2016. [Dissertação de Mestrado-Fundação Antônio Prudente].

Os adenomas hepatocelulares (AHC) são tumores hepáticos benignos raros. Estudos em biologia molecular têm demonstrado que os AHC são neoplasias heterogêneas com classificação genotípica que permite identificar 4 subtipos: AHC com mutação de HNF1A (35-40%), AHC com mutação de Beta-catenina (10%), AHC inflamatório (50 a 55%) e AHC Inclassificável (menos de 10%). Esta classificação pode ser feita através da pesquisa imunoistoquímica (IMQ) de alguns marcadores específicos, tais como, como o LFAPB (liver fatty acid-binding protein), Amilóide A, Glutamina Sintetase (GS), Beta-catenina e Proteína C Reativa (PCR). Este estudo pretende classificar os AHC operados no A.C. Camargo Cancer Center, no período de 2001 a 2014, em subtipos moleculares através da IMQ e correlacionar os subtipos com características clínicas e histopatológicas. Para tanto foi realizado IMQ com os marcadores LFAPB, amilóide A, GS, Beta-catenina e PCR seguindo os protocolos já estabelecidos no Laboratório de imunoistoquímica do Departamento de Anatomia Patológica do A.C. Camargo Cancer Center. As informações clínicas relevantes foram obtidas dos prontuários clínicos dos pacientes e os dados anátomo-patológicos das revisões histopatológicas das lâminas correspondentes. Espécimes cirúrgicos de 21 pacientes com diagnóstico de AHC, foram revisados, sendo realizado análise IMQ com os 5 reagentes descritos acima, sendo possível classificá-los em 3 subtipos: 10 pacientes (47,5%) com AHC Inflamatórios; 5 pacientes (24%) com AHC Inflamatórios com mutação da Beta-catenina e 6 pacientes (28,5%) com AHC Inclassificável. Foram aplicados testes estatísticos apropriados para as análises dos dados. Das características clínicas relevantes pesquisadas (idade, sexo, uso de anticoncepcional,

índice de massa corpórea, tamanho e número de nódulos), apenas o sexo masculino, apresentou correlação estatisticamente significativa com o subgrupo AHC Inflamatório com Beta-catenina ativada. Em relação às variáveis histopatológicas, atipias citológicas e presença associada de Carcinoma hepatocelular (CHC) apresentaram diferenças estatísticas significantes com o subtipo AHC Inflamatório com Beta-catenina ativada. Este estudo nos permitiu reproduzir a classificação molecular imunoistoquímica dos AHC em nossa casuística, com resultados comparáveis aos da literatura. De acordo com as implicações prognósticas desta classificação, a sua aplicação e padronização na rotina clínica, poderão auxiliar na decisão terapêutica em nosso meio.

SUMMARY

Godoy AL. **[Molecular classification of liver adenomas through immunohistochemical markers]**. São Paulo; 2016. [Dissertação de Mestrado-Fundação Antônio Prudente].

Hepatocellular adenomas (AHC) are rare benign liver tumors. Molecular biology studies have demonstrated that tumors are heterogeneous with AHC genotypic classification which identifies four subtypes: AHC with HNF1A mutation (35-40%), AHC with beta-catenin mutation (10%), inflammatory AHC (50-55%) and unclassified AHC (less than 10%). This classification can be made by immunohistochemical study (IMQ) of specific markers such as LFAPB (liver fatty acid-binding protein), amyloid A, glutamino synthetase (GS), Beta-catenin and C Reactive Protein (CRP). This study aims to classify AHC operated in A.C. Camargo Cancer Center in the period from 2001 to 2014 in molecular subtypes by IMQ and correlate subtypes with clinical and histopathologic features. For this was done with the IMQ LFAPB markers, amyloid A, GS, Beta-catenin and PCR following the protocols established in the Immunohistochemistry Laboratory of the Department of Pathology of the A.C. Camargo Cancer Center. The relevant clinical data were obtained from clinical records of patients and pathologic data of histopathologic review of the corresponding blades. Surgical specimens from 21 patients diagnosed with AHC were reviewed, being held IMQ analysis with 5 reagents described above, it is possible to classify them into 3 subgroups: 10 patients (47.5%) with AHC inflammatories; 5 patients (24%) as mutation AHC inflammatories with beta-catenin and 6 patients (28.5%) with AHC unclassified. Appropriate statistical tests for data analysis were applied. The relevant clinical characteristics studied (age, sex, contraceptive use, body mass index, size and number of nodes), only the males showed a statistically significant correlation with the AHC Inflammatory subgroup with mutation of beta-catenin. Regarding the histopathologic variables, cytologic atypia and the

associated presence of hepatocellular carcinoma showed statistically significant differences with the AHC Inflammatory subgroup with mutation of Beta -catenin. This study allowed us to reproduce the immunohistochemical molecular classification of AHC in our sample, with results comparable to literature. According to the prognostic implications of this classification, the application and standardization in clinical practice may assist in therapeutic decision in our midst.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Adenoma hepático classificado como AHC inflamatório, identificado como caso 1.....	53
Figura 2	Adenoma hepático classificado como AHC inflamatório com ativação da Beta catenina, identificado como caso 6.....	54
Figura 3	Adenoma hepático classificado como AHC Inclassificável; identificado como caso 3.....	55

LISTA DE TABELAS E QUADROS

Tabela 1	Classificação genotípica/fenotípica do AHC pelo mundo.....	9
Tabela 2	Classificação Imunoistoquímica do AHC no Mundo.....	10
Tabela 3	Características dos subtipos de Adenomas de acordo com a classificação Molecular e fenotípica dos AHC.....	25
Tabela 4	Dados demográficos e epidemiológicos dos pacientes (N=21)	47
Tabela 5	Características histopatológicas dos Nódulos Hepáticos e das Cirurgias.....	48
Tabela 6	Principais achados histopatológicos dos AHCs.....	50
Tabela 7	Resultados das reações imunoistoquímicas.....	52
Tabela 8	Características clínicas e os subgrupos moleculares.....	57
Tabela 9	Principais achados histológicos e os subgrupos moleculares..	58
Quadro 1	Padrão de Interpretação dos anticorpos.....	40
Quadro 2	Padrão de expressão dos anticorpos, conforme os subtipos moleculares.....	40

LISTA DE ABREVIATURAS

ACO	Anticoncepcional Oral
AHC	Adenoma (s) Hepatocelular (s)
AHC HNF 1 alfa	Adenoma (s) Hepatocelular(s) tipo Fator Nuclear Hepatocitário 1alfa (Hepatocyte Nuclear Factor 1 alfa)
AHC I	Adenoma (s) Hepatocelular(s) tipo Inflamatório
CHC	Carcinoma Hepatocelular
Dsh	Dishevelled
FDG	Fluorodeoxyglucose
FRK	Fyn-Related Src Family Tyrosine Kinase
HNF	Hiperplasia Nodular Focal
IMQ	Imunoistoquímica (s)
GNAS	G-Protein Alpha Subunit
GS	Glutamina sintetetase
GSK	Glicogen Synthase Kinase
IMC	Índice de Massa Corpórea
JAK	Janus kinase
LFABP	Liver Fatty Acid-Binding Protein
LEF	Lymphoid enhancer factor (Fator Intensificador Linfóide)
MTOR	Mechanistic Target Of Rapamycin
NASH	Nonalcoholic Steatohepatitis (Esteatohepatite não alcoólica).
PET	Positron Emission Tomography
PTEN	Phosphatase and Tensin Homolog
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RFA	Radiofrequência
RT-PCR	Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real
STAT	Signal Transducers and Activators of Transcription
TAE	Embolização Transarterial
TCF	Transcription fator 1
TC	Tomografia Computadorizada
TCF	T cell fator (Fator celular-T)

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Considerações Iniciais.....	1
1.2	Epidemiologia do AHC	4
1.3	Fatores de Riscos Associados ao AHC	5
1.4	Classificação molecular do AHC	7
1.5	Subtipos Moleculares de Adenomas Hepatocelulares	10
1.5.1	Adenomas com Mutação de HNF (Hepatocyte Nuclear Factor) 1 Alfa	10
1.5.2	Adenomas com Mutação de Beta-Catenina	12
1.5.3	Adenomas Hepatocelulares Inflamatórios (AHC I)	15
1.5.4	Adenomas não Classificáveis (Inclassificáveis).....	17
1.6	Aspectos Macroscópicos.....	18
1.7	Características Histopatológicas	19
1.8	Adenomatose Hepática	20
1.9	Diagnóstico por Exames de Imagem.....	22
1.10	Conduta Terapêutica	26
1.11	Aspectos Técnicos da Cirurgia.....	28
1.12	Embolização Transarterial (TAE).....	29
1.13	RFA (RADIOFREQUÊNCIA)	30
1.14	Transplante de Fígado	31
1.15	Adenomas Hepatocelulares e Gravidez	32
1.16	Decisão Terapêutica.....	33
2	OBJETIVOS	35
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	36
3.1	Caracterização da Amostra	36
3.2	Reações Imunoistoquímicas.....	39
3.3	Caracterização dos Subtipos Moleculares	40

3.4	Análise Estatística	41
4	RESULTADOS	42
4.1	Variáveis Clínicas e Cirúrgicas	42
4.2	Variáveis Histopatológicas.....	48
4.3	Análises Imunoistoquímicas e Classificação Molecular.....	51
4.4	Correlação entre as Variáveis Clínicas e Histopatológicas e os Subgrupos Moleculares	56
4.5	Seguimento Clínico dos Pacientes	58
5	DISCUSSÃO	61
6	CONCLUSÃO	69
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	70

ANEXOS

- Anexo 1** Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa-CEP
- Anexo 2** Figuras dos AHC, em Hematoxilina Eosina (HE) e com a IMQ para Amilóide A, LFABP, proteína Beta catenina e Glutamina Sintetase (GS), com a identificação dos casos.

1 INTRODUÇÃO

1.1 CONSIDERAÇÕES INICIAIS

Adenomas hepatocelulares (AHC) são neoplasias hepáticas benignas que se tornaram reconhecidas nas décadas de 1960 e 1970, após a introdução e uso frequente de pílulas contraceptivas orais (ACO), tornando-se o principal fator de risco (EDMONDSON et al. 1976; ROOKS et al. 1979).

Estes tumores são definidos por uma proliferação monoclonal de hepatócitos bem diferenciados e pela ausência de tríade portal e ductos biliares (BIOULAC-SAGE et al. 2011a). O AHC geralmente caracteriza-se por lesão única e assintomática e o seu tamanho varia de milímetros a massas que podem ocupar todo o fígado. A presença de nódulos múltiplos, tipicamente possuindo mais de 10 lesões no fígado, indica uma entidade única chamada adenomatose hepática (FLEJOU et al. 1985).

Ao contrário dos outros tumores benignos do fígado, como hemangiomas e hiperplasia nodular focal, o AHC necessita de uma abordagem clínica mais agressiva, pela possibilidade de ruptura e sangramento que podem causar choque hipovolêmico, além do risco de malignização, que pode ocorrer entre 4,2% a 10,6 % dos casos (STOOT et al. 2010; FARGES et al. 2011).

Por acometer principalmente mulheres jovens em idade reprodutiva, o diagnóstico ou alta possibilidade diagnóstica de AHC, traz um impacto

significativo na vida dessas pacientes, considerando o risco de complicações relacionadas, impacto sobre futuras gestações, risco aumentado de sangramento durante a gravidez, necessidade de suspensão do uso de contraceptivos orais e a possibilidade de cirurgia hepática de grande porte.

Historicamente, desde suas primeiras descrições o AHC foi considerado uma entidade homogênea, bem definida (EDMONDSON et al. 1976).

Entretanto, na última década, em decorrência dos avanços nos estudos genéticos e moleculares, iniciados pelo grupo de Bordeaux na França (ZUCMAN-ROSSI et al. 2006), o AHC foi definido como uma doença heterogênea com apresentações genótípicas e fenotípicas distintas (BALABAUD et al. 2013; BIOULAC-SAGE et al. 2007, 2009, 2013b; NAULT et al. 2013).

De acordo com os estudos do grupo de Bordeaux, foram identificados 4 subgrupos de AHC, sendo que 3 deles apresentam alterações genéticas distintas na sua tumorigênese. As mutações do gene Fator Nuclear Hepatocítico 1 alfa (HNF1alfa) são responsáveis por 35% dos AHC, as mutações ativadoras do gene Beta catenina (AHC Beta-catenina) estão presentes em 10% dos pacientes afetados e as mutações dos genes da via de sinalização da JAK / STAT3 (*Janus kinase/signal transducers and activators of transcription*) estão presentes nos AHC do tipo inflamatório (AHC I) que correspondem a 45% dos AHC. O quarto subgrupo denominado inclassificável (AHC inclassificável) não possui característica genética ou histológica definida. Devido à forte associação do AHC do tipo Beta catenina

mutado com transformação para carcinoma hepatocelular, a identificação deste subtipo é de extrema importância na prática clínica.

Essa classificação molecular possui correspondentes histológicos típicos e pode ser realizada através de marcadores imunoistoquímicos específicos (BIOULAC-SAGE et al. 2007).

Atualmente os AHC, apresentam-se como um desafio crescente na prática clínica para os hepatologistas, cirurgiões, radiologistas e patologistas, no que tange os diagnósticos diferenciais radiológicos e histológicos, especialmente quando essas lesões apresentam características morfológicas sobrepostas com Hiperplasia Nodular Focal ou ao CHC bem diferenciado.

A descoberta e a identificação de subtipos de AHC, representaram um significativo avanço no conhecimento desta doença complexa. Sua distinção é importante para a prática clínica, uma vez que o prognóstico é fortemente relacionado com cada subgrupo individual (NAULT et al. 2013).

Apesar de recente, a classificação molecular dos AHC, tem contribuído com impacto na prática clínica, tanto na utilização para os diagnósticos por métodos de imagem, revelando características imagiológicas típicas nos exames de ressonância magnética nuclear, como na identificação de lesões com potencial de malignização, que demandam tratamento cirúrgico (BALABAUD et al. 2013; BIOULAC-SAGE et al. 2013b; CRISTIANO et al. 2014; SEMPOUX et al. 2013).

1.2 EPIDEMIOLOGIA DO AHC

AHC é um problema mundial, corresponde a terceira causa de tumores benignos hepáticos, após hemangiomas e hiperplasia nodular focal (NAULT et al. 2013).

Existe uma clara diferença na incidência desta neoplasia entre os países da Europa e da Ásia. Esta diferença é explicada principalmente pelos diferentes métodos de contracepção usados no mundo. Na Europa, os contraceptivos orais são utilizados por 54, 58, 60, 68 e 75% das mulheres na França, Holanda, Bélgica, Portugal e Alemanha, respectivamente, versus 1% na China, de 2% no Japão, e 21 % nos EUA (BIOULAC-SAGE et al. 2013a).

A incidência anual de AHC é de 1 por 1.000.000 em mulheres que nunca usaram contraceptivos orais, comparados com 30-40 por milhão nas usuárias, sendo particularmente mais comum no uso de ACO com altas concentrações de estrógeno e tempo de utilização acima de 2 anos (ROOKS et al. 1979). Porém esses dados são referentes ao final da década de 70, e desde então não houve estudos epidemiológicos sistemáticos sobre este assunto (CHANG et al. 2013).

A verdadeira prevalência dos AHC é desconhecida, por tratar-se de tumores usualmente assintomáticos, sendo diagnosticados de forma incidental pela presença de sintomas não relacionados (LIAU et al. 2013). De acordo com Biolac Sage em 2011, seria necessário um rastreamento populacional com ressonância magnética, para obter números precisos (BIOULAC-SAGE et al. 2011b).

A incidência de AHC predomina em mulheres jovens (idade de 20 aos 44 anos) e raramente acomete crianças, homens e idosos, sendo estes casos relacionados principalmente, a etiologias específicas, como desordens vasculares, síndromes genéticas como polipose adenomatosa familiar, glicogenoses, entre outras (BALABAUD et al. 2013; BIOULAC-SAGE et al. 2013b).

Até o final do século passado, imaginava-se que o AHC iria desaparecer com o uso de ACO de terceira geração que contém baixas doses de estrogênio (BALABAUD et al. 2013). Porém, com a identificação de outros fatores etiológicos associados como obesidade, síndrome metabólica, etilismo e principalmente com o maior acesso da população aos exames de imagem, o AHC tem sido cada vez mais diagnosticado como um achado incidental em pacientes submetidos a exames de ultrassom, tomografia computadorizada ou ressonância magnética por sintomas não relacionados ao fígado.

1.3 FATORES DE RISCOS ASSOCIADOS AO AHC

A associação entre o uso de contraceptivos orais e o desenvolvimento do AHC, foi descrita pela primeira vez em 1976, quando observou-se o surgimento de vários casos de AHC em curto período de tempo em pacientes que utilizavam ACO (EDMONDSON et al. 1976; ROOKS et al. 1979).

O mecanismo através do qual a terapia com estrogênio contribui para o desenvolvimento de AHC não está completamente compreendido, mas parece estar relacionado a dose e ao tempo prolongado de uso. No entanto 20% das mulheres com AHC, não apresentam exposição aos ACO (BIOULAC-SAGE et al. 2013b).

O uso de esteróides andrógenos anabolizantes utilizados para o tratamento de anemia aplástica ou anemia de Fanconi, angioedema hereditário, assim como para melhora de performance atlética e impotência, também é um fator de risco reconhecido para o desenvolvimento do AHC (LIAU et al. 2013).

Síndromes de Klinefelter e de ovário policístico também podem estar associadas ao desenvolvimento de AHC, em consequência de desequilíbrio dos hormônios endógenos. Outras doenças metabólicas associadas ao AHC incluem diabetes de início na maturidade do jovem Tipo 3 e síndrome de McCune-Albright (VAXILLAIRE et al. 1997).

Anormalidades na vasculatura hepática, incluindo a ausência ou a oclusão da veia porta, shunt porto-sistêmico intrahepático, Síndrome de Budd-Chiari, telangiectasia hemorrágica hereditária e Síndrome de Rendu-Osler-Weber também são considerados fatores associados à patogênese do AHC (KAWAKATSU et al. 1994).

Obesidade e características associadas às síndromes metabólicas são frequentemente observadas nos pacientes com AHC do tipo Inflamatório, anteriormente definido como Hiperplasia Nodular Focal Telangiectásica (PARADIS et al. 2007; BUNCHORNTAVAKUL et al. 2011).

1.4 CLASSIFICAÇÃO MOLECULAR DO AHC

Em 2002, foram descritas duas alterações genéticas relacionadas ao AHC: a inativação bi alélica do gene *hepatocyte nuclear fator 1 alpha* (HNF1alfa) (BLUTEAU et al. 2002) e a mutação do gene *CTNNB1*, que codifica o gene da Beta-catenina (CHEN et al. 2002).

Em 2006, ZUCMAN-ROSSI et al. a partir de um estudo retrospectivo realizado por uma rede colaborativa francesa, envolvendo 96 pacientes com diagnóstico confirmado ou suspeito para AHC, utilizaram diversas técnicas genéticas e moleculares caracterizando o AHC como uma entidade heterogênea. Os AHC mostraram características genótípicas e fenotípicas distintas, sendo identificados 4 subgrupos. O primeiro subtipo foi definido pela mutação no gene *TCF1* ou HNF1 alfa; o segundo pela mutação do gene *CTNNB1*, cujo alvo é a Beta-catenina; a categoria sem mutações de HNF1alfa ou Beta-catenina foi dividida em 2 subgrupos dependendo da presença ou ausência de inflamação.

Em 2007, BIOULAC-SAGE et al. realizou a associação entre a classificação molecular do AHC com alguns marcadores imunoistoquímicos em uma série de 93 AHC ressecados. A partir das análises de expressão dos genes HNF1alfa e *CTNNB1* (Beta-catenina) pela técnica de RT-PCR e pelo padrão de expressão dos marcadores imunoistoquímicos LFAPB, GS, Beta-catenina, Amilóide A e Proteína C Reativa, estabeleceu-se uma estreita relação entre a expressão destes marcadores e o subtipo molecular com sensibilidade e especificidade estatisticamente significantes. Observaram

que os AHC com mutação de HNF1 alfa mostravam perda de expressão da proteína LFABP ($p < 0,0002$) com 100% de sensibilidade e especificidade. Houve uma forte associação (85% de sensibilidade e 100% de especificidade) entre o AHC com mutação da Beta-Catenina e a expressão citoplasmática difusa da GS e forte marcação nuclear da proteína Beta-Catenina ($p < 0,0005$). As expressões da proteína Amilóide A e da Proteína C-Reativa foram associadas aos AHC Inflamatórios ($P < 0,0001$), com sensibilidade e especificidade de 91%.

Posteriormente a Bioulac-Sage, outros grupos de estudo, sobretudo europeus (VAN DER BORGHT et al. 2007; NAULT et al. 2013), reclassificaram os AHC ressecados através da expressão imunohistoquímica destes marcadores, consolidando a classificação genotípica-fenotípica dos AHC (Tabela 1).

Em 2010, a Organização Mundial da Saúde (OMS) reconheceu essa classificação e ratificou os critérios para o diagnóstico imunohistoquímico dos AHC.

No início dessa década, vários centros mundiais de referência no tratamento das neoplasias hepatobilio-pancreáticas, tem revisitado seus arquivos de patologia, reclassificando os AHC, em subtipos moleculares, a partir de análise imunohistoquímica e publicando seus próprios resultados (BALABAUD et al. 2013). Tabela 2.

Tabela 1 - Classificação genotípica/fenotípica do AHC pelo mundo

Referência País/modelo	Tipo de análise	Número	Subgrupo molecular (%)				Inclassificável
			HNF1alfa	Inflamatório	Inflamatório e Betacatenina	Betacatenina	
Zucman-Rossi et al 2006 França /multicêntrico	Molecular em espécime	96	46	18	NS	13	23
Bioulac-Sage et al.2007 França/Monocêntrico	Molecular e IMQ em espécime	93	33	29	11	9	8
Van der Borgh et al.2007 Belgica/Monocêntrico	IMQ em espécime	33	NS	NS	NS	9	NS
Bioulac-Sage et al.2009 França/Monocêntrico	Molecular e IMQ em espécime	128	36	42	7	5	9
Dokmak et al.2009 França/Multicêntrico	IMQ em espécime	22	27	54	1	2	16
Farges et al. 2011 França/Monocêntrico	IMQ em espécime	25	4	24	32	32	8
Ronot et al. 2011 França Monocêntrico	IMQ em biópsia	47	23	72	NS	2	3
Van Aalten et al.2011 Holanda/Multicêntrico	IMQ em espécime	57	19	56	4	7	11
Sasaki et al. 2011 Japão/Monocêntrico	IMQ em espécime	14	7	50	NS	14	28
Bellamy et al. 2013 Reino Unido Monocêntrico	IMQ em espécime	64	56	24	8	8	5
Evason et al. 2012 EUA/Monocêntrico	Molecular e IMQ espécime e biópsia	70	NS	46	9	16	NS
Bioulac-Sage et al.2012 França/Multicêntrico	IMQ em bipsia	143	21	52	10	3	14
Sakellariou et al.2012 Reino Unido Multicêntrico	Molecular e IMQ espécime	33 (glicogenose)	0	79	3	3	15
Calderaro et al.2013 União Europeia Multicentrico	Molecular e IMQ espécime	25 (glicogenose)	0	44	8	20	20
Fonseca et al.2013 Bélgica/Monocêntrico	IMQ em espécime	37	27	51	5	8	5

Fonte: Adaptado de NAULT et al. (2013) IMQ = Imunoistoquímica; Espécime = peça cirúrgica; NS = não especificado.

Tabela 2 - Classificação Imunoistoquímica do AHC no Mundo

Séries/ Período	N	HNF1 alfa	Beta catenina	Inflamatório	Inclassificável	Misto (HNF1a + Inflamatório)
(Cliniques universitaires Saint-Luc-UCL) (1992-2012)	37	10	3	21	2	1
Heidelberg (2007-2011)	11	1		9		1
London Kings (1998-2011)	35	7	1	18	9	
NY (Mt Sinai) (2007-2011)	27	9		11	7	
San Francisco	12	3	3	2	4	
Seattle (2008-2011)	9	3	1	3	2	
Seoul (2008-2011)	2		1	1		
Taiwan	12	1	2	3	6	
Erasmus University Rotterdam -Holanda (2000-2010)	58	11	3	36	6	
Korea University Seoul 2013	8	3	1	4		

Fonte: BALABAUD et al. (2013)

1.5 SUBTIPOS MOLECULARES DE ADENOMAS HEPATOCELULARES

1.5.1 Adenomas com Mutação de HNF 1 alfa

Os AHC HNF1 alfa correspondem a 30-40% dos AHC. As mutações foram inicialmente descritas em 2002, através de técnicas genômicas, identificando perdas de heterozigosidade do cromossomo 12q que, nas análises subsequentes revelaram associações com as mutações somáticas do gene *TCF 1* ou HNF1 alfa (BLUTEAU et al. 2002).

Na maioria dos casos, as mutações do HNF1 alfa são somáticas e encontradas apenas nas células tumorais. No entanto, alguns pacientes carregam uma mutação germinativa herdada em um alelo do HNF1 alfa. Esta condição está também associada à diabetes de início da maturidade tipo 3 (MODY3), um tipo de diabetes não-insulino dependente. Adenomas que se desenvolvem em pacientes com MODY3 apresentam uma mutação somática que inativa o segundo alelo do gene HNF1 alfa nos hepatócitos, de acordo com o modelo *2-hits* descrito para a inativação da maioria dos genes supressores de tumor (VAXILLAIRE et al. 1997). Conseqüentemente, os pacientes com mutações germinativas de HNF1 alfa são mais predispostos a desenvolver adenomatose hepática (BACQ et al. 2003).

O gene HNF1 alfa pertence à família dos fatores nucleares de hepatócitos, sendo fatores de transcrição envolvidos no desenvolvimento normal do fígado. Em adição, o gene HNF1 alfa controla a diferenciação de hepatócitos, bem como o metabolismo da glicose e lipídios. A análise transcriptômica do HNF1 alfa, usando microarrays, revelou que as características observadas são a supressão da gliconeogênese, ativação da glicólise e estimulação da síntese de ácido graxo. Além disso, nos AHC HNF1 alfa mutados, vários fatores oncogênicos estão presentes levando a ativação do gene *mTOR*, da angiogênese, da ativação do ciclo celular e da proliferação celular. Essas alterações genótípicas e moleculares revelam um fenótipo típico, definindo um subgrupo de adenomas muito homogêneos caracterizados pela intensa esteatose intra-lesional (NAULT et al. 2013). No entanto, a presença de esteatose isoladamente é insuficiente para

diagnosticar os AHC HNF1 alfa, porque também pode estar presente em mais de 35% dos AHC subtipos Inflamatórios e Inclassificáveis. (ZUCMAN-ROSSI et al. 2006).

A expressão da proteína LFABP, uma das proteínas mais abundantes presentes nos hepatócitos normais e envolvida no metabolismo citoplasmático de ácido graxo, é especificamente *down*-regulada nos AHC HNF1 alfa mutados. Outras características deste subtipo molecular incluem a ausência de atipias citológicas e de infiltrado inflamatório. A coloração por IMQ distingue este subtipo dos demais, através da ausência de expressão da LFABP (especificidade, 100%; sensibilidade, 100%) em hepatócitos tumorais e expressão normal no fígado não tumoral (BIOULAC-SAGE et al. 2007).

1.5.2 Adenomas com Mutações da Beta-Catenina

As mutações do gene da Beta-catenina foram descritas pela primeira vez por CHEN et al. (2002) em 3 de 10 pacientes com AHC em Taiwan. Constituem aproximadamente 10% a 15% de todos os AHC diagnosticados (BIOULAC-SAGE et al. 2007).

Nos AHC Beta-catenina mutados, as mutações ocorrem predominantemente no exon 3 do gene *CTNNB1*, podendo também ser encontradas nos exons 7 e 8. Contudo, qualquer tipo de mutação, leva a ativação da via Wnt (RAFT et al. 2015).

Sob condições fisiológicas, em células não expostas a um sinal de Wnt, a proteína Beta-catenina é degradada através das interações com axina,

APC, e GSK-3. A fosforilação da Beta-catenina leva a sua ubiquitinação e subsequente degradação pelo proteossoma. Quando a via é ativada, proteínas Wnt se ligam aos receptores Frizzled/LRP na superfície da célula. Estes receptores sinalizam Dishevelled (Dsh) e Axina. Como consequência o complexo de degradação de Beta-catenina é inibido e esta proteína acumula-se no citoplasma. Essas mutações induzem ao acúmulo de Beta-catenina no citoplasma e sua translocação para o núcleo, onde interage com o fator celular-T/Fator Intensificador linfoide (TCF/LEF, T-CellFactor/LymphoidEnhancerFactor), controlando fatores transcricionais que regulam a atividade de genes como C-MYC e MMP; sendo estes associados aos eventos de progressão tumoral, proliferação e invasão (LOGAN e NUSSE 2004).

A correlação genótipo/fenótipo revela características marcantes do AHC Beta-catenina mutado. Estes se caracterizam histologicamente pela presença de atipias citológicas, displasias e formações pseudoacinares, o que dificulta o diagnóstico diferencial com o CHC bem diferenciado, principalmente em fígados não cirróticos (BIOULAC-SAGE et al. 2007).

Este subtipo de AHC tem sido descrito em homens. A prevalência de transformação maligna deste AHC é 10 vezes maior em homens do que em mulheres e está associado a alterações metabólicas, principalmente, doença do armazenamento de glicogênio e história de uso crônico ou de tratamento com andrógenos. Os AHC Beta-catenina mutados representam dois terços de todos os adenomas transformados (FARGES et al. 2011).

Pela IMQ, o diagnóstico é feito através das análises de expressão das

proteínas Beta-catenina e GS. Caracterizam-se pela coloração nuclear aberrante da Beta-catenina e uma forte expressão homogênea citoplasmática de GS. A GS cataliza a conversão do glutamato e amônia em glutamina no fígado. A GS é um alvo do gene *CTNNB1*, e é regulada positivamente quando esta via é constitutivamente ativada. O padrão de marcação imunistoquímico da GS é homogêneo e difuso, o que difere do padrão *map like* observado na Hiperplasia Nodular Focal. Porém, a marcação nuclear da Beta-catenina é de difícil interpretação, por estar presente apenas em alguns núcleos. A expressão da Beta-catenina apresenta maior especificidade e menor sensibilidade que a GS; contudo a GS pode ter sua expressão sensível ao fluxo de sangue, colestase e insuficiência hepática (BIOULAC-SAGE et al. 2011b). Conseqüentemente, para aumentar a sensibilidade, a análise da expressão da Beta-catenina deve ser combinada com a IMQ para GS. A expressão conjunta destes 2 marcadores, apresenta especificidade aproximada de 100%, com uma sensibilidade entre 75 a 85% para o diagnóstico de mutação (BIOULAC-SAGE et al. 2007).

Nos casos em que a expressão da GS é heterogênea, a interpretação se torna mais difícil, exceto se a marcação nuclear da Beta-catenina for observada. Nesses casos a análise molecular do gene *CTNNB1* deve ser requerida para definição diagnóstica. (BIOULAC-SAGE et al. 2011).

1.5.3 Adenomas Hepatocelulares Inflamatórios (AHC I)

Os AHC I representam um subgrupo heterogêneo de adenomas, responsáveis por 40 a 50% de todos os AHC (BIOULAC-SAGE et al. 2011b).

Estes tumores predominam principalmente em mulheres, em associação com obesidade, esteatose hepática, diabetes mellitus e glicogenose tipo I. A maioria das pacientes tem histórico de uso de ACO, sendo que outro fator de risco relacionado é a ingestão de álcool (BIOULAC-SAGE et al. 2013b).

Histologicamente são caracterizados pela presença de infiltrado inflamatório polimórfico, vasos distróficos, dilatações sinusoidais e graus variados de esteatose intralesional, porém menos extensa em relação ao AHC HNF 1 alfa. Caracterizam também por exibir áreas de proliferação ductular, ao contrário dos outros subtipos, o que no passado, levaram os AHC I a serem classicamente definidos como Hiperplasia Nodular Focal Telangiectásico (PARADIS et al. 2007).

No soro, apresentam superexpressão de proteína Amilóide A e da PCR, que são 2 proteínas de fase aguda da inflamação. Na imunistoquímica os AHC I, demonstram forte e difusa positividade aos reagentes respectivos demarcando claramente o tumor do tecido hepático não tumoral (BIOULAC-SAGE et al. 2007).

Anemia da inflamação crônica e síndrome inflamatória sistêmica podem estar associadas ao AHC I, sendo consideradas síndromes paraneoplásicas que regredem após a ressecção do adenoma.

Os AHC I estão associados ao risco aumentado de sangramento, que pode ocorrer em mais de 30% dos casos (BIOULAC-SAGE et al. 2007, 2011b).

Notoriamente, um subconjunto de AHC I (cerca de 10%) podem também apresentar mutação do gene da Beta-catenina e, conseqüentemente, mostram um aumento do risco de transformação maligna (DHINGRA e FIEL 2014).

Atualmente, 5 vias de sinalização moleculares são identificadas no AHC I: *IL6ST* (codificação para gp130), *STAT 3*, *GNAS* e mutações nos genes *JAK 1* e *FRK* (REBOUISSOU et al. 2009; PILATI et al. 2011; NAULT et al. 2012; PILATI et al. 2014). Todas estas alterações genômicas do AHC I, agem através de mecanismos semelhantes levando à ativação constitutiva e descontrolada da via JAK-STAT (NAULT et al. 2013; GOLTZ e FISCHER 2015).

Mutações somáticas ativadoras de gp130 são encontradas em 65 % dos AHC I (REBOUISSOU et al. 2009) e conduz à uma ativação constitutiva do STAT3 (*Signal Transducer and Activator of Transcription*) na ausência de IL- 6. Raros casos de CHC também carregam mutações no gp130. Curiosamente, estes carcinomas desenvolvem-se em fígados normais e também revelam mutação da Beta-catenina (GUICHARD et al. 2012).

O STAT 3, representa o segundo gene mutado nos AHC I, presente em 5 % dos casos (PILATI et al. 2011). Estas mutações levam a substituições de aminoácidos, envolvidos na dimerização do STAT3, que

são fosforilados e ativados na ausência de IL-6 e também levam a uma ativação constitutiva descontrolada da via inflamatória.

O gene GNAS é encontrado mutado em 5% dos AHC I (NAULT et al. 2012). Mutações típicas da ativação do GNAS são descritas em AHC esporádicos e em pacientes com Síndrome de McCune-Albright, uma doença rara, caracterizada pela presença de “manchas café com leite” na pele, displasia fibrosa óssea, e ao desenvolvimento de adenomas de hipófise e tireóide (WEINSTEIN et al. 2004).

As mutações no gene FRK (*fyn-related Src family tyrosine kinase*), membro da família das tirosina quinases não receptoras, ocorrem em 10% dos AHC I e resultam na fosforilação do STAT 3 (PILATI et al. 2014).

Em aproximadamente 15% dos AHC I não se identifica um defeito genético específico. Considera-se que outros genes e vias de sinalização que levam à ativação de JAK/STAT3, necessitam ser melhor estudados e identificados nos AHC (GOLTZ e FISCHER 2015).

1.5.4 Adenomas não Classificáveis (Inclassificáveis)

O último subgrupo molecular dos AHC corresponde a menos de 10% dos casos. Representa um grupo heterogêneo de tumores que por definição, não apresentam as características histológicas, moleculares e de IMQ clássicas dos outros subtipos (BIOULAC-SAGE et al. 2007).

Até agora, a sua patogênese permanece desconhecida. Dados de estudos prévios mostraram que alguns AHC previamente identificados como inclassificáveis, eram de fato, AHC com mutação do gene Beta-catenina nos

éxons 7-8, (PILATI et al. 2014). Aparentemente, o risco de transformação maligna destes tumores é baixo (BALABAUD et al. 2013; BIOULAC-SAGE et al. 2007, 2013b).

1.6 ASPECTOS MACROSCÓPICOS

Macroscopicamente, os AHCs podem ser representados por lesões solitárias ou múltiplas, com limites mal definidos, não-capsulados e eventualmente pedunculados (BIOULAC-SAGE et al. 2011b).

Entre os subtipos de AHCs, os subtipos HNF1alfa mutados e os inflamatórios podem formar múltiplos nódulos ou massas. A adenomatose hepática pode apresentar até centenas de lesões que podem ser visualizadas na ultrassonografia intra-operatória. Os AHCs apresentam consistência macia e carnosa, podem apresentar dimensões variáveis, desde lesões microscópicas até lesões que ocupam todo o fígado.

O AHC pode apresentar coloração e textura semelhantes ao fígado, não tumoral, porém podem ser mais facilmente visualizados quando apresentam esteatose intralesional, áreas de congestão, hemorragia ou alterações degenerativas. Quando ocorre hemorragia, o sangue pode se espalhar facilmente para o fígado ou para cavidade peritoneal, pela ausência de uma capsula verdadeira ou fibrótica.

A presença de hematoma subcapsular está frequentemente associada á áreas de rotura tumoral.

O fígado não neoplásico é tipicamente não cirrótico, porém observam-se graus variados de esteatose, principalmente nos AHC I. Fibrose e consistência heterogênea podem ocorrer quando relacionados com hepatopatia alcoólica, esteatohepatite não alcoólica, glicogenoses, anomalias vasculares intra-hepáticas, entre outras. Em algumas situações, podem ser encontrados simultaneamente, diversos adenomas de vários subtipos, assim como outros nódulos como hiperplasia nodular focal, hemangiomas, peliose e CHC (BIOULAC-SAGE et al. 2013b).

1.7 CARACTERÍSTICAS HISTOPATOLÓGICAS

As características microscópicas dos AHCs incluem a presença de hepatócitos com abundante citoplasma hidrópico, dispostos em placas ou trabéculas pouco espessas, com rede reticular preservada e artérias de paredes finas. As artérias e arteríolas não são acompanhados por outros elementos do trato portal, como ductos biliares, veia porta, ou tecido fibroconjuntivo. Porém, a presença de ductos biliares não exclui a possibilidade de AHC (BIOULAC-SAGE et al. 2011a). Frequentemente são encontradas áreas de dilatação sinusoidal, peliose, infarto e hemorragia que podem resultar em edema e fibrose. Atipias citológicas podem estar presentes, porém, são raras (GRAZIOLI et al. 2001).

Notadamente, as características histológicas podem ser heterogêneas e específicas para cada subtipo da classificação molecular (BIOULAC-SAGE et al. 2013b).

1.8 ADENOMATOSE HEPÁTICA

Em sua descrição original, FLEJOU et al. (1985) definiu adenomatose hepática quando mais de 10 nódulos adenomatosos são encontrados no fígado, na ausência de Glicogenose ou de outra patologia hepática de base e, sem associação com o uso de ACO.

Porém, esta definição antecede em mais 20 anos o conhecimento e progresso proveniente da classificação molecular dos AHC. À luz dos conhecimentos atuais, muitos pesquisadores consideram a adenomatose hepática uma entidade semelhante aos demais subtipos de adenomas, propondo abolir a sua definição original (THAPAR et al. 2015).

AHC múltiplos podem ocorrer tanto em fígados normais, como em hepatopatias associadas a glicogenose ou doenças vasculares subjacentes, sendo que até um terço dos pacientes com AHC podem ser diagnosticados com tumores múltiplos nos exames de imagem, ressaltando que muitas vezes, o número de adenomas pode ser subestimado (AGRAWAL et al. 2014).

Condições como obesidade, esteatose hepática e síndrome metabólica estão associadas com múltiplos AHC. Na adenomatose, o subtipo predominante é o AHC HNF1 alfa mutado, que mostra baixo risco de transformação maligna. Porém, a presença de múltiplos nódulos pode ser encontrada em qualquer subtipo da classificação molecular (FRULIO et al. 2014).

CHICHE et al. (2000) descreveu 2 apresentações clínicas: uma maciça, com hepatomegalia secundária a várias massas de adenomas, e outra multifocal, na qual o fígado mantém suas dimensões normais com predomínio de 1 ou 2 adenomas sobre as demais lesões menores.

A presença de complicações, como hemorragia e transformação maligna não estão relacionadas com a quantidade de nódulos, e sim, com as dimensões dos nódulos e o gênero dos pacientes (THAPAR et al. 2015).

A avaliação e acompanhamento clínico a longo prazo dos pequenos nódulos de AHC residuais, após ressecção cirúrgica das lesões dominantes, mostraram que 90% dos tumores permanecem estáveis, alguns podem apresentar regressão, ou até desaparecimento completo (DOKMAK et al. 2009).

De uma forma geral, o manejo e o tratamento da adenomatose hepática devem seguir os mesmos parâmetros dos AHC solitários ou múltiplos, incluindo desde a conduta conservadora com vigilância, TAE (Embolização Transarterial), RFA (Radiofrequência), ressecção cirúrgica até o transplante hepático (FRULIO et al. 2014).

O aconselhamento genético é recomendado para os pacientes com adenomatose hepática, particularmente para a variante familiar. Screening para os familiares é recomendado, assim como a investigação de diabetes de início da maturidade tipo 3 (AGRAWAL et al. 2014).

1.9 DIAGNÓSTICO POR EXAMES DE IMAGEM

A ultrassonografia do abdome desempenha um papel importante na detecção da lesão hepática, e usualmente é o primeiro exame a ser realizado, porém apresenta baixa acurácia. A ressonância magnética nuclear (RMN) e a tomografia computadorizada (TC) helicoidal multislice são as modalidades de escolha para o diagnóstico radiológico, sendo que a RMN apresenta a maior sensibilidade e especificidade (MCINNES e HIBBERT 2015).

Tradicionalmente, exames axiais como a TC e a RMN evidenciam rápida impregnação do material de contraste pelo tumor na fase arterial, seguida da rápida lavagem do material de contraste nas fases portal e de equilíbrio. Estes achados são similares aos observados nas lesões de hiperplasia nodular focal e o diagnóstico diferencial entre as lesões através dos exames de imagem é fundamental. Entretanto, os AHC podem apresentar sinal aumentado de gordura na RMN, e heterogeneidade relacionada a focos de necrose e hemorragia intralesional. Por outro lado, a Hiperplasia Nodular Focal pode apresentar uma cicatriz central característica, principalmente nas lesões maiores que 3 cm (GRAZIOLI et al. 2001).

Recentemente, dois agentes de contrastes hepatoespecíficos da RMN, têm sido incorporados na prática clínica, com resultados promissores para o diagnóstico diferencial entre Hiperplasia Nodular Focal e as outras neoplasias hepatocelulares. O Gadobenato de dimeglumina (Gd-BOPTA),

conhecido como Multihance (Bracco Diagnostics, Milan, Italy) e o Ácido gadoxético, conhecido como Eovist nos EUA e Primovist, no resto do mundo (Bayer Pharmaceuticals, Whippany, NJ) têm sido utilizados com este intuito (MCINNES e HIBBERT 2015; MATOS 2015). O racional justifica-se que na Hiperplasia Nodular focal, por apresentar hepatócitos funcionais e ductos biliares, o contraste persiste nas fases tardias, ou fase hepatobiliar, ao contrário dos AHC ou outras lesões hepatocelulares.

Embora a acurácia no diagnóstico diferencial entre HNF e AHC sejam altos, os estudos nesta área são escassos, heterogêneos e com alto risco de viés, indicando que a precisão do diagnóstico destas lesões pode estar superestimada. Além do mais, o AHC I também pode apresentar sinal hiperintenso na fase hepatobiliar, mimetizando os achados de HNF (MATOS 2015).

Com a introdução da classificação genótipo-fenótipo dos AHC, as características dos exames de imagem também, tem sido estudados na tentativa de se estabelecer associações típicas para cada subtipo molecular (NAULT et al. 2013).

Na RMN, o AHC I caracteriza-se por sinal hiperintenso nas imagens ponderadas em T2, correspondendo a focos de dilatação sinusoidal e persistência do realce arterial do contraste até nas fases venosas tardias.

O AHC HNF1 alfa mostra esteatose difusa, facilmente identificada na RMN, caracterizada pela queda difusa do sinal na sequência fora de fase, das imagens ponderadas em T1. Na fase do estudo com contraste, o AHC HNF 1 alfa mostra realce arterial que não persiste na fase venosa. A

sensibilidade e especificidade para detecção de AHC I por RMN é por volta de 80% e do AHC HNF 1 alfa permanece entre 80 a 100% (GRAZIOLI et al. 2013).

Nos AHC Beta-catenina mutados, não existe uma característica típica pela RMN, podendo ocorrer lesão hipervascular homogênea, ou heterogênea, e na ausência de gordura intralesional, torna-se um desafio diferenciar dos CHC (GRAZIOLI et al. 2013).

De acordo com as características dos exames de imagem, alguns grupos fazem o diagnóstico inicial de AHC e definem as condutas clínicas a partir dos achados da RMN (NAULT et al. 2013). Nos casos, com as características típicas de AHC HNF 1 alfa, não é necessária a biópsia, e a conduta é conservadora. Nos casos típicos de AHC I, a biópsia deve ser feita nas lesões menores que 5cm, com intuito de confirmação histopatológica e IMQ, para o diagnóstico diferencial com os AHC com mutação da Beta-catenina associada. As lesões maiores que 5 cm devem ser ressecadas cirurgicamente.

Nas lesões, em que não há particularidades típicas de AHC HNF1 alfa ou AHC I, a biópsia percutânea da lesão é necessária para a identificação dos AHC Beta-catenina, os quais apresentam formalmente a indicação cirúrgica.

Em relação aos exames de imagem funcionais, os AHC podem apresentar achados de falso-positivos no PET CT com 18 FDG, sobretudo, o subtipo AHC HNF1 alfa, simulando neoplasias malignas primárias ou metastáticas para o fígado (LEE et al. 2016).

A Tabela 3 resume as principais características dos subtipos moleculares de AHC.

Tabela 3 - Características dos subtipos de Adenomas de acordo com a classificação Molecular e fenotípica dos AHC

Subtipos de AHC	HNF 1 alfa	Beta- catenina	Inflamatório	Inclassificável
Características Moleculares	Mutações alélicas do gene TCF1	Mutação do gene CTNNB1	GP130, GNAS, STAT3, JAK1, FRK Ativação da via JAK STAT	Indefinida
Epidemiologia	35-40%	10-15% > risco no Sexo masculino	35-50% Relacionado a obesidade, etilismo, síndrome metabólica	<10% Sem predileção por gênero
Características Clínicas	Associado a diabetes MODY 3 Adenomatose Não maligniza	Alto risco de transformação maligna Associado ao uso de andrógenos	Maior risco de sangramento Síndrome Inflamatória IMC alto	Variável
Patologia	Marcada esteatose Intralesional Ausência de atipias	Formações pseudoglandulares Atipias celulares	Dilatação sinusoidal Infiltrados inflamatórios Vasos distróficos	Sem morfologia específica
Imunoistoquímica	Perda de pressão de LFABP	Forte expressão da GS no citoplasma e da Beta- catenina no núcleo	Expressão da Proteína Amiloide do soro e PCR. Em 10% Mutação da Beta-catenina associado	Sem padrão definido
Características pela RMN	Esteatose difusa na lesão com queda de sinal na seqüência fora de fase, em imagens ponderadas em T1. Realce arterial que não persiste nas fases tardias.	Massa hipervascular pode ser heterogênea, a depender de sangramento ou necrose. Pode mimetizar CHC	Hiperintenso, em T2, realce arterial do contraste persistente nas fases venosas tardias	Sem características típicas
PET CT	Falso positivo			

1.10 CONDUTA TERAPÊUTICA

Atualmente não existem guidelines ou diretrizes internacionais para acompanhamento, tratamento e vigilância dos AHC (LIAU et al. 2013; BLANC et al. 2015; GOLTZ e FISCHER 2015).

As possibilidades de tratamento variam desde a suspensão do uso de ACO, vigilância clínica, ressecção cirúrgica, embolização arterial, radiofrequência e até transplante de fígado (AGRAWAL et al. 2014; VIJAY et al. 2015).

Historicamente, o tratamento tem sido definido por uma conduta mais agressiva, em vista da imprevisibilidade do comportamento das lesões. Desde a década passada, parâmetros clínicos têm norteado a conduta cirúrgica, sendo que, muitas vezes, a indicação de ressecção é baseada na experiência da equipe cirúrgica e na localização das lesões (STOOT et al. 2010; VAN AALTEN et al. 2012).

Numa revisão sistemática com mais de 1600 casos de AHC ressecados, a transformação maligna ocorreu numa frequência de 4,2%; e 95% destes casos, em pacientes com adenomas maiores ou igual a 5 cm (STOOT et al. 2010).

Em uma outra revisão sistemática, que abordou o risco de sangramento e rotura dos AHC em 1176 pacientes, no período de 1969 a 2011; a hemorragia foi relatada com uma frequência de 27% e a rotura com hemorragia intraperitoneal em 17,5% dos pacientes. Seis dos 13 artigos definiram o tamanho das lesões, na qual a hemorragia ocorreu nos AHC

menores que 5 cm, inclusive com relato de sangramento em lesão de 1 cm. Os autores concluíram que hemorragia e ruptura são complicações comuns em pacientes com AHC (VAN AALTEN et al. 2012).

De uma forma geral, existe um consenso, que as mulheres com AHC devem ser aconselhadas a suspender o uso de ACO ou qualquer outra terapia de reposição hormonal, sendo que existem relatos da regressão parcial dos AHC, apenas com a suspensão do ACO. Por outro lado, em alguns casos podem ocorrer crescimento e ruptura dos adenomas, mesmo após a cessação dos ACO, sugerindo que outros fatores adicionais, como a obesidade, possam desempenhar um papel na patogênese tumoral.

Recentemente DOKMAK e BELGHITI (2015), em Beaujon na França, publicaram um artigo com relato de casos, de remissão dos adenomas, apenas com dieta e perda de peso, e recomendam que esta conduta conservadora deva ser considerada em pacientes com obesidade mórbida.

Baseado nas séries históricas e determinado pelo tamanho da lesão, nódulos maiores que 5 cm devem ser ressecados para evitar o risco de hemorragia e o risco de malignização, por outro lado existe grande controvérsia no melhor manejo para pacientes com nódulos < que 5 cm (BLANC et al. 2015).

Com os conhecimentos e avanços no entendimento dos AHC, a partir da classificação molecular dos adenomas e suas características fenotípicas, vários centros do mundo têm realizado protocolos de conduta, a partir dos subtipos moleculares dos AHC (NAULT et al. 2013; AGRAWAL et al. 2014; BLANC et al. 2015).

Existe uma concordância de que todos os AHC Beta-catenina identificados necessitam ser ressecados, independentemente do tamanho, assim como todos os adenomas no sexo masculino. Nos AHC HNF1 alfa, é possível adotar uma conduta mais conservadora, apenas com a suspensão do ACO e vigilância. Nos AHC I, que possuem a mutação da Beta-catenina, a conduta deve ser cirúrgica, mesmo nas lesões menores que 5cm (BLANC et al. 2015).

1.11 ASPECTOS TÉCNICOS DA CIRURGIA

Em relação ao tratamento cirúrgico, alguns aspectos precisam ser destacados: a abordagem via laparoscópica deve ser sempre considerada, principalmente nas lesões periféricas e em segmentos anteriores, pelos benefícios da cirurgia minimamente invasiva (HERMAN et al. 2012). Por outro lado, a ressecção de lesões localizadas em segmentos postero-superiores (I, IV A, VII e VIII) e ressecções hepáticas maiores demandam procedimentos complexos e tecnicamente exigentes, que devem ser reservados para equipes altamente qualificadas (COELHO et al. 2016).

Não é necessária a realização de linfadenectomia ou margens cirúrgicas amplas. A utilização da ultrassonografia intra-operatória é fundamental, pois muitas lesões não são palpáveis ou visíveis, sendo que pode ser difícil a delimitação da lesão com o restante do parênquima hepático esteatótico (AGRAWAL et al. 2014).

Em pacientes com um grande AHC, uma abordagem cirúrgica em 2 tempos com embolização da veia porta, pode ser necessária.

Na presença de adenomas com shunt venoso intra-hepático, fator relacionado à sua patogênese, o tratamento por embolização percutânea ou ressecção deve ser realizado. A falha no fechamento do shunt pode resultar em progressão de AHC residuais (KAWAKATSU et al. 1994; VIJAY et al. 2015).

1.12 EMBOLIZAÇÃO TRANSARTERIAL (TAE)

Pacientes com hemorragia tumoral devem preferencialmente ser tratados, inicialmente, por TAE seletivo da lesão, após estabilização hemodinâmica, visto que a cirurgia de urgência neste cenário pode trazer alta morbidade e mortalidade (KARKAR et al. 2013).

Ressecção hepática é considerada somente após a reabsorção do hematoma, geralmente 6 meses após a hospitalização inicial. TAE pode resultar em regressão ou involução completa do tumor, e em alguns casos a ausência de tecido residual na RMN pode justificar uma abordagem não-cirúrgica (AGRAWAL et al. 2014).

A possibilidade de regressão de tumor após TAE para AHC hemorrágico levou a utilização desta abordagem para o tratamento eletivo. TAE pode ser usado como opção, no tratamento da lesões irresecáveis ou sintomáticas na adenomatose e também no pré-operatório, para grandes

lesões, como estratégia para redução no tamanho do tumor (HUURMAN e SCHAAPHERDER 2010; VIJAY et al. 2015).

1.13 RFA (RAFIOFREQUÊNCIA)

Ablação por radiofrequência pode ser adequada para pacientes que não são candidatos a cirurgia, por hepatopatia crônica associada ou risco cirúrgico alto. Também pode ser uma opção para as mulheres que expressam um desejo ativo de gravidez, nos tumores de localização central, ou que apresentam progressão dos tumores residuais após a ressecção (THAPAR et al. 2015). O tamanho do AHC deve ser menor que 4 cm e idealmente menor que 3 cm para uma ablação eficaz, e a experiência inicial sugere que é segura e bem tolerada (RHIM et al. 2008).

1.14 TRANSPLANTE DE FÍGADO

A presença de múltiplos nódulos adenomatosos irresecáveis já não é mais uma indicação absoluta de transplante de fígado, como em décadas passadas, e um resultado favorável a longo prazo não justifica a complexidade do procedimento e a escassez de enxertos (AGRAWAL et al. 2014; THAPAR et al. 2015).

Em uma recente publicação europeia (CHICHE et al. 2016), a partir de um estudo retrospectivo multicêntrico europeu, no período de 1986 a 2013, compreendendo 49 pacientes em que foram revisados todos os casos

de transplante de fígado para adenomatose hepática deste continente, observou-se que 16 tinham glicogenose e 7 apresentaram anormalidades vasculares hepáticas. As principais indicações para o transplante foram uma suspeita de CHC (15 pacientes) ou uma prova histológica de malignização (16 pacientes). Porém, na análise do explante, apenas 17 pacientes apresentaram transformação maligna dos adenomas, sendo que 3 pacientes com CHC, apresentaram recorrência após o transplante.

De acordo com as análises de subgrupos e consenso dos autores, foi determinado um algoritmo para indicação de transplante de fígado na adenomatose, baseado nesta experiência: presença de 1 critério maior: confirmação histológica de 1 ou mais adenomas transformados em CHC ou 3 ou mais critérios menores: ocorrência de 2 ou mais episódios de hemorragias com repercussão hemodinâmica, 2 ou mais hepatectomias prévias, presença de AHC Beta-catenina mutado ou AHC Inflamatório, hepatopatia associada e idade > 30 anos.

Outros autores defendem uma conduta mais conservadora, reservando o transplante de fígado para casos excepcionais, como adenomas múltiplos irreseccáveis, adenomas irreseccáveis em homens, adenomas em fígados com shunt porto sistêmico intra-hepático e em pacientes com glicogenose Tipo 1, associado a adenomatose. Embora o transplante hepático forneça tratamento definitivo para a glicogenose Tipo I, corrigindo o defeito enzimático associado, a indicação deve ser individualizada e baseada na condição do parênquima hepático subjacente (AGRAWAL et al. 2014).

1.15 ADENOMAS HEPATOCELULARES E GRAVIDEZ

Outro motivo de debate e discussão na literatura é a melhor conduta nas pacientes jovens, portadoras de pequenos adenomas com desejo de gravidez. Devido à escassez dos casos, não existe qualquer algoritmo baseado em evidências, e a conduta tem sido baseada em séries de casos (BLANC et al. 2015).

Considerando que a gestação é um estado hiperdinâmico, e que existe um intenso estímulo hormonal, as gestantes portadoras de adenoma possuem um risco aumentado de crescimento, sangramento e ruptura das lesões, levando a choque hipovolêmico (PARANGI et al. 2007; BRÖKER et al. 2012).

Alguns grupos advogam ressecção dos adenomas antes da gravidez, enquanto que outros, defendem uma conduta mais conservadora, com monitorização do adenoma a cada 6 semanas, por exame de ultrassonografia (BRÖKER et al. 2012).

No entanto, as pacientes com adenomas > 5 cm, ou aquelas que apresentaram complicações relacionadas ao adenoma em gestações anteriores, devem ser submetidas à ressecção cirúrgica anterior à gravidez. Radiofrequência ou embolização pode ser uma opção a ser considerada nos casos não passíveis de ressecção. Quando o diagnóstico é feito na gravidez, a cirurgia pode ser indicada, excepcionalmente nas grandes lesões e nas pacientes sintomáticas, preferencialmente realizadas no segundo semestre (AGRAWAL et al. 2014).

1.16 DECISÃO TERAPÊUTICA

No processo de decisão terapêutica, deve-se considerar os riscos gerais das complicações dos AHC, como sangramento em torno de 30% e malignização entre 4 a 10% (AGRAWAL et al. 2014); assim como o potencial risco do tratamento envolvido: hepatectomia, que pode apresentar mortalidade de até 5% com morbidade até 30% e transplante hepático, com uma mortalidade perioperatória de 10%, além da morbidade e das complicações tardias (ALOIA et al. 2009; CHICHE et al.2016).

As controvérsias em relação a terapêutica desta doença heterogênea, são baseadas na maioria das vezes, sobre o tratamento do risco, e não propriamente sobre a lesão, que a depender da sua morfologia e biologia, pode ser indolente, apresentando em algumas situações risco mínimo, ao contrário das complicações de um tratamento cirúrgico.

Neste contexto a individualização de cada caso é fundamental, além dos parâmetros clínicos, sexo e tamanho das lesões, a análise imunoistoquímica e molecular dos AHC, surge como uma ferramenta valiosa, para melhor entendimento da biologia tumoral, contribuindo para decisão terapêutica.

Seguindo os principais centros de referência hepatobiliares do mundo, que padronizaram esta classificação na rotina clínica nos

materiais de biopsia; este trabalho pretende estudar a série desta Instituição, à luz do conhecimento IMQ/Molecular, correlacionando com os parâmetros clínicos e sistematizar a técnica, para que possa ser aplicada na rotina diária, contribuindo para a assertividade na decisão terapêutica.

2 OBJETIVOS

1. Classificar molecularmente os adenomas hepáticos operados no A.C.Camargo Cancer Center no período de 2001 a 2014 através do perfil de expressão imunohistoquímica de marcadores específicos;
2. Correlacionar os subtipos moleculares de adenomas hepáticos com as principais características clínicas e histopatológicas.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA

Foram incluídos no estudo, pacientes com o diagnóstico histopatológico de AHC nos espécimes cirúrgicos dos pacientes submetidos à hepatectomias no A.C.Camargo Cancer Center entre o período de 2001 a 2014; sendo excluídos os pacientes que não apresentavam material histopatológico (blocos de parafina e lâminas) disponível para revisão.

As informações clínicas relevantes foram obtidas dos prontuários médicos dos pacientes, após aprovação do Comitê de Ética e Pesquisa da Instituição (Anexo 1).

As lâminas contendo cortes histológicos representativos dos AHC corados pela hematoxilina e eosina foram revistas por um patologista, para a identificação das características:

- 1 Esteatose: graduada em graus: 1. Leve, até 33% da área total; 2. Moderada, de 34 a 66% da área total; 3. Acentuada, esteatose em mais de 66% da área examinada.
- 2 Infiltrado inflamatório intralesional: presença de infiltrado inflamatório crônico de permeio na área tumoral: 1. Leve (até 25%), 2. Moderado (25 a 50% de infiltrado) e 3. Acentuado (acima de 50% de infiltrado inflamatório em relação as células tumorais).

- 3 Presença de arranjo ou formação pseudoacinar dos hepatócitos: classificada como presente ou ausente.
- 4 Presença de atipias celulares em hepatócitos: classificada como presente ou ausente.
- 5 Áreas de telangiectasias, hemorragias, presença de vasos com paredes espessas, presença de dilatação sinusoidal e de proliferação ductular: foram classificadas como presentes ou ausentes.

Dados demográficos, epidemiológicos, clínicos e cirúrgicos (incluindo avaliação pré-operatória, técnica cirúrgica e complicações) e também de seguimento dos pacientes, foram coletados a partir dos prontuários médicos da instituição.

Ressecção cirúrgica foi realizada em pacientes sintomáticos ou em lesões maiores (acima de 5 cm); quando não se podia excluir a possibilidade de carcinoma pelos exames de imagem, ou nas mulheres jovens portadoras de AHC com desejo de gravidez.

Os pacientes foram operados pela equipe cirúrgica do Departamento de Cirurgia Abdominal do A.C.Camargo Cancer Center, sendo incluídas as cirurgias realizadas de forma eletiva e também as de urgência. Dois casos foram submetidos à cirurgia de transplante hepático, realizados pela equipe de Transplante de Fígado da mesma Instituição.

Durante o pré-operatório, os pacientes foram submetidos aos exames de imagem, incluindo: ultrassonografia abdominal, tomografia abdominal e ressonância magnética. Em alguns poucos casos, a biópsia hepática

percutânea foi realizada somente quando o diagnóstico por imagem foi inconclusivo.

Em relação às técnicas cirúrgicas realizadas, os casos foram operados por via aberta convencional e por via laparoscópica; sendo os principais critérios para indicação da via laparoscópica as lesões menores, de localizações periféricas e nos segmentos hepáticos anteriores.

As cirurgias incluíam todos os tipos de ressecções hepáticas a depender do tamanho da lesão, número de nódulos e localização. Sendo realizadas segmentectomias, bissegmentectomias, ressecções não regradas e hepatectomias maiores (quando há ressecção de 3 ou mais segmentos hepáticos). As hepatectomias totais foram reservadas aos casos de transplantes.

As seguintes variáveis clínicas foram coletadas e analisadas: gênero, idade, índice de massa corpórea, uso de ACO e hormônios, doenças prévias associadas, neoplasias associadas, marcadores tumorais, resultados dos exames de imagem, número e tamanho dos nódulos, tratamentos percutâneos (TAE e RFA), dados cirúrgicos (acesso convencional, ou laparoscópico, tipos de ressecção hepática), tempo de internação, complicações pós operatórias de acordo com a classificação de Clavien – Dindo (DINDO et al. 2004), tempo de internação, fístulas biliares, sangramento, necessidade de radiologia intervencionista, reoperação, hérnias, presença de recidiva tumoral e seguimento clínico.

Após a revisão histopatológica, as lâminas de vidro com os cortes das neoplasias foram encaminhadas para a realização dos exames

imunoistoquímicos. A reação imunoistoquímica para a pesquisa dos marcadores LFABP, Amiloide A, GS, Beta-catenina e PCR foi realizada seguindo os protocolos já estabelecidos no Laboratório de imunoistoquímica do Departamento de Anatomia Patológica do A.C.Camargo Cancer Center.

3.2 REAÇÕES IMUNOISTOQUÍMICAS

As lâminas previamente selecionadas contendo área representativa da neoplasia foram identificadas com etiquetas de códigos de barras e processadas no equipamento Benchmark XT (Ventana) para desparafinização em solução de EZ PREP e recuperação antigênica por calor em solução de pH alto, com temperatura e tempo previamente padronizados para cada anticorpo. A peroxidase endógena foi bloqueada por 5 minutos utilizando-se o reagente de bloqueio de peroxidase (ultraView Universal DAB Inhibitor (3% H₂O₂), seguido de lavagem em solução apropriada (Wash-buffer). Em seguida, os cortes foram incubados com anticorpos primários (LFABP -policlonal - Abcam®; Beta-catenina - clone 17C2, Neomarkers®; PCR - clone Y284, Abcam ®; Amiloide A - clone MC1, Dako®, GS - policlonal- Abcam®) por tempo previamente padronizado. Na sequência, os cortes foram incubados com polímero HRP (HRP Multimer) com subseqüentes lavagens em tampão. Logo após, foram incubados com cromógeno Diaminobenzidina (DAB), lavados em tampão e contracorados com hematoxilina (Ventana). Seguiu-se com lavagem com solução própria, água com detergente e água corrente destilada. As lâminas foram

desidratadas em álcool, xilol e montadas em equipamento automatizado (Tissue-Tek Film).

As informações sobre a interpretação da marcação de cada anticorpo utilizado seguem abaixo:

Quadro 1 - Padrão de interpretação dos anticorpos

Anticorpos	Padrão de expressão	Marcação esperada	
		Normal	AHC
LFABP	Citoplasma/ núcleo	marcação difusa	HNF1alfa: ausência de expressão
Amiloide A PCR	Citoplasma	negativo	Inflamatórios: marcação forte
GS	Citoplasma	marcação predominante perivenular	Beta-catenina mutados ou ativados: marcação difusa
Beta-catenina	Membrana celular	marcação forte na membrana celular	Beta-catenina mutado marcação nuclear e citoplasmática

3.3 CARACTERIZAÇÃO DOS SUBTIPOS MOLECULARES

Os subtipos de AHC foram determinados de acordo com o padrão de marcação dos anticorpos pesquisados e podem ser vistos na tabela abaixo.

Quadro 2 - Padrão de expressão dos anticorpos, conforme os subtipos moleculares

Subtipo molecular	LFABP	Amiloide A	PCR	GS	Beta-catenina
HNF1-mutado	Negativo	Negativo	Negativo	Padrão perivenular	Marcação na membrana celular
Inflamatório	Positivo	Positivo	Positivo	Padrão perivenular ou difuso (misto)	Marcação na membrana celular
Beta-catenina mutado	Positivo	Negativo	Negativo	Padrão difuso	Marcação nos núcleos das células
Inclassificável	Positivo	Negativo	Negativo	Padrão perivenular	Marcação na membrana celular

3.4 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

As análises estatísticas foram realizadas de acordo com a distribuição dos dados paramétricos, e não paramétricos através de teste exato de Fisher, Qui-Quadrado e Kruskal-Wallis. Para a realização das análises, foi utilizado o software SPSS 20.0.

As variáveis foram analisadas e correlacionadas com a classificação molecular imunoistoquímica dos AHC. O valor de P menor ou igual a 0.05 foi indicativo de estatisticamente significativa.

4 RESULTADOS

4.1 VARIÁVEIS CLÍNICAS E CIRÚRGICAS

A partir da pesquisa no registro de cirurgias hepáticas realizadas no A.C.Camargo Cancer Center, no período de 2001 a 2014, foram identificados 25 pacientes submetidos à ressecção cirúrgica de AHC, sendo transplante hepático realizados em 2 pacientes.

Neste período, também identificamos, 15 outros pacientes com diagnóstico presuntivo de AHC, através dos exames de imagem, no qual a conduta adotada não foi cirúrgica, sendo realizado apenas seguimento. Tais pacientes não são objeto específico deste estudo, porém dimensiona o número de pacientes com AHC da instituição.

Dos 25 casos de AHC operados, em 4 casos os materiais histopatológicos (blocos de parafina e lâminas) não estavam mais disponíveis nos arquivos da Anatomia Patológica e foram excluídos da casuística. Um dos casos excluídos era de uma criança com o diagnóstico de adenoma hepático gigante, tratado com hepatectomia total e transplante de fígado. Todo o seu material histopatológico foi encaminhado para outro serviço de Anatomia Patológica para uma segunda opinião diagnóstica. Portanto a casuística final deste estudo foi constituída por 21 pacientes.

A Tabela 4 mostra as principais características clínicas dos 21 pacientes com AHC. A média de idade destes pacientes ao diagnóstico foi

de 36 anos, e a mediana de 33 anos, sendo a idade mínima de 20 anos e a máxima de 89 anos. Dos 21 pacientes estudados, 17 (80%) eram do sexo feminino e apenas 4 (20%) eram do sexo masculino. Dentre as pacientes femininas, o uso de anticoncepcional oral foi confirmado por 4 (23%) e negado por 6 (35%). Esta informação não estava disponível nos prontuários médicos de 7 (42%) pacientes. Deste mesmo grupo de pacientes, 4 delas estavam na menopausa.

Biópsias hepáticas percutâneas pré-cirúrgicas foram realizadas em 6 (24%) pacientes, sendo 4 biópsias guiadas por ultrassonografia e 2 guiadas por tomografia computadorizada. Dos casos biopsiados o diagnóstico anatomopatológico de adenomas hepatocelulares foi feito em 3 casos, 1 caso foi diagnosticado com hepatite crônica, 1 caso com alterações histopatológicas associadas a colestase e 1 caso foi genericamente diagnosticado como “ausência de neoplasia”. As reações imunoistoquímicas complementares não foram realizadas nestas amostras.

Na casuística estudada, não houve relato de etilismo, uso de drogas, ou anabolizantes (incluindo hormônio de crescimento e testosterona); dois (10%) pacientes faziam uso crônico de corticosteróides, sendo 1 deles por DPOC e o outro para o tratamento de câncer de mama metastático. Dois (10%) pacientes eram portadores de diabetes tipo II (não insulino-dependentes), cinco (23%) pacientes eram portadores de esteatose hepática, dois apresentavam hipertensão arterial sistêmica e dois apresentavam hipotireoidismo.

Em relação aos marcadores tumorais, os níveis séricos de alfafetoproteína estavam em níveis normais em 16 casos. Este dado não estava disponível nos prontuários médicos de 5 casos. Os níveis séricos de CA 19.9 estavam normais em 11 casos e 1 caso apresentava nível aumentado (1,5x o valor de referência). Em 9 casos não havia a presença deste dado no prontuário médico.

Não há registros da dosagem de PCR (Proteína C Reativa) sérica nos pacientes detes estudo.

Nenhum dos pacientes apresentavam síndromes genéticas relacionadas como glicogenoses, pólipos adenomatosos familiares, diabetes Tipo 3 ou Sd de McCune-Albright. No entanto 1 paciente apresentava uma síndrome rara denominada Bannayan-Zonana - Ruvalcaba-Riley, uma patologia autossômica dominante com mutação no gene *PTEN*, caracterizada por malformações múltiplas, sobretudo macrocefalia, múltiplos lipomas, pólipos hamartomatosos intestinais, malformações vasculares e anomalias da pigmentação do pênis (MARSH et al. 1998). Um outro paciente apresentava hermafroditismo verdadeiro.

Em relação à presença de obesidade, 12 (57%) pacientes apresentavam IMC (índice de massa corpórea) abaixo de 25 kg/cm²; 3 (14%) pacientes tinham IMC entre 25 a 30 kg/cm² e 5 (23%) pacientes tinham IMC acima de 30 kg/cm², sendo que o maior IMC observado foi de 52 kg/cm² em uma paciente do sexo feminino. Em 1 caso não foi possível o cálculo do IMC.

A presença de sintomatologia foi relatada por 12(57%) pacientes, sendo o sintoma mais comum a dor abdominal, relatada por 9 (42%) pacientes.

Quatro pacientes (19%) apresentaram dispepsia; massa palpável foi a sintomatologia detectada em 4 pacientes. Uma paciente apresentou ruptura espontânea do adenoma com sangramento intracavitário e anemia aguda. 9 pacientes (43%) eram assintomáticos, sendo o diagnóstico de AHC realizado incidentalmente.

As dimensões tumorais observadas foram de 4 nódulos menores de 5 cm; 11 casos apresentavam lesões medindo entre 5 a 10 cm e 6 casos exibiam lesões maiores de 10 cm.

De acordo com os exames de imagem pré-operatórios, 12 (57%) casos representavam lesão única. Adenomas múltiplos com presença de 2 a 9 nódulos foram encontrados em 6 casos e 3 casos apresentavam adenomatose (presença de 10 ou mais nódulos).

Em relação as características imagenológicas, existiu considerável ausência de dados no prontuário eletrônico e laudos incompletos, relacionados a uma série histórica, sem a disponibilidade de acesso para a revisão das imagens. Porém foi possível concluir que a ultrasonografia de abdome foi realizada em 15 casos, apresentando-se em 4 pacientes lesões hipoecogênicas, 3 lesões hiperecogênicas, 2 lesões isoecogênicas e em 6 pacientes não houve definição sobre ecogenicidade. Tomografia helicoidal foi realizada em todos os pacientes e em 10 pacientes havia registro de realce arterial intenso ao contraste, porém sem informações sobre *washout*.

Há registro de realização de RMN em 12 pacientes. Não há descrição da utilização de contraste hepato-específico nessa casuística. De acordo com os laudos radiológicos, o diagnóstico presumível de AHC, foi relatado em 9 pacientes. PET CT com 18 FDG, foi realizado em 1 paciente, que apresentava lesões hepáticas hipervasculares indefinidas, associado a histórico oncológico de melanoma cutâneo.

Cirurgicamente, foram realizadas 7 hepatectomias menores (até 2 segmentos) e 14 hepatectomias maiores (incluindo o caso de hepatectomia total). 16 (76%) pacientes realizaram cirurgias pela técnica convencional aberta e 5 (24%) realizaram cirurgia por vídeo laparoscopia, sendo que 1 deles necessitou de conversão para a cirurgia aberta. (Tabela 5). O tempo médio de internação foi de 8 (4 - 50) dias.

A única paciente submetida ao transplante de fígado era portadora de adenomatose, apresentava história de ruptura espontânea e sangramento das lesões com repercussão hemodinâmica importante. Neste caso foi utilizado enxerto de doador cadáver.

A embolização arterial ou RFA do AHC no período pré-operatório não foi realizada em nenhum caso.

A associação com outros tumores prévios ou sincrônicos, foi um evento presente em 7 (33,3%) dos 21 pacientes estudados : 1 caso de sarcoma de Ewing, 1 caso de câncer de mama, 1 caso com hiperplasia de adrenal (hermafroditismo, angiomiolipoma), 1 paciente teve tumor sólido cístico pancreático (tumor de Frantz), 1 paciente teve sarcoma cervical; 1 paciente teve carcinoma papilífero de tireóide e 1 paciente apresentou seminoma de testículo.

Em relação às complicações pós-cirúrgicas: 2 pacientes apresentaram complicações pós-operatórias grau V da classificação de Clavien-Dindo, sendo os óbitos relacionados as comorbidades consequentes de DPOC e Insuficiência hepática por NASH (Esteatohepatite não alcoólica). 5 pacientes apresentaram complicações Clavien I (relacionados a dor e gastroparesia no pós-operatório); 4 pacientes Clavien II (relacionado a transfusão de hemoderivados); 1 paciente Clavien IV (por sangramento no pós-operatório imediato com repercussão hemodinâmica e necessidade de reoperação de urgência). Em nove (42%) pacientes não houve nenhum tipo de complicação. Estes dados estão presentes na Tabela 5.

Tabela 4 - Dados demográficos e epidemiológicos dos pacientes (N=21)

Característica	Número	Porcentagem (%)
Idade (mediana) em anos	33 (20-89)	
Sexo		
Feminino	17	80
Masculino	4	20
IMC kg/cm²		
<25	12	57
25 a 30	3	14
>30	5	23,8
Sem informação	1	4,7
Anticoncepcional, sexo F (N=17)		
Uso de ACO	4	23,5
Não uso de ACO	6	35
Sem informação de ACO	7	41
Presença de Sintomas		
Dor abdominal	9	42
Dispepsia	4	19
Massa palpável	4	19
Sangramento	1	4,7

Tabela 5 - Características dos Nódulos Hepáticos, Cirurgia e Complicações

Número de nódulos (por exame de imagem)	N	Media
Único	12	
Entre 2 e 9	6	
Maior ou igual a 10	3	
Tamanho do > nódulo		7,8 cm (2,5-19 cm)
< 5cm	4	
Entre 5 a 10 cm	11	
>10 cm	6	
Cirurgia laparoscópica	4	
Cirurgia aberta	17	
Transplante de Fígado	1	
Complicações (Clavien-Dindo)		
I	5	
II	4	
IV	1	
V	2	
Sem complicações	14	

4.2 VARIÁVEIS HISTOPATOLÓGICAS

Os principais achados histopatológicos observados nas amostras dos AHCs foram: esteatose, dilatação sinusoidal, áreas de hemorragia e telangiectasias, presença de vasos espessos, hepatócitos com atipias ou em arranjos pseudoacinares, presença de proliferação ductular e infiltrado inflamatório intratumoral. O parênquima hepático peri-tumoral ou não neoplásico não foi avaliado.

Em todos os AHC foram observadas áreas de esteatose, sendo o grau 3 presente em 5 (24%) casos, o grau 2 observado em 6 (28%) casos e o grau 1 presente em 10 casos, correspondendo a 48% dos AHC. Infiltrado

inflamatório crônico focal ou de leve intensidade foi observado em 14 (67%) casos; 7 (33%) casos apresentavam infiltrado inflamatório predominantemente linfocitário de moderada intensidade. Áreas de hemorragia e com telangiectasias foram detectadas em 11 (52%) e 14 (67%) casos, respectivamente. Foram observados vasos sanguíneos com a parede espessa em 7 (33%) casos e focos de congestão vascular presentes em 16 (76%) AHC. Foram observados hepatócitos atípicos em 7 (33%) casos. Arranjos pseudoacinares foram detectados em 9 dos 21(42%) casos e áreas com reação ductular foram encontradas em somente 3 casos (14%).

Em 2 pacientes (9,5%) havia sobreposição de carcinoma hepatocelular nos AHC, 1 caso com CHC fibrolamelar com áreas pouco diferenciadas e outro caso com CHC bem diferenciado, sendo classificados como Grau 3 e Grau 2 pela Classificação de Edmondson - Steiner, respectivamente. Estes pacientes correspondentes aos casos 6 e 7 desta casuística.

Os dados gerais histopatológicos podem ser observados na Tabela 6.

Tabela 6 - Principais achados histopatológicos dos AHC, correlacionados com idade , sexo e IMC

AHC	Idade	Sexo	IMC (kg/cm ²)	Esteatose	Atipias Citológicas	Infiltr. Inflam.	Dilatação Sinusoidal	Congestão Vascular	Arranjos Pseudoacinares	Hemorragia	Telangiectasia	Reação Ductular	Vasos Espessos	Presença de CHC
Caso 1	42	F	23.9	Acentuada	não	Leve	não	sim	Não	não	não	não	não	não
Caso 2	29	M	26.3	Moderada	sim	Leve	sim	sim	Sim	não	sim	sim	não	não
Caso 3	28	F	25.6	Moderada	não	Leve	sim	sim	Não	sim	sim	não	sim	não
Caso 4	89	F	27.1	Leve	sim	Leve	sim	sim	Sim	sim	sim	não	não	não
Caso 5	28	F	22.3	Acentuada	não	Leve	não	Não	Não	sim	não	não	não	não
Caso 6	24	F	16.6	Moderada	sim	Leve	sim	não	Sim	não	não	não	sim	sim
Caso 7	35	M	33.1	Leve	sim	Leve	sim	sim	Sim	sim	sim	sim	Sim	sim
Caso 8	33	F	20.7	Leve	não	Leve	não	Não	Sim	não	não	não	Não	não
Caso 9	41	F	24	Leve	não	Leve	sim	sim	Não	sim	sim	não	Não	não
Caso 10	33	F	21.9	Leve	não	Leve	sim	sim	Não	sim	sim	não	Não	não
Caso 11	56	F	31.6	Acentuada	não	Leve	não	sim	Não	não	não	não	Não	não
Caso 12	29	F	24.8	Acentuada	não	Leve	não	Não	Não	não	não	não	Não	não
Caso 13	42	F	-	Leve	não	moderado	Sim	sim	Sim	não	sim	não	não	não
Caso 14	39	F	32.8	Leve	sim	Leve	sim	sim	Não	sim	sim	não	sim	não
Caso 15	29	M	30.3	Leve	sim	Leve	SIM	sim	Não	sim	sim	sim	sim	não
Caso 16	42	F	20.6	Leve	não	Não	leve	sim	Sim	não	sim	não	não	não
Caso 17	26	F	18.4	Acentuada	não	Leve	não	sim	Não	sim	não	não	sim	não
Caso 18	33	F	21.5	Leve	não	Leve	sim	Não	Não	não	sim	não	não	não
Caso 19	25	M	17.6	Moderada	sim	moderado	Sim	sim	Sim	não	sim	não	Não	não
Caso 20	36	F	56	Moderada	não	Leve	sim	sim	Sim	sim	sim	não	não	não
Caso 21	20	F	19.6	Moderada	não	Leve	Sim	sim	Não	sim	sim	Não	Sim	não

Esteatose: graduada em graus: 1. Leve, até 33% da área total; 2. Moderada, de 34 a 66% da área total; 3. Acentuada, esteatose em mais de 66% da área examinada; Infiltrado inflamatório intralesional: presença de infiltrado inflamatório crônico de permeio na área tumoral: 1. Leve (até 25%), 2. Moderado (25 a 50% de infiltrado).

4.3 ANÁLISES IMUNOISTOQUÍMICAS E CLASSIFICAÇÃO MOLECULAR

De acordo com o padrão observado nas análises das reações imunoistoquímicas dos marcadores pesquisados, os AHC foram classificados em 3 subgrupos moleculares: 1- AHC inflamatório, 2- AHC inflamatório com Beta-catenina ativada e 3- AHC inclassificável. Notadamente, nenhum caso foi classificado como AHC HNF1 alfa ou AHC Beta-catenina sem características inflamatórias associadas.

Os resultados dos marcadores e os subgrupos encontrados estão na Tabela 7. O AHC tipo inflamatório caracterizado pela expressão 3+ ou 2+ da Proteína Amiloide e/ou PCR foi o subgrupo mais frequente, encontrado em 15 (71%) dos 21 casos estudados. Dos 15 casos com subtipo molecular inflamatório, 5 deles apresentam também a expressão difusa e forte da proteína GS. Bioulac Sage definiu este subgrupo como AHC I com ativação da Beta-catenina (BIOULAC-SAGE et al. 2011b).

Os 6 (29%) AHC restantes mostraram padrão variado de expressão imunoistoquímica e foram considerados como AHC Inclassificáveis.

Todos os casos estudados apresentaram expressão de Beta-catenina na membrana celular e o padrão de marcação nuclear para este marcador não foi observado em nenhum caso. Também não observamos perda ou ausência de expressão da proteína LFABP em nenhum caso, sugerindo que a mutação do gene HNF1 alfa não está presente nestes tumores.

Os dois pacientes que apresentavam CHC sobrepostos ao AHC, foram classificados no subtipo AHCI com ativação da Beta-catenina.

Tabela 7 - Resultados das reações imunoistoquímicas

AHC	Amilóide	LFABP	Beta-catenina*	GS	PCR	Subtipo Molecular
Caso 1	2+	1+	2+	1+	2+	Inflamatório
Caso 2	3+	3+	3+	2+	3+	Inflamatório
Caso 3	1+	3+	3+	1+	1+	Inclassificável
Caso 4	1+	2+	3+	1+	2+	Inclassificável
Caso 5	1+	1+	3+	0	1+	Inclassificável
Caso 6	3+	3+	3+	3+	3+	Inflamatório Beta-catenina
Caso 7	3+	2+	3+	3+	3+	Inflamatório Beta-catenina
Caso 8	2+	2+	3+	1+	2+	Inflamatório
Caso 9	3+	2+	3+	1+	3+	Inflamatório
Caso 10	1+	2+	3+	2+	2+	Inflamatório
Caso 11	2+	2+	3+	0	1+	Inflamatório
Caso 12	1+	1+	3+	3+	2+	Inflamatório Beta-catenina
Caso 13	3+	2+	3+	0	3+	Inflamatório
Caso 14	2+	1+	3+	1+	2+	Inclassificável
Caso 15	3+	1+	3+	3+	3+	Inflamatório Beta-catenina
Caso 16	0	2+	3+	1+	2+	Inclassificável
Caso 17	2+	2+	3+	0	1+	Inflamatório
Caso 18	0	1+	3+	1+	2+	Inclassificável
Caso 19	3+	2+	3+	3+	3+	Inflamatório Beta-catenina
Caso 20	2+	1+	2+	0	3+	Inflamatório
Caso 21	2+	2+	3+	1+	3+	Inflamatório

*O padrão da expressão da Beta-catenina descrito é apenas na membrana celular. Em nenhum dos casos houve expressão nuclear da Beta-catenina.

Nas Figuras 1, 2, 3 abaixo, alguns exemplos de AHC com expressão dos marcadores e o subgrupo molecular. No Anexo 2, apresentamos as figuras dos casos com os padrões histológicos observados nas lâminas de HE, e a expressão dos marcadores imunoistoquímicos.

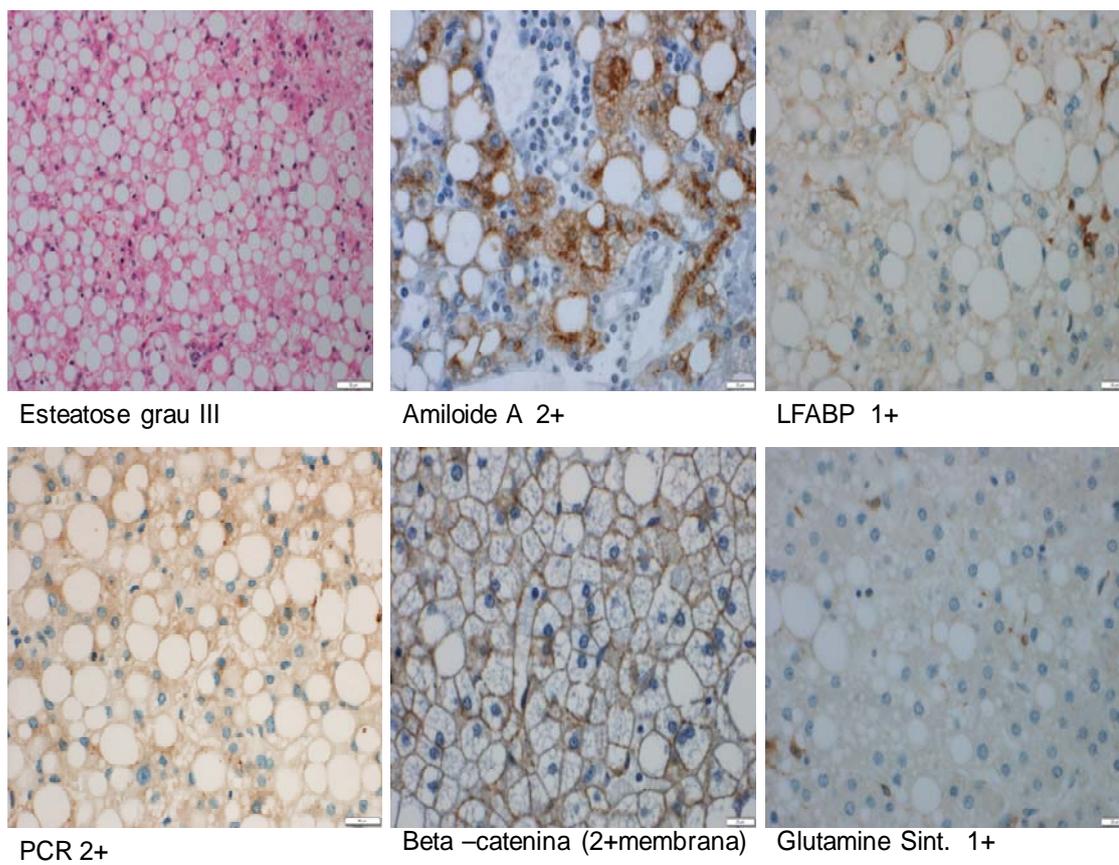
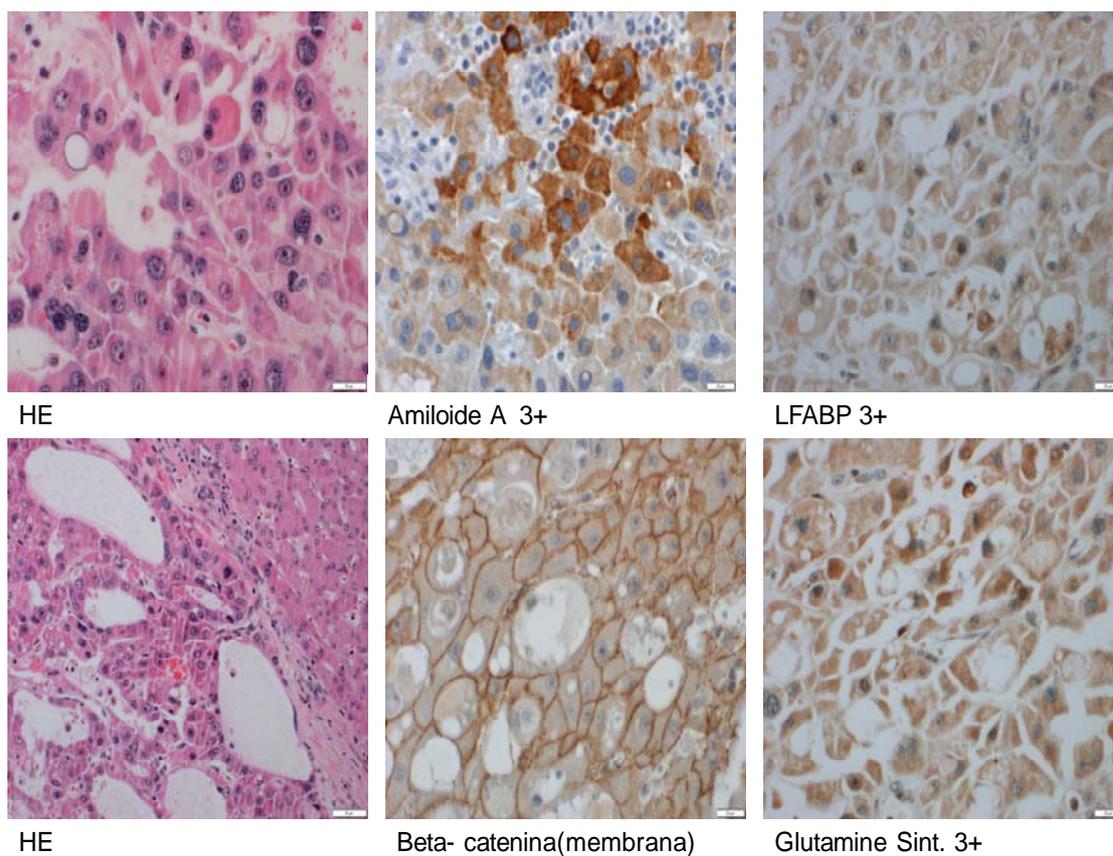
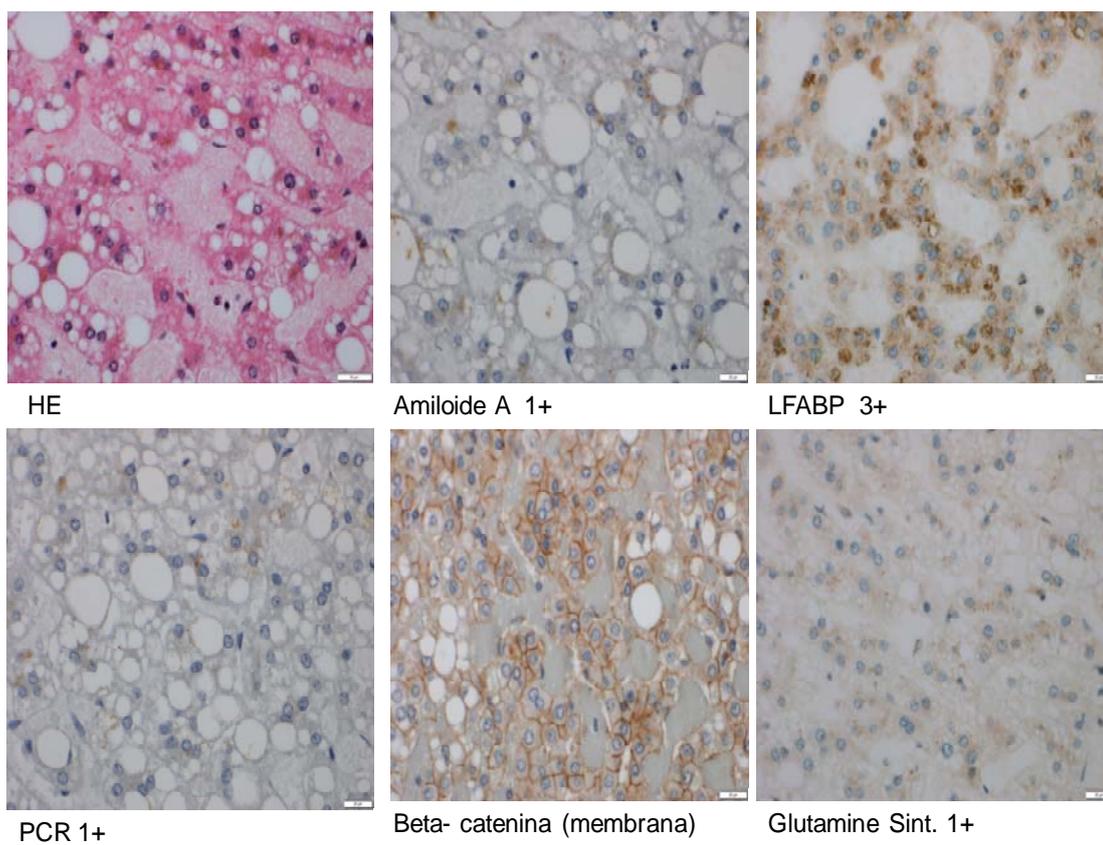


Figura 1 - Adenoma hepático classificado como AHC inflamatório; identificado como caso 1



NA HE, presença de atipias, arranjos pseudoacinares e vasos espessos. Na IMQ Amilóide A corado fortemente; LFABP 3+; Beta-catenina apenas na membrana e glutamina sintetase difusa 3+.

Figura 2 - Adenoma hepático classificado como AHC inflamatório com Ativação da Beta-Catenina; identificado como caso 6



HE : mostra esteatose grau 2, dilatação sinusoidal e teleangiectasia

Figura 3 - Adenoma hepático classificado como AHC Inclassificável;
identificado como caso 3

4.4 CORRELAÇÃO ENTRE AS VARIÁVEIS CLÍNICAS E HISTOPATOLÓGICAS E OS SUBGRUPOS MOLECULARES

A média de idade dos pacientes do subgrupo AHC I foi de 35,8 anos; dos AHC I com ativação da Beta-catenina foi de 28,4 anos e dos AHC Inclassificáveis foi de 43,2 anos ($p = 0,216$).

Em relação ao gênero, no subgrupo AHC I, 9 pacientes eram do sexo feminino e 1 paciente era do sexo masculino, no subgrupo AHC I com ativação da Beta-catenina havia 2 pacientes do sexo feminino e 3 pacientes do sexo masculino e no subgrupo AHC Inclassificável, as 6 pacientes eram do sexo feminino. Houve diferença estatisticamente significativa entre o sexo masculino e o subgrupo AHC I com ativação da Beta-catenina ($p = 0,047$).

Em relação às características dos nódulos e a classificação imunohistoquímica, o tamanho médio dos nódulos no subgrupo AHC I foi de 10 cm (5 -15 cm); no subgrupo de AHC I com beta-catenina foi de 11 cm (3.8 -19 cm) e no subgrupo Inclassificável foi de 5,7 cm (2.5-11cm). Não houve diferença estatística, $p= 0,11$. Dos 3 pacientes com Adenomatose (> 10 nódulos), os AHC foram classificados como 1 AHC I; 1 AHC I com mutação da Beta-catenina e 1 AHC Inclassificável. Não houve diferença estatística entre o número de nódulos e os subgrupos moleculares ($p= 0,59$).

A média de IMC (kg/cm^2) no subgrupo AHC I foi de 26.9 (18,3 - 56), com exceção de 1 paciente sem dados sobre IMC; no subgrupo AHC I com ativação da Beta-catenina foi de 24.4 (16.6 - 33,1) e no subgrupo

Inclassificável foi de 24.96 (21,4 - 32,8). A diferença entre os grupos não alcançou significância estatística ($p=0,942$).

As características clínicas relevantes identificadas, correlacionadas com os subgrupos moleculares, são demonstradas na tabela 8.

Tabela 8 - Características clínicas e os subgrupos moleculares

Variáveis	Categorias	AHC I (N=10)	AHC I com Beta-catenina (N= 5)	Inclassificável (N=6)	Valor de P
Gênero	Feminino	9	2	6	0.047
	Masculino	1	3	0	
Idade em anos	Média	35.8 (20-56)	28.4 (24-35)	43.2 (28-89)	0.21
IMC	Média	26.9	24.4	24.96	0.87
Tamanho dos nódulos	Média	10 (5-15)	11 (3,8-19)	5,7 (2,5-11)	0.11
Nódulos na imagem	Média	2,2	3,4	2,6	0.59

As principais características histológicas estudadas e suas correlações com os 3 subgrupos identificados estão na Tabela 9. Houve diferença estatisticamente significativa entre a presença de atipias citológicas ($p=0.021$) e presença sobreposta de CHC ($p= 0,048$) com o subgrupo AHC I com Beta-catenina ativada. As demais características histológicas não mostraram diferenças estatisticamente significantes entre os subgrupos moleculares.

Tabela 9 - Principais achados histológicos e os subgrupos moleculares

Alterações histológicas presentes	N	AHC I	AHCI com Betacatenina	Inclassificável	Valor de P
Atipias citológicas	7 (33%)	1	4	2	0.021
Arranjo pseudoacinar	5(24%)	4	3	2	0.729
Esteatose*					0.858
leve	10(47%)	4	2	4	
moderada	6(28%)	3	2	1	
acentuada	5(24%)	3	1	1	
Infiltrado Inflamatório					0.662
leve	18(85%)	9	4	5	
moderado	2(10%)	1	1		
Telangiectasia	14(66%)	6	3	5	0.710
Dilatação sinusoidal	14(66%)	6	4	4	0.571
Congestão vascular	16(76%)	9	3	4	0.436
Hemorragia microvascular	11(52%)	5	2	4	0.738
Reação ductular	3(14%)	1	2	0	0.199
Vasos espessos	7(33%)	2	3	2	0.294
Presença de CHC associado	2(9,5%)	0	2	0	0.048

*Esteatose: graduada em graus: Leve- até 33% da área total; Moderada- de 34 a 66% da área total; Acentuada- esteatose em mais de 66% da área examinada

4.5 SEGUIMENTO CLÍNICO DOS PACIENTES

O tempo de seguimento mediano dos pacientes foi de 47 meses, com intervalo interquartil de 9 a 86 meses.

Dos 21 pacientes estudados, 2 (9,5%) evoluíram a óbito no período peri-operatório. Uma paciente apresentou óbito no 50º dia pós-operatório, por complicações cirúrgicas secundárias a DPOC e a imunossupressão relacionado a corticóide, com necessidade de reoperações por síndrome compartimental abdominal e peritoneostomia. Outro paciente evoluiu a óbito no 12º dia pós-operatório por insuficiência hepática, secundária a NASH.

Em 2 pacientes não há dados de seguimento nesta Instituição, por fazerem acompanhamento em clínica privada.

Dentre os 3 pacientes com adenomatose, havia uma paciente portadora de câncer de mama, na qual a ressecção cirúrgica hepática foi realizada apenas na lesão maior, as outras múltiplas lesões menores apresentaram remissão espontânea; 1 caso foi submetido a transplante de fígado, apresentando-se sem evidência de recidiva hepática e com uso regular de medicação imunossupressora até o momento; 1 caso com adenomatose corresponde ao paciente que evoluiu a óbito, por insuficiência hepática.

O paciente, portador da Síndrome de Bannayan-Zonana - Ruvalcaba-Riley teve o AHC, inicialmente único, ressecado, porém desenvolveu recidiva multinodular (> de 10 adenomas). Foi avaliado pela equipe de Transplante Hepático, porém em consequência da predisposição da síndrome para neoplasias, o transplante foi contra-indicado. Foi submetido a TAE, com regressão parcial das lesões. Permanece atualmente com adenomatose, com estabilidade dos adenomas.

Uma paciente jovem, portadora de CHC em adenoma, apresentou recidiva hepática e linfonodal do CHC, sendo reoperada, e está atualmente realizando tratamento quimioterápico sistêmico.

Uma paciente jovem, portadora de adenoma, com desejo de gravidez, apresentou no seguimento pós-operatório uma gestação, que cursou sem intercorrências e atualmente não apresenta sinais de recidiva da doença.

Nos 7(33%) pacientes com outras neoplasias associadas encontramos 1 paciente com câncer de mama, corresponde ao caso de remissão espontânea da adenomatose, descrito anteriormente; 1 paciente com melanoma, 1 paciente com tumor sólido papilar do pâncreas, 1 paciente com câncer de tireóide; estão em acompanhamento sem sinais de recidiva da neoplasia ou do adenoma; 2 pacientes (1 portador de seminoma de testículo e outro com sarcoma de osso temporal) perderam seguimento nesta instituição há 2 anos; 1 paciente com neoplasia de adrenal com angiomiolipoma renal e hermafroditismo corresponde ao paciente que evoluiu a óbito, secundário a insuficiência hepática no pós operatório;este paciente também apresentava CHC, associado ao AHC.

Todos os demais casos (14 pacientes) não apresentaram recidiva do adenoma, ou óbito relacionado.

5 DISCUSSÃO

Atualmente, lesões hepáticas focais são cada vez mais diagnosticadas, devido ao maior acesso da população aos exames de imagem, especialmente a ultrassonografia de abdome. Em algumas séries, achados de lesões incidentais no fígado, foram encontrados em até 33% dos estudos radiológicos e revelam um espectro grande de patologias benignas (cistos, hemangiomas, hamartomas, HNF, AHC, esteatose focal, abscesso, nódulos de regeneração, até pseudolesões) e malignas (CHC, colangiocarcinoma, angiossarcoma, hemangioendotelioma, linfoma e metástases) (BOUTROS et al. 2010; ALGARNI et al. 2016).

A diferenciação entre lesões benignas e malignas é passo fundamental, a partir de um diagnóstico diferencial amplo, e deve ser norteada inicialmente por uma anamnese completa, antecedentes oncológicos, avaliação de hepatopatia, história familiar, exame físico e marcadores tumorais.

Estudos sobre a prevalência das lesões focais benignas são heterogêneos, dependente da população estudada e os métodos de investigação utilizados. A prevalência de hemangioma hepático pode variar entre 0,1 a 20,0 % e de cistos hepáticos entre 0,06 a 17,8 %. Poucos estudos investigaram especificamente HNF, AHC e esteatose, sendo que a prevalência relatada em séries históricas para HNF foram de 0,8 a 3,2%,

AHC entre 0,4 a 1,5 %, e áreas focais hepáticas de preservação de esteatose entre 7,2 a 19.8% (KALTENBACH et al. 2016).

Nas lesões hepatocelulares benignas, após a exclusão dos hemangiomas, os principais diagnósticos diferencias são a HNF e o AHC, caracterizando-se por incidirem principalmente em mulheres jovens, na idade reprodutiva. HNF é uma neoplasia policlonal benigna com etiologia relacionada à hiperperfusão localizada, regenerativa à presença de um vaso anômalo. Histologicamente, o tipo clássico é uma lesão nodular hiperplásica com uma cicatriz central contendo uma artéria anómala e reação ductular. Em casos inconclusivos, a utilização de IMQ com GS revela um padrão *map-like* típico.

Em relação a indicação cirúrgica nos casos desta série, a decisão terapêutica foi baseada em variáveis clínicas, sendo as principais definidas como adenomas no sexo masculino, lesões suspeitas de carcinoma hepatocelular, lesões maiores que 5 cm e uma paciente com desejo de gravidez, sendo que nenhum caso foi determinado pela análise da IMQ.

Nesta série podemos confirmar que os AHC, são neoplasias heterogêneas, sendo possível classificar pela IMQ em 3 subgrupos: AHC I, AHC I com Beta-catenina Ativada e AHC inclassificável.

A Glutamina Sintetase foi decisiva, quando fortemente corada, para identificar o subgrupo AHCI com ativação da Beta-catenina. A sua expressão fraca ou moderada, permanece com significado incerto, sugerindo a necessidade de estudo molecular dirigido para melhor definição.

Nesta série, não observamos a expressão nuclear da proteína Beta-catenina em nenhum dos casos , e desta maneira este marcador não apresentou sensibilidade para identificar o subgrupo dos AHC com mutação do gene Beta-catenina ou o subgrupo dos AHC I com ativação da Beta-catenina. Porém em todos os casos , foi notório, a expressão da proteína da Beta-catenina na membrana das células neoplásicas.

Os resultados observados no nosso estudo são divergentes dos estudos previamente publicados na literatura, por apresentar proporcionalmente maior número de casos do subtipo AHC Inclassificável e nenhum caso de AHC HNF 1 alfa mutado, pois em todas as lesões estudadas foram observadas expressões da proteína LFABP, em intensidade e frequência variáveis. Estas diferenças podem estar relacionadas a alguns fatores como: utilização de diferentes clones de anticorpos e protocolos na realização da IMQ, inexperiência na interpretação das reações IMQs e seleção das áreas mais adequadas para a realização das IMQs, dentre outros. Neste estudo, a interpretação das lâminas de IMQ foi realizada com o auxílio do patologista Dr. Michael Toberson, especialista em hepatopatologia da Mayo Clinic, Rochester, EUA. Todas as lâminas foram fotografadas e enviadas para sua interpretação, e os resultados foram comparados com os obtidos no Dep. de Anatomia Patológica do AC Camargo Cancer Center. Nos casos discordantes, outras áreas das lesões foram recoradas ou os anticorpos foram novamente testados para obtenção da concordância em todos os casos. A interpretação das reações IMQ foram feitas às cegas em relação aos dados clínicos dos pacientes. A participação

de um patologista especialista na área e com experiência no assunto foi fundamental para o treinamento do patologista e padronização da técnica.

Uma outra possível explicação dos resultados divergentes, seria o número pequeno de pacientes da nossa casuística, não permitindo uma amostra representativa dos subtipos.

De fato, para a confirmação definitiva dos nossos resultados, se impõe a necessidade de estudo molecular e genômico para pesquisa de mutação dos genes CTNNB1, IL6ST, JAK, STAT, HNF1alfa e FRK.

Em relação as características histológicas apenas atipia e a presença de CHC sobreposta ao AHC apresentou significância estatística com o subgrupo AHCI com Beta catenina ativada, em concordância com a literatura, assim como o sexo masculino. Existem estudos recentes relacionados a sequência adenoma-carcinoma, em que mutação do gene da Beta catenina (CTNNB1) é um pré-requisito na carcinogênese, porém outras vias de sinalização e alterações moleculares como a promoção do TERT (*Telomerase Reverse Transcriptase*) são necessários para a transformação em CHC (MARQUARDT e THORGEIRSSON 2014).

Não foi possível alcançar diferença estatística entre as demais variáveis clínicas e histológicas com os subgrupos identificados, provavelmente devido ao pequeno número da amostra, o que traz a necessidade de estudos multicêntricos para uma casuística maior. De acordo com testes estatísticos específicos de tamanho de amostra, seriam necessário pelo menos 90 casos, para uma amostra representativa dos subgrupos.

Este estudo demonstrou em peça cirúrgica, que a análise e técnica de IMQ, para a identificação dos subgrupos dos AHC, foram reproduzíveis em nosso meio.

Contudo a incapacidade de diferenciar AHC de outros tumores benignos, ou para identificar pacientes de subgrupos com risco aumentado de complicações, determina a necessidade da análise de IMQ no pré-operatório, realizados em tecidos de fragmentos provenientes de biópsia por agulha. Neste cenário essa análise poderá contribuir para decisão terapêutica podendo evitar ressecções hepáticas desnecessárias e será objeto de estudo na nossa Instituição.

Apesar do fato de que técnicas de imagem radiológicas apresentarem contínuo progresso e aperfeiçoamento, como por exemplo, ressonância magnética com a Quantificação do Coeficiente Aparente de Difusão ou com a utilização de contrastes hepatespecíficos, a biópsia hepática pode ser necessária, quando os exames são inconclusivos, sendo considerada o padrão ouro para definição das lesões hepáticas.

Em um estudo multicêntrico Francês, a maior série publicada, endereçando especificamente neoplasias hepatocelulares benignas, foram analisadas 239 biópsias de lesões hepáticas, realizadas por agulha de 18 gauge; O diagnóstico de AHC, pelo HE, foi conclusivo em 58,6% dos pacientes, que se elevou para 74,3%, quando a IMQ com os marcadores imunistoquímicos (LFABP, GS, Amilóide A, PCR e beta-catenina) foram utilizados, apresentando similaridade, quando comparados com a análise da peça cirúrgica. Da mesma forma, para a Hiperplasia nodular focal, o

acrécimo da IMQ a análise histológica convencional, com a caracterização do aspecto *map-like* pela GS aumentou a assertividade do diagnóstico de 53% para 86,7%. Os autores concluíram que é possível, em biópsias hepáticas por agulha, identificar HNF e AHC, incluindo os subgrupos moleculares dos AHC, com um elevado grau de confiabilidade usando marcadores imunoistoquímicos (BIOULAC-SAGE et al. 2012).

Por outro lado a diferenciação entre AHC e CHC pode ser um desafio, principalmente nas lesões bem diferenciadas e o acréscimo de outros marcadores imunoistoquímicos como *glypican-3* e *heat shock protein 70*, podem ser requeridos (GONZALEZ 2015).

Entretanto deve se mencionar que existe complicações relacionadas a biópsia hepática percutânea. A possibilidade de implantes no trajeto da agulha, no diagnóstico de CHC foi relatada entre 0 a 5% (DURAND et al. 2001; NG et al. 2004; WANG et al. 2015). Em relação a sangramento, pós biópsias de lesões hepáticas em geral, a ocorrência média encontrada na literatura nos últimos 30 anos é de 0,29%, podendo variar entre 0 até 24% (SAG et al. 2016). Outras complicações raras são fístulas biliares, hemobilia, infecção e pneumotórax (BOUTROS et al. 2010).

Na nossa casuística, apenas 6 pacientes realizaram biópsia prévia a cirurgia e evoluíram sem complicações, sendo a indicação relacionada pela indefinição pelos exames de imagem.

Nossa conduta atual, é indicar estudo histológico nas lesões hepatocelulares inconclusivas após extensa investigação clínica, laboratorial incluindo marcadores tumorais (CA19,9; CEA e alfafetoproteína) e

radiológica com RMN e contraste hepatoespecífico. Nas lesões com diagnóstico presumível de AHC, indicamos biópsia nas lesões menores que 5 cm com análise de IMQ (GS, PCR, LFABP, Beta catenina e Amilóide). Existem porém dúvidas no tamanho mínimo da lesão para indicação de estudo histológico entre 2 a 3 cm, nestes casos a conduta é discutida em âmbito multidisciplinar, com envolvimento do radiologista, e quando a RMN favorece o diagnóstico de AHC HNF 1 alfa, a biópsia pode ser preterida.

É relevante relatar em nossa casuística, o caso de uma paciente de 89 anos, idade não relacionada a incidência de AHC, portadora de um adenoma de 6.5 cm, que foi submetida a bissegmentectomia hepática. Na análise de IMQ, apresentou padrão de marcação inespecífica (GS, Amilóide e PCR), com LFABP positivo e Beta-catenina negativa no núcleo (corresponde ao caso 4), sendo classificada como AHC inclassificável.

A elevada associação dos AHC com outros tumores prévios ou sincrônicos, na nossa casuística (33,3%) pode ser fortuita, possivelmente relacionada pelo viés da população oncológica assistida na Instituição, em que exames de imagem abdominais são amplamente realizados para estadiamento ou seguimento. Porém revela uma população específica que necessita de pesquisas e estudos moleculares dirigidos, para definição de uma provável associação.

Em relação as complicações cirúrgicas grau V de Clavien - Dindo, 2 óbitos em 21 pacientes (9,5 %), está acima da reportada na literatura, que permece abaixo de 5 %. Em uma revisão de uma banco de dados multistitucional americano, com 2.313 hepatectomias para diversas

patologias, a mortalidade em 30 dias ocorreu em 2,5 % dos pacientes (ALOIA et al. 2009). Em uma publicação recente brasileira com 31 pacientes com AHC, submetidos a hepatectomia videolaparoscópica não houve óbitos (HERMAN et al. 2012).

Na nossa casuística, os 2 pacientes que evoluíram a óbito foram submetidos a hepatectomias maiores (hepatectomia direita) e apresentavam comorbidades (1 paciente ASA II e outro ASA III). É uma série pequena que não reflete a mortalidade em hepatectomias da Instituição, como por exemplo em ressecções hepáticas por metástases coloretais em que a mortalidade em 90 dias encontra-se abaixo de 3 % (RIBEIRO et al. 2013).

Em relação ao perfil imunohistoquímico, uma paciente apresentava AHC I, com nódulo de 5.5 cm e o outro paciente foi classificado como AHC I com Beta catenina ativada, e neste contexto, se tivéssemos essa análise no pré operatório a indicação formal de cirurgia seria mantida.

Com os avanços em técnicas moleculares e gênicas, como o Next Generation, surgem novas perspectivas em relação ao tratamento dos AHC, baseados em terapia alvo, direcionado na alteração genética subjacente, permitindo a realização de um tratamento personalizado.

Devemos considerar, entretanto, que o resultado a longo prazo de uma abordagem seletiva dos AHC requer avaliação sistemática e, dada a raridade da doença, faz se necessário a realização de estudos multicêntricos.

6 CONCLUSÃO

- 1 A classificação molecular dos AHC, através do perfil imunoistoquímico foi reproduzível em nossa casuística, sendo classificados nos subgrupos AHC I, AHC I com ativação da Beta-catenina e AHC inclassificável.
- 2 As variáveis que mostraram diferenças estatisticamente significantes entre os subgrupos moleculares foram o sexo masculino, presença de atipias citológicas e presença de CHC, todas relacionadas com o subgrupo AHC I com ativação da Beta-catenina. Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre as demais variáveis clínicas, histológicas e os subgrupos moleculares identificados, provavelmente devido ao pequeno número da amostra.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Agrawal S, Agarwal S, Arnason T, Saini S, Belghiti J. Management of Hepatocellular Adenoma: Recent Advances. **Clin Gastroenterol Hepatol** 2014; 13:1221-1230.

Algarni AA, Alshuhri AH, Alonazi MM, Mourad MM, Bramhall SR. Focal liver lesions found incidentally. **World J Hepatol** 2016; 8:446-451.

Aloia TA, Fahy BN, Fischer CP, et al. Predicting poor outcome following hepatectomy: analysis of 2313 hepatectomies in the NSQIP database. **HPB (Oxford)** 2009; 11:510-5.

Bacq Y, Jacquemin E, Balabaud C, et al. Familial liver adenomatosis associated with hepatocyte nuclear factor 1alpha inactivation. **Gastroenterology** 2003; 125:1470-5.

Balabaud C, Al-Rabih WR, Chen PJ, et al. Focal nodular hyperplasia and hepatocellular adenoma around the world viewed through the scope of the immunopathological classification. **Int J Hepatol** 2013; 2013:268625.

Bioulac-Sage P, Rebouissou S, Thomas C, et al. Hepatocellular adenoma subtype classification using molecular markers and immunohistochemistry. **Hepatology** 2007; 46:740-748.

Bioulac-Sage P, Laumonier H, Couchy G, et al. Hepatocellular adenoma management and phenotypic classification: the Bordeaux experience. **Hepatology** 2009; 50:481-9.

Bioulac-Sage P, Cubel G, Balabaud C. Pathological diagnosis of hepatocellular adenoma in clinical practice. **Diagnostic Histopathol** 2011a; 17:521-29.

Bioulac-Sage P, Cubel G, Balabaud C, Zucman-Rossi J. Revisiting the pathology of resected benign hepatocellular nodules using new immunohistochemical markers. **Semin Liver Dis** 2011b; 31:91-103.

Bioulac-Sage P, Cubel G, Taouji S, et al. Immunohistochemical markers on needle biopsies are helpful for the diagnosis of focal nodular hyperplasia and hepatocellular adenoma subtypes. **Am J Surg Pathol** 2012; 36:1691-9.

Bioulac-Sage P, Grazioli L, Terkivatan T, Chang C. Benign hepatocellular tumors: a multidisciplinary approach. **Int J Hepatol** 2013a; 2013:153693.

Bioulac-Sage P, Sempoux C, Possenti L, et al. Pathological diagnosis of hepatocellular cellular adenoma according to the clinical context. **Int J Hepatol** 2013b; 2013:253261.

Blanc JF, Frulio N, Chiche L, et al. Hepatocellular adenoma management: call for shared guidelines and multidisciplinary approach. **Clin Res Hepatol Gastroenterol** 2015; 39:180-187.

Bluteau O, Jeannot E, Bioulac-Sage P, et al. Bi-allelic inactivation of TCF1 in hepatic adenomas. **Nat Genet** 2002; 32:312-5.

Boutros C, Katz SC, Espat NJ. Management of an Incidental Liver Mass. **Surg Clin North Am** 2010; 90:699-718.

Bröker MEE, Ijzermans JNM, Van Aalten SM, De Man RA, Terkivatan T. The management of pregnancy in women with hepatocellular adenoma: a plea for an individualized approach. **Int J Hepatol** 2012; 2012:725735.

Bunchorntavakul C, Bahirwani R, Drazek D, et al. Clinical features and natural history of hepatocellular adenomas: the impact of obesity. **Aliment Pharmacol Ther** 2011; 34:664-74.

Chang CY, Hernandez-Prera JC, Roayaie S, Schwartz M, Thung SN. Changing epidemiology of hepatocellular adenoma in the United States: review of the literature. **Int J Hepatol** 2013; 2013:604860.

Chen YW, Jeng YM, Yeh SH, Chen PJ. P53 gene and Wnt signaling in benign neoplasms: beta-catenin mutations in hepatic adenoma but not in focal nodular hyperplasia. **Hepatology** 2002; 36:927-35.

Chiche L, Dao T, Salamé E, et al. Liver adenomatosis: reappraisal, diagnosis, and surgical management: eight new cases and review of the literature. **Ann Surg** 2000; 231:74-81.

Chiche L, David A, Adam R, et al. Liver transplantation for adenomatosis: The European experience. **Liver Transpl** 2016; 22:516-26.

Coelho FF, Kruger JAP, Fonseca GM, et al. Laparoscopic liver resection: Experience based guidelines. **World J Gastrointest Surg** 2016; 8:5-26.

Cristiano A, Dietrich A, Spina JC, Ardiles V, De Santibañes E. Focal nodular hyperplasia and hepatic adenoma: current diagnosis and management. **Updates Surg** 2014; 66:9-21.

Dhingra S, Fiel MI. Update on the new classification of hepatic adenomas: Clinical, molecular, and pathologic characteristics. **Arch Pathol Lab Med** 2014; 138:1090-1097.

Dindo D, Demartines N, Clavien P-A. Classification of surgical complications: a new proposal with evaluation in a cohort of 6336 patients and results of a survey. **Ann Surg** 2004; 240:205-13.

Dokmak S, Paradis V, Vilgrain V, et al. A single-center surgical experience of 122 patients with single and multiple hepatocellular adenomas. **Gastroenterology** 2009; 137:1698-705.

Dokmak S, Belghiti J. Will weight loss become a future treatment of hepatocellular adenoma in obese patients? **Liver Int** 2015; 35:2228-32.

Durand F, Regimbeau JM, Belghiti J, et al. Assessment of the benefits and risks of percutaneous biopsy before surgical resection of hepatocellular carcinoma. **J Hepatol** 2001; 35:254-8.

Edmondson HA, Henderson B, Benton B. Liver-cell adenomas associated with use of oral contraceptives. **N Engl J Med** 1976; 294:470-2.

Farges O, Ferreira N, Dokmak S, Belghiti J, Bedossa P, Paradis V. Changing trends in malignant transformation of hepatocellular adenoma. **Gut** 2011; 60:85-9.

Flejou JF, Barge J, Menu Y, et al. Liver adenomatosis. An entity distinct from liver adenoma? **Gastroenterology** 1985; 89:1132-8.

Fruilio N, Chiche L, Bioulac-Sage P, Balabaud C. Hepatocellular adenomatosis: What should the term stand for! **Clin Res Hepatol Gastroenterol** 2014; 38:132-136.

Goltz D, Fischer H. Current proceedings in the molecular dissection of hepatocellular adenomas: review and hands-on guide for diagnosis. 2015; 20994-21007.

Gonzalez AKK. Current concepts in the immunohistochemical evaluation of liver tumors. **World J Hepatol** 2015; 7:1403.

Grazioli L, Federle MP, Brancatelli G, Ichikawa T, Olivetti L, Blachar A. Hepatic adenomas: imaging and pathologic findings. **Radiographics** 2001; 21:877-892; discussion 892-894.

Grazioli L, Olivetti L, Mazza G, Bondioni MP. MR imaging of hepatocellular adenomas and differential diagnosis dilemma. **Int J Hepatol** 2013; 2013:374170.

Guichard C, Amaddeo G, Imbeaud S, et al. Integrated analysis of somatic mutations and focal copy-number changes identifies key genes and pathways in hepatocellular carcinoma. **Nat Genet** 2012; 44:694-8.

Herman P, Coelho FF, Perini MV, Lupinacci RM, D'Albuquerque LAC, Cecconello I. Hepatocellular adenoma: an excellent indication for laparoscopic liver resection. **HPB (Oxford)** 2012; 14:390-5.

Huurman VAL, Schaapherder AFM. Management of ruptured hepatocellular adenoma. **Dig Surg** 2010;

Kaltenbach TE-M, Engler P, Kratzer W, et al. Prevalence of benign focal liver lesions: ultrasound investigation of 45,319 hospital patients. **Abdom Radiol (New York)** 2016; 41:25-32.

Karkar AM, Tang LH, Kashikar ND, et al. Management of hepatocellular adenoma: comparison of resection, embolization and observation. **HPB (Oxford)** 2013; 15:235-43.

Kawakatsu M, Vilgrain V, Belghiti J, Flejou JF, Nahum H. Association of multiple liver cell adenomas with spontaneous intrahepatic portohepatic shunt. **Abdom Imaging** 19:438-40.

Lee SY, Kingham TP, Lagratta MD, et al. PET-avid hepatocellular adenomas: incidental findings associated with HNF1- α ; mutated lesions. **Int Hepato-Pancreato-Biliary Assoc** 2016; 18:41-48.

Liau S-S, Qureshi MS, Praseedom R, Huguet E. Molecular pathogenesis of hepatic adenomas and its implications for surgical management. **J Gastrointest Surg** 2013; 17:1869-82.

Logan C, Nusse R. The Wnt signaling pathway in development and disease. **Annu Rev Cell Dev Biol** 2004; 20:781-810.

Marquardt JU, Thorgeirsson SS. Next-generation genomic profiling of hepatocellular adenomas: a new era of individualized patient care. **Cancer Cell** 2014; 25:409-11.

Marsh DJ, Coulon V, Lunetta KL, et al. Mutation spectrum and genotype-phenotype analyses in Cowden disease and Bannayan-Zonana syndrome, two hamartoma syndromes with germline PTEN mutation. **Hum Mol Genet** 1998; 7:507-15.

Matos AP. Focal liver lesions: Practical magnetic resonance imaging approach. **World J Hepatol** 2015; 7:1987.

McInnes MD, Hibbert RM, Inácio JR, Schieda N. Focal nodular hyperplasia and hepatocellular adenoma: accuracy of gadoxetic acid-enhanced mr imaging--a systematic review. **Radiology** 2015; 277:413-23.

Nault JC, Fabre M, Couchy G, et al. GNAS-activating mutations define a rare subgroup of inflammatory liver tumors characterized by STAT3 activation. **J Hepatol** 2012; 56:184-91.

Nault JC, Bioulac-Sage P, Zucman-Rossi J. Hepatocellular benign tumors—from molecular classification to personalized clinical care. **Gastroenterology** 2013; 144:888-902.

Ng KK-C, Poon RT-P, Lo C-M, et al. Impact of preoperative fine-needle aspiration cytologic examination on clinical outcome in patients with hepatocellular carcinoma in a tertiary referral center. **Arch Surg** 2004; 139:193-200.

Paradis V, Champault A, Ronot M, et al. Telangiectatic adenoma: an entity associated with increased body mass index and inflammation. **Hepatology** 2007; 46:140-6.

Parangi S, Levine D, Henry A, Isakovich N, Pories S. Surgical gastrointestinal disorders during pregnancy. **Am J Surg** 2007; 193:223-32.

Pilati C, Amessou M, Bihl MP, et al. Somatic mutations activating STAT3 in human inflammatory hepatocellular adenomas. **J Exp Med** 2011; 208:1359-66.

Pilati C, Letouzé E, Nault JC, et al. Genomic profiling of hepatocellular adenomas reveals recurrent FRK-activating mutations and the mechanisms of malignant transformation. **Cancer Cell** 2014; 25:428-41.

Raft MB, Jørgensen EN, Vainer B. Gene mutations in hepatocellular adenomas. **Histopathology** 2015; 66:910-21.

Rebouissou S, Amessou M, Couchy G, et al. Frequent in-frame somatic deletions activate gp130 in inflammatory hepatocellular tumours. **Nature** 2009; 457:200-4.

Rhim H, Lim HK, Kim Y-S, Choi D. Percutaneous radiofrequency ablation of hepatocellular adenoma: initial experience in 10 patients. **J Gastroenterol Hepatol** 2008; 23:e422-7.

Ribeiro HSC, Costa WL, Diniz AL, et al. Extended preoperative chemotherapy, extent of liver resection and blood transfusion are predictive factors of liver failure following resection of colorectal liver metastasis. **Eur J Surg Oncol** 2013; 39:380-5.

Rooks JB, Ory HW, Ishak KG, et al. Epidemiology of hepatocellular adenoma. The role of oral contraceptive use. **JAMA** 1979; 242:644-8.

Sag AA, Brody LA, Maybody M, et al. Acute and delayed bleeding requiring embolization after image-guided liver biopsy in patients with cancer. **Clin Imaging** 2016; 40:535-40.

Sempoux C, Chang C, Gouw A, et al. Benign hepatocellular nodules: what have we learned using the patho-molecular classification. **Clin Res Hepatol Gastroenterol** 2013; 37:322-7.

Stoot JHMB, Coelen RJS, De Jong MC, Dejong CHC. Malignant transformation of hepatocellular adenomas into hepatocellular carcinomas: a systematic review including more than 1600 adenoma cases. **HPB (Oxford)** 2010; 12:509-22.

Thapar M, Grapp O, Fisher C. Management of hepatic adenomatosis. **Curr Gastroenterol Rep** 2015; 17:12.

Van Aalten SM, De Man RA, IJzermans JNM, Terkivatan T. Systematic review of haemorrhage and rupture of hepatocellular adenomas. **Br J Surg** 2012; 99:911-6.

Van der Borght S, Libbrecht L, Katoonizadeh A, et al. Nuclear beta-catenin staining and absence of steatosis are indicators of hepatocellular adenomas with an increased risk of malignancy. **Histopathology** 2007; 51:855-6.

Vaxillaire M, Rouard M, Yamagata K, et al. Identification of nine novel mutations in the hepatocyte nuclear factor 1 alpha gene associated with maturity-onset diabetes of the young (MODY3). **Hum Mol Genet** 1997; 6:583-6.

Vijay A, Elaffandi A, Khalaf H. Hepatocellular adenoma: An update. **World J Hepatol** 2015; 7:2603-9.

Wang L, Wang J, Zhang X, et al. Diagnostic value of preoperative needle biopsy for tumor grading assessment in hepatocellular carcinoma. **PLoS One** 2015; 10:e0144216.

Weinstein LS, Liu J, Sakamoto A, Xie T, Chen M. Minireview: GNAS: normal and abnormal functions. **Endocrinology** 2004; 145:5459-64.

Zucman-Rossi J, Jeannot E, Van Nhieu JT, et al. Genotype-phenotype correlation in hepatocellular adenoma: New classification and relationship with HCC. **Hepatology** 2006; 43:515-24.

Anexo 1 - Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa-CEP



**A.C. Camargo
Cancer Center**

**Comitê de Ética em
Pesquisa - CEP**

São Paulo, 01 de dezembro de 2014.

A

Dra. Maria Dirlei Ferreira de Souza Begnami.

Aluno: André Luís de Godoy (Mestrado).

Ref.: Projeto de Pesquisa nº. 1981/14

“Classificação molecular dos adenomas hepáticos através de marcadores imunoistoquímicos”

Os membros do Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Fundação Antonio Prudente – Hospital do Câncer - A.C. Camargo/SP, em sua última reunião de 11/11/2014, **aprovaram** a realização do projeto (datado de 09 de novembro de 2014) e tomaram conhecimento dos seguintes documentos:

- Folha de Rosto para Pesquisa Envolvendo Seres Humanos;
- Termo de Compromisso do Pesquisador com Resoluções do Conselho Nacional de Saúde;
- Termo de Dispensa do Consentimento Livre e Esclarecido;
- Declaração Sobre os Dados Coletados, Publicação dos Dados e Propriedade das Informações Geradas;
- Declaração Sobre o Uso e Destino do Material Biológico, Publicação dos Dados e Propriedade das Informações Geradas;
- Declaração de Ciência e Comprometimento do Departamento de Anatomia Patológica;
- Declaração de Ciência e Comprometimento do Departamento de Cirurgia Abdominal;
- Declaração de Infraestrutura e Instalações do Departamento de Cirurgia Abdominal;
- Orçamento Financeiro Detalhado.

Informações a respeito do andamento do referido projeto deverão ser encaminhadas ao CEP dentro de 06 meses em relatório (modelo CEP).

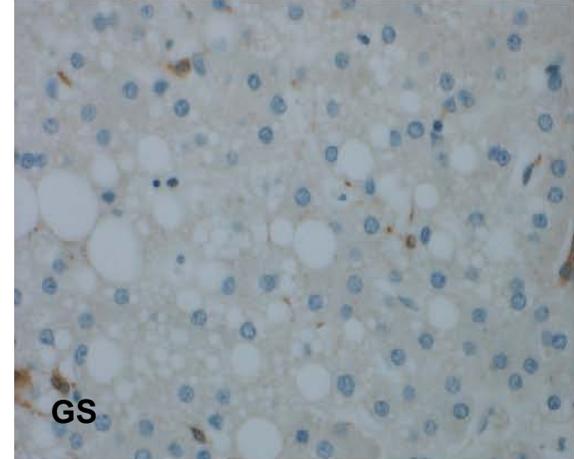
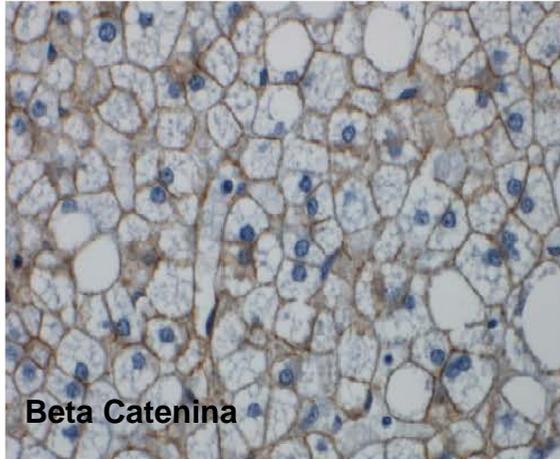
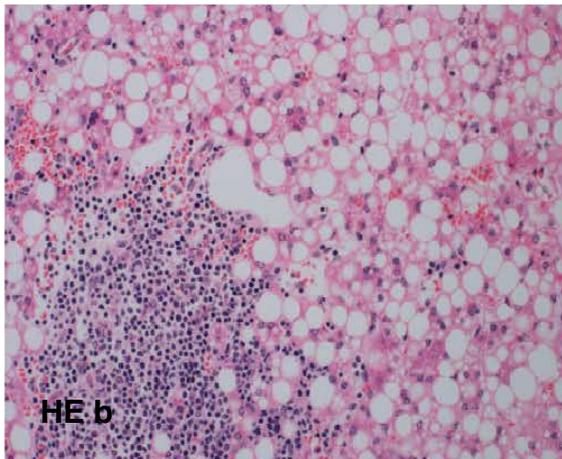
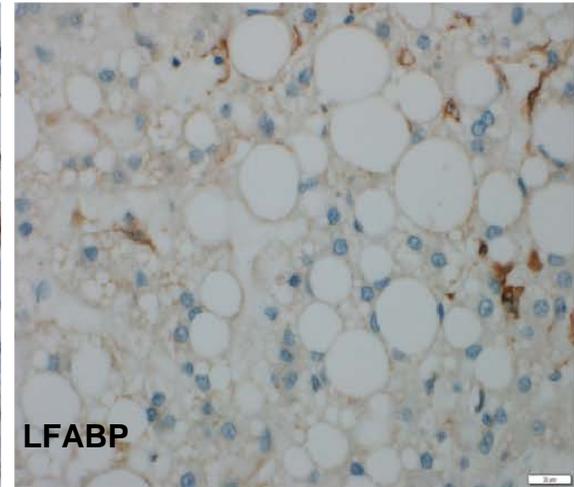
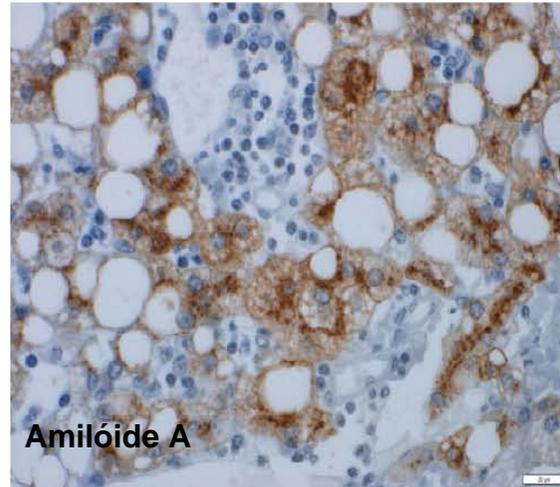
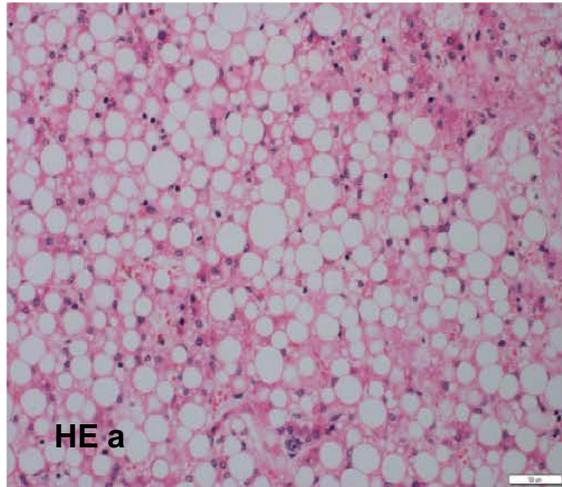
Atenciosamente,


Dr. Jefferson Luiz Gross

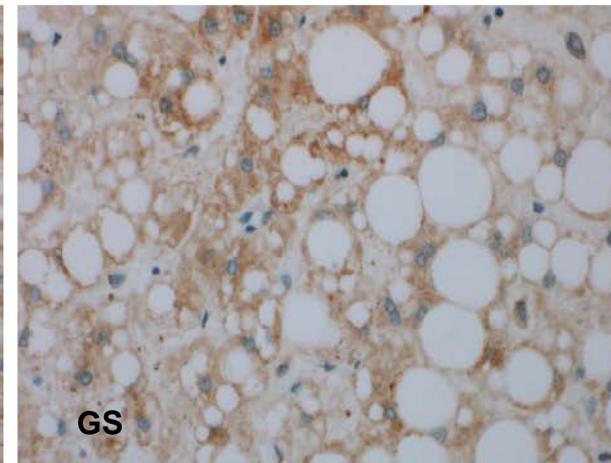
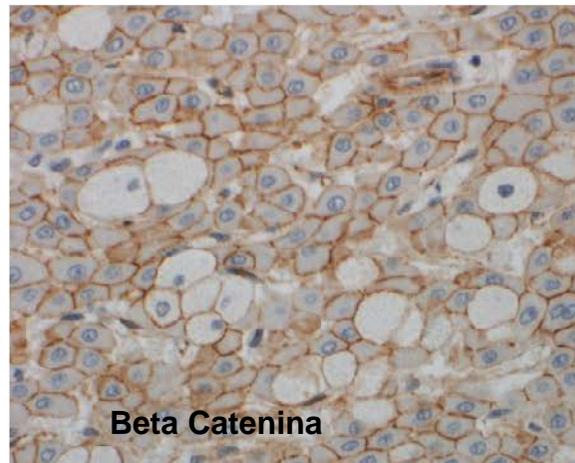
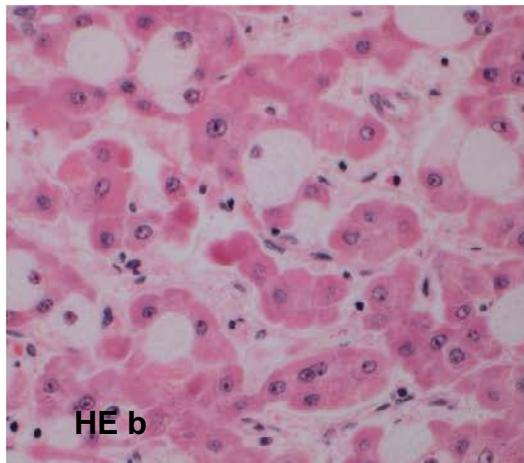
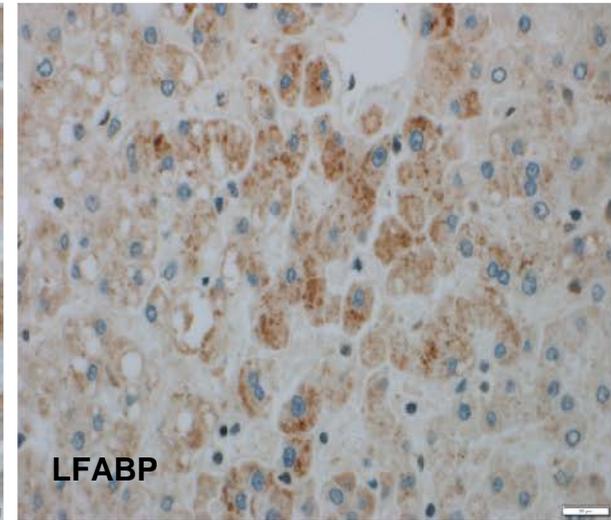
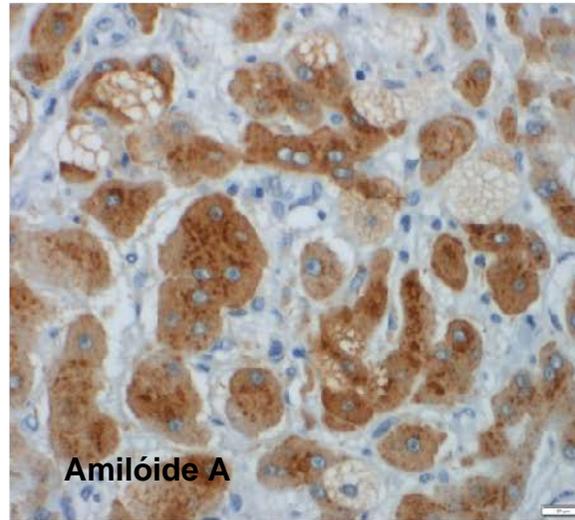
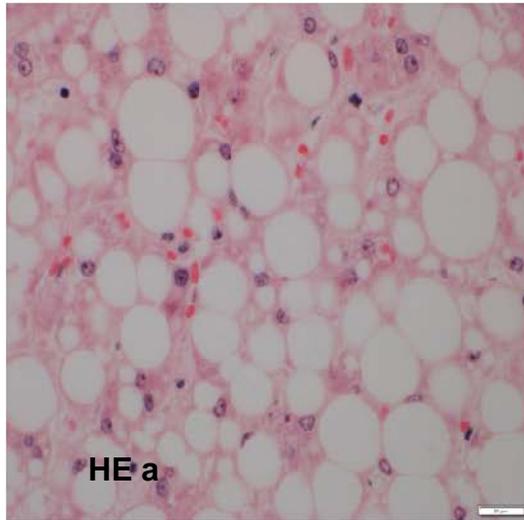
1º Vice-Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa

1/1

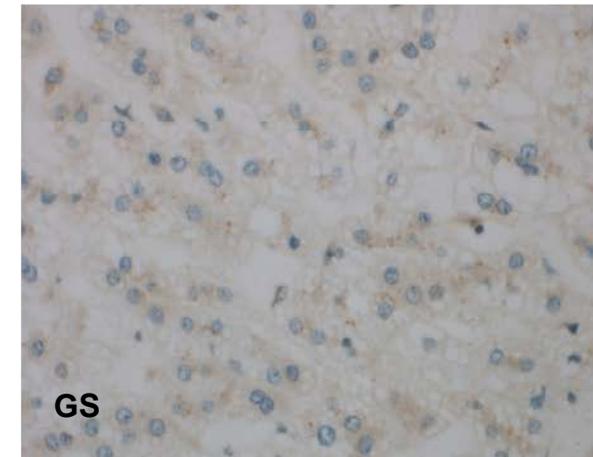
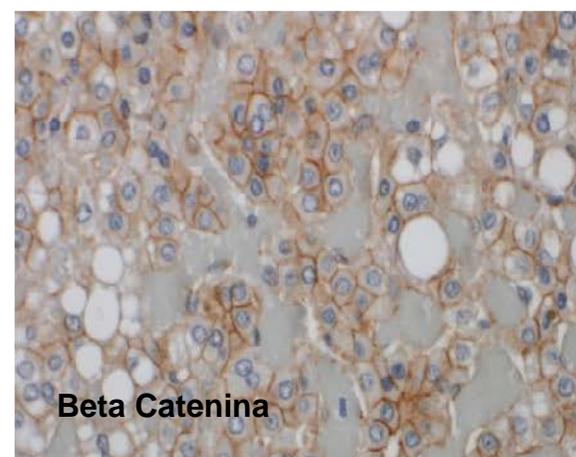
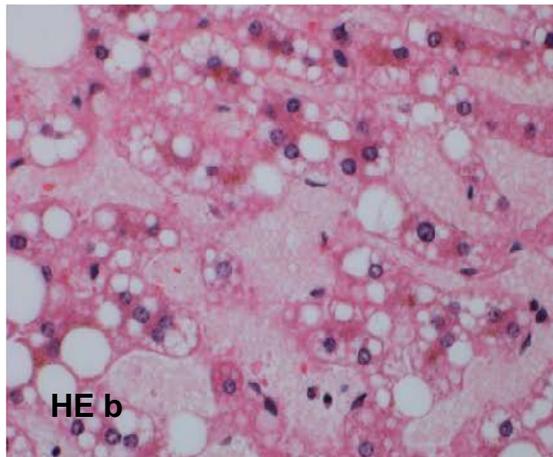
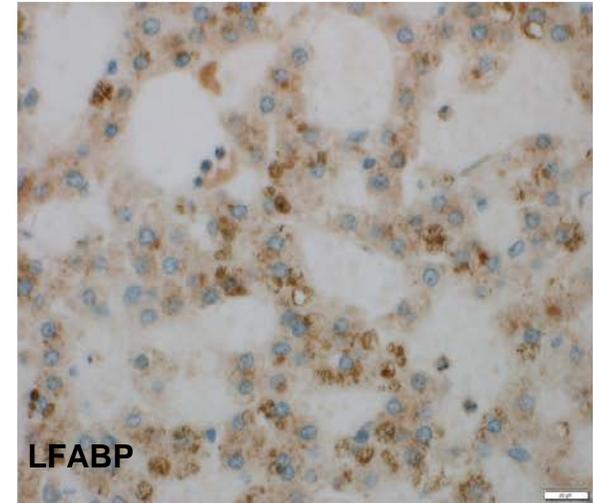
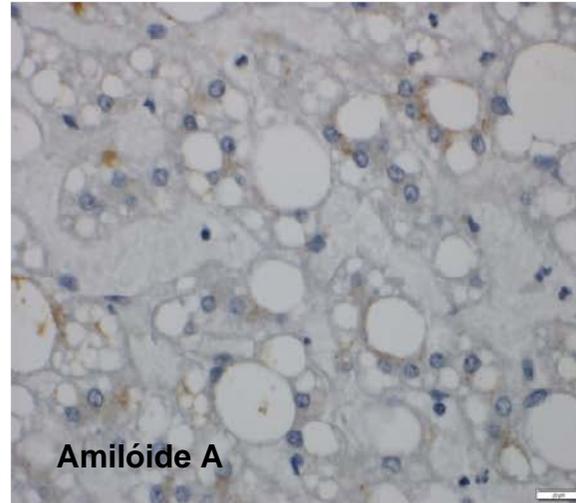
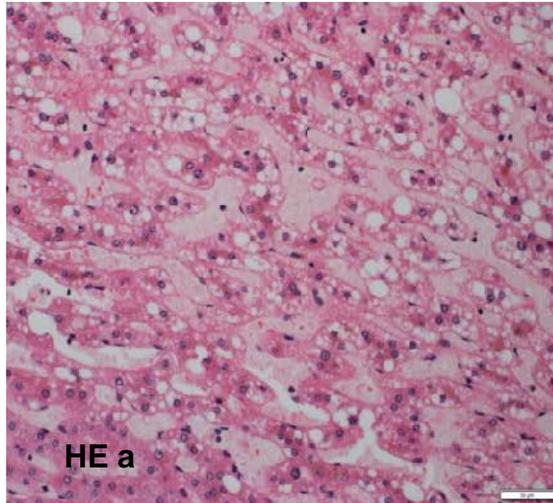
Anexo 2 - Figuras dos AHC, em Hematoxilina Eosina (HE) e com a IMQ para Amilóide A, LFABP, proteína Beta catenina e Glutamina Sintetase (GS), com a identificação dos casos.



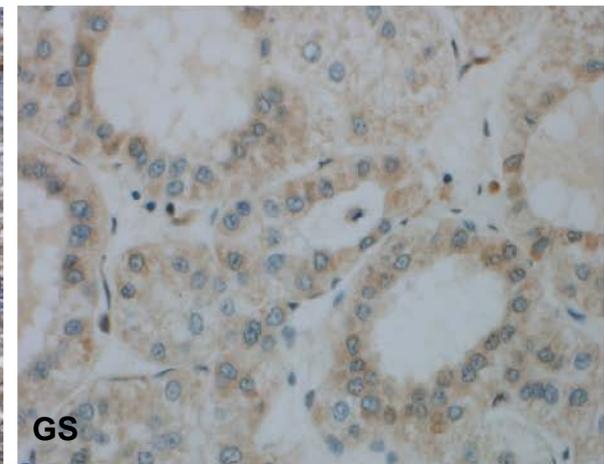
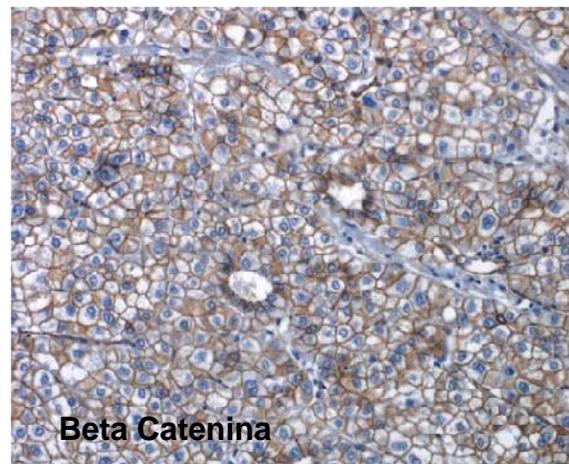
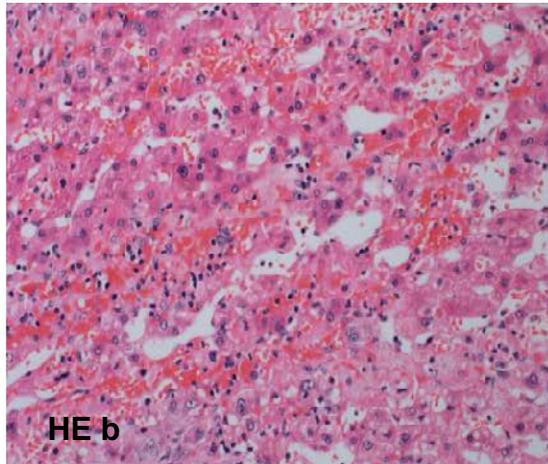
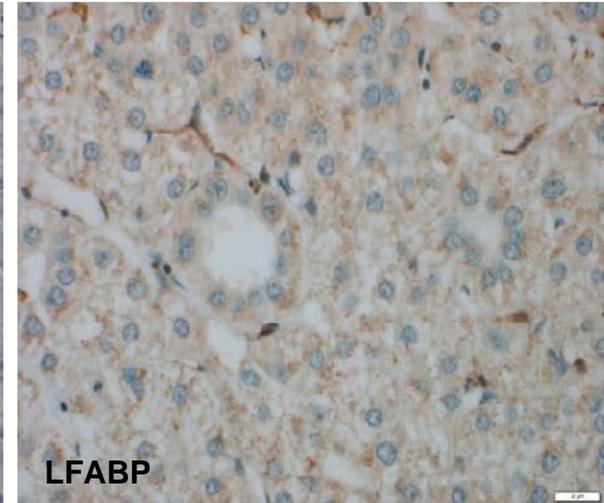
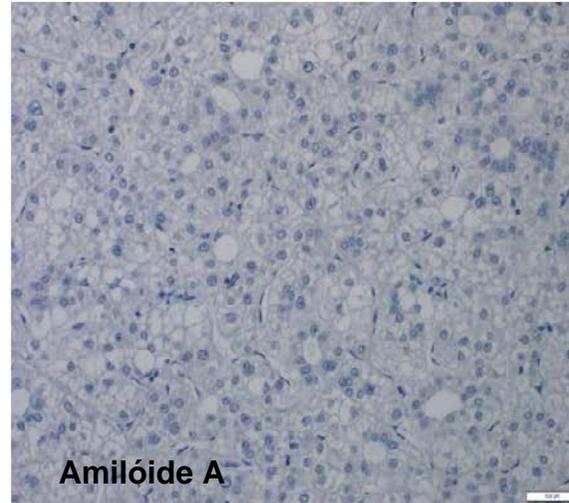
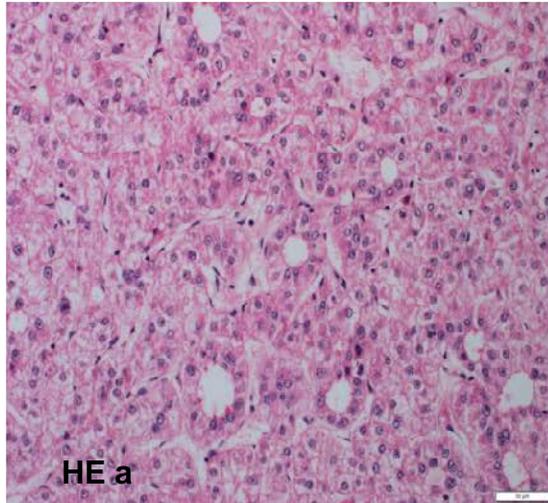
Caso 1 - AHC I; (918599); HE a, HE b: Áreas de esteatose e infiltrado inflamatório linfocitário. Marcação IMQ para Amilóide A exibindo forte expressão citoplasmática nas células neoplásicas; expressão fraca, citoplasmática para a proteína LFABP; expressão forte na membrana das células para a proteína Beta catenina e positividade forte e negatividade nas células neoplásicas para a GS. Tamanho original de 40x para todas as imagens.



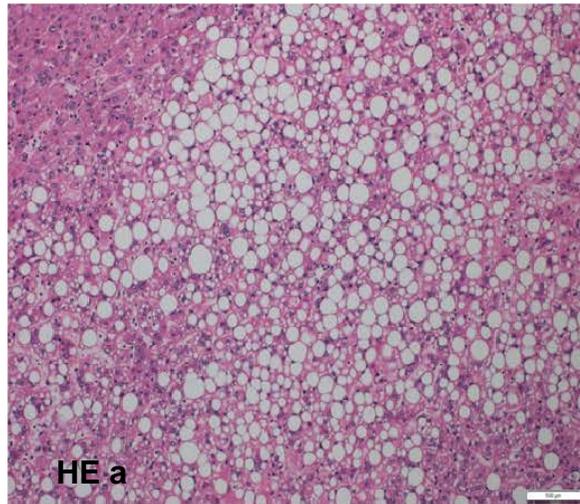
Caso 2 - AHC I; (1018015); HE a, HE b: Áreas de esteatose e arranjos pseudoacinares. Marcação IMQ para Amilóide A exibindo forte expressão citoplasmática nas células neoplásicas; expressão moderada para LFABP; expressão forte na membrana das células para a proteína Beta catenina e positividade difusa no citoplasma das células neoplásicas para GS. Tamanho original de 40x para todas as imagens.



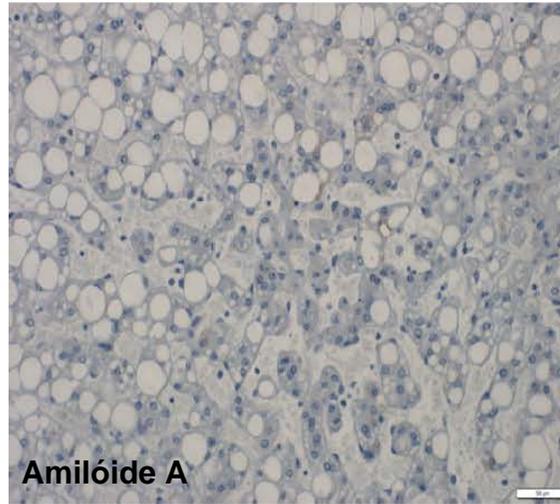
Caso 3 - AHC Inclassificável; (1103112); HE a; HE b: Esteatose macro e microvesicular. Marcação IMQ negativa para Amilóide A; expressão moderada, citoplasmática para a proteína LFABP; expressão forte na membrana das células para a proteína Beta catenina e positividade fraca no citoplasma das células neoplásicas para a GS. 40x para todas as imagens.



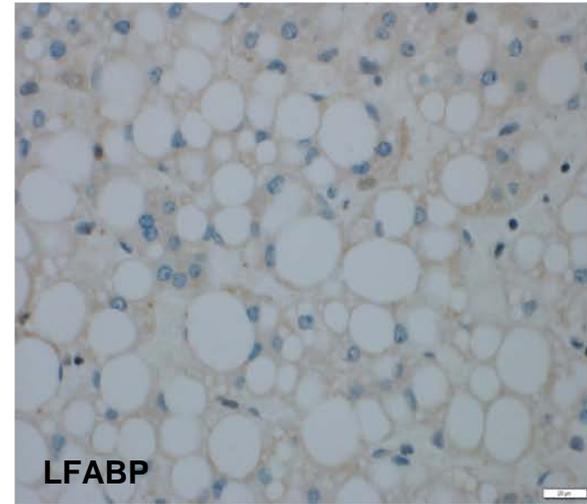
Caso 4 - AHC Inclassificável; (1113439); HE a, HE b: arranjos pseudoacinares, focos de hemorragia. Marcação IMQ negativa para Amilóide A; expressão fraca, citoplasmática para a proteína LFABP; expressão forte na membrana das células para a proteína Beta catenina e positividade moderada e difusa no citoplasma das células neoplásicas para a GS. 40x para todas as imagens.



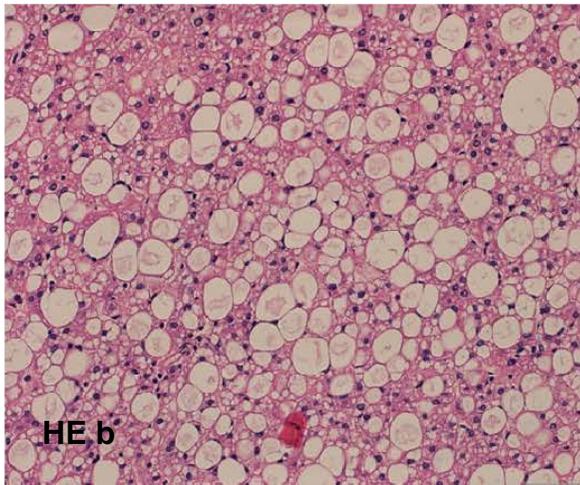
HE a



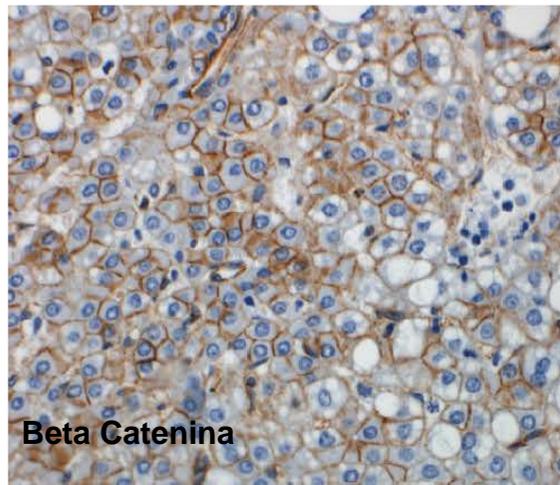
Amilóide A



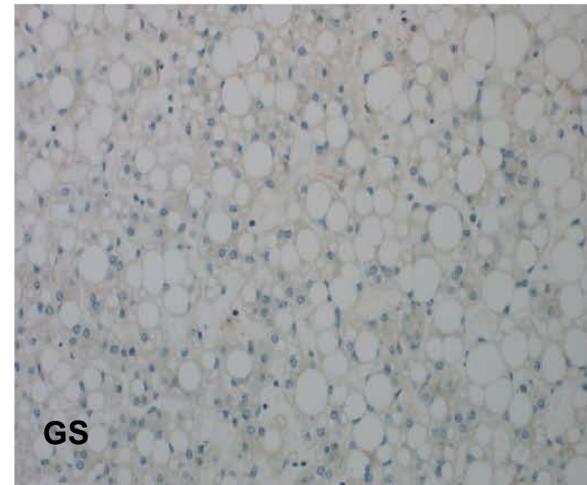
LFABP



HE b

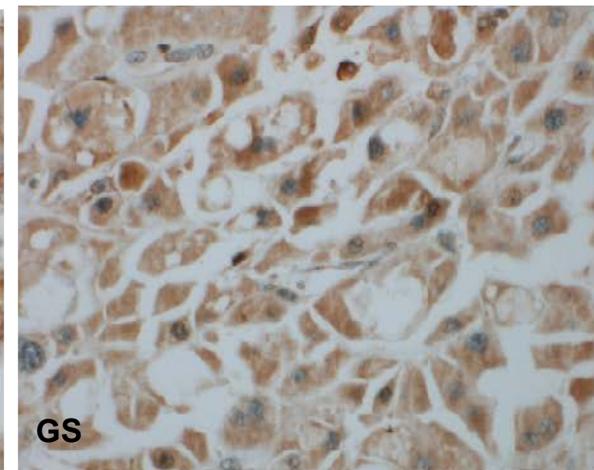
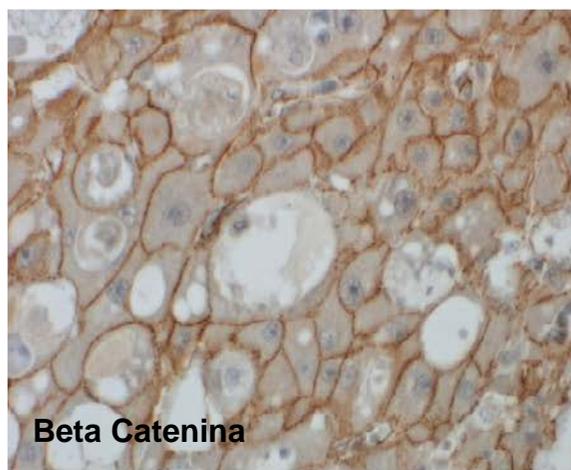
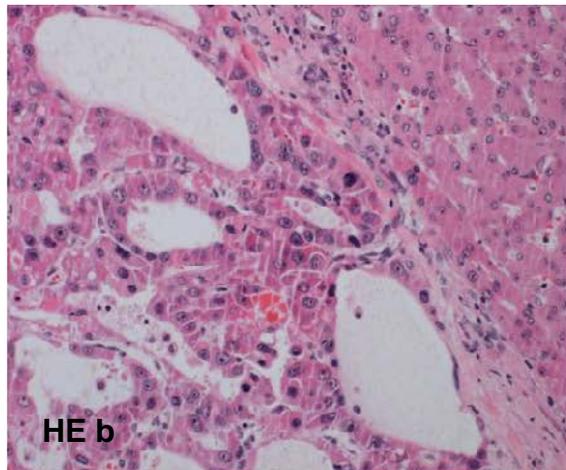
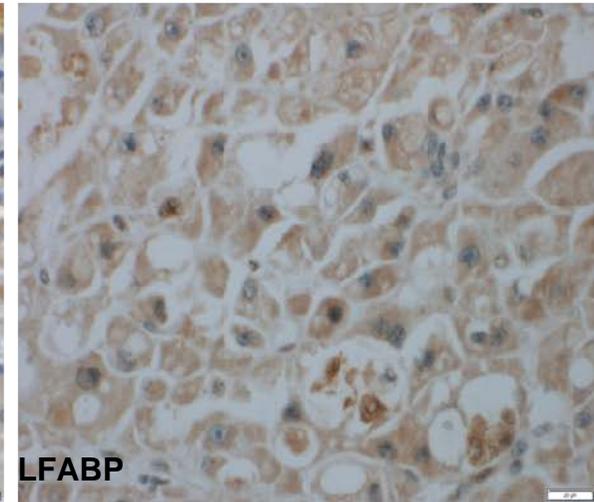
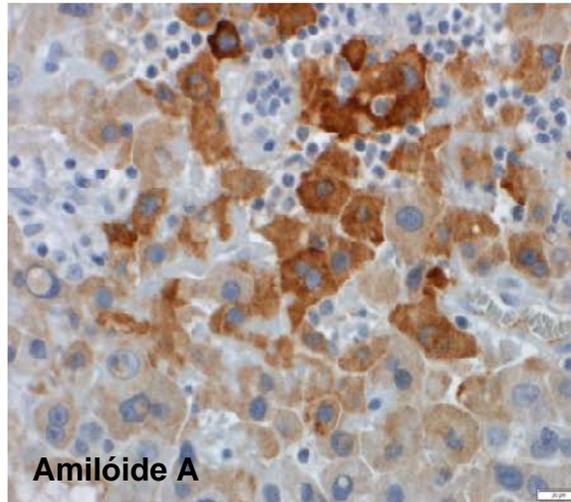
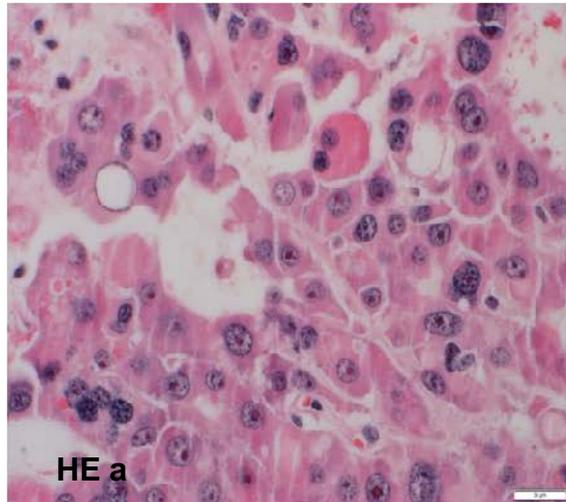


Beta Catenina

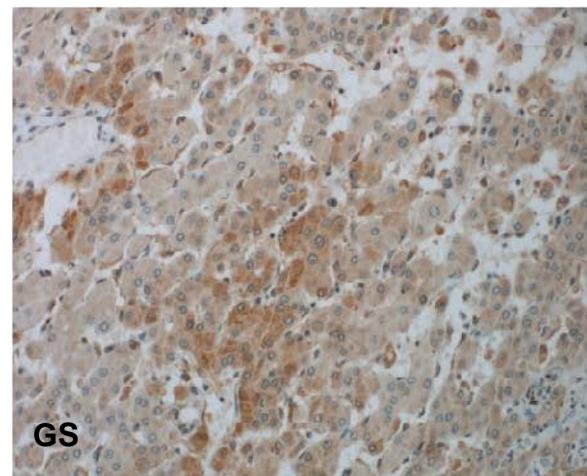
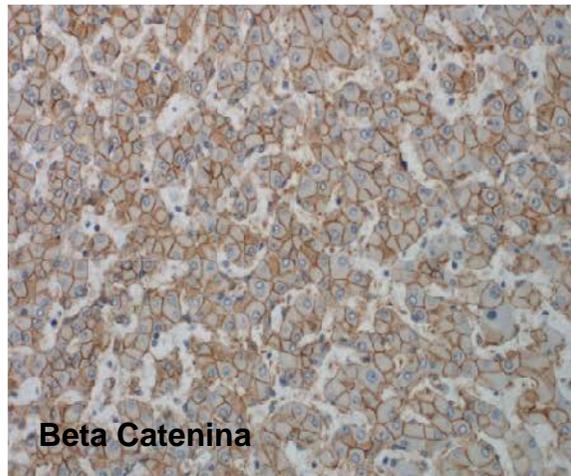
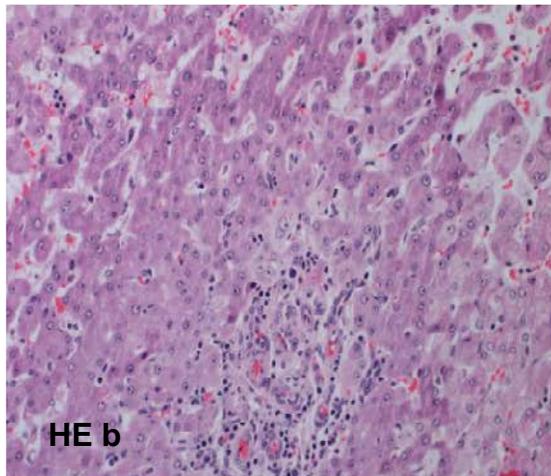
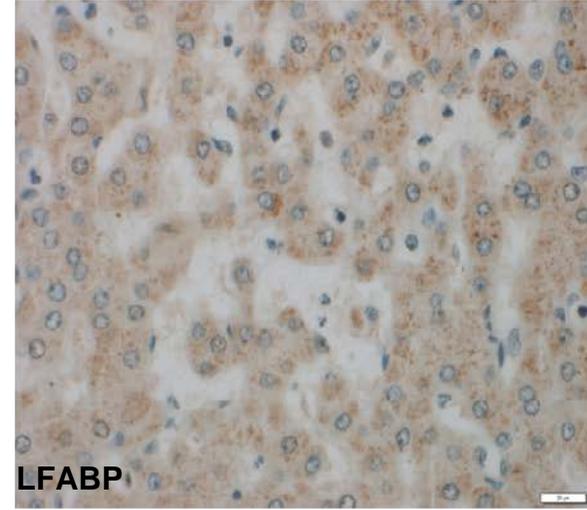
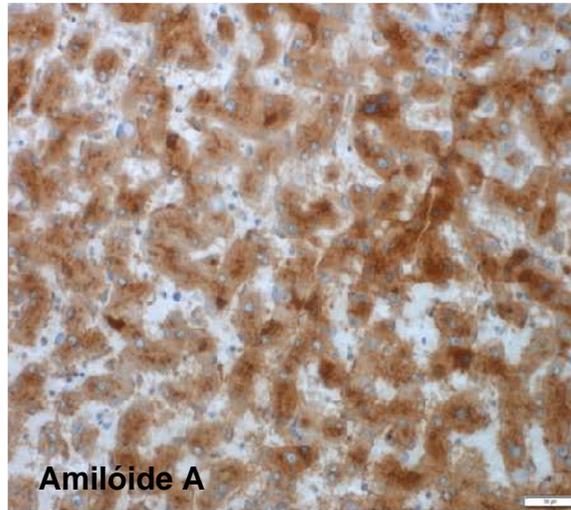
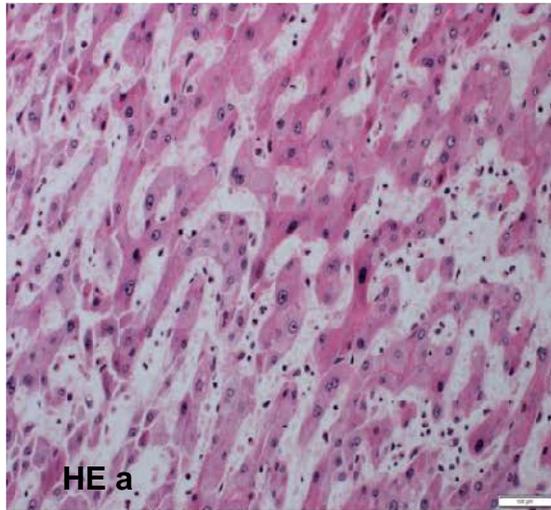


GS

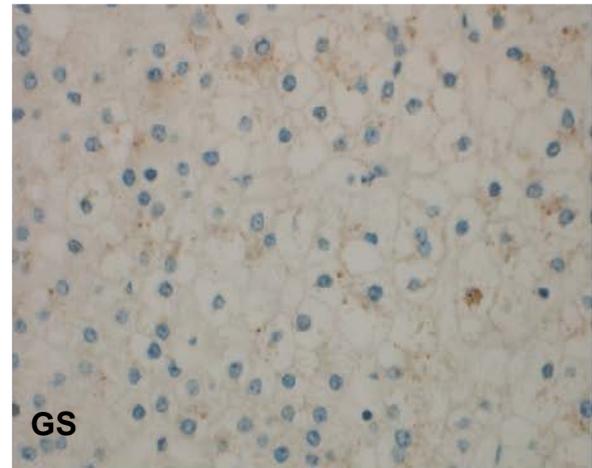
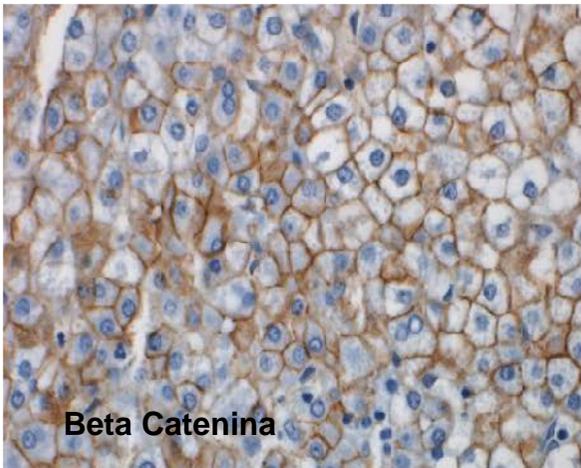
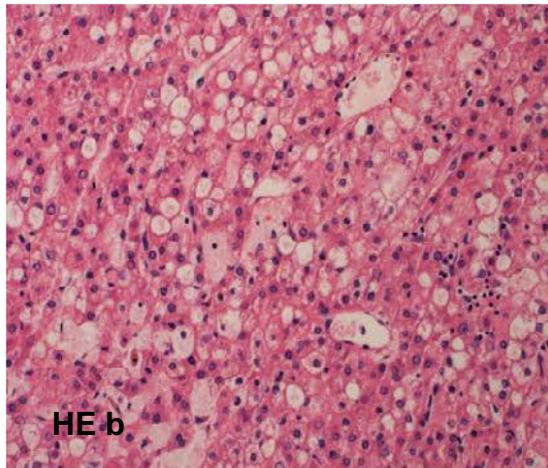
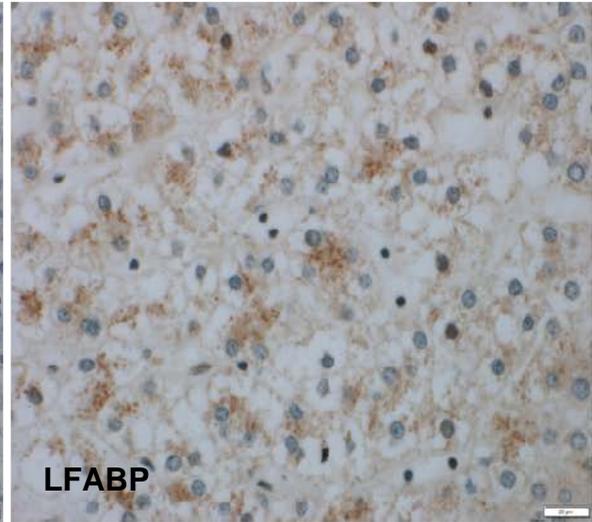
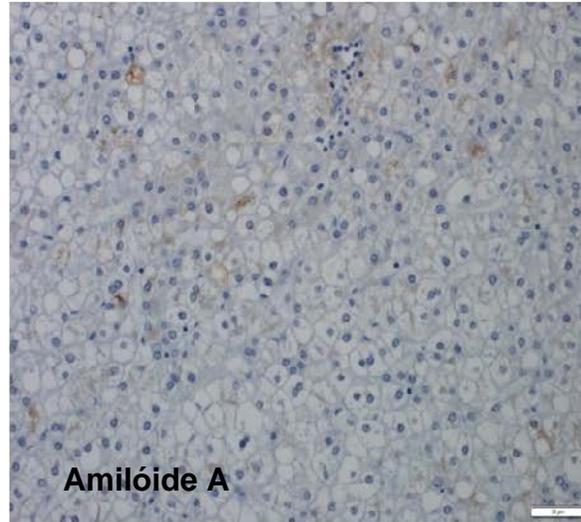
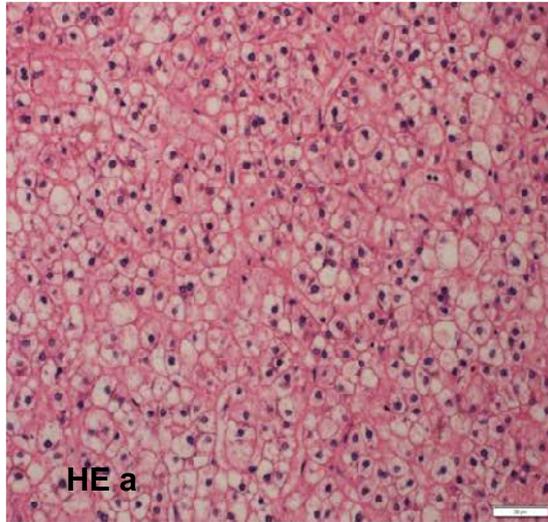
Caso 5 - AHC Inclassificável; (1122799); HE a; HE b: Esteatose macro e microvesicular. IMQ negativa para Amilóide A; expressão fraca, citoplasmática para a proteína LFABP; expressão forte na membrana das células para a proteína Beta catenina e positividade fraca no citoplasma das células neoplásicas para a proteína GS. 40x



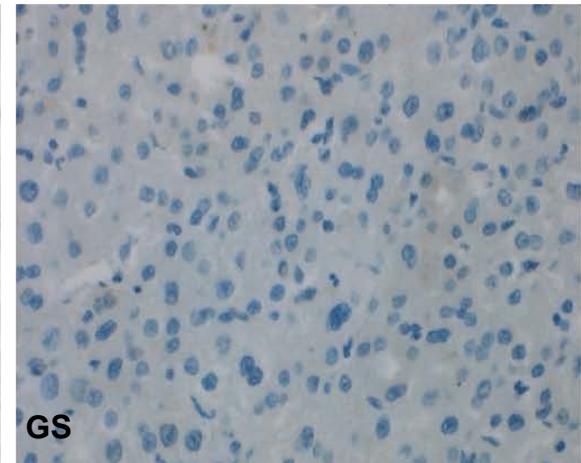
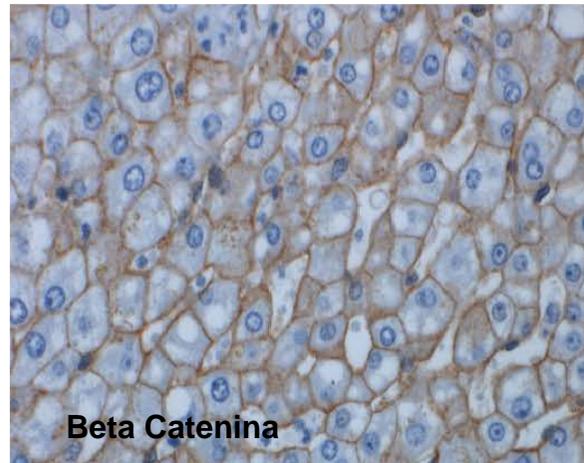
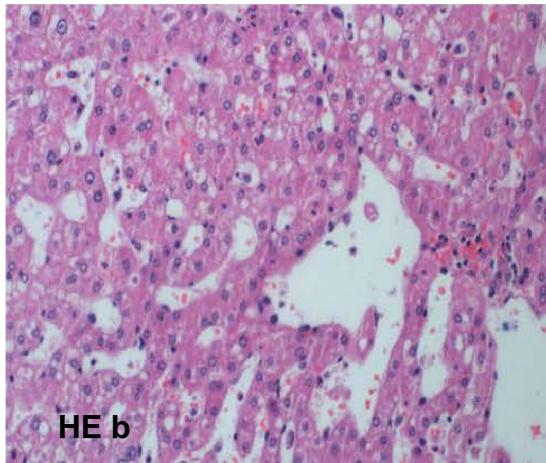
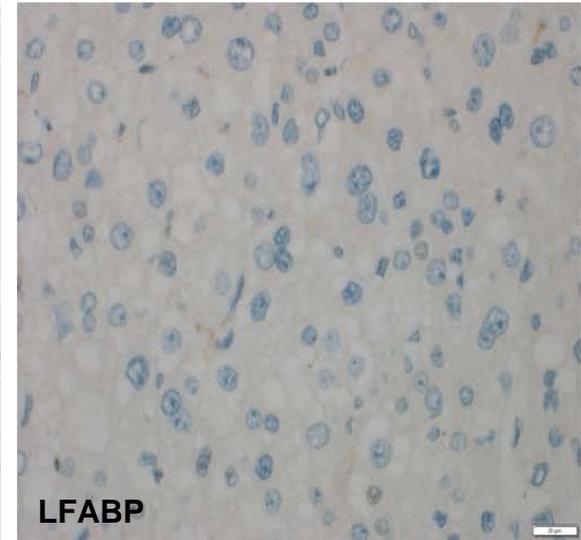
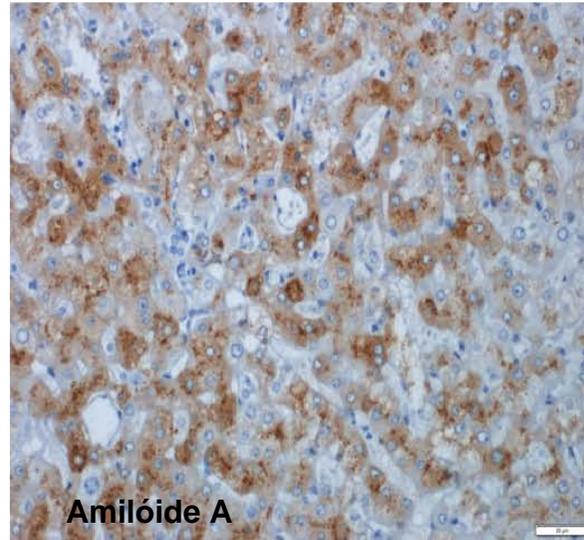
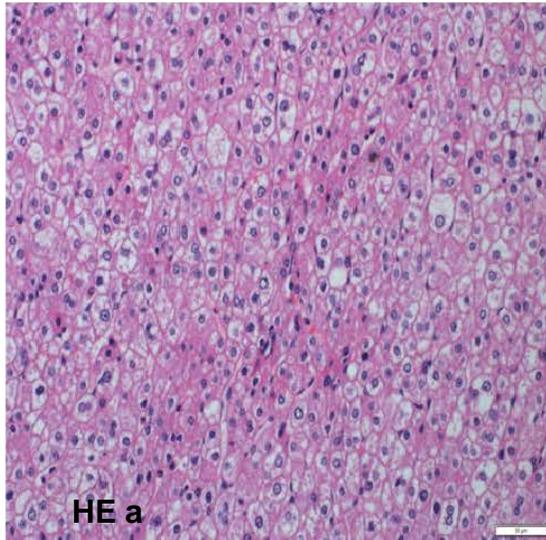
Caso 6 - AHC I Beta catenina Ativada; (1125743); HE a, HE b: Células com atipias nucleares, arranjos pseudoacinares e vasos sanguíneos com espessamento de parede. IMQ para Amilóide A exibindo forte expressão citoplasmática nas células neoplásicas; expressão moderada para a proteína LFABP; expressão forte na membrana, para a proteína Beta catenina e positividade forte e difusa no citoplasma das células neoplásicas para a GS. 40x.



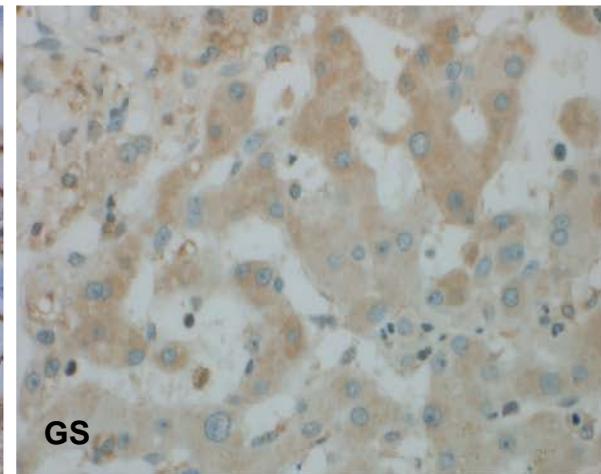
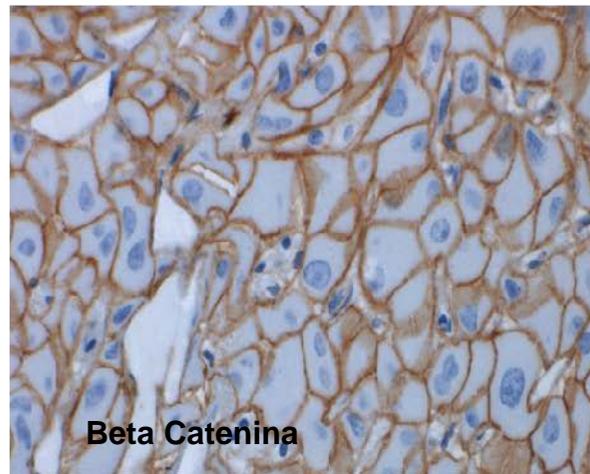
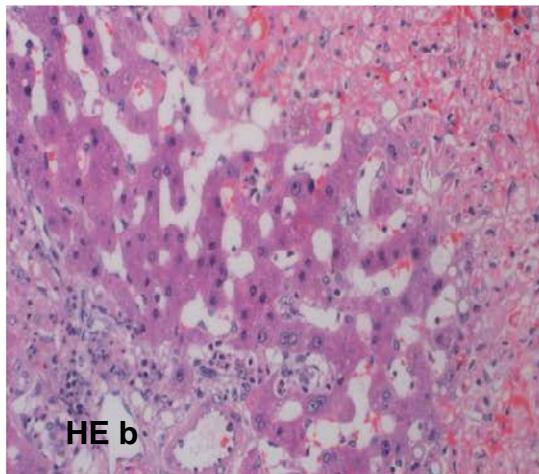
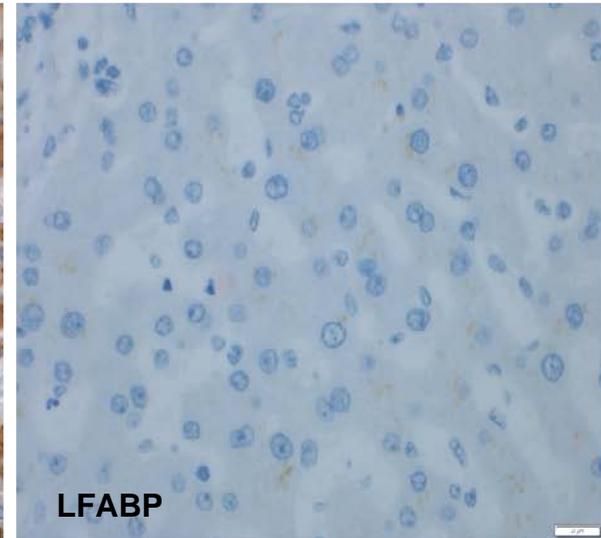
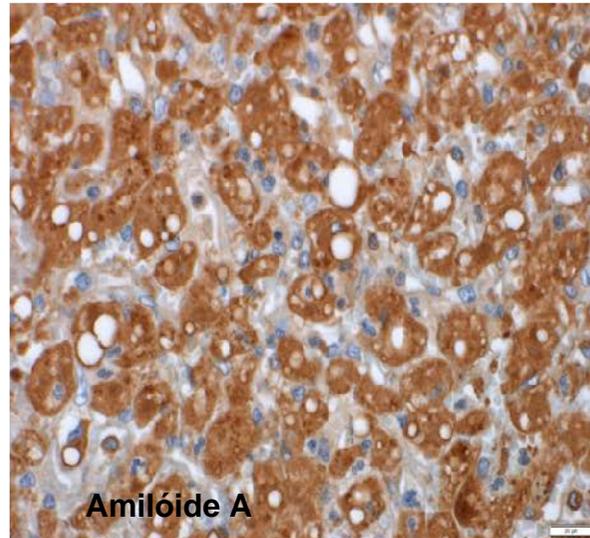
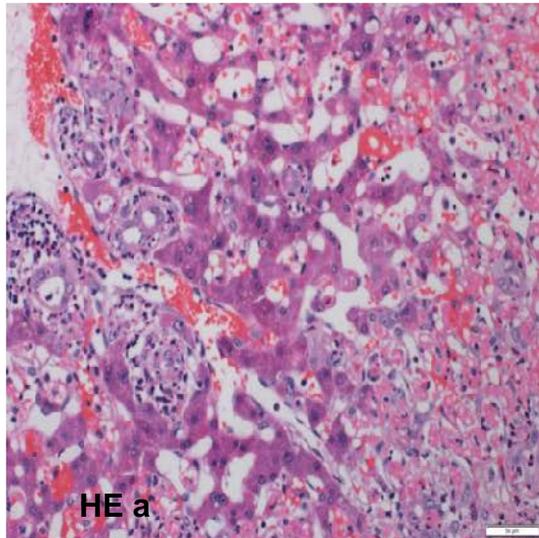
Caso 7 - AHC I com Ativação da Beta catenina; (1139643) HE a, HE b: Células com arranjos trabeculares, dilatação sinusoidal e infiltrado linfocitário. IMQ para Amilóide A exibindo forte expressão citoplasmática nas células neoplásicas; expressão moderada, citoplasmática para a proteína LFABP; expressão forte na membrana das células para a proteína beta catenina e positividade forte e difusa no citoplasma das células neoplásicas para a GS . 40x.



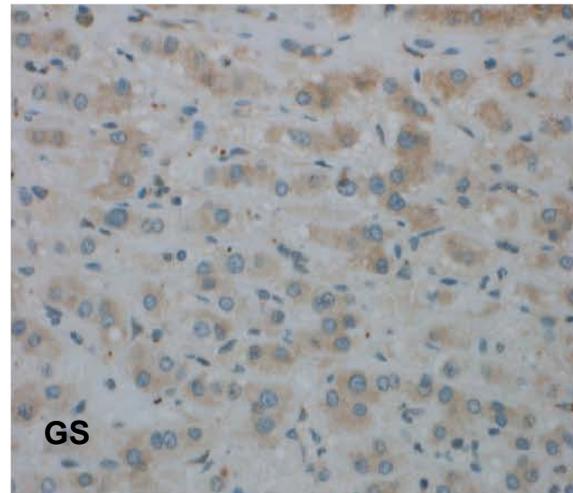
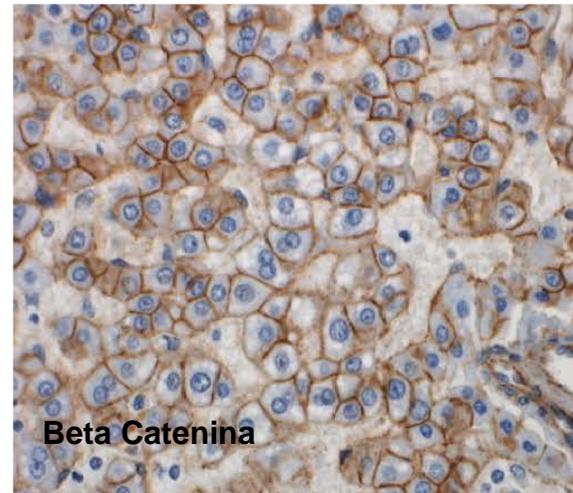
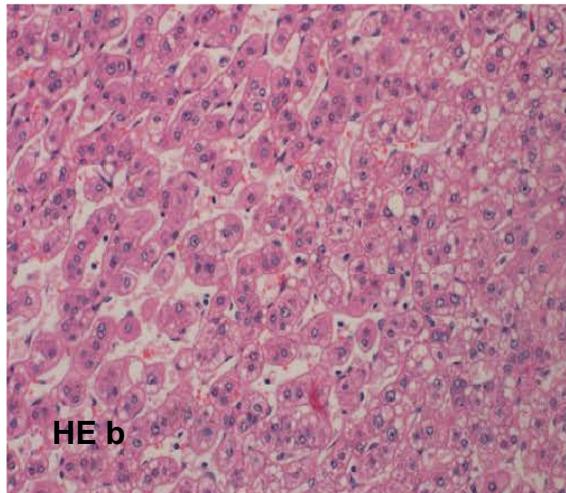
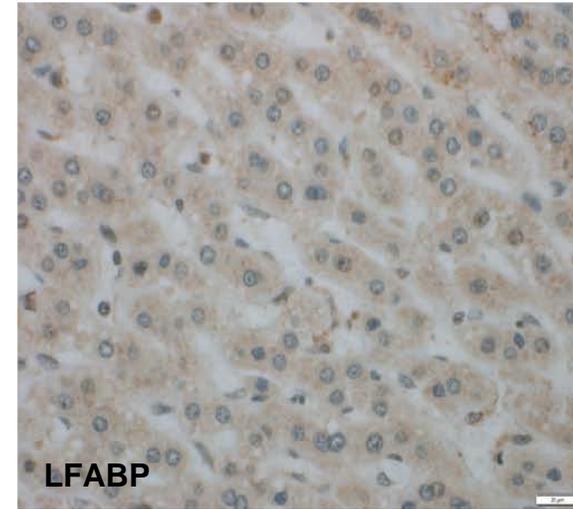
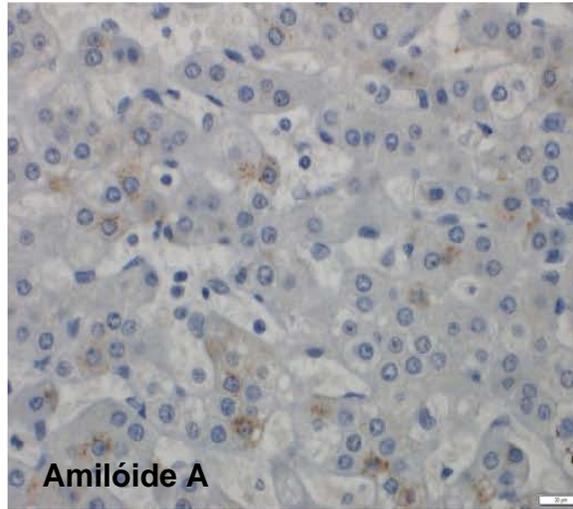
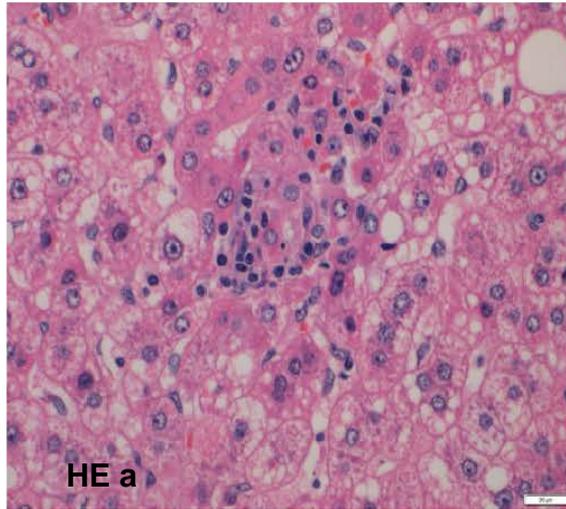
Caso 8 - AHC I; (1204786); HE a, HE b: Esteatose macro e microvesicular. Marcação IMQ negativa para Amilóide A; expressão fraca, citoplasmática para a proteína LFABP; expressão forte na membrana das células para a proteína Beta catenina e positividade fraca no citoplasma das células neoplásicas para a proteína GS. 40x.



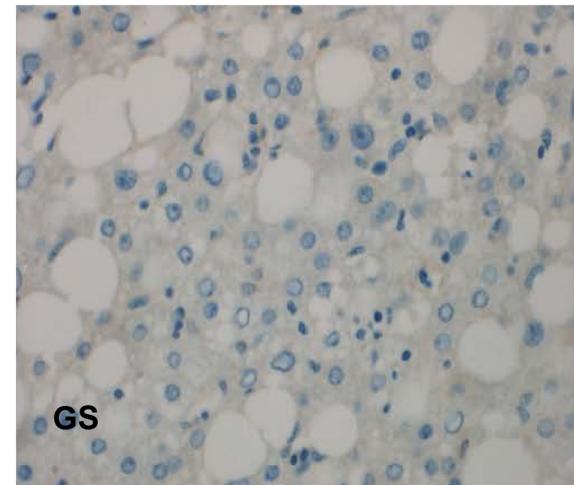
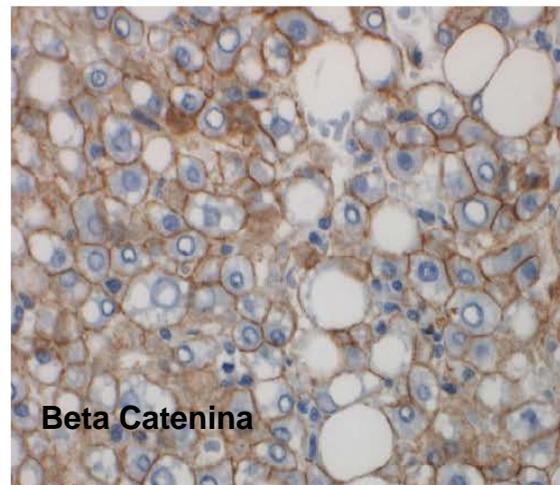
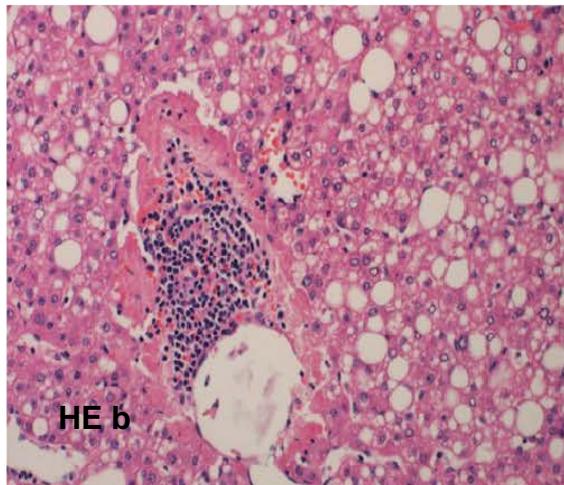
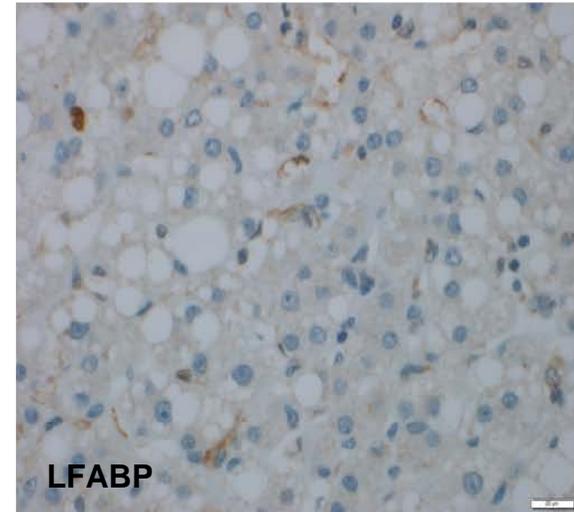
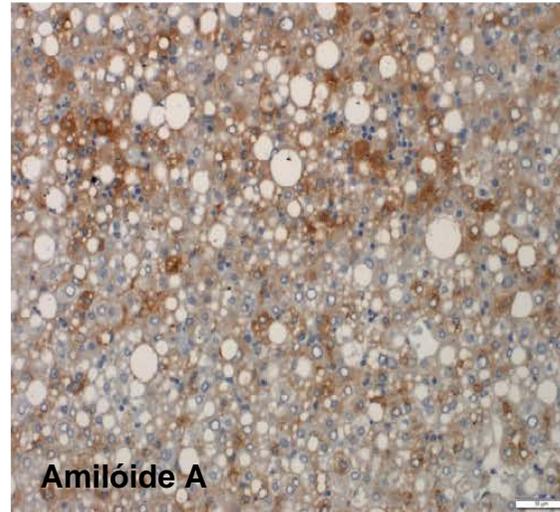
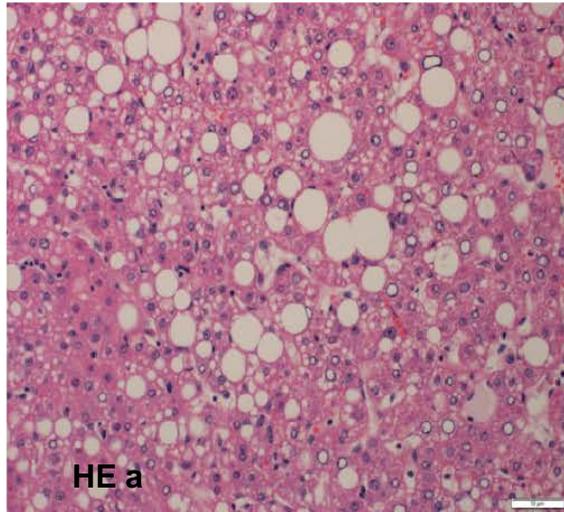
Caso 9 - AHC I; (1253469); HE a, HE b: células com arranjos trabeculares, dilatação sinusoidal e infiltrado linfocitário. IMQ para Amilóide A exibindo forte expressão citoplasmática nas células neoplásicas; expressão fraca LFABP; expressão forte na membrana das células para a proteína Beta catenina e negatividade para a proteína GS. 40x.



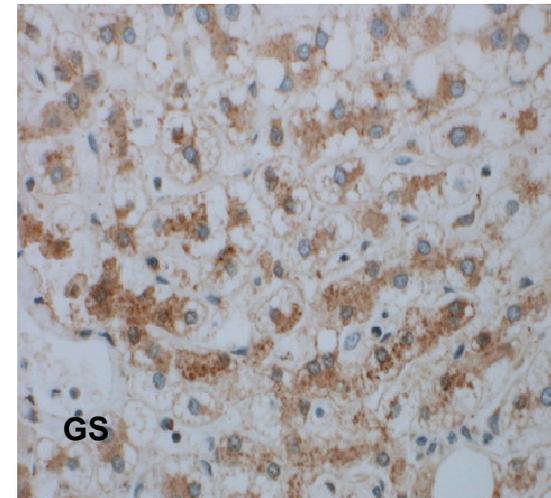
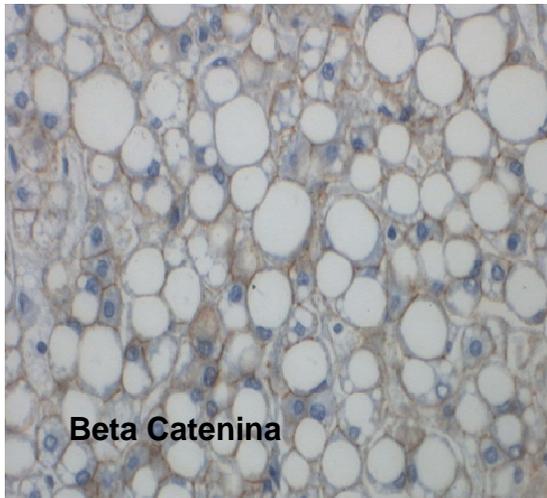
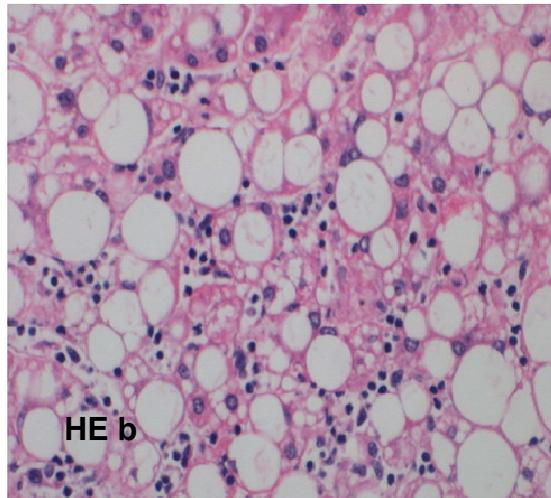
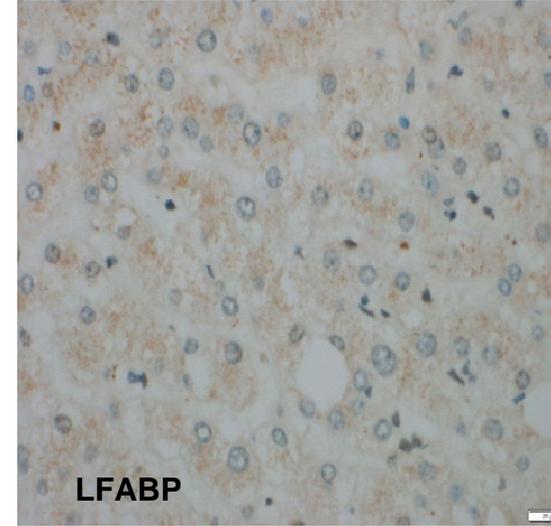
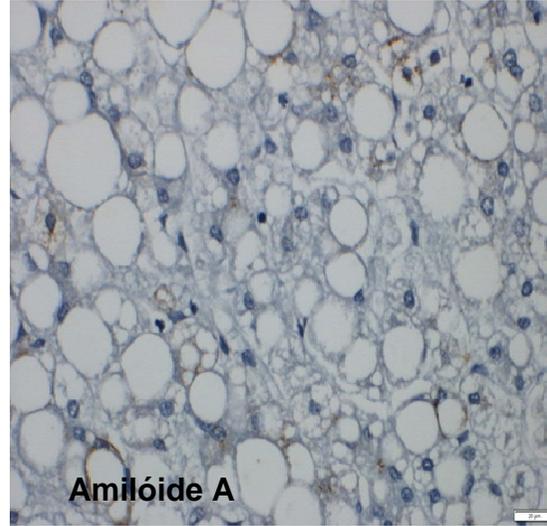
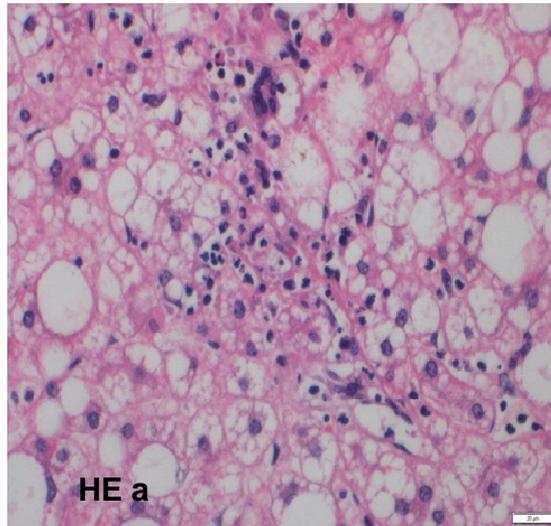
Caso 9 - AHC I; (1254723); HE a, HE b: Células com arranjos trabeculares, dilatação sinusoidal e infiltrado linfocitário. Marcação IMQ para Amilóide A exibindo forte expressão citoplasmática nas células neoplásicas; expressão fraca, citoplasmática para a proteína LFABP; expressão forte na membrana das células para a proteína Beta catenina e positividade fraca e difusa no citoplasma das células neoplásicas para GS. 40x.



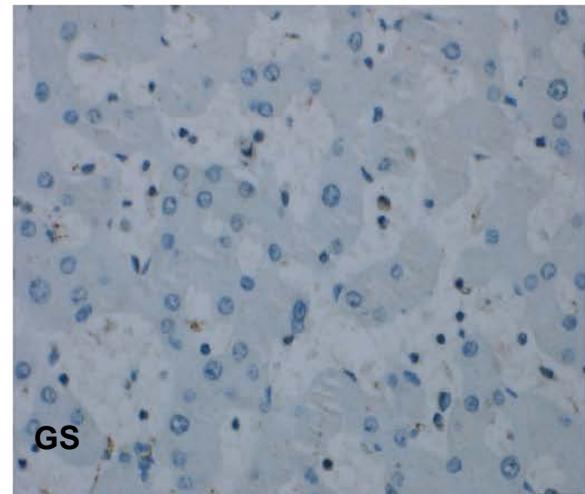
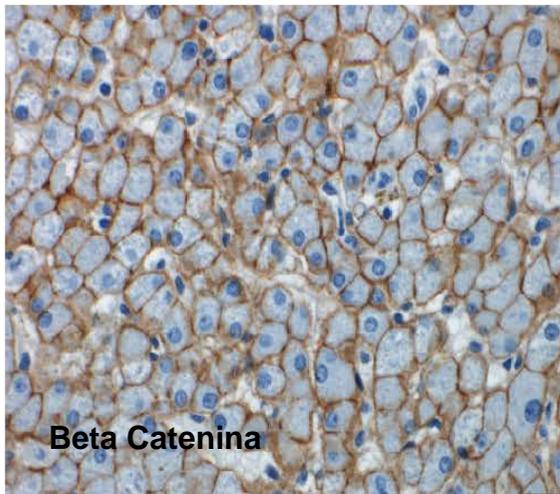
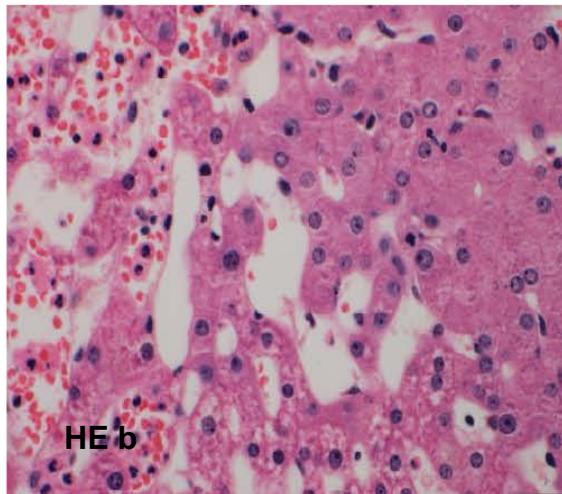
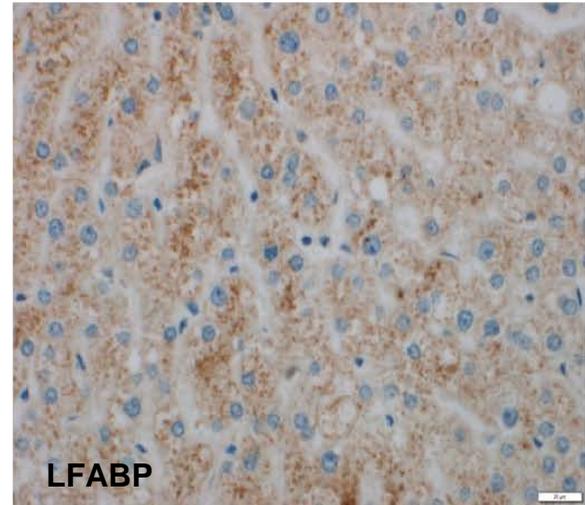
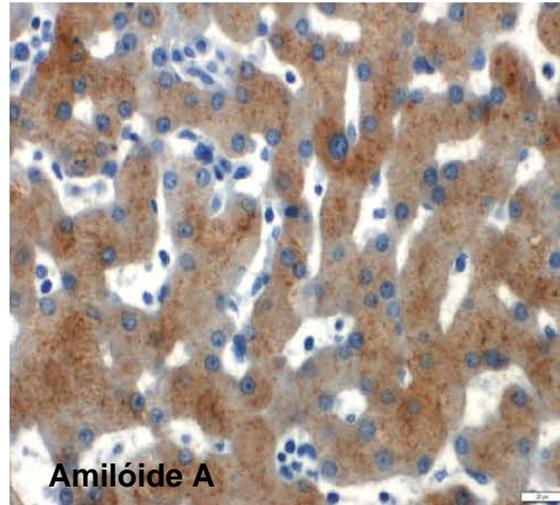
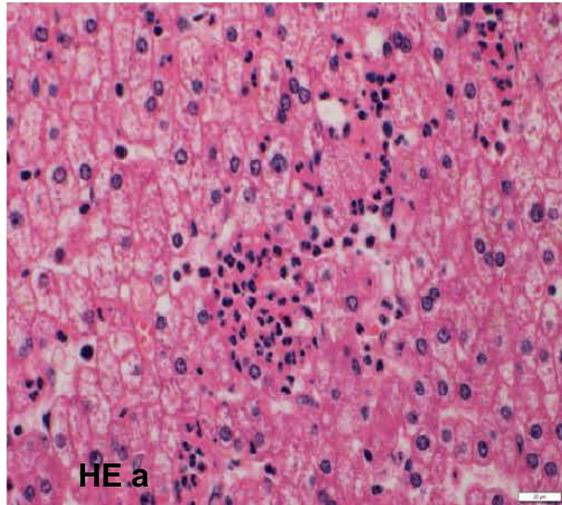
Caso 10 - AHC I; (1312125) HE a, HE b: Células com arranjos trabeculares, dilatação sinusoidal e infiltrado linfocitário. IMQ para Amilóide A exibindo fraca e focal expressão citoplasmática nas células neoplásicas; expressão moderada, citoplasmática para a proteína LFABP; expressão forte na membrana das células para a proteína Beta catenina e positividade moderada e difusa no citoplasma das células neoplásicas para a proteína GS. 40x.



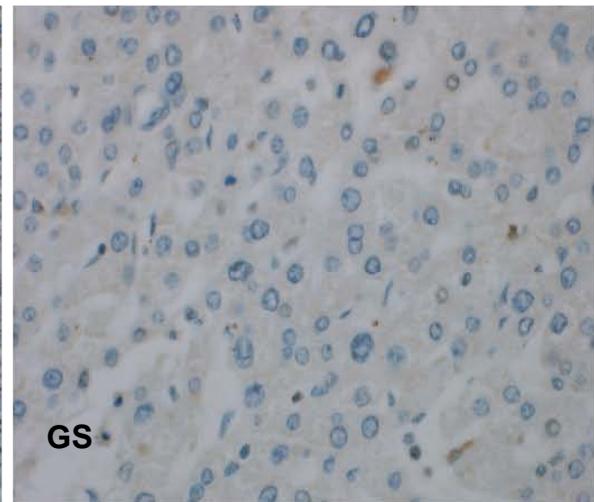
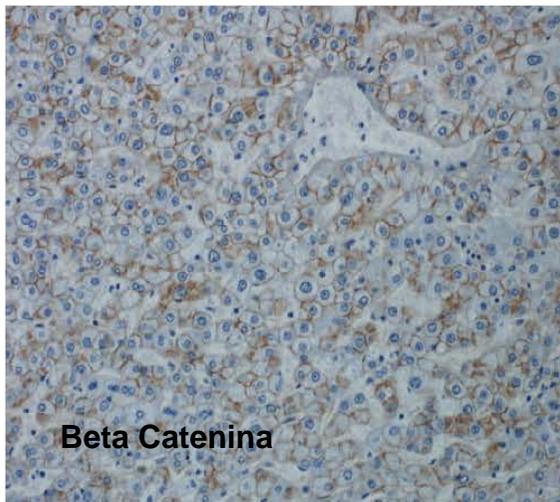
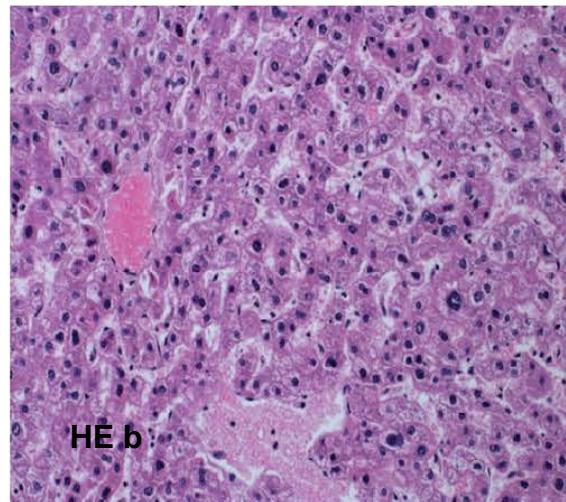
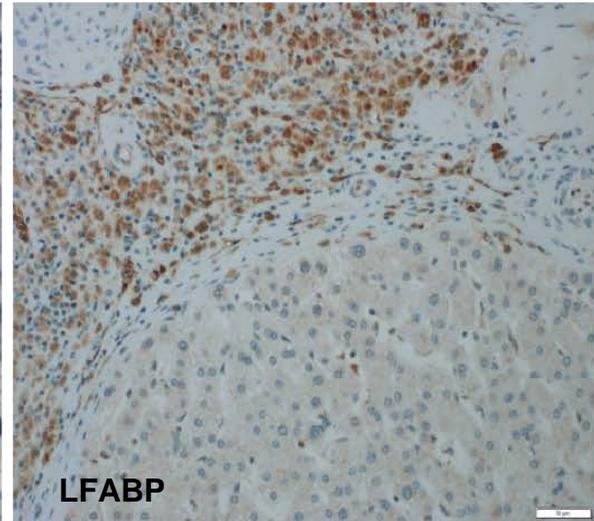
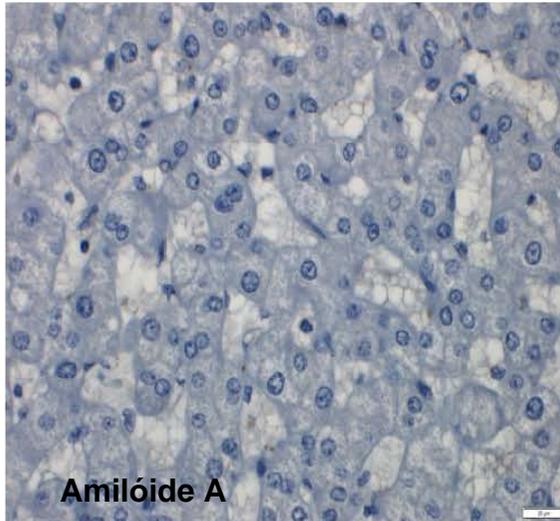
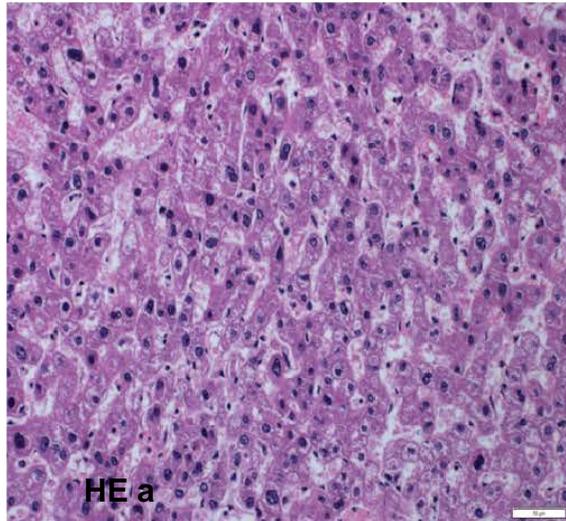
Caso 11 - AHC I; (1365875); HE a, HE b: Presença de esteatose macro e microvesicular com focos de infiltrado linfocitário. Marcação IMQ para Amilóide A com positividade forte e difusa nas células neoplásicas; expressão fraca e focal para a proteína LFABP; expressão forte na membrana das células para a proteína Beta catenina e negatividade para a proteína GS. 40x.



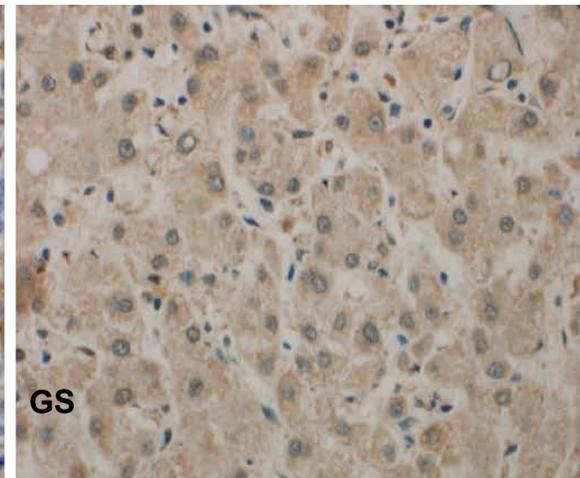
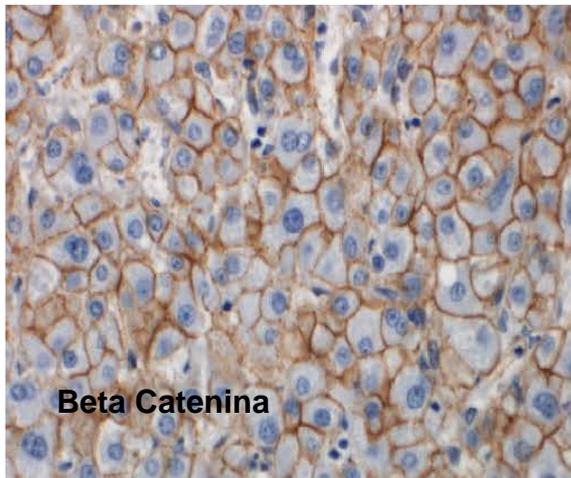
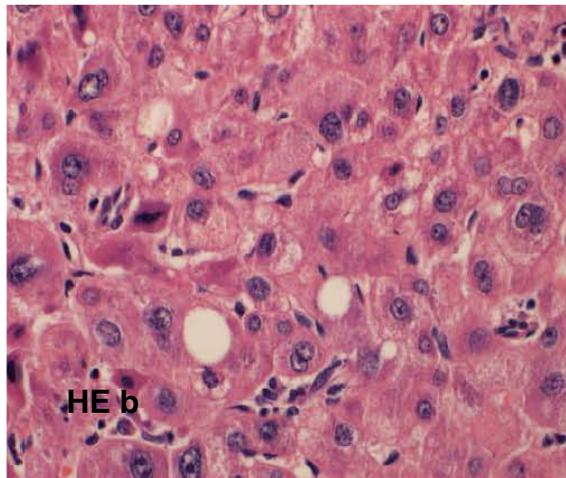
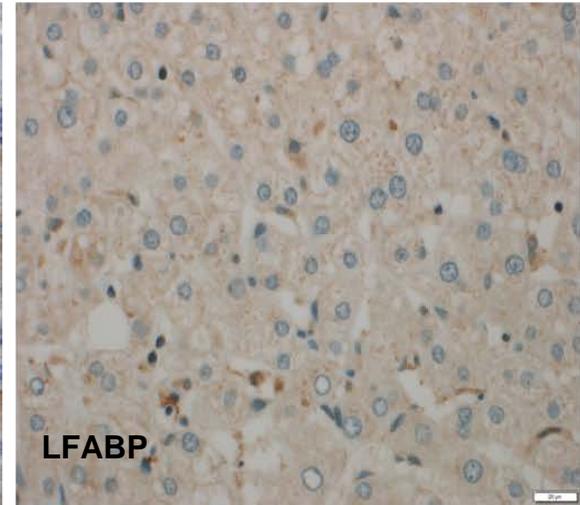
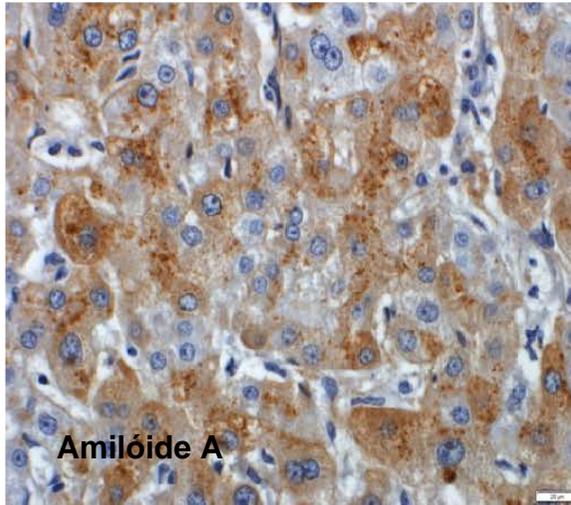
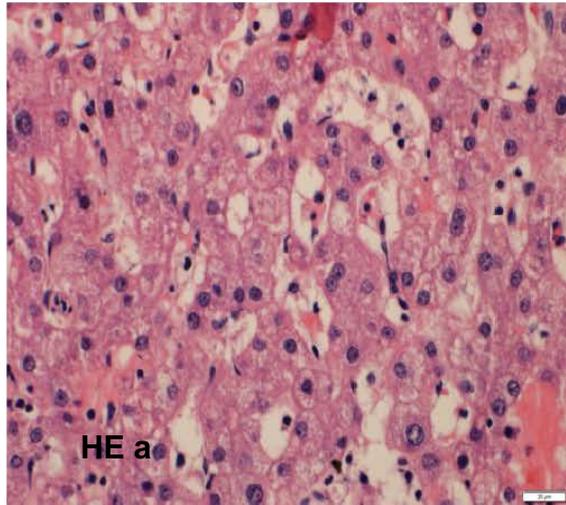
Caso 12 - AHC I com Beta catenina ativada; (14048077); HE a, HE b: Esteatose macro e microvesicular com focos de infiltrado linfocitário. Marcação IMQ negativa para Amilóide A; expressão fraca e focal para a proteína LFABP; expressão fraca na membrana das células para a proteína Beta catenina e marcação forte para a proteína GS. 40x.



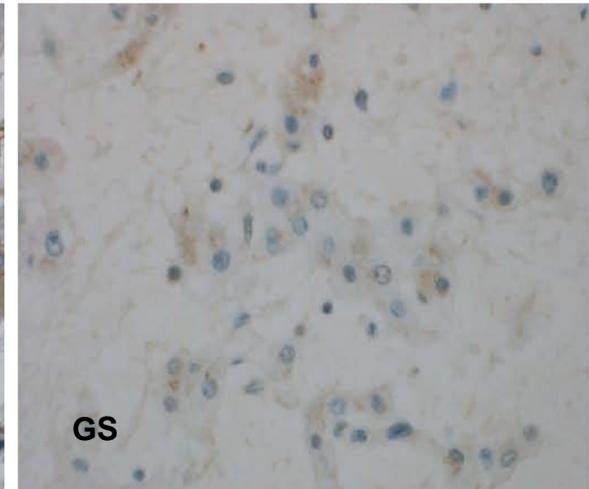
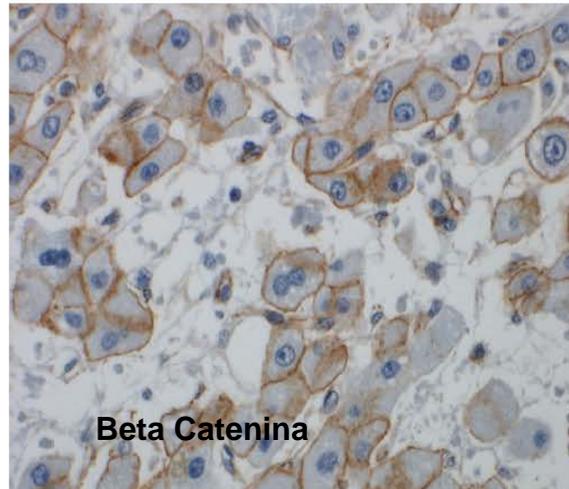
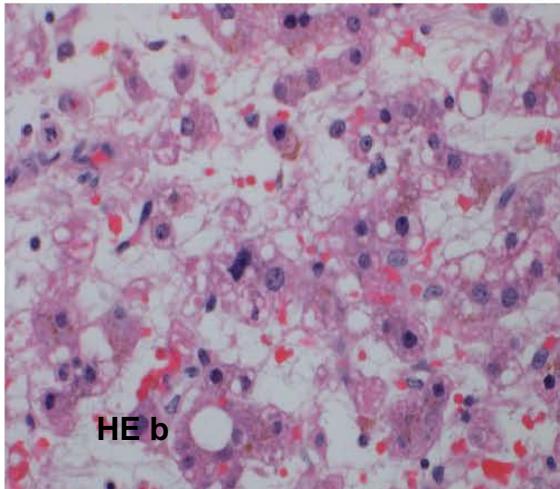
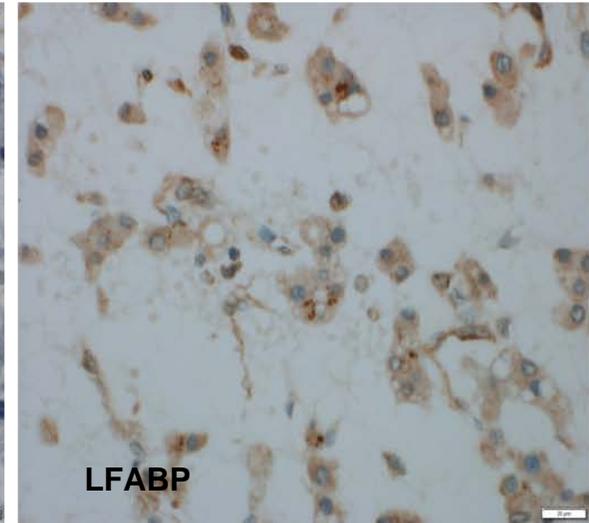
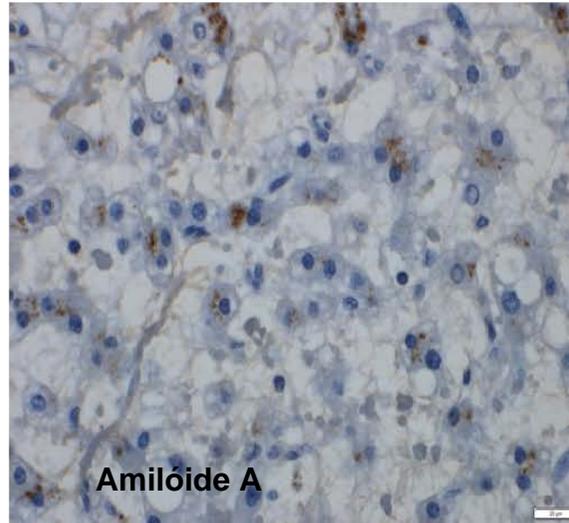
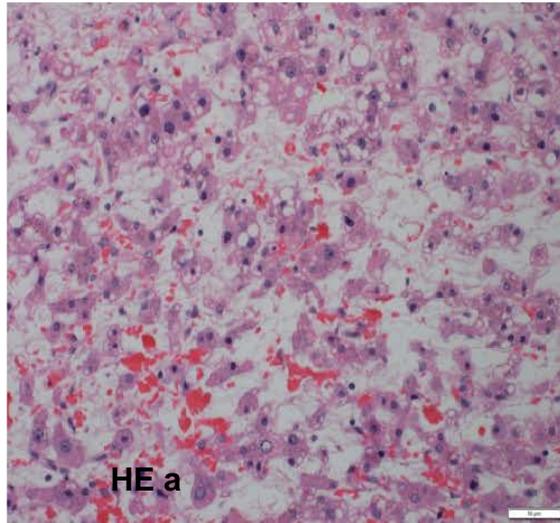
Caso 13 - AHC I; (BA1-10578); HE a, HE b: Presença mostrando células com arranjos trabeculares, dilatação sinusoidal, infiltrado linfocitário. Marcação IMQ forte e difusa para Amilóide A, marcação moderada, citoplasmática para a proteína LFABP; marcação da Beta catenina na membrana; e negatividade para a proteína GS. 40x.



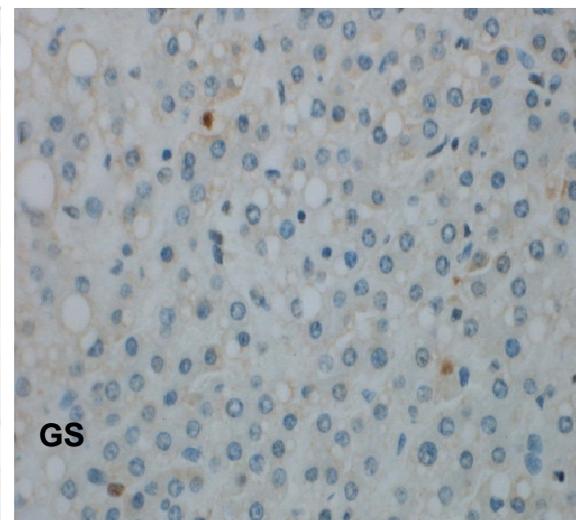
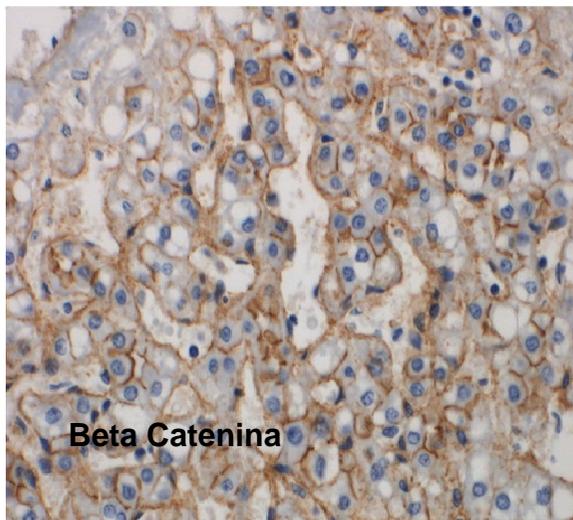
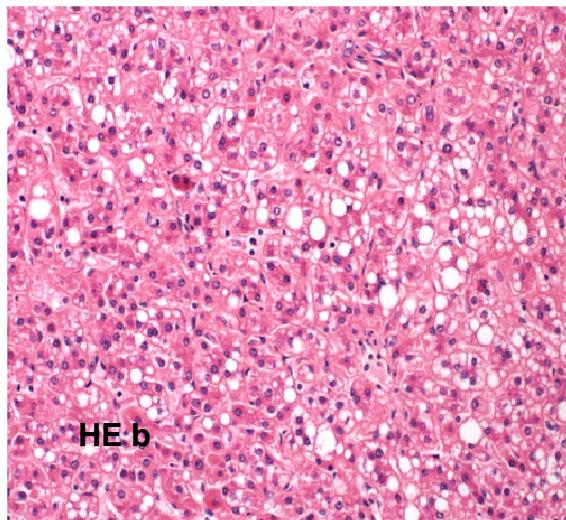
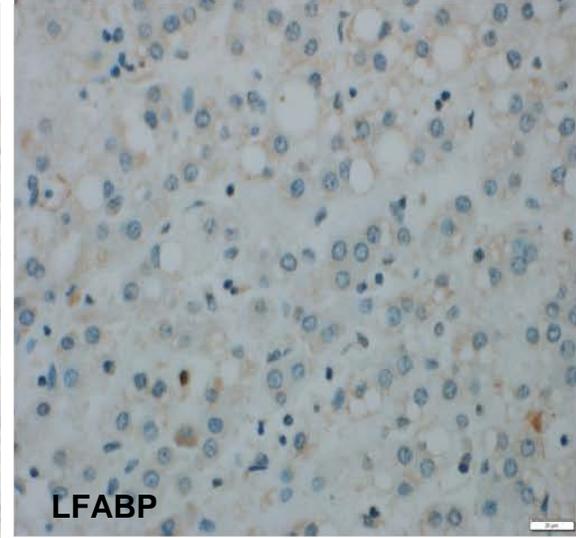
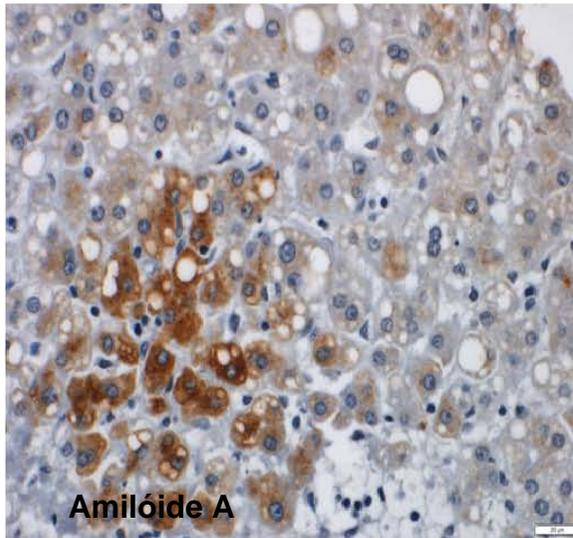
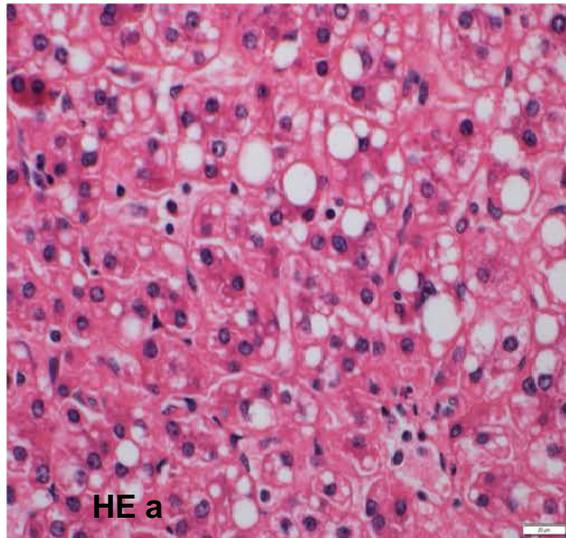
Caso 14 - AHC Inclassificável; (BA1-8504) HE a, HE b: Células com atipias nucleares, arranjos trabeculares e vasos sanguíneos com espessamento de parede. Marcação IMQ negativa para Amilóide A, marcação fraca, citoplasmática para a proteína LFABP; expressão forte na membrana das células para a proteína Beta catenina e negatividade para a proteína GS. 40x.



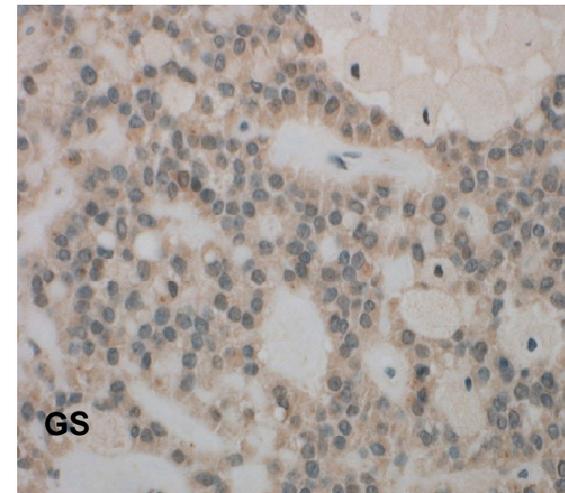
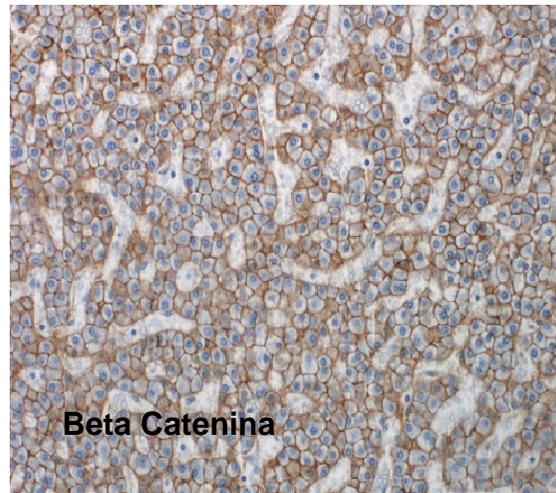
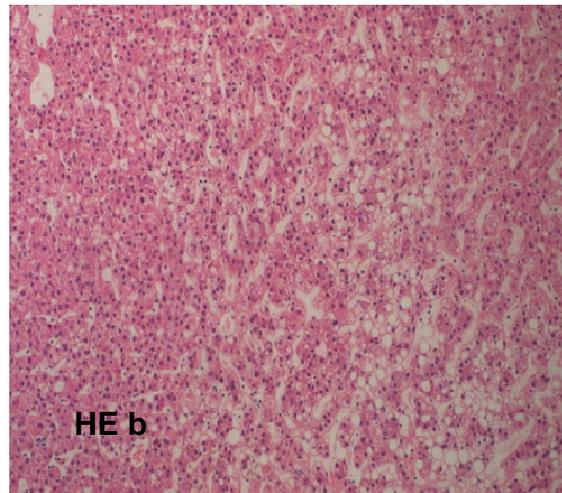
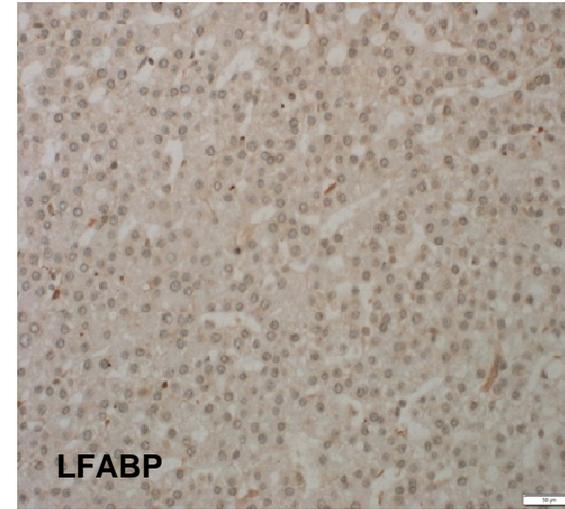
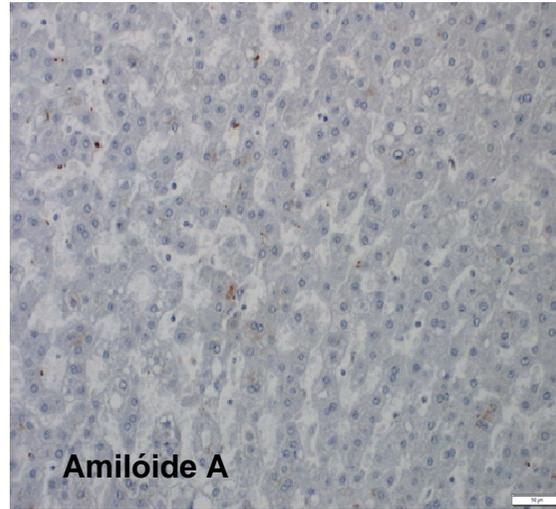
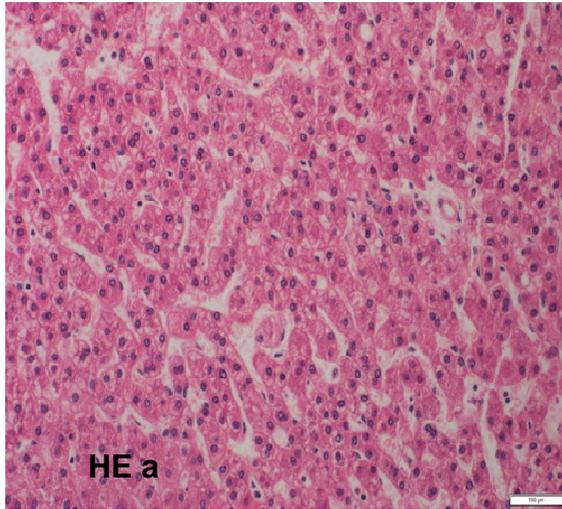
Caso 15 – AHC I com ativação da Beta catenina; (BA4-1080); HE a, HE b: Células com arranjos trabeculares, dilatação sinusoidal e infiltrado linfocitário. Marcação IMQ para Amilóide A exibindo forte expressão citoplasmática nas células neoplásicas; expressão moderada, citoplasmática para a proteína LFABP; expressão forte na membrana das células para a proteína Beta catenina e positividade moderada e difusa no citoplasma das células neoplásicas para a GS. 40x.



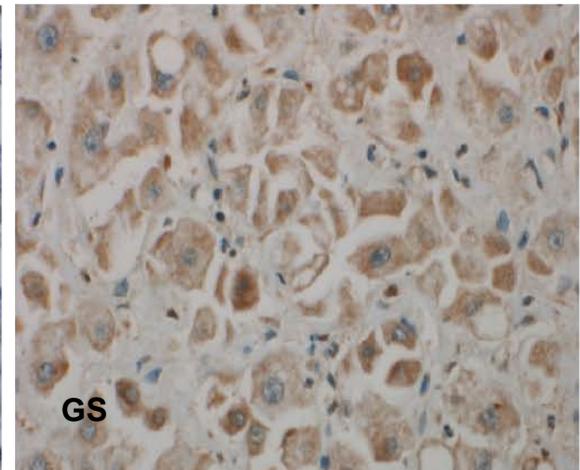
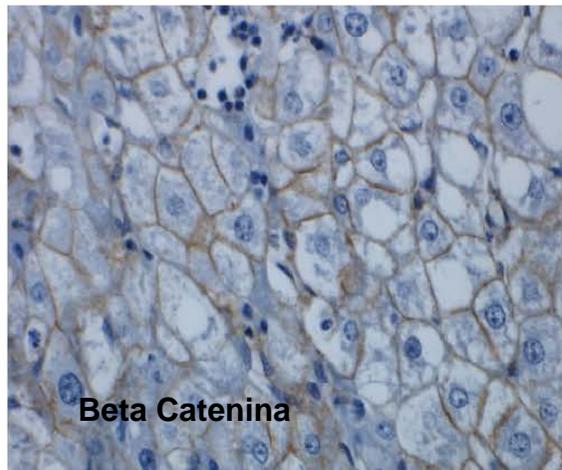
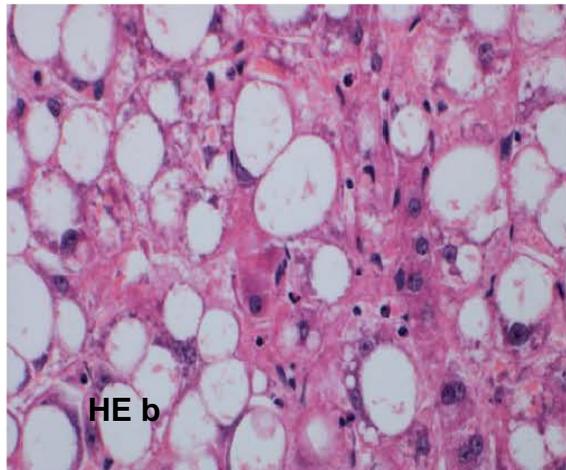
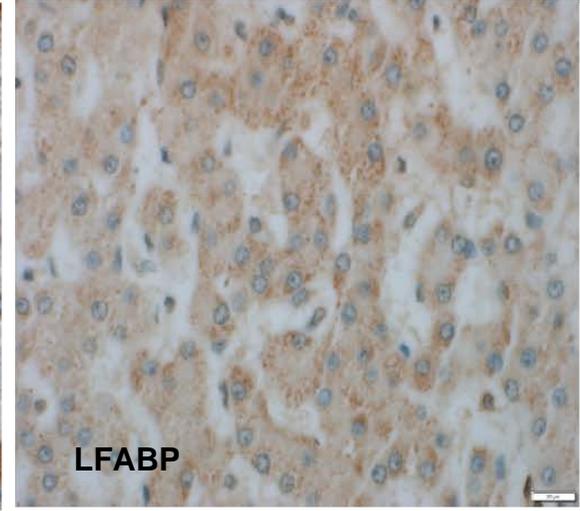
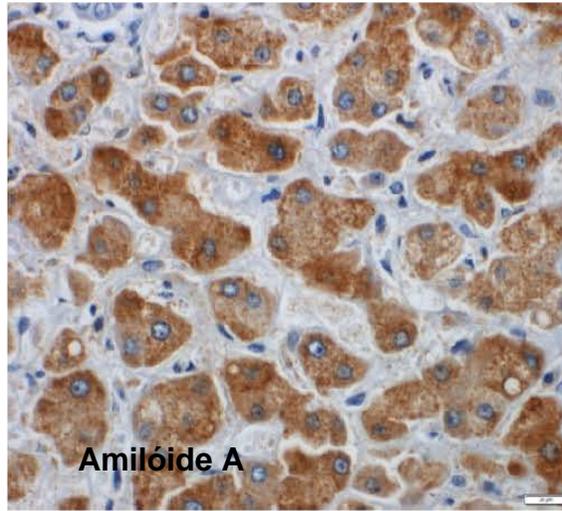
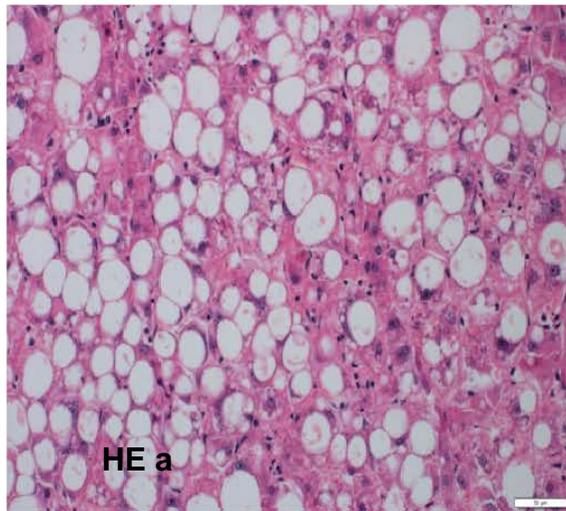
Caso 16 - AHC Inclassificável; (BA5-1949); HE a, HE b: Células com arranjos trabeculares, dilatação sinusoidal e infiltrado linfocitário. Marcação IMQ negativa para Amilóide A exibindo fraca e focal expressão citoplasmática nas células neoplásicas; expressão moderada, citoplasmática para a proteína LFABP; expressão forte na membrana das células para a proteína Beta catenina e positividade fraca no citoplasma das células neoplásicas para a GS. 40x.



Caso 17 - AHC I; (BA5-2479); HE a, HE b: Esteatose macro e microvesicular com focos de infiltrado linfocitário. Marcação IMQ forte e focal para Amilóide A; expressão fraca e focal para a proteína LFABP; Marcação na membrana para Beta catenina; e negatividade para GS. 40x.



Caso 18 - AHC Inclassificável; (BA6-12727) HE a, HE b: Células com arranjos trabeculares, dilatação sinusoidal e infiltrado linfocitário. Marcação IMQ para Amilóide A exibindo fraca expressão citoplasmática nas células neoplásicas; expressão moderada, citoplasmática para a proteína LFABP; expressão forte na membrana das células para a proteína beta catenina e positividade moderada e difusa no citoplasma das células neoplásicas para a proteína GS. 40x.



Caso 19 - AHC I com ativação da Beta catenina; (BA06-5413); HE a, HE b: Células com atipias nucleares, esteatose macro e microvesicular. IMQ para Amilóide A exibindo forte expressão citoplasmática nas células neoplásicas; expressão moderada, citoplasmática para a proteína LFABP; expressão forte na membrana das células para a proteína Beta catenina e positividade forte e difusa no citoplasma das células neoplásicas para a GS. 40x