



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL

NORMA ARTEIRO FILGUEIRA

**EXPRESSÃO TECIDUAL DE GALECTINA3 COMO FATOR DE RISCO PARA
RECORRÊNCIA DO CARCINOMA HEPATOCELULAR SECUNDÁRIO À
HEPATITE C APÓS TRANSPLANTE HEPÁTICO**

Recife

2018

NORMA ARTEIRO FILGUEIRA

**EXPRESSÃO TECIDUAL DE GALECTINA3 COMO FATOR DE RISCO PARA
RECORRÊNCIA DO CARCINOMA HEPATOCELULAR SECUNDÁRIO À
HEPATITE C APÓS TRANSPLANTE HEPÁTICO**

Tese de Doutorado apresentada à banca avaliadora do Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito para obtenção do título de Doutora em Medicina Tropical

Orientador

Prof.: Dra. Heloísa Ramos Lacerda de Melo

Professor Associado do Departamento de Medicina Clínica do CCS/UFPE

Recife

2018

Catálogo na fonte:
bibliotecário: Aécio Oberdam, CRB4:1895

F481e Filgueira, Norma Arteiro.
Expressão tecidual de galectina 3 como fator de risco para recorrência do carcinoma hepatocelular secundário à hepatite C após transplante hepático / Norma Arteiro Filgueira. – Recife: o autor, 2018.
195 f.; il.; 30 cm.

Orientadora: Heloísa Ramos Lacerda de Melo.
Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-graduação em Medicina Tropical.
Inclui referências, apêndices e anexos.

1. Carcinoma hepatocelular. 2. Transplante de fígado. 3. Galectina 3. 4. Análise de sobrevida. 5. Recidiva. I. Melo, Heloísa Ramos Lacerda de (orientadora). II. Título.

616.988

CDD (23.ed.)

UFPE (CCS 2018 - 248)

NORMA ARTEIRO FILGUEIRA

**EXPRESSÃO TECIDUAL DE GALECTINA 3 COMO FATOR DE RISCO PARA
RECORRÊNCIA DO CARCINOMA HEPATOCELULAR SECUNDÁRIO À
HEPATITE C APÓS TRANSPLANTE HEPÁTICO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutora em Medicina Tropical.

Aprovada em: 29/08/2018.

BANCA EXAMINADORA:

Prof.^ª. Dr.^ª. Heloísa Ramos Lacerda de Melo (Presidente da Banca/Examinadora Interna)
Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

Prof. Dr. Edmundo Pessoa de Almeida Lopes Neto (Examinador Interno)
Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

Prof. Dr. Cláudio Moura Lacerda (Examinador Externo)
Universidade Pernambuco (UPE)

Prof. Dr. Jose Eymard Moraes de Medeiros Filho (Examinador Externo)
Universidade Federal da Paraíba (UFPB)

Prof. Dr. Paulo Celso Bosco Massarollo (Examinador Externo)
Universidade de São Paulo (USP)

A meus avós, José e Iracy, sem eles não seria quem sou.

A meus pais que me ensinaram a valorizar o conhecimento.

A meus sobrinhos Matheus e Daniel, para que nunca esqueçam o valor do estudo e da dedicação.

AGRADECIMENTOS

Aos pacientes que me confiaram o cuidado de sua saúde e aceitaram participar deste estudo.

A minha família e amigos, todos fundamentais na formação da pessoa que sou hoje em dia, que souberam compreender minhas ausências durante esses quatro anos de doutorado e me apoiaram ao longo dessa jornada.

A Matheus Figueira Bezerra, grande incentivador do meu retorno à pesquisa, que em sua juventude trouxe entusiasmo e sabedoria para me acompanhar neste desafio.

À Profa. Heloísa Ramos Lacerda de Melo por ter me acolhido como orientanda e pelas colocações sempre sensatas e pertinentes.

Ao Dr. Djalma Agripino de Melo Filho, pela ajuda inestimável na elaboração do projeto e no entendimento dos modelos multivariados.

À Profa. Norma Jucá e à Dra. Érika Maranhão pela contribuição e expertise na avaliação histopatológica dos explantes.

Aos médicos da Unidade de Transplante de Fígado do Hospital Oswaldo Cruz, principalmente na pessoa do Prof. Claudio Lacerda, pelo incentivo na realização deste trabalho e por compartilharem comigo o cuidado de seus pacientes.

Aos funcionários da Unidade de Transplante de Fígado do Hospital Oswaldo Cruz, principalmente nas pessoas de Tânia Xavier, Karla Bezerra e Shirley Monteiro, pelo apoio na coleta dos dados.

A meus preceptores e professores, especialmente na pessoa do Dr. Virgílio Lucena, por terem plantado em mim a semente da curiosidade científica e contribuído na formação da médica que sou hoje.

Aos colegas preceptores e residentes do Serviço de Clínica Médica do Hospital das Clínicas da UFPE pela compreensão pela minha ausência e apoio incontestável.

Aos colegas do serviço de Gastroenterologia do Hospital das Clínicas da UFPE, especialmente nas pessoas do Prof. Edmundo Lopes e da Dra. Andrea Doria Batista, pela compreensão, incentivo e colaboração na realização deste projeto.

Ao Prof. Clezio Cordeiro de Sá Leitão, pela amizade e pelo compartilhamento de angústias e realizações durante essa longa caminhada.

À Profa. Suênia França, amiga de todas as horas, pela ajuda na revisão dos textos finais e sábias sugestões.

Ao Dr. Rodrigo Azevedo, pela ajuda com as referências bibliográficas, provando que os laços entre preceptores e ex-residentes podem se estender por décadas, apesar da distância física.

Aos colegas hepatologistas do Brasil que contribuíram com informações de seus pacientes: Sérgio Mies, José Eymard Filho, Leila Tojal, Fábio Marinho, Maria do Carmo Godoy, Cynthia Cordeiro, Marcelo Maia, Leila Beltrão, Bernardo Times, Andrea Doria, Liana Machado Foulon.

Ao Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA) pela acolhida na realização da imuno-histoquímica.

À Secretaria Executiva de Vigilância em Saúde da Secretaria Estadual de Saúde de Pernambuco, em especial às Sras. Luciana Albuquerque e Patrícia Ismael de Carvalho, pela ajuda ao acesso aos dados do Sistema de Informação de Mortalidade.

Às professoras de Análise de Sobrevida, Rita Byington e Tereza Serrano, pela dedicação e disponibilidade em me fazer entender e realizar a análise do material.

Aos médicos residentes de Patologia do Hospital das Clínicas da UFPE, Fernanda Didjurgeit e Luiz Eduardo Leimig, pela ajuda na documentação fotográfica das lâminas.

“Conheça todas as teorias, domine todas as técnicas, mas ao tocar uma alma humana, seja apenas outra alma humana”

- Carl Gustav Jung (1875 – 1961)

RESUMO

A infecção crônica pelo vírus da hepatite C provoca fibrose hepática progressiva, o que propicia o desenvolvimento de cirrose e carcinoma hepatocelular (CHC). O transplante hepático é considerado a melhor opção terapêutica para pacientes com cirrose e CHC irresssecável, o que torna esta neoplasia uma das indicações mais frequentes de transplante no mundo. Apesar do uso dos Critérios de Milão na seleção de pacientes com CHC para transplante hepático, a recorrência tumoral (RT) ainda se desenvolve em 15 a 20% dos casos e determina péssimo prognóstico. Alguns autores avaliaram a influência da glectina 3 (Gal3) sobre o CHC, demonstrando *in vitro* que a inibição da expressão de Gal3 reduziu as capacidades de proliferação, migração e invasão das células tumorais. Em pacientes submetidos a ressecção de CHC, a expressão de Gal3 se associou a redução da sobrevida. Este estudo se propôs a investigar a expressão tecidual da Gal3 nos CHC explantados e a analisar sua associação com características clínico-histológicas e com o prognóstico após transplante. Trata-se de um estudo de coorte que acompanhou 148 pacientes com CHC submetidos a transplante hepático entre 1999 e 2016 em um centro de referência do Nordeste brasileiro, para monitorização de RT. Em uma segunda etapa, os 36 pacientes que desenvolveram RT foram acompanhados até o óbito. A expressão de Gal3 foi analisada por imunohistoquímica do fígado explantado. A incidência de RT na amostra foi 7,92/100 pessoas-ano. A expressão de Gal3 foi identificada em 36 (24,3%) dos 148 casos analisados e apresentou associação independente com presença de invasão vascular (OR 3,49; IC95% 1,24-9,79; $p=0,018$) e hepatite B (OR 3,42; IC95% 1,06 – 11,02; $p=0,039$). A combinação de expressão de Gal3 e invasão vascular foi associada a aumento do risco de RT após transplante (HR 5,88; IC95% 1,81-19,12; $p=0,003$). Entre os 36 pacientes que desenvolveram RT, foi observada associação entre expressão de Gal3 e ocorrência de RT precoce (OR 24,4; IC95% 2,1-278,2; $p<0,001$), desenvolvimento de metástases pulmonares (OR 7,62; IC95% 1,15 – 50,5; $p=0,03$) e mortalidade pós-transplante (HR 3,53; IC95% 1,24 – 10,0; $p = 0,018$). Em conclusão, a expressão de Gal3 pelo CHC, quando associada à presença de invasão vascular, aumenta o risco de RT após transplante hepático. Entre os pacientes que desenvolvem RT após transplante, a Gal3 parece estar associada a desenvolvimento de RT precoce, metástase pulmonar e maior mortalidade.

Palavras-Chave: Carcinoma hepatocelular. Transplante de fígado. Galectina 3.
Análise de sobrevida. Recidiva.

ABSTRACT

Hepatitis C virus chronic infection causes progressive liver fibrosis, which promotes the development of cirrhosis and hepatocellular carcinoma (HCC). Liver transplantation is considered first line therapy for patients with cirrhosis and unresectable HCC, which makes this cancer one of the most frequent indications for transplantation around the world. Despite use of Milan Criteria in HCC-patients selection for liver transplantation, tumour recurrence (TR) still develops in 15 to 20% of cases and determines poor prognosis. Some authors evaluated the influence of galectin-3 (Gal3) on HCC, demonstrating that the *in vitro* inhibition of Gal3 expression reduced the proliferation, migration and invasive capacities of tumour cells. In patients submitted to HCC resection, Gal3 expression was associated with decreased survival. The aim of this study was to assess the tissue expression of Gal3 by immunohistochemistry in the explanted HCC and to analyse its association with clinical and histological characteristics and with post-transplant prognosis. This was a cohort study that followed 148 patients with HCC submitted to liver transplantation between 1999 and 2016 at a referral centre in Northeastern Brazil, for recurrence monitoring. In a second step, 36 patients who developed TR were followed until death. Gal3 expression was analysed by explanted liver immunohistochemistry. The incidence of TR in the sample was 7.92/100 person-years. Galectin3 expression was identified in 36 (24.3%) of 148 cases examined and showed an independent association with vascular invasion (OR 3.49; 95% CI: 1.24-9.79; $p=0.018$) and hepatitis B (OR 3.42; 95% CI 1.06 - 11.02; $p=0.039$). The combination of Gal3 expression and vascular invasion was associated with an increased risk of HCC recurrence after transplantation (HR 5.88; 95% CI 1.81-19.12; $p=0.003$). Among patients who developed TR, an association was observed between Gal3 expression and early occurrence of TR (OR 24.4; 95% CI 2.1-278.2; $p<0.001$), development of lung metastases (OR 7.62; 95% CI 1.15 - 50.5; $p=0.03$) and mortality after transplantation (HR 3.53; 95% CI 1.24 - 10.0; $p = 0.018$). As conclusion, Galectin 3 expression, when associated with the presence of vascular invasion, increases the risk of HCC recurrence after liver transplantation. Among patients who develop TR post-transplantation, Gal3 expression seems to be associated with the early development of TR, lung metastases and increased mortality.

Keywords: Hepatocellular carcinoma. Liver transplantation. Galectin 3. Survival analysis. Recurrence.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Prevalência relativa dos genótipos do HCV nas diversas regiões do mundo	23
Figura 2	Algoritmo de estadiamento e conduta para pacientes portadores de cirrose hepática e carcinoma hepatocelular	31
Figura 3	Distribuição mundial dos transplantes de fígado realizados no ano de 2014	33
Quadro 1	Critérios de seleção para transplante hepático por CHC	35
Quadro 2	Fatores possivelmente associados à recorrência do carcinoma hepatocelular após transplante hepático	37
Figura 4	Estrutura dos membros da família das galectinas, classificados de acordo com o número de domínios de reconhecimento de carboidratos	56
Figura 5	Número de artigos publicados a cada ano abordando a galectina 3 (1988 – 2018)	57
Figura 6	Representação esquemática da estrutura da galectina 3, sob suas diversas formas	57
Figura 7	Funções da galectina 3, de acordo com sua localização na célula	58
Quadro 3	Resumo dos estudos disponíveis sobre a associação entre a galectina 3 e o carcinoma hepatocelular	63
Quadro 4	Definição e categorização das covariáveis analisadas	68
Figura S1	Fluxograma de seleção da população de estudo	79
Figura 1	Microfotografias de lâminas de imuno-histoquímica para galectina 3 em fígados explantados por carcinoma hepatocelular	83
Figura 2	Associação entre a expressão tecidual da Gal3 e a etiologia da doença de base e os achados histológicos do explante, em pacientes submetidos a TH para tratamento do CHC	86
Figura 3	Curvas de Kaplan-Meier para estimativa de sobrevida livre de recorrência tumoral em pacientes submetidos a transplante hepático para tratamento do CHC	90

Figura 1	Ano de diagnóstico da recorrência do CHC após o transplante hepático	103
Figura 2	Curvas de Kaplan-Meier para estimativa de sobrevida após transplante em pacientes que desenvolveram recorrência do carcinoma hepatocelular após transplante hepático, de acordo com a expressão tecidual de galectina 3	109

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Características clínicas, laboratoriais e histológicas de 148 pacientes submetidos a transplante hepático para tratamento do CHC	81
Tabela 2	Características da expressão de galectina 3 por IHQ nos nódulos tumorais, em pacientes submetidos a transplante hepático para tratamento de CHC	84
Tabela 3	Associação entre características clínico-histológicas e a expressão tumoral da Gal3 em pacientes submetidos a transplante hepático para tratamento do CHC	85
Tabela S1	Densidade de incidência de recorrência tumoral global e segundo a expressão tecidual de Gal3 e a doença de base, em pacientes com CHC submetidos a transplante hepático	87
Tabela 4	Fatores de risco relacionados à recorrência tumoral em pacientes submetidos a transplante hepático para tratamento do CHC	88
Tabela S2	Sobrevida livre de recorrência do CHC ao final do primeiro e terceiro ano após transplante hepático, global e segundo os fatores de risco de recorrência tumoral	89
Tabela 5	Modelo multivariado dos fatores de risco associados à recorrência tumoral em pacientes submetidos a transplante hepático para tratamento do CHC	91
Tabela 1	Características clínico-histológicas de 36 pacientes que desenvolveram recorrência do CHC após transplante hepático	104
Tabela 2	Fatores associados à recorrência tumoral precoce após transplante hepático	106
Tabela 3	Fatores associados à ocorrência de metástase pulmonar em pacientes que desenvolveram recorrência do CHC após transplante hepático	106
Tabela 4	Fatores associados à mortalidade após transplante em pacientes com recorrência do CHC	108

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

¹⁸ FDG	18 Fludeoxiglicose
AASLD	<i>American Association for the Study of Liver Diseases</i>
AFP	Alfa fetoproteína
Anti-HCV	Anticorpo contra o vírus da hepatite C
BCLC	<i>Barcelona Clinic Liver Cancer</i>
CHC	Carcinoma hepatocelular
CM	Critérios de Milão
DAAs	Drogas antivirais de ação direta
DAB	Diaminobenzidina
DEN	Dietilnitrosamina
DHGNA	Doença hepática gordurosa não alcoólica
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DRC	Domínio de reconhecimento de carboidrato
EHNA	Esteatohepatite não alcoólica
ELTR	<i>European Liver Transplant Registry</i>
Gal3	Galectina 3
GBD	<i>Global Burden of Disease</i>
HBV	Vírus da hepatite B
HCV	Vírus da hepatite C
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
HR	<i>Hazard ratio</i>
HUOC/HJF	Hospital Universitário Oswaldo Cruz/ Hospital Jayme da Fonte
IHQ	Imuno-histoquímica
IMV	Invasão microvascular
MELD	<i>Model for End Stage Liver Disease</i>
OMS	Organização mundial da Saúde
OR	<i>Odds ratio</i>
PET Scan	Tomografia por emissão de pósitrons
QETA	Quimioembolização transarterial

RM	Ressonância magnética
RNA	Ácido ribonucleico
RNA _m	Ácido ribonucleico mensageiro
RNL	Razão neutrófilo-linfócito
RT	Recorrência tumoral
RVS	Resposta virológica sustentada
SIM	Sistema de informação de mortalidade
SLR	Sobrevida livre de recorrência
SNT	Sistema Nacional de Transplantes
TC	Tomografia computadorizada
TH	Transplante hepático
TLR	Terapia locorregional
UNOS	<i>United Network for Organ Sharing</i>
USG	Ultrassonografia
UTF	Unidade de Transplante de Fígado
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular

SUMARIO

1	INTRODUÇÃO.....	20
2	REVISÃO DA LITERATURA.....	22
2.1	A Hepatite C.....	22
2.1.1	O vírus C.....	22
2.1.2	Epidemiologia da Hepatite C.....	22
2.1.3	Formas de transmissão do HCV.....	22
2.1.4	História natural da hepatite C.....	24
2.1.5	O CHC na história natural da hepatite C.....	25
2.1.6	O tratamento do HCV e a ocorrência de CHC.....	25
2.2	O Carcinoma Hepatocelular	27
2.2.1	Epidemiologia do CHC.....	27
2.2.2	Fatores de risco para o CHC.....	28
2.2.3	<i>Screening</i> do CHC.....	29
2.2.4	Diagnóstico e estadiamento do CHC.....	30
2.2.5	Opções terapêuticas para o CHC.....	30
2.3	O transplante hepático no tratamento do CHC.....	32
2.3.1	Cenário mundial.....	32
2.3.2	Critérios de seleção de CHC para transplante hepático.....	33
2.4	A recorrência do CHC no pós-transplante hepático.....	36
2.4.1	Fatores associados ao risco de recorrência tumoral.....	36
2.4.1.1	<i>Fatores relacionados ao tumor.....</i>	<i>37</i>
2.4.1.2	<i>Fatores relacionados ao paciente.....</i>	<i>43</i>
2.4.1.3	<i>Fatores relacionados ao tratamento.....</i>	<i>46</i>
2.4.2	Acompanhamento do paciente após TH por CHC.....	52
2.4.3	Apresentação clínica da recorrência do CHC após TH.....	52
2.4.4	Tratamento da recorrência do CHC após TH.....	53
2.5	As galectinas.....	55
2.5.1	Estrutura e funções.....	55
2.5.2	A galectina 3 e as neoplasias.....	58
2.5.3	Relação da galectina 3 com as doenças hepáticas.....	59
2.5.4	Relação da galectina 3 com o CHC.....	60

3	OBJETIVOS.....	64
3.1	Objetivo geral.....	64
3.2	Objetivos específicos.....	64
4	CASUÍSTICA E MÉTODOS.....	65
4.1	Desenho do estudo, local e período.....	65
4.2	População.....	65
4.2.1	Critérios de inclusão.....	65
4.2.2	Critérios de exclusão.....	65
4.3	Definição e categorização das variáveis.....	66
4.3.1	Variáveis dependentes (desfechos)	66
4.3.2	Variáveis independentes.....	67
4.3.3	Covariáveis.....	68
4.4	Operacionalização da pesquisa e técnicas.....	70
4.4.1	Métodos e procedimentos para coleta dos dados.....	70
4.4.2	Análise anátomo-patológica do explante.....	71
4.4.3	Análise da expressão tecidual da galectina 3.....	71
4.5	Análise estatística.....	72
5	QUESTÕES ÉTICAS.....	73
6	RESULTADOS.....	74
6.1	ARTIGO 1 - Expressão tecidual de Galectina 3 como fator de risco para recorrência do carcinoma hepatocelular após transplante hepático.....	74
6.2	ARTIGO 2 - Expressão tecidual de Galectina 3 e a apresentação clínica da recorrência do carcinoma hepatocelular após transplante hepático.....	98
7	CONCLUSÕES.....	114
8	RECOMENDAÇÕES.....	115
	REFERÊNCIAS.....	116
	APÊNDICE A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO.....	130
	APÊNDICE B – FORMULÁRIO DE COLETA DE DADOS.....	132
	APÊNDICE C – RESULTADOS SUPLEMENTARES.....	134
	APÊNDICE D – VERSÃO DO ARTIGO 1 EM INGLÊS.....	138
	APÊNDICE E – VERSÃO DO ARTIGO 2 EM INGLÊS.....	163

ANEXO A – PARECER CONSUBSTANCIADO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DA UFPE.....	179
ANEXO B – PARECER CONSUBSTANCIADO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DO COMPLEXO HOSPITALAR HUOC/PROCAPE.....	185
ANEXO C – TERMO DE AUTORIZAÇÃO PARA PESQUISA AOS PRONTUÁRIOS.....	189
ANEXO D – TERMO DE AUTORIZAÇÃO PARA USO DE MATERIAL BIOLÓGICO.....	190
ANEXO E – OUTROS PRODUTOS DESTA LINHA DE PESQUISA....	191

1 INTRODUÇÃO

A infecção crônica pelo vírus da hepatite C (HCV) provoca fibrose hepática progressiva, o que leva ao desenvolvimento de cirrose em cerca de 16% dos casos, após 20 anos da contaminação (THEIN et al., 2008). Após a instalação da cirrose, cerca de 3% dos pacientes a cada ano desenvolverão carcinoma hepatocelular (SANGIOVANNI et al., 2006).

Em 2015, o câncer de fígado foi a sexta neoplasia mais frequente no mundo e a quarta causa de óbito por câncer (AKINYEMIJU et al., 2017). O carcinoma hepatocelular (CHC) é responsável por cerca de 80% desses casos (PETRICK et al., 2016). Noventa por cento dos casos de CHC têm etiologia definida, sendo hepatites virais B e C, distúrbios metabólicos, consumo crônico de álcool e ingestão de aflatoxinas as causas mais comuns (DE MARTEL et al., 2015). O transplante hepático (TH) é considerado a melhor opção terapêutica para pacientes com cirrose e CHC irresssecável (GALLE et al., 2018), o que torna esta neoplasia uma das indicações mais frequentes de transplante no mundo (ADAM et al., 2012)(YANG et al., 2017).

A despeito do uso dos critérios de Milão (MAZZAFERRO et al., 1996) na seleção de pacientes com CHC para transplante hepático, a recorrência tumoral ainda se desenvolve em 15 a 20% dos casos (MAZZAFERRO et al., 2011). Uma das razões aventadas para este fato é que provavelmente os sistemas de estadiamento radiológico não conseguem retratar com precisão o estadiamento histológico nem o comportamento biológico do tumor.

As galectinas são glicoproteínas comprovadamente envolvidas na fisiopatologia de vários tumores (SONG et al., 2014a). Alguns autores têm avaliado a influência da galectina 3 (Gal3) sobre o CHC. Estudos experimentais com culturas de células de CHC mostraram que a inibição da expressão de Gal3 acarretou redução significativa das capacidades de proliferação, migração e invasão (ZHENG et al., 2014)(JIANG et al., 2014)(SONG et al., 2014b). Matsuda e colaboradores (2008), estudando 52 japoneses com CHC submetidos a hepatectomia, encontraram positividade para Gal3 no tecido tumoral de 65% deles, o que foi associado a redução da sobrevida global e livre de recorrência. Um estudo com 165 pacientes chineses submetidos a ressecção de CHC, encontrou associação significativa entre expressão de Gal3 e redução da sobrevida global, embora não tenha havido aumento da taxa de recorrência tumoral (JIANG et al., 2014).

Os estudos atualmente disponíveis foram, em sua maioria, realizados em países orientais, onde a etiologia mais frequente do CHC é a infecção crônica pelo vírus da hepatite B (HBV). Os estudos citados sugerem uma associação entre a expressão tecidual da Gal3 e o prognóstico após cirurgias de ressecção hepática. No entanto, a imunossupressão terapêutica é obrigatória no pós-transplante para prevenção da rejeição e perda do enxerto e acredita-se que ela possa favorecer o desenvolvimento e disseminação tumoral (RODRÍGUEZ-PERÁLVAREZ; DE LA MATA; BURROUGHS, 2014). Portanto, é importante conhecer o impacto da expressão da Gal3 sobre a recorrência tumoral nesta situação especial.

Este estudo se propõe a investigar a expressão tecidual da Gal3 nos nódulos de CHC em fígados explantados e analisar sua associação com características histológicas de mau prognóstico, risco de recorrência tumoral, comportamento clínico da recorrência e sobrevida pós-transplante. A identificação de subgrupos de pacientes transplantados por CHC com maior risco de recorrência tumoral poderia permitir a otimização dos protocolos de monitorização da recorrência e a utilização de possíveis tratamentos preemptivos que venham a se mostrar eficazes na prevenção da recidiva.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 A Hepatite C

2.1.1 O vírus C

A hepatite C foi inicialmente descrita nos anos 1980 como hepatite não-A não B, em pacientes que desenvolviam hepatite aguda pós-transfusional (ALTER et al. 1992). O vírus da hepatite C (HCV) foi identificado pela primeira vez em 1989, através de técnicas de clonagem (CHOO et al., 1989) e posteriormente incluído na família *Flaviridae*. Com base na variação de nucleotídeos, o HCV pode ser classificado em sete genótipos principais e mais de 80 subtipos. (ASHFAQ et al., 2011).

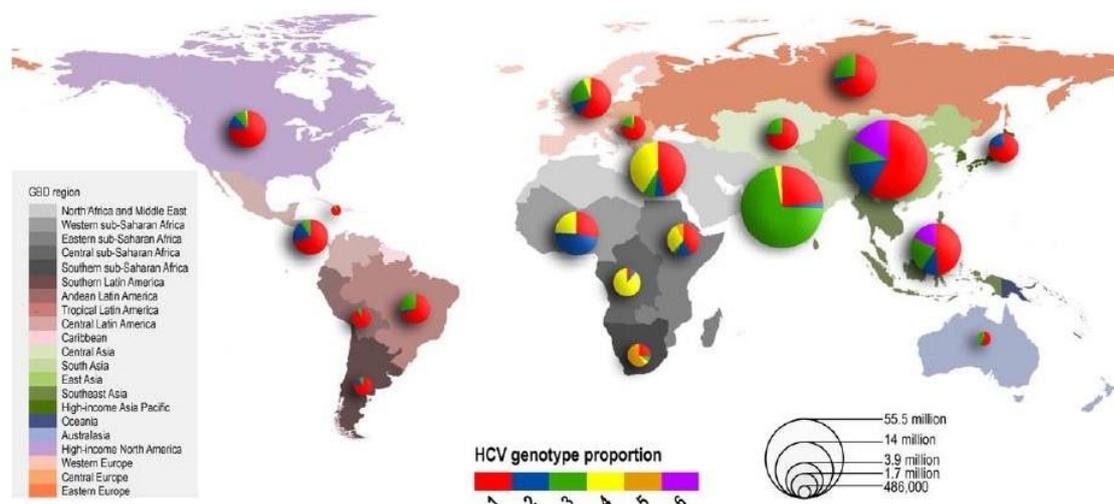
2.1.2 Epidemiologia da Hepatite C

As hepatites virais são uma causa de morbimortalidade em ascensão no mundo. Comparando os dados do *Global Burden of Disease* (GBD) de 1990 e 2013, observou-se que as hepatites virais foram a décima causa mais frequente de mortes em 1990 e a sétima em 2013, quando analisados conjuntamente óbitos por hepatite aguda, cirrose e CHC, sendo que 48% delas foram associadas à hepatite C. Dentre as hepatites virais, a hepatite C foi a única com proporção crescente de mortes no período, sobrepujando os casos por hepatite B na Europa, Américas, Oriente Médio e norte da África (STANAWAY et al., 2016).

Na maioria dos países, a infecção predomina no sexo masculino, provavelmente por maior exposição a alguns fatores de risco, como o uso de drogas ilícitas injetáveis. No entanto, alguns países apresentam prevalência maior no sexo feminino, como França e Alemanha, por maior exposição no passado a transfusões inseguras no período periparto (THRIFT; EL-SERAG; KANWAL, 2017).

Globalmente, o genótipo 1 é o mais prevalente, sendo responsável por cerca de 46,2% dos casos, seguido pelo genótipo 3 (30,1%) e genótipo 2 (9,1%). Os genótipos 4 e 6 são responsáveis por 8,3% e 5,4% dos casos mundiais, respectivamente, e apresentam uma distribuição geográfica mais limitada, sendo o genótipo 6 mais encontrado no leste da Ásia e o genótipo 4 no norte da África e Oriente Médio. O genótipo 5 é o menos frequente, sendo responsável por menos de 1% dos casos mundiais e restrito praticamente à África subsaariana. A figura 1 apresenta a distribuição genotípica mundial do HCV (MESSINA et al., 2015).

Figura 1 - Prevalência relativa dos genótipos do HCV nas diversas regiões do mundo



Fonte: Messina et al, 2015

Obs.: o diâmetro do gráfico é proporcional à soroprevalência regional do HCV

2.1.3 Formas de transmissão do HCV

A transmissão do HCV ocorre primordialmente por via parenteral. A transfusão de sangue e derivados contaminados com o HCV era uma das principais vias de transmissão do vírus até o início da década de 1990, quando os bancos de sangue incluíram a pesquisa do anti-HCV na rotina de testagem do sangue. Nos países desenvolvidos, hoje em dia, essa via de transmissão do HCV foi praticamente eliminada, mas dados da Organização Mundial de Saúde (OMS) mostram que 40 países ainda não realizam o *screening* universal do vírus C em bancos de sangue (THRIFT; EL-SERAG; KANWAL, 2017).

O uso de material médico-hospitalar inseguro, não descartável e submetido a métodos ineficazes de esterilização, ainda é uma fonte frequente de disseminação do HCV. Em 2000, a OMS estimou que 40% das novas infecções pelo HCV eram decorrentes do uso de injeções realizadas com materiais inseguros. Dois terços desses casos estavam concentrados em duas regiões específicas da GBD: Mediterrâneo Oriental e Pacífico Ocidental (PÉPIN et al., 2014).

Em países desenvolvidos, o uso de drogas recreativas por via endovenosa, com compartilhamento de agulhas e parafernália é o responsável pela maioria dos novos casos de hepatite C. Em 2007, cerca de 16 milhões de pessoas em todo o

mundo utilizavam drogas injetáveis para fins recreativos. Uma revisão sistemática estimou prevalência global de hepatite C entre os usuários de drogas injetáveis em torno de 67%. Em números absolutos, cerca de dez milhões de usuários de drogas endovenosas estariam infectados (NELSON et al., 2011).

Dentre as vias de transmissão não parenteral, destacam-se a via sexual e a materno-fetal, já que a via intradomiciliar é pouco frequente. A transmissão por via sexual é incomum, com estimativa de risco de transmissão de 1:190.000 contatos sexuais heterossexuais monogâmicos, risco que parece ser maior nos pacientes coinfetados com o HIV. A transmissão materno-fetal ocorre em 4 a 8% das mulheres monoinfectadas e em 11 a 25% das coinfetadas com o HIV (LANINI et al., 2016).

Com o controle dos principais fatores de risco para transmissão do HCV, a taxa de incidência aparentemente está decrescendo nos países desenvolvidos, mas provavelmente o número de mortes por essa doença ainda continuará crescendo nos próximos anos (MESSINA et al., 2015).

2.1.4 História Natural da Hepatite C

A maioria dos estudos mostra que cerca de 80% dos pacientes que se contaminam com o HCV serão incapazes de eliminar o vírus espontaneamente, evoluindo para uma fase crônica oligossintomática, lentamente progressiva. Mais recentemente, surgiram evidências de que a taxa de clearance espontâneo do vírus pode ser maior (42 a 45%) em crianças e mulheres jovens (SEEFF, 2009).

Pessoas infectadas que não clareiam o vírus espontaneamente estão em risco de desenvolver doença hepática progressiva, com inflamação hepática persistente que leva à formação de fibrose, cirrose e carcinoma hepatocelular (CHC). Uma metanálise mostrou que o risco de cirrose após 20 anos do contágio é em média 16%, variando de 14 a 80%, a depender do subgrupo em estudo. Vários fatores podem ser determinantes do ritmo de progressão da doença, entre eles destacam-se idade avançada na época da contaminação, sexo masculino, obesidade, resistência insulínica, coinfecção com HIV ou HBV, diabetes, consumo alcoólico e transmissão transfusional (THEIN et al., 2008).

A taxa de progressão da fibrose não é linear e pode acelerar com a duração da doença e idade (WESTBROOK; DUSHEIKO, 2014). Um estudo recente descreveu a evolução de coorte de mulheres contaminadas pelo HCV genótipo 1b

através da administração da imunoglobulina anti-D no pós-parto, em 1977. As frequências de cirrose, CHC e morte de causas hepáticas após 36 anos da infecção foram: 19,3%, 1,9% e 4,9%, cerca do dobro das frequências dessas complicações aos 31 anos da contaminação, comprovando que a progressão do dano hepático não é linear. Diabetes mellitus e consumo de mais de 40 doses de álcool por semana foram os principais fatores contribuintes para a progressão da doença (GARVEY et al., 2017).

2.1.5 O CHC na história natural da Hepatite C

O HCV é um vírus RNA que não se incorpora ao DNA do hepatócito. A maioria dos casos de CHC observados em pacientes portadores crônicos do HCV acontece no contexto de cirrose hepática, pois este aparentemente é o mecanismo da carcinogênese hepática. O risco de CHC aumenta proporcionalmente à progressão da fibrose hepática. Uma coorte que acompanhou 214 pacientes com cirrose compensada por cerca de 17 anos, identificou a ocorrência de CHC em 32% deles, o que correspondeu a incidência anual de 3,9%, sendo esta neoplasia a causa de 44% dos óbitos (SANGIOVANNI et al., 2006).

Estudos orientais acompanhando coortes de infectados pelo HCV observaram risco de CHC proporcional à elevação de transaminases, à carga viral e maior nos infectados pelo genótipo 1 (LEE et al., 2010).

No entanto, autores ocidentais têm descrito maior risco de CHC nos infectados pelo genótipo 3. Um grupo francês acompanhou 353 cirróticos com infecção viral persistente por uma média de 5,5 anos, observando o desenvolvimento de CHC em 34% dos infectados pelo genótipo 3 e em 17% dos infectados pelos outros genótipos (NKONTCHOU et al., 2011). Coorte retrospectiva nos Estados Unidos confirmou esses achados, observando risco de desenvolvimento de CHC 80% maior nos infectados pelo genótipo 3 que nos portadores do genótipo 1 (KANWAL et al., 2014).

2.1.6 O tratamento do HCV e a ocorrência de CHC

Nas últimas décadas, o tratamento do HCV era baseado em esquemas contendo interferon, que ofereciam taxa de resposta virológica sustentada (RVS) em torno de 50%. Uma metanálise detectou redução de 76% do risco de CHC nos pacientes que obtiveram RVS com esquemas baseados em interferon. A redução de

risco entre os portadores de cirrose foi menos marcante, sugerindo que este grupo deva ser mantido em acompanhamento regular, mesmo após a cura virológica (MORGAN et al., 2013).

Estudo retrospectivo analisou mais de 20.000 veteranos de guerra tratados com interferon, encontrando redução de 51% do risco de CHC nos que obtiveram RVS. Nesse subgrupo, os seguintes fatores foram preditores do risco de CHC: cirrose (HR 6,69), diabetes (HR 1,88), genótipo 3 (HR 1,62), idade acima de 65 anos (HR 4,5) e etnia hispânica (HR 2,27) (EL-SERAG et al., 2016).

A introdução, em torno de 2014-2015, dos regimes com drogas antivirais de ação direta (DAAs) livres de interferon transformou o tratamento da hepatite C, oferecendo taxas de RVS acima de 90%, independente do grau de fibrose, com um excelente perfil de segurança, o que permitiu o tratamento de pacientes com hepatopatia avançada ou outras comorbidades (FALADE-NWULIA et al., 2017). A obtenção de RVS nos pacientes com hepatopatia avançada tem sido associada a melhora da função hepática, aumento de sobrevida e até retirada da fila de transplante (BELLI et al., 2016).

Existe controvérsia sobre o impacto da RVS obtida com os DAAs sobre o risco e o comportamento do CHC. Em 2016, o grupo de Barcelona descreveu uma inesperada taxa de recorrência do CHC (27,6%) nos seis meses subsequentes ao início do tratamento antiviral, em pacientes previamente submetidos a terapia locorregional (TLR) do CHC (REIG et al., 2016). Outro estudo descritivo observou recorrência do CHC nas 24 semanas após o fim da terapia antiviral em 28,8% dos pacientes previamente submetidos a cirurgia ou TLR (CONTI et al., 2016). No entanto, esses estudos careciam de grupo controle e seus achados não foram uniformemente reproduzidos por outros autores. Estudo francês incluindo resultados de três coortes de pacientes com CHC tratados com DAAs não encontrou diferença significativa nas taxas de recorrência tumoral (RT) entre os tratados e não tratados (ANRS, 2016). Metanálise envolvendo 17 estudos não encontrou diferença significativa na RT entre os pacientes que atingiram RVS com esquemas baseados em interferon e os tratados com DAAs (WAZIRY et al., 2017).

Os estudos iniciais haviam sugerido também que o tratamento com DAAs poderia aumentar o risco de surgimento de CHC em pacientes previamente sem neoplasia. Conti e colaboradores encontraram incidência de 3,16% de CHC em cirróticos, 24 semanas após término de esquema com DAAs (CONTI et al., 2016).

No entanto, metanálise de 26 estudos não encontrou diferença significativa na ocorrência de CHC após terapia com DAAs (WAZIRY et al., 2017). Finalmente, dois grandes estudos de coorte mostraram que a RVS induzida pelos DAAs foi associada a redução de cerca de 70% no risco de ocorrência de CHC. Um estudo norte-americano compilou os dados de 62.354 veteranos que realizaram tratamento para o HCV entre 1999 e 2015, com esquemas baseados em interferon ou DAAs e seguidos por seis anos em média, encontrando que a RVS reduziu a incidência de CHC em 50% nos cirróticos e em 68% nos não cirróticos, sendo a redução da incidência com os DAAs semelhante à do interferon (IOANNOU; GREEN; BERRY, 2018). Outro estudo avaliou 22500 pacientes com HCV tratados com DAAs no ano de 2015, encontrando 86,7% de RVS e redução de 76% do risco de ocorrência de CHC, benefício que foi observado já nos primeiros meses e que cresceu com o passar do tempo (KANWAL et al., 2017).

Um grupo escocês relatou recentemente seus resultados comparando a taxa de ocorrência de CHC em cirróticos que obtiveram RVS após tratamento com esquemas com ou sem interferon. Na análise univariada, observaram que o risco de surgimento de CHC nos tratados com DAAs foi 2,48 vezes maior, no entanto, quando corrigiram os resultados de acordo com grau de disfunção hepática e contagem de plaquetas, a associação perdeu a significância estatística, concluindo que o aparente maior risco de CHC após o uso de DAAs é apenas reflexo da mudança do perfil dos pacientes tratados (INNES et al., 2018).

2.2 O Carcinoma Hepatocelular

2.2.1 Epidemiologia do CHC

Levantamento da OMS mostrou que em 2015 o CHC foi o sexto câncer mais comum, tendo sido a quarta causa de morte por câncer no mundo (AKINYEMIJU et al., 2017). Estima-se que em 2015 houve 810.000 mortes por câncer de fígado, com um aumento de 11,5% do número absoluto com relação a 2005. No entanto, a taxa de mortalidade ajustada por idade reduziu 13,1%, com estimativa de 12,1 óbitos por câncer hepático por 100.000 pessoas em 2015, ficando como a vigésima causa de óbito naquele ano (WANG et al., 2016).

Petrick *et al*, analisaram a tendência mundial de incidência do câncer primário de fígado entre os anos de 1978 e 2007, encontrando redução da incidência em regiões de alto risco e aumento em regiões de baixo risco, como exemplificado pela

queda da incidência na China, Singapura e Japão e elevação significativa nas Américas, Austrália e Reino Unido. Os autores atribuíram a redução da incidência na Ásia às campanhas de vacinação universal contra a Hepatite B e à menor exposição a aflatoxina, enquanto o aumento nos países Ocidentais provavelmente foi decorrente da epidemia de Hepatite C adquirida nas décadas de 1970-1980, à crescente prevalência de obesidade, diabetes e síndrome metabólica e à maior sobrevivência dos cirróticos (PETRICK et al., 2016).

2.2.2 Fatores de risco para o CHC

Noventa por cento dos casos de CHC têm etiologia definida, sendo as hepatites virais B e C, distúrbios metabólicos, consumo crônico de álcool e ingestão de aflatoxinas as causas mais comuns. Metanálise recente avaliou a etiologia de aproximadamente 120.000 casos de CHC em 50 países, encontrando que na maioria dos países as hepatites B e C conjuntamente foram responsáveis por mais de 60% dos casos. Apenas sete países, de elevado índice de desenvolvimento humano, tiveram mais de 40% dos CHC de causa não viral. De forma geral, a hepatite B predominou na Ásia e África subsaariana, enquanto a hepatite C predominou nas Américas e Europa. Exceções a essa regra foram Grécia e Rússia (países europeus com elevado percentual de hepatite B), Japão (país do extremo Oriente com 65% dos casos relacionados ao HCV) e Egito (país africano com mais de 80% dos casos associados ao HCV) (DE MARTEL et al., 2015).

Um estudo caso-controle analisou os principais fatores de risco para CHC nos Estados Unidos. Foi observado que 59,5% de todos os casos de CHC podiam ser atribuídos a seis principais fatores de risco: distúrbios metabólicos (obesidade, diabetes, síndrome metabólica e intolerância a glicose), hepatites C e B, consumo abusivo de álcool, síndromes genéticas e tabagismo. Embora o risco para desenvolvimento de CHC tenha sido maior nos portadores de hepatite C (OR 59,9), por conta da sua elevada prevalência os distúrbios metabólicos tiveram a maior fração atribuível populacional (32%)(MAKAROVA-RUSHER et al., 2016).

Inquérito com hepatologistas de 29 centros brasileiros reuniu em 2009 dados sobre 1405 casos de CHC, dos quais 98% apresentavam cirrose. Hepatite C foi a hepatopatia mais frequentemente associada ao tumor em todas as regiões do país, embora nas regiões norte e nordeste tenha sido responsável por menos de 50% dos casos, devido à elevada frequência de CHC associado ao HBV naquelas regiões

(CARRILHO et al., 2010).

2.2.3 *Screening* do CHC

Já que 90% dos casos de CHC se desenvolvem em pacientes com hepatopatias crônicas, consegue-se identificar assim uma população de risco para ser incluída em programa de vigilância. Estudo randomizado chinês demonstrou redução de 37% da mortalidade em cinco anos em pacientes com hepatite B crônica submetidos a *screening* semestral com ultrassonografia (USG) e dosagem de alfa fetoproteína (AFP) (ZHANG; YANG; TANG, 2004). Metanálise de 47 estudos observacionais, em que 90% dos casos eram cirróticos, demonstrou que a realização de *screening* regular foi associada a aumento significativo na proporção de diagnóstico precoce, tratamento curativo e sobrevida em três anos (SINGAL; PILLAI; TIRO, 2014).

Revisão sistemática de estudos observacionais avaliou a validade das várias modalidades de *screening* do CHC, encontrando sensibilidade e especificidade da USG em torno de 90% para os tumores de forma geral, mas abaixo de 50% para tumores precoces. A inclusão da dosagem de AFP ao protocolo melhorou a sensibilidade para o diagnóstico do CHC precoce (63% versus 45%) (TZARTZEVA et al., 2018).

Dessa forma, os consensos internacionais recomendam realização de *screening* semestral em cirróticos, portadores de hepatite C com fibrose grau 3 e portadores do vírus B não cirróticos com hepatite ativa ou história familiar de CHC. Importante ressaltar que pacientes com hepatites virais tratadas não devem ser excluídos do *screening* semestral se apresentarem fibrose avançada, já que o tratamento antiviral reduz, mas não elimina o risco de CHC. Ainda não há consenso sobre a inclusão da dosagem da AFP no *screening*. O consenso da Associação americana para o estudo das doenças hepáticas (AASLD) deixa a critério do médico assistente o uso ou não da AFP, mas o consenso europeu recomenda a não utilização do método em pacientes com inflamação hepática ativa, pela elevada frequência de resultados falsos-positivos (GALLE et al., 2018) (HEIMBACH et al., 2018).

2.2.4 Diagnóstico e estadiamento do CHC

Diferentemente de outras neoplasias, o diagnóstico de CHC em pacientes cirróticos pode ser estabelecido de forma não invasiva, através de métodos de imagem, reservando a biopsia apenas para casos radiologicamente indeterminados e para os tumores que surgem em fígados não cirróticos. O achado radiológico típico, com realce intenso do nódulo pelo contraste na fase arterial seguido pela lavagem rápida (*washout*) na fase portal ou tardia, se desenvolve em decorrência do suprimento sanguíneo quase exclusivamente arterial da lesão (MITCHELL et al., 2015). Os consensos internacionais propõem estratégia de confirmação diagnóstica de nódulos identificados pela USG de *screening*: nódulos maiores que 1 cm devem ser avaliados por tomografia computadorizada (TC) ou ressonância magnética (RM) multifásicas contrastadas; nódulos menores que 1 cm devem ser reavaliados por USG em intervalos de três meses e, caso apresentem crescimento, com TC ou RM. Lesões de comportamento radiológico atípico em um método devem ser reavaliadas por outro método de imagem ou submetidas à biopsia (GALLE et al., 2018)(HEIMBACH et al., 2018).

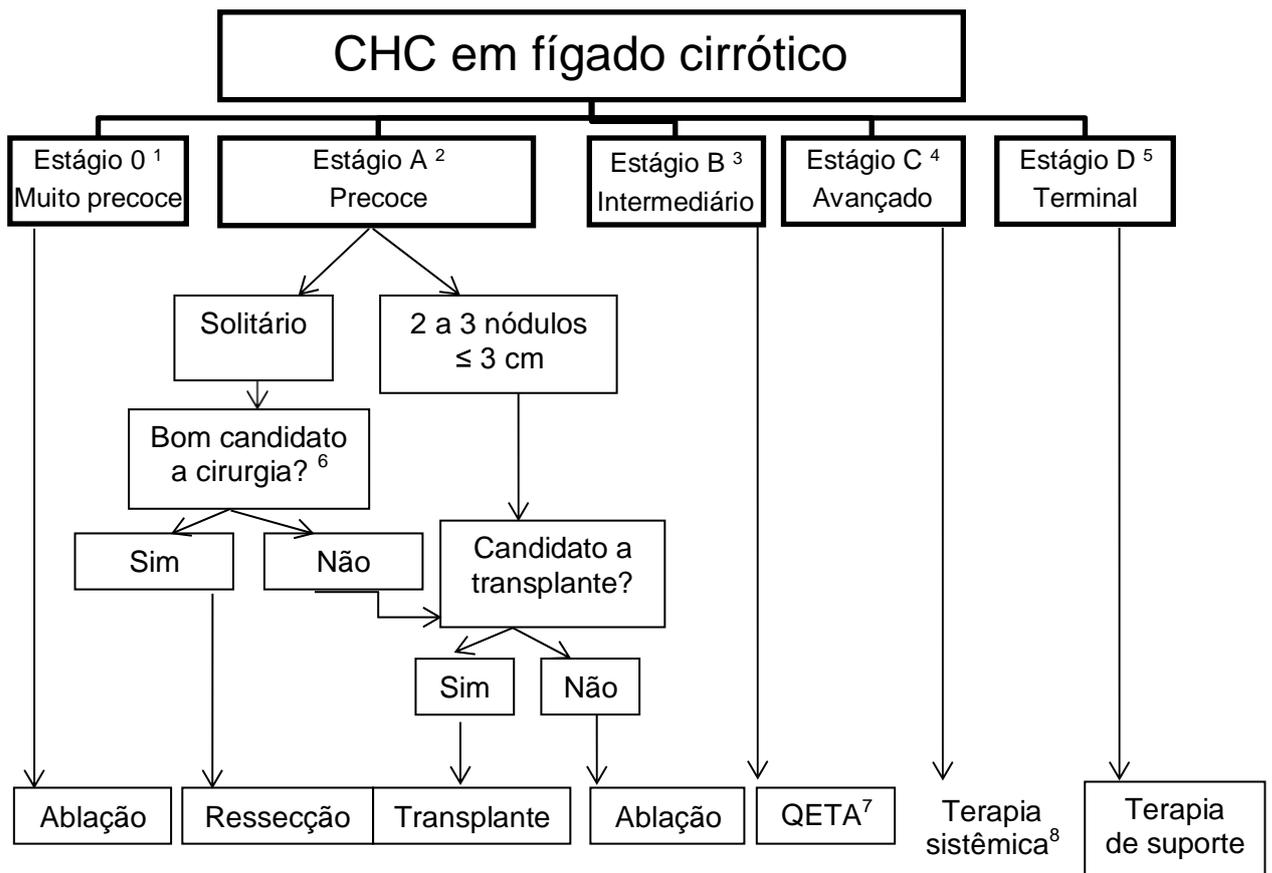
O estadiamento de uma neoplasia é passo crucial para a programação terapêutica. O estadiamento do CHC traz um desafio maior que o das outras neoplasias, pois deve considerar também o grau de disfunção hepática e a presença de sintomas relacionados ao tumor. Embora haja vários protocolos de estadiamento do CHC, o mais amplamente utilizado e validado é o sistema do *Barcelona Clinic Liver Cancer* (BCLC), revisado periodicamente, que classifica os pacientes em estágios muito precoce (0), precoce (A), intermediário (B), avançado (C) e terminal (D) e propõe a melhor estratégia terapêutica para cada estágio (Figura 2) (GALLE et al., 2018).

2.2.5 Opções terapêuticas para o CHC

O tratamento do CHC deve envolver equipe multidisciplinar, que inclua hepatologistas, cirurgiões, patologistas, radiologistas intervencionistas e oncologistas, a fim de selecionar a melhor modalidade terapêutica para cada caso. Ressecção, transplante, ablação percutânea, quimioembolização transarterial (QETA) e os inibidores de tirosina-quinase foram comprovadamente ligados a melhora de sobrevida. Embolização arterial sem quimioterapia, radioterapia externa e radioembolização têm atividade antitumoral, mas ainda não foi comprovado o

benefício de sobrevida. Quimioterapia sistêmica tem atividade marginal, com risco de toxicidade e sem trazer aumento de sobrevida, não devendo ser empregada (FORNER; REIG; BRUIX, 2018)(GALLE et al., 2018).

Figura 2 – Algoritmo de estadiamento e conduta para pacientes portadores de cirrose hepática e carcinoma hepatocelular



Fonte: Adaptado de Galle et al, 2018

- 1 Nódulo único menor que 2 cm em paciente Child A e com boa reserva funcional
- 2 Nódulo único ou até três nódulos menores que 3 cm, em paciente Child A e com boa reserva funcional
- 3 Tumor multinodular irresssecável em paciente Child A e com boa reserva funcional
- 4 Tumor com invasão portal ou disseminação extra-hepática em paciente Child A com algum comprometimento da reserva funcional
- 5 Tumor não passível de tratamento por transplante em paciente com insuficiência hepática avançada e reserva funcional precária
- 6 A definição de indicação cirúrgica é complexa e deve levar em consideração estado funcional do paciente (Child A, MELD menor que 10), ausência de sinais de hipertensão porta grave, percentual de fígado residual e possibilidade de ressecção laparoscópica
- 7 QETA, quimioembolização transarterial
- 8 Sorafenib e lenvatinib são aprovados como terapia sistêmica de primeira linha e regorafenib como terapia de segunda linha para pacientes tolerantes a sorafenib que apresentaram progressão radiológica da lesão

2.3 O transplante hepático no tratamento do CHC

2.3.1 Cenário mundial

O transplante hepático (TH) teoricamente é o tratamento de escolha para pacientes cirróticos com CHC, pois ao mesmo tempo trata o tumor e a hepatopatia subjacente, que é o principal fator de risco para o surgimento de novos tumores. Desde meados dos anos 2000, vários países do mundo, e dentre eles o Brasil, passaram a utilizar o critério de gravidade na alocação de órgãos para transplante, com base no escore MELD (*Model for Endstage Liver Disease*). A Portaria nº 1160 do Ministério da Saúde normatizou em 2006 o processo de alocação de órgãos para transplante no Brasil e definiu o CHC como situação especial, atribuindo 20 pontos no escore MELD para o CHC precoce, com aumento progressivo da pontuação para 24 e 29 pontos, de acordo com a duração da espera (BRASIL, 2006).

O percentual de casos de CHC entre as indicações para TH vem aumentando significativamente. Estudo retrospectivo do *European Liver Transplant Registry* (ELTR), compilando informações de mais de 90.000 transplantes realizados em 26 países europeus entre 1968 e 2009 em todas as faixas etárias, descreveu que o CHC foi a indicação em 12% desses casos (ADAM et al., 2012). Estudo semelhante realizado nos Estados Unidos apresentou os dados de mais de 100.000 inscrições para transplante hepático entre 2004 e 2015, identificando que o CHC foi a indicação de listagem em 18,5% dos pacientes maiores de 18 anos, chegando a ser a indicação mais frequente em 2015 (YANG et al., 2017).

No entanto, a escassez de órgãos para transplante limita a seleção desta modalidade terapêutica para o CHC. A OMS estima que em 2014 foram realizados 27.759 transplantes hepáticos em todo o mundo, o que atende a menos de 10% das necessidades mundiais (*Global Observatory on Donation and Transplantation*, 2015). A Figura 3 apresenta a distribuição mundial dos transplantes hepáticos realizados em 2014. Desta forma, a priorização dos casos de CHC na alocação de órgãos para transplante deve ser avaliada criteriosamente, pesando a elevada mortalidade de cirróticos na fila de espera, situação em que não existe outra alternativa terapêutica, e o risco de recorrência tumoral (RT) com redução da sobrevida nos pacientes com CHC.

Figura 3 - Distribuição mundial dos transplantes de fígado realizados no ano de 2014.



Fonte: Fonte - Global Observatory on Donation and Transplantation, <http://www.transplant-observatory.org/data-charts-and-tables/chart>, acesso em 20/07/2018.

2.3.2 Critérios de seleção de CHC para transplante hepático

Um dos pontos primordiais na análise das indicações de TH para tratamento do CHC é avaliar o risco de RT, já que esta ocorrência reduziria a sobrevida pós-transplante deste grupo com relação aos transplantados por causas não neoplásicas. Experiências iniciais com o TH para tratamento do CHC se caracterizaram por um risco inaceitável de RT e redução de sobrevida, pois devido à ausência de critérios específicos de seleção, pacientes com tumores volumosos e multifocais foram submetidos a TH (RINGE B, PICHLMAYR R, WITTEKIND C, 1991).

Em 1996, um grupo italiano publicou estudo revolucionário em que selecionaram para TH 48 pacientes com tumores únicos com diâmetro menor que 5 cm ou com até três tumores com no máximo 3 cm cada um, sem invasão vascular macroscópica ou metástases extra-hepáticas. Observaram sobrevida livre de recorrência (SLR) em quatro anos em 92% dos pacientes que preenchem os critérios contra 59% dos que estavam fora dos critérios. Esses critérios ficaram conhecidos como **Critérios de Milão** (CM) e rapidamente foram adotados na prática clínica de vários países (MAZZAFERRO et al., 1996).

No entanto, os CM são sujeitos a críticas, pois não são capazes de evitar a

RT em 15 a 20% dos casos e, por outro lado, são considerados muito restritivos. Outros grupos passaram a descrever os resultados de TH para tratamento do CHC com critérios de seleção expandidos.

O grupo da Universidade da Califórnia em San Francisco propôs a inclusão de pacientes com tumores solitários de até 6,5 cm de diâmetro ou com até três nódulos com até 4,5 cm cada e soma total de até 8,0 cm, obtendo sobrevida em cinco anos de 75,2% nesse grupo, criando os chamados **critérios de San Francisco** (YAO et al., 2001).

Um estudo chinês, incluindo basicamente pacientes com CHC secundário a hepatite B, propôs dois critérios para inclusão: soma dos diâmetros dos nódulos menor que 8,0cm ou acima deste valor desde que a AFP seja menor que 400 ng/dl e o tumor não seja mal diferenciado. Naquela casuística, os chamados **critérios de Hangzhou** obtiveram SLR semelhante à dos CM e ofereceriam o TH a mais 37,5% de pacientes, sendo necessário realizar biopsia do nódulo apenas nos casos com diâmetro total maior que 8,0 cm com AFP abaixo de 400 ng/dl (ZHENG et al., 2008).

Em 2009 o mesmo grupo italiano que criou os CM estudou 1112 pacientes transplantados fora daqueles critérios, para tentar identificar um subgrupo com sobrevida em cinco anos acima de 70%. A partir desses dados criaram uma calculadora disponível online (<http://www.hcc-olt-metroticket.org/>) que permite estimar a sobrevida em cinco anos com base em dados pré e/ou pós-operatórios. Com base nesses achados, propuseram o **critério UpToSeven**, que inclui para TH pacientes cuja soma do diâmetro do maior nódulo com o número de nódulos seja menor que sete, na ausência de invasão vascular, o que foi associado a sobrevida em cinco anos de 71,2%. O avanço deste estudo foi oferecer estimativa individualizada da sobrevida e demonstrar que diferentes características tumorais podem resultar em expectativa de sobrevida semelhante, permitindo decisão sobre a inclusão para TH de acordo com a disponibilidade local de órgãos (MAZZAFERRO et al., 2009).

Um grupo canadense, por considerar os CM muito restritivos, decidiu não restringir limite de número ou tamanho de nódulos para indicação de TH, excluindo apenas os pacientes com sintomas sistêmicos relacionados ao tumor, os com invasão macrovascular no exame de imagem e os com tumores além dos CM e mal diferenciados (**critérios de Toronto**). Encontraram SLR em cinco anos de 68%, sem diferença estatística em relação aos pacientes que obedeciam aos CM, tendo

possibilitado a inclusão de 55% a mais de pacientes (DUBAY et al., 2011).

Embora a legislação brasileira afirme que a inclusão em lista de pacientes com CHC deva obedecer aos CM, considera, para fins de estadiamento, todas as lesões menores que 2,0 cm como indeterminadas e portanto não incluídas como nódulos de CHC (BRASIL, 2006). Este detalhe criou um critério à parte, conhecido como **Critério Milão-Brasil**. Sá e colaboradores avaliaram 414 pacientes com CHC submetidos a TH na cidade de São Paulo entre 2007 e 2011, observando que os critérios de Milão-Brasil permitiram a inclusão de 8,6% a mais de pacientes que os CM, sem alterar a sobrevida em cinco anos (SÁ et al., 2016).

Quadro 1 – Critérios de seleção para transplante hepático por CHC

CRITÉRIO	PRÉ-REQUISITOS
Milão	Nódulo único < 5,0 cm ou até três nódulos < 3,0 cm cada, na ausência de invasão macrovascular
San Francisco	Nódulo único de até 6,5 cm ou até três nódulos < 4,5 cm cada e soma total de até 8,0 cm
Hangzhou	Soma dos diâmetros dos nódulos \leq 8,0cm ou maior que isso desde que a AFP < 400 ng/dl e grau de diferenciação I ou II
UpToSeven	Soma do diâmetro do maior nódulo com o número de nódulos < 7, na ausência de invasão vascular
Toronto	Exclui pacientes com sintomas sistêmicos relacionados ao tumor, invasão macrovascular e tumores mal diferenciados além dos CM
Milão-Brasil	Nódulo único < 5,0 cm ou até três nódulos < 3,0 cm cada, na ausência de invasão macrovascular, mas considera todo nódulo < 2cm como indeterminado

Fonte: Autora

Uma limitação para a correta classificação dos pacientes segundo os critérios morfológicos é a subestimação do estadiamento tumoral pelos métodos de imagem pré-operatórios em comparação à análise do explante, o que foi descrito em 15 a 31% dos casos (YAO et al., 2001) (MONTALVÁ et al., 2016).

Alguns autores argumentam contra a valorização apenas da imagem radiológica na seleção de pacientes para TH, devido a: a) dificuldade de diagnosticar nódulos pequenos em pacientes com tumores multifocais, b) dificuldade de reproduzir fielmente as dimensões tumorais, c) correlação fraca dos achados

morfológicos com o comportamento biológico do tumor e d) elevada taxa de discordância entre os resultados da imagem e do explante (DUBAY et al., 2011).

Para tentar aperfeiçoar a seleção de pacientes com CHC para TH, um grupo francês propôs um novo critério, que associa dados morfológicos (número e diâmetro dos nódulos) com o valor de AFP. Atribuem pontos a estes três itens, gerando um escore de risco, que, quando menor ou igual a dois pontos, retrata tumores de baixo risco de RT que poderiam ser selecionados para TH (DUVOUX et al., 2012).

Bauschke e colaboradores compararam a acurácia de onze critérios diferentes na estimação do risco de RT após TH, encontrando que os critérios de Duvoux ofereceram a melhor acurácia, pois foram os únicos a prever as recorrências extra-hepáticas (BAUSCHKE et al., 2017).

2.4 A recorrência do CHC no pós-transplante hepático

Apesar da utilização de critérios morfológicos, como os de Milão, para selecionar os pacientes com CHC para TH, a RT ainda ocorre em 15 a 20% dos casos, sendo associada a prognóstico muito desfavorável (DE'ANGELIS et al., 2015)(NAGAI et al., 2015a) (SAPISOCHIN et al., 2015) (BODZIN et al., 2017).

Portanto, torna-se necessária a identificação de outros fatores de risco para RT para refinar a seleção dos pacientes e também tentar identificar fatores modificáveis que possam reduzir a incidência de RT.

2.4.1 Fatores associados ao risco de recorrência tumoral

Há inúmeros estudos que buscam identificar fatores de risco para recorrência do CHC após TH. Classificaremos esses fatores como relacionados ao tumor, ao paciente ou ao tratamento (Quadro 2).

Quadro 2 - Fatores possivelmente associados à recorrência do carcinoma hepatocelular após transplante hepático.

Relacionados ao tumor	Relacionados ao paciente	Relacionado ao tratamento
Estadiamento tumoral	Etiologia viral	PRÉ-TRANSPLANTE:
Invasão vascular	Obesidade	Biopsia tumoral percutânea
Grau de diferenciação	Linfopenia	Tempo de lista
Alfa fetoproteína	Tratamento do HCV	Terapia ponte
Razão neutrófilo-linfócito	DHGNA	PERITRANSPLANTE:
PET scan		Idade do doador
Resposta à TLR		Tempo de isquemia
		Tipo de cirurgia
		Hemotransfusão
		PÓS-TRANSPLANTE:
		Nível sérico de tacrolimus
		Uso de inibidores da mTOR
		Sorafenib adjuvante

Fonte: Autora

TLR, terapia locorregional; HCV, vírus da hepatite C; DHGNA, doença hepática gordurosa não alcoólica

2.4.1.1 Fatores relacionados ao tumor

a) Estadiamento, número e tamanho dos nódulos

Em 2011 foi publicada uma revisão sistemática depois de 15 anos de utilização dos CM na prática clínica, incluindo 90 artigos e 17.780 pacientes. Esta metanálise validou os CM, demonstrando que a sobrevida em cinco anos dos pacientes com CHC transplantados dentro dos critérios foi semelhante à dos pacientes transplantados por causas não tumorais. Também comprovou associação entre os CM e sobrevida em cinco anos, ausência de invasão vascular e tumores bem diferenciados (MAZZAFERRO et al, 2011).

Outra revisão sistemática demonstrou que o risco de RT e a SLR são fortemente associados aos critérios de Milão e aos de San Francisco, com risco relativo para os pacientes que estão fora de critério de 2,79 para os CM e 6,11 para os de San Francisco. O risco de RT também teve associação com o tamanho do maior nódulo, sendo 6,7 vezes maior nos pacientes com diâmetro do maior nódulo maior ou igual a 3,0 cm e 2,5 vezes nos com tumores maiores que 5,0 cm. No entanto, não encontraram diferença significativa no risco de RT com relação ao

número de nódulos, especulando que nódulos múltiplos, porém pequenos, não teriam maior frequência de invasão vascular e, portanto, não acarretariam maior risco de RT (GERMANI et al., 2011).

O estudo que criou o critério UpToSeven observou que o aumento do risco de RT com o aumento do número de nódulos não é linear, pois, a partir de três nódulos, a inclinação da reta de aumento do risco começa a diminuir (MAZZAFERRO et al., 2009).

Dessa forma, talvez seja importante diferenciar os pacientes fora de critérios por tamanho da lesão ou por maior número de lesões, pois o impacto sobre RT e SLR pode ser distinto.

b) Invasão vascular

A invasão tumoral macrovascular pode ser identificada pelos exames de imagem e é considerada contra-indicação à realização de TH. Já a presença de invasão microvascular (IMV) só pode ser determinada com exatidão pela análise histopatológica da peça cirúrgica, sendo, portanto, uma informação indisponível para tomada de decisão no pré-operatório.

Vários autores descreveram a associação entre IMV e maior risco de RT e redução de sobrevida. O estudo que criou o critério UpToSeven encontrou associação entre IMV e o número de tumores e o tamanho do maior nódulo. Detectaram IMV em 16,6% dos tumores dentro dos CM, em 29,3% dos tumores fora dos CM mas ainda nos limites do UpToSeven e em 50,2% dos tumores além do UpToSeven. Informação muito importante desse estudo foi que a presença de IMV duplicou o risco de morte (MAZZAFERRO et al., 2009).

Agopian e colaboradores (2015) observaram que a presença de invasão micro ou macrovascular no explante era associada a aumento significativo da RT (RR 2,42 e 7,82, respectivamente) e redução da SLR em cinco anos (44% e 13%, respectivamente, em comparação a 64% nos pacientes sem invasão vascular) (AGOPIAN et al., 2015). Resultados semelhantes foram reportados por Xu e colaboradores (XU et al., 2017). Já um grupo espanhol não encontrou diferença significativa na sobrevida em cinco anos dos pacientes com tumores dentro dos CM que apresentavam IMV, mas nos fora dos CM a presença de IMV foi associada a redução da sobrevida de 57,9% para 27,3% (DONAT et al., 2016).

c) Grau de diferenciação

Tumores mal diferenciados são encontrados em 11 a 25% dos casos submetidos a TH (YAO et al., 2001)(MAZZAFERRO et al., 2009)(AGOPIAN et al., 2015)(DONAT et al., 2016) e esta frequência parece se elevar à medida que se expandem os critérios morfológicos de seleção (16% nos tumores dentro dos CM, 21,3% nos dentro dos critérios UpToSeven e 30,6% nos pacientes fora destes critérios) (MAZZAFERRO et al., 2009).

A literatura é rica em estudos associando o grau de diferenciação ao risco de RT. Citamos como exemplo um estudo que observou que pacientes com tumores bem e moderadamente diferenciados apresentavam em cinco anos frequência de RT menor (13% versus 39,3%) e SLR maior (57,7% versus 39,9%) que os pacientes com tumores mal diferenciados. Encontraram também associação entre a presença de tumores mal diferenciados e nódulos maiores que 5 cm e valores de AFP acima de 200 ng/dl (DONAT et al., 2016).

No entanto, nem sempre o grau de diferenciação é corretamente diagnosticado pela biopsia percutânea da lesão. Em um estudo, a biopsia pré-operatória subestimou a presença de má diferenciação tumoral, quando comparada com a análise da peça cirúrgica, determinando baixo percentual de concordância entre os dois exames (PAWLIK et al., 2007). Estudo recente confirmou estes achados, identificando que a biopsia de agulha fina teve baixa sensibilidade (29%) e valor preditivo positivo (35%) na identificação de tumores mal diferenciados, tendo sido incapaz de prever corretamente a presença de IMV e RT e não melhorando a acurácia da seleção de candidatos para TH, quando associada aos CM (COURT et al., 2017).

d) Alfa fetoproteína (AFP)

A AFP é uma glicoproteína normalmente sintetizada pelo fígado do feto e saco vitelino, que se encontra em níveis elevados em cerca de 60% dos casos de CHC (VIBERT et al., 2010). Embora venha perdendo valor no diagnóstico do CHC, devido aos valores pouco satisfatórios de sensibilidade e especificidade, seu papel no prognóstico do CHC é relevante.

BERRY e IOANNOU (2013), analisando retrospectivamente, com base nos dados da UNOS (*United Network for Organ Sharing*), 45.267 pacientes submetidos a transplante hepático por CHC nos Estados Unidos entre 2002 e 2011, observaram

uma relação de dose-resposta entre os níveis de AFP (a partir de 16ng/dl) e a sobrevida pós-TH. Observaram também que a associação da AFP com os critérios morfológicos era capaz de selecionar casos de tumor avançado com bom prognóstico, sugerindo que é possível expandir os critérios de Milão, em pacientes com AFP abaixo de 15ng/dl.

Outros autores fizeram propostas para incorporação do valor da AFP aos critérios de indicação de TH. O mais difundido é o que propôs e validou um escore simples, associando os valores de AFP com tamanho e número de nódulos nos exames de imagem. Utilizando o ponto de corte de dois pontos para diferenciar os pacientes de baixo e alto risco, encontraram taxas de recorrência tumoral pós-TH de 8,8 e 50,6%, respectivamente (DUVOUX et al., 2012). Este escore já foi incorporado na prática clínica de alguns países.

Já um grupo polonês sugeriu que pacientes com tumores além dos critérios de Milão, mas dentro dos critérios de San Francisco e UpToSeven com níveis de AFP abaixo de 100ng/dl podem ser submetidos a TH com baixo risco de recorrência (GRAȚ et al., 2015).

HAMEED e colaboradores (2014), estudando 211 transplantes por CHC da Califórnia que respeitaram os critérios de Milão, observaram que 4,7% dos casos tinham níveis de AFP acima de 1.000 ng/dl, o que foi fortemente associado a invasão microvascular no explante (OR 6,8) e RT em cinco anos (47,3%), com sensibilidade de 14% e especificidade de 96%. Demonstraram que a utilização deste marcador como critério de exclusão, eliminaria apenas 4,7% da amostra, mas reduziria em 20% a recorrência tumoral. Um grupo espanhol encontrou resultados semelhantes, com risco de recorrência 9,5 vezes maior nos casos com AFP acima de 1000 ng/dl (MONTALVÁ et al., 2016).

Outros autores advogam que a dinâmica dos níveis de AFP durante a espera pelo TH teria mais acurácia na previsão da RT que os níveis estáticos, sugerindo um ponto de corte de elevação da AFP maior que 15ng/dl/mês como fator de risco, o que foi associado a invasão vascular no explante e sobrevida global e livre de recorrência (VIBERT et al., 2010)(LAI et al., 2013).

Vários autores relataram que a redução dos níveis de AFP após terapia locorregional (TLR) se associa a bom prognóstico após TH (DUVOUX et al., 2012)(BERRY; IOANNOU, 2013)(HAMEED et al., 2014)(TOSO et al., 2015). Merani e colaboradores mostraram que pacientes que alcançaram valores de AFP menores

de 400 ng/ml após TLR foram menos excluídos por progressão tumoral e obtiveram maior sobrevida que os que já possuíam valores baixos desde o início, enquanto que os pacientes cujos valores de AFP se elevaram acima desse nível apresentaram o pior prognóstico. Mesmo pacientes com níveis iniciais de AFP acima de 1000 ng/dl obtiveram boa sobrevida desde reduzissem seus níveis para menos de 400ng/dl após a TLR (MERANI et al., 2011).

Um estudo multicêntrico europeu analisou a resposta à TLR através da associação da dinâmica da AFP e da resposta radiológica observando que pacientes com tumores dentro dos critérios de Milão, mas com um dos fatores de mau prognóstico (elevação da AFP acima de 15ng/dl/mês e progressão radiológica) apresentaram pior sobrevida livre de recorrência em cinco anos (LAI et al., 2013).

Também parece haver uma associação entre a velocidade de queda da AFP após o TH com o risco de RT. Um estudo coreano acompanhou 125 pacientes transplantados por CHC que apresentavam níveis elevados de AFP no pré-transplante, observando que 77,6% deles normalizaram os valores no primeiro mês após a cirurgia. A não normalização da AFP nesse prazo foi associada a maior risco de RT e a menor SLR em dois anos (YOO et al., 2016).

e) Razão neutrófilo-linfócito

Já é sabido que alguns tumores induzem resposta inflamatória que estimula a liberação de citocinas e mediadores inflamatórios, elevando o risco de metástases por inibição da apoptose, promoção de angiogênese e lesão do DNA. Razão neutrófilo-linfócito (RNL) no sangue periférico elevada pode ser um marcador desta resposta inflamatória e já foi demonstrada sua associação com o mau prognóstico de várias neoplasias (TEMPLETON et al., 2014). Alguns autores estudaram a associação entre a RNL, calculada com base em exames do pré-operatório imediato, e o risco de RT após TH. Halazun e colaboradores encontraram RNL maior ou igual a cinco em 9% de 150 pacientes transplantados por CHC, os quais apresentaram SLR em cinco anos de apenas 25%, inferior aos 75% de SLR dos que apresentavam RNL menor que cinco. Propuseram um escore associando a RNL ao diâmetro do maior nódulo, e observaram sobrevida mediana de apenas três meses nos pacientes com RNL maior ou igual a cinco e diâmetro do tumor maior que 3 cm (HALAZUN et al., 2009).

Um estudo com 158 TH intervivos no Japão sugeriu que o melhor ponto de corte da RNL era 4, sendo que a cada aumento de um ponto da RNL o risco de RT se elevava 1,2 vezes. Observaram ainda que pacientes com tumores dentro dos CM e RNL maior ou igual a 4 apresentaram SLR em cinco anos menor que os pacientes fora dos CM com RNL menor que 4. Nenhum dos pacientes fora dos CM com RNL maior que 4 estava livre de RT aos cinco anos. (MOTOMURA et al., 2013).

Uma metanálise de 15 estudos envolvendo 3094 pacientes confirmou a associação da RNL com pior sobrevida global e SLR, invasão vascular, multifocalidade, tamanho e má diferenciação tumoral (XIAO et al., 2014).

f) Tomografia por emissão de prótons (PET scan)

A captação de ^{18}F -fludeoxiglicose (^{18}FDG) na tomografia por emissão de prótons (PET scan) é baseada no aumento do metabolismo glicolítico nas células tumorais. A sensibilidade diagnóstica do PET scan para CHC é de apenas 50%, já que tumores bem-diferenciados têm atividade glicolítica comparável à das células hepáticas não-tumorais. Dessa forma, sua utilização em casos de CHC deve ser reservada para outras indicações que não o diagnóstico, tais como: estadiamento com pesquisa de metástases, avaliação da resposta a TLR e avaliação do prognóstico (KORNBERG; SCHERNHAMMER; FRIESS, 2017).

A literatura tem apresentado resultados que relacionam a captação de ^{18}FDG pelo tumor com a agressividade do CHC, com base em associação com invasão vascular e má-diferenciação tumoral, maior risco de saída de lista por progressão tumoral, maior risco de RT, menor sobrevida global e livre de RT em cinco anos (KORNBERG et al., 2012)(TAKADA et al., 2017).

g) Resposta à terapia locorregional

Como os principais marcadores de agressividade tumoral (invasão vascular e grau de diferenciação) geralmente não são disponíveis no pré-transplante, alguns grupos passaram a avaliar se a resposta do tumor à TLR poderia ser usada como marcador do comportamento biológico do tumor. As TLR podem ser usadas no pré-transplante em dois cenários: a) nos tumores além dos CM, com o objetivo de reduzir massa tumoral e assim possibilitar a inclusão nos critérios (*downstaging*) ou b) nos pacientes com tumores dentro dos CM, como terapia neoadjuvante, para evitar a retirada do paciente da lista por progressão tumoral (*dropout*). As

modalidades de tratamento que podem ser empregadas para TLR são quimioembolização transarterial (QETA), ablação por radiofrequência, alcoolização e radioembolização, a depender de características do tumor e do paciente (GALLE et al., 2018).

Otto e colaboradores estudaram 136 pacientes com CHC submetidos a QETA, observando que a resposta radiológica à TLR selecionou melhor o candidato ao TH que dados patológicos, como tamanho tumoral, invasão vascular e grau de diferenciação. Nessa casuística, os pacientes cujos tumores inicialmente volumosos passaram a preencher os CM após a TLR obtiveram a menor taxa de RT (3,3%), enquanto os que apresentaram algum grau de progressão tumoral tiveram SLR em cinco anos significativamente menor (22 versus 92%, RR 21,7) (OTTO et al., 2013).

O grupo da Universidade da Califórnia incluiu prospectivamente, em um programa de *downstaging*, pacientes com tumores além dos CM, desde que não apresentassem invasão macrovascular e preenchessem um destes critérios: a) nódulo único menor ou igual a 8 cm, b) dois ou três nódulos menores que 5cm, com soma menor que 8 cm ou c) quatro a cinco nódulos menores que 3 cm com soma menor que 8 cm. Os casos que apresentassem redução do tumor para dentro dos CM após a TLR e assim permanecessem por três meses seriam inscritos para transplante e seus resultados comparados com os pacientes que preenchiam os CM desde o início. Dos 118 pacientes incluídos no protocolo de TLR, 65,3% alcançaram um *downstaging* efetivo. Comparando os grupos, observou-se que o risco de *dropout* por progressão tumoral em dois anos foi maior nos pacientes que sofreram *downstaging* (34,2% versus 25,6%), mas que a SLR em um e cinco anos foi semelhante entre eles (YAO et al., 2015).

Metanálise recente confirmou os bons resultados com o processo de *downstaging* (KULIK et al., 2018), tanto que a Associação Americana para Estudo do Fígado (AASLD) recomenda a inclusão desses pacientes em lista de TH (HEIMBACH et al., 2018).

2.4.1.2. Fatores relacionados ao paciente

a) Obesidade

Alguns autores têm relatado a associação entre obesidade e piores resultados após TH por CHC. Siegel e colaboradores encontraram 25% de pacientes obesos entre 342 transplantados por CHC na Universidade de Columbia. Este grupo teve o

dobro do risco de óbito, maior frequência de invasão vascular e tendência a maior taxa de RT, sugerindo que a maior expressão de fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) induzida pelo tecido adiposo possa estimular a angiogênese tumoral (SIEGEL et al., 2012). Já outro grupo americano não observou associação entre sobrepeso e características histopatológicas, mas confirmou o maior risco de RT, com tempo para RT mais curto, sugerindo que a obesidade induza um estado pró-oncogênico, via redução da adiponectina e aumento da leptina, o que estimularia proliferação, migração e invasividade do CHC (MATHUR et al., 2013).

b) Etiologia viral

Ainda é incerta a influência da etiologia viral sobre o risco de RT após TH. Estudo de Taiwan descreveu uma forte associação entre a falha da terapia profilática contra reativação do vírus B no pós-transplante e o risco de RT, ambos relacionados à presença de uma mutação específica do vírus, que parece induzir um estado pró-carcinogênico (WU et al., 2013). Outro estudo encontrou um risco de RT 2,45 vezes maior nos pacientes com hepatite B e carga viral acima de 5 log, encontrando também associação entre a reativação do vírus B no pós-TH e o risco de RT (LI et al., 2011).

A hepatite C recorre quase universalmente após o TH, com evolução mais acelerada da fibrose, levando a cirrose cinco anos após o TH em 20 a 50% dos casos (BERENQUER; SCHUPPAN, 2013). A literatura é controversa sobre a influência da hepatite C sobre o risco de RT após TH por CHC. Bozorgzadeh e colaboradores compararam pequeno grupo de pacientes transplantados por CHC com e sem hepatite C, observando associação da infecção viral com menor SLR em cinco anos (BOZORGZADEH et al., 2007). Um levantamento de dados da UNOS entre 1994 e 2008 revelou que a infecção pelo HCV piora a sobrevida após TH, independente da presença de CHC (THULUVATH et al., 2009). Resultado semelhante foi relatado por um grupo canadense, que observou sobrevida mediana após TH por CHC de 6,7 anos no grupo com hepatite C em comparação a 12,3 anos no grupo com outras etiologias, mas essa diferença foi decorrente principalmente da perda do enxerto pela reativação da infecção viral, sem diferença significativa na taxa de RT (DUMITRA et al., 2013). Já um grupo de Taiwan encontrou menor SLR em cinco anos no subgrupo de pacientes com hepatite C que evoluíram com

desenvolvimento rápido de fibrose hepática após o TH intervivos (VASAVADA; CHAN, 2015).

c) Tratamento do HCV

Existem poucos dados sobre o impacto do tratamento do HCV no pós-TH sobre o risco de RT. Pequenas séries de casos sugerem que o tratamento com esquemas a base de interferon pode estar associado a menor risco de RT, às custas de elevada morbidade do tratamento, com altas taxas de interrupção do mesmo e baixa taxa de RVS (KOHLI et al., 2012).

Os dados sobre o uso de DAAs para tratamento do HCV em pacientes com CHC no cenário do transplante hepático ainda são escassos. Na coorte CUPILT da ANRS, 314 transplantados por CHC foram tratados com DAAs após cerca de 67 meses do transplante, obtendo 96,8% de RVS, sendo observados apenas 2,2% de recorrência tumoral (ANRS, 2016).

Alguns autores têm descrito resultados preliminares sobre o tratamento antiviral em pacientes com CHC durante o tempo de espera do transplante. Yang e colaboradores descreveram os desfechos de 81 transplantados por CHC, sendo que 18 haviam sido tratados com DAA no pré-transplante, obtendo RVS estranhamente baixa (50%). A RT pós-transplante ocorreu em 27,8% dos tratados com DAAs e em 9,5% dos não tratados ($p=0,06$), sendo que 80% das recorrências pós-DAAs ocorreram nos primeiros seis meses pós-transplante. Todos os que recorreram pós-DAAs apresentavam características de mau prognóstico na análise do explante e desenvolveram metástases extra-hepáticas (YANG et al., 2016).

Um grupo italiano relatou os resultados do tratamento com DAAs em 35 pacientes com CHC durante o tempo de fila de espera, obtendo RVS de 94% e recorrência tumoral em apenas 8,5% deles após seguimento médio de 20 meses pós-transplante, sendo que todos os recorrentes apresentavam tumores além dos critérios de Milão, com invasão vascular e mal diferenciados (DONATO et al., 2017). Outro estudo comparou pacientes tratados ou não com DAAs durante o tempo de espera para transplante, não encontrando diferença no risco de saída da lista de transplante por progressão tumoral, nas características do explante, nem na recorrência tumoral precoce após o transplante (ZANETTO et al., 2017).

d) Linfopenia

Um estudo chinês encontrou maior risco de RT em pacientes com percentual de linfócitos no pré-TH abaixo de 30% (LI et al., 2013). Já um estudo americano observou um risco de RT significativamente maior quando o paciente apresentava linfopenia persistente (menos de 1000 linfócitos/mm³ no pré-operatório e abaixo de 500 linfócitos/mm³ após 30 dias da cirurgia)(NAGAI et al., 2014).

e) Doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA)

Recentemente alguns autores têm questionado um comportamento biológico mais indolente nos CHC associados à DHGNA. Lewin e colaboradores analisando o banco de dados da UNOS, observaram que 7% dos TH por CHC eram secundários a DHGNA, e que os explantes desse subgrupo apresentavam frequência 32% menor de características de alto risco para RT (LEWIN et al., 2017). Um estudo incluindo 929 pacientes transplantados por CHC nas Universidades de Toronto e San Francisco encontrou diagnóstico de DHGNA em 6,5% deles, sem detectar diferença nos achados patológicos do explante ou no risco de RT. No entanto, observaram após análise multivariada que entre os pacientes com tumores fora dos CM os portadores de DHGNA apresentaram taxa de RT 80% menor que os de outras etiologias (SADLER et al., 2018).

2.4.1.3 Fatores relacionados ao tratamento

a) Biopsia tumoral pré-transplante

Embora os consensos atuais permitam o diagnóstico de CHC por meio de métodos de imagem na maioria dos casos, a biopsia percutânea ainda pode ser necessária nos casos com padrão radiológico atípico (GALLE et al., 2018)(HEIMBACH et al., 2018). Os principais riscos da biopsia tumoral percutânea são sangramento e semeio tumoral no trajeto da agulha, estimado ocorrer em torno de 1 a 5% dos casos. Poucos autores têm relatado o impacto da realização de biopsia percutânea sobre o risco de RT após o TH. Em 2005, um grupo espanhol relatou que a biopsia teve sensibilidade de apenas 57,6% no diagnóstico pré-operatório do CHC, tendo sido associada a maior risco de RT, principalmente extra-hepática (PÉREZ SABORIDO et al., 2005). Lopez e colaboradores estudaram pacientes com CHC que foram submetidos a biopsia e ablação por radiofrequência antes do TH, verificando que nenhum caso de RT no trajeto da agulha ocorreu nos

pacientes que realizaram os dois procedimentos na mesma ocasião, enquanto que 16,7% dos que realizaram a radiofrequência em data posterior à biopsia apresentaram recorrência na parede torácica (LOPEZ; KUWADA; WONG, 2013). Um estudo francês não observou influência da biopsia percutânea sobre a frequência de *dropout* ou sobre a taxa de RT (DAVID et al., 2014). Estudo alemão recente identificou um aumento do risco de RT pós-TH nos pacientes que foram submetidos a biopsia percutânea do tumor, principalmente naqueles com invasão vascular e sugeriram que a biopsia possa levar ao extravasamento de células tumorais para vasos sanguíneos e linfáticos, concorrendo para o surgimento de metástases à distância (SEEHOFER et al., 2017).

b) Tempo de lista de espera

Estudos baseados em banco de dados da UNOS relataram associação entre tempo de espera em lista curto e aumento do risco de RT no pós-TH e redução da sobrevida. Os autores sugeriram que o acompanhamento rigoroso por imagem durante a espera poderia selecionar os tumores com comportamento biológico mais favorável (SAMOYLOVA et al., 2014)(SCHLANSKY et al., 2014). Um estudo multicêntrico americano comparou o impacto do tempo transcorrido entre o diagnóstico de CHC e o TH no risco de *dropout* e RT, encontrando frequência de *dropout* de 3,2% após seis meses e de 12,4% após 18 meses, apesar da realização de TLR. O risco de RT em cinco anos foi maior nos pacientes transplantados antes de seis meses ou após 18 meses do diagnóstico do CHC (MEHTA et al., 2017).

No entanto, outros estudos encontraram maior risco de RT quando o tempo de lista era maior. Um estudo brasileiro encontrou associação entre tempo de lista acima de 7,8 meses e RT no pós-TH (COSTA et al., 2014).

c) Terapia ponte

Chama-se de terapia ponte as TLR realizadas nos pacientes com tumores dentro dos CM, como tratamento neoadjuvante, para reduzir o risco de saída de lista por progressão tumoral. A literatura ainda é controversa sobre seus benefícios, mas uma conferência internacional recomendou sua realização quando a expectativa de espera for maior que seis meses (CLAVIEN et al., 2012) e a AASLD sugere a realização nos pacientes com tumores dentro dos CM (HEIMBACH et al., 2018). Em sua metanálise, Kulik e colaboradores encontraram redução não significativa no risco

de *dropout* após TLR em pacientes dentro dos CM, enquanto não observaram qualquer impacto sobre o risco de RT e SLR (KULIK et al., 2018).

No entanto, recentemente foram publicados dois estudos que trouxeram novas informações a respeito da questão, que ainda precisam ser analisadas com cautela. Estudo multicêntrico americano analisou 3601 pacientes transplantados com CHC, dos quais 79,3% receberam TLR, observando que não houve diferença na RT e na SLR em relação aos que não receberam essas terapias. No entanto, observaram maior risco de RT naqueles que desenvolveram necrose apenas parcial do nódulo, quando comparados aos que não receberam TLR (AGOPIAN et al., 2017).

Outro grupo americano confirmou a similaridade de taxas de RT em pacientes dentro dos CM submetidos ou não a TLR e o maior risco de RT naqueles com necrose parcial do tumor, quando comparados aos com necrose completa e aos sem necrose. Encontraram também associação entre necrose parcial do tumor e maior risco de metástases linfonodais, demonstrando que a necrose parcial era acompanhada de maior densidade de vasos linfáticos peritumorais e maior expressão do fator de crescimento endotelial vascular. Levantaram a hipótese que a necrose tumoral estimularia os fatores de crescimento e neoangiogênese, facilitando a progressão e disseminação linfática das células tumorais remanescentes (XU et al., 2017).

d) Idade do doador

Um estudo norte-americano observou maior mediana de idade do doador entre pacientes que evoluíram com RT após TH, achado que permaneceu significativo após análise multivariada, o que os levou a especular se fígados mais velhos apresentariam menor tolerância à preservação e maior susceptibilidade à isquemia fria (SHARMA et al., 2012). Resultado semelhante foi observado em um levantamento de mais de 5000 TH do banco de dados da UNOS, em que foi encontrado risco de RT 70% maior nos pacientes que receberam enxertos de doadores acima de 60 anos, independente da etiologia da doença hepática (VAGEFI et al., 2015).

e) Tempo de isquemia

O tempo de isquemia fria corresponde ao tempo entre o clampeamento da aorta na cirurgia de captação no doador e a retirada do enxerto do gelo durante a cirurgia do receptor, enquanto o tempo de isquemia quente é aquele entre a retirada do enxerto da solução de resfriamento e a reperfusão portal no receptor. Ambos se relacionam com a intensidade da lesão de isquemia-reperfusão, que estimula fenômenos imunes e inflamatórios. Alguns autores têm associado os tempos de isquemia com o risco de RT no pós-TH. Nagai e colaboradores observaram aumento gradativo do risco de RT com o aumento do tempo de isquemia, encontrando diferença significativa após dez horas de isquemia fria e 50 minutos de isquemia quente (NAGAI et al., 2015b). Um grupo alemão encontrou associação entre o tempo de isquemia quente maior que 50 minutos e o risco de RT (KORNBERG et al., 2015). Especula-se que a lesão de isquemia-reperfusão possa acelerar o crescimento e o implante de micrometástases de CHC presentes no momento do TH.

f) Hemotransfusão

Nagai e colaboradores observaram maior risco de RT nos pacientes que receberam mais de dez unidades de concentrados de hemácias no intra-operatório (NAGAI et al., 2015). Um grupo chinês encontrou associação entre perda sanguínea intraoperatória maior que 4 litros e risco de RT, o que os levou a especular se esta associação seria decorrente da disseminação de células tumorais pela maior manipulação do fígado ou efeito da imunossupressão induzida por hipóxia tissular (LIU et al., 2015).

g) Técnica cirúrgica

Existem duas técnicas para reconstrução das anastomoses venosas durante o TH. Na técnica convencional, a veia cava retro-hepática é ressecada junto com o fígado nativo e são feitas anastomoses término-terminais com a cava supra e infra-hepática. Na técnica conhecida como *piggyback*, a cava retro-hepática do receptor é preservada, realizando-se anastomose venosa látero-lateral do enxerto com a cava do receptor. A preservação da cava nos procedimentos de *piggyback* reduz a instabilidade hemodinâmica e o tempo de isquemia quente. Por outro lado, a preservação da cava teoricamente poderia aumentar o risco de persistência de

margem comprometida por tumor e a maior manipulação do órgão doente poderia aumentar a disseminação de células tumorais. Poucos estudos avaliaram o desfecho do TH para o tratamento do CHC de acordo com a técnica cirúrgica empregada. Mangus e colaboradores não encontraram diferença na frequência de RT nem na SLR, de acordo com a técnica de reconstrução venosa (MANGUS et al., 2008), já um estudo polonês encontrou maior risco de RT nos pacientes submetidos à técnica convencional (GRAŹT et al., 2013).

Como a escassez de órgãos limita o uso do TH como tratamento do CHC, a doação intervivos é uma alternativa viável para os pacientes com doador disponível. A técnica de TH intervivos implica anastomose *piggyback* entre o receptor e o enxerto parcial do doador. Os dados na literatura são controversos sobre o impacto do TH intervivos no risco de RT. Metanálise mostrou SLR cerca de 60% maior nos pacientes submetidos a TH com doador cadáver que nos submetidos a TH intervivos (GRANT et al., 2013).

As possíveis explicações para o pior prognóstico do TH intervivos no tratamento do CHC seriam: a) menor tempo de lista, o que impediria a identificação de tumores de comportamento biológico mais agressivo; b) maior manipulação cirúrgica, que poderia contribuir para a disseminação de células neoplásicas e c) rápida regeneração hepática após o TH intervivos, que liberaria fatores de crescimento e citocinas que poderiam contribuir para a RT (PARK et al., 2014).

h) Imunossupressão

No cenário de transplante para tratamento de uma neoplasia é necessário buscar um equilíbrio entre os riscos imunológicos (rejeição do enxerto) e oncológicos (recorrência tumoral). Já que o sistema imune inato normalmente localiza e destrói agregados de células tumorais nos estágios precoces do CHC, imagina-se que a imunossupressão possa afetar negativamente os desfechos oncológicos. Já foi demonstrada a associação entre o nível sérico do tacrolimus no primeiro mês após TH com o risco de RT, sendo observado que pacientes com nível acima de 10 ng/ml apresentavam risco de RT 2,82 vezes maior (RODRÍGUEZ-PERÁLVAREZ et al., 2013).

Como os inibidores da mTOR (sirolimus e everolimus) inibem a proliferação celular e angiogênese, postulou-se que o uso dessas drogas poderia reduzir o risco de RT após TH. Uma metanálise de cinco estudos de coorte encontrou risco de RT

70% menor nos pacientes que usaram sirolimus associado a inibidor de calcineurina (MENON; HAKEEM; HEATON, 2013). Outra metanálise incluindo 42 estudos observou menor frequência de RT entre os pacientes que usaram algum inibidor de mTOR, embora esta diferença só tenha sido significativa entre os pacientes com tumores dentro dos CM (CHOLONGITAS et al., 2014). No entanto, ambas as metanálises assumiam que os estudos em que se basearam eram de baixa qualidade.

Um grande estudo de intervenção randomizado, prospectivo e multicêntrico (estudo SILVER) incluiu 525 pacientes transplantados por CHC, associando ou não sirolimus, a partir de quatro a seis semanas do TH, ao esquema tradicional de imunossupressão de cada centro participante. Embora a taxa de RT em cinco anos tenha sido semelhante entre os grupos, os que usaram sirolimus apresentavam maior percentual de SLR nos quatro primeiros anos, já que ao final do primeiro ano o risco de RT foi 50% menor. Quando foi feita análise de subgrupos, observou-se que a adição de sirolimus foi benéfica nos pacientes abaixo de 60 anos e nos com tumores dentro dos CM. De forma geral, a adição de sirolimus ao esquema imunossupressor foi associada a ganho de 6,4 meses na SLR (GEISLER et al., 2016).

i) Sorafenib preemptivo

Sorafenib é um inibidor tirosino quinase múltiplo que exerce efeito antiangiogênico através da inibição do fator de crescimento endotelial vascular e do fator de crescimento derivado das plaquetas, tendo sido a primeira droga a propiciar aumento da sobrevida para pacientes com CHC avançado (LLOVET et al., 2008). Sua utilização como terapia adjuvante após TH no intuito de reduzir o risco de RT começou a ser descrita, a partir de 2010, em pequenos estudos de caso controle, com resultados promissores, mas às custas de toxicidade que exigiu redução de dose em 75 a 82% dos casos (SAAB et al., 2010)(TENG et al., 2012). No entanto, um estudo caso-controle recente, incluindo 45 pacientes, não encontrou diferença quanto ao risco de RT, sobrevida global ou SLR entre os que usaram ou não sorafenib adjuvante (SATAPATHY et al., 2018).

2.4.2 Acompanhamento do paciente após TH por CHC

Não existe um protocolo de consenso para monitorização da RT após TH, sem definição firmada sobre a modalidade de exames a ser realizada, periodicidade e duração do acompanhamento. A maioria dos autores empregou monitorização com tomografia computadorizada (TC) tóraco-abdominal e dosagem de AFP em intervalos de três a seis meses nos dois ou três primeiros anos, alargando o intervalo entre os exames a partir dessa data. Também não há consenso sobre a duração do rastreo de RT (ROAYAIE et al., 2004) (TOSO et al., 2013) (SAPISOCHIN et al., 2015) (BODZIN et al., 2017). Resultados de uma conferência de consenso sobre TH para tratamento do CHC trouxeram uma recomendação vaga de combinação de exames de imagem (TC ou ressonância magnética - RM) e AFP a cada seis a doze meses (CLAVIEN et al., 2012).

Um estudo multicêntrico propôs um protocolo de monitorização pós-operatória, estratificado de acordo com o risco de RT, que seria estimado pelo escore RETREAT, escore calculado com base em três informações simples: AFP por ocasião do TH, invasão vascular e soma do diâmetro com o número de nódulos viáveis (MEHTA et al., 2016).

2.4.3 Apresentação clínica da recorrência do CHC após TH

Apesar da utilização de critérios restritivos para a seleção de pacientes com CHC para o TH, recorrência tumoral ainda se desenvolve em cerca de 12 a 20% dos casos, na maioria das vezes precocemente, com SLR mediana de 12 a 16 meses. Na maioria dos casos é evento de péssimo prognóstico, com sobrevida após recorrência mediana de 7 a 16 meses (ROAYAIE et al., 2004) (TOSO et al., 2013) (SAPISOCHIN et al., 2015)(NAGAI et al., 2015a) (BODZIN et al., 2017).

O tempo para RT parece depender de variados fatores, como etiologia da doença de base (mais longo na cirrose alcoólica e mais curto na hepatite B) (ROAYAIE et al., 2004), diâmetro do maior nódulo acima de 5cm, tumores mal diferenciados (AGOPIAN et al., 2015), níveis elevados de AFP (VIBERT et al., 2010), razão neutrófilo-linfócito elevada (XIAO et al., 2014)(MOTOMURA et al., 2013), invasão vascular (DONAT et al., 2016), dentre outros.

O curso clínico da RT após TH costuma ser dramático, pois envolve disseminação tumoral em paciente imunossuprimido. A RT após TH deve ser considerada um evento sistêmico, pois se apresenta restrita ao enxerto em apenas

30% dos casos (GUERRINI et al., 2017). Os órgãos mais comumente envolvidos na RT são pulmão, fígado, ossos, linfonodos e adrenal. Acometimento de mais de um órgão é observado em mais de 50% dos casos (BODZIN et al., 2017).

Cerca de 75% das RT ocorrem durante os dois primeiros anos após o TH (BODZIN et al., 2017). A maioria dos autores considera precoce a RT que se desenvolve durante o primeiro ano após-TH. Do ponto de vista fisiopatológico, a RT precoce ocorre por falha do estadiamento pré-transplante, que deixa de identificar metástases já existentes, ou pelo implante e crescimento em outro órgão de células tumorais circulantes. Já a RT tardia surgiria em decorrência de semeio tardio de células que permaneceram latentes e em menor número por um longo tempo após o TH (DE'ANGELIS et al., 2015).

A SLR tem forte impacto sobre a sobrevida após a RT, pois a RT precoce geralmente denota maior carga tumoral e comportamento biológico mais agressivo (TOSO et al., 2013)(SAPISOCHIN et al., 2015)(BODZIN et al., 2017). Outros fatores parecem impactar a sobrevida após RT: estado nutricional por ocasião da RT (NAGAI et al., 2015a), metástases ósseas (ROAYAIE et al., 2004) (BODZIN et al., 2017), nível de AFP após a RT (SAPISOCHIN et al., 2015)(NAGAI et al., 2015a)(BODZIN et al., 2017) e impossibilidade de ressecção cirúrgica da RT (SAPISOCHIN et al., 2015).

2.4.4 Tratamento da recorrência do CHC após TH

O tratamento cirúrgico da RT é possível em apenas 20 a 30% dos casos. A maioria dos casos é considerada irresssecável por se apresentar com múltiplos nódulos em mais de um órgão. Vários estudos observacionais descreveram melhores sobrevidas nos pacientes que foram submetidos a ressecção cirúrgica, sendo difícil determinar se a ressecção realmente prolongou a sobrevida ou se apenas selecionou um grupo de tumores com comportamento mais indolente (ROAYAIE et al., 2004)(ESCARTIN et al., 2007)(KORNBERG; KU, 2010)(SAPISOCHIN et al., 2015)(BODZIN et al., 2017). Sapisochin e colaboradores identificaram um subgrupo de pacientes que alcançava até 50% de sobrevida em cinco anos após RT, que seriam os casos de RT tardia com AFP menor que 100ng/ml e submetidos à ressecção cirúrgica (SAPISOCHIN et al., 2015).

Um grupo publicou seus resultados em pacientes submetidos a metastasectomia pulmonar de CHC, descrevendo sobrevida de 30% após três anos

da cirurgia e concluindo pela recomendação de ressecção em cunha por toracoscopia para pacientes com bom estado geral, boa função do enxerto, sem neoplasia extra-pulmonar ativa e com até cinco nódulos tumorais (HWANG et al., 2012).

Já os pacientes com RT não passível de tratamento cirúrgico apresentam uma sobrevida mais curta, com poucas opções terapêuticas e sem protocolos bem definidos. Alguns estudos avaliaram o uso de sorafenib em pacientes que desenvolveram RT após transplante, porém por questões éticas, nenhum desses estudos foi randomizado com placebo. Martin e colaboradores revisaram os dados do estudo de vida real GIDEON, analisando os pacientes que fizeram uso de sorafenib após o TH, descrevendo maior frequência de efeitos colaterais que nos não transplantados, mas com taxa de suspensão semelhante (MARTIN et al., 2017). Dois outros estudos compararam a sobrevida dos tratados com sorafenib com a de controles históricos que receberam apenas terapia de suporte, observando melhores valores de sobrevida, mas com necessidade de redução de dose em mais de 50% dos casos (SPOSITO et al., 2013)(WAGHRAY et al., 2013).

Estudo coreano recente avaliou os resultados do uso combinado de sorafenib com inibidores da mTOR, tanto *in vitro* quanto *in vivo*. Nos experimentos *in vitro* com linhagens de células de CHC, foi identificado incremento da apoptose e redução da viabilidade das células tumorais tratadas tanto com sorafenib quanto com o inibidor da mTOR, efeito mais intenso quando era feita a exposição combinada às duas drogas. No componente clínico observacional do estudo em pacientes com RT após TH, o uso de inibidores da mTOR foi associado à melhora da sobrevida, mas o acréscimo do sorafenib aparentemente não trouxe benefício adicional (JUNG et al., 2018).

Importante ressaltar a dificuldade em estabelecer protocolos de tratamento baseados em evidências, por ser condição pouco comum e pela ausência de estudos de intervenção randomizados, em que os variados fatores de confusão fossem corrigidos. Enquanto as evidências científicas não se consolidam, os autores sugerem algumas medidas para a condução desses casos (TOSO et al., 2013)(GUERRINI et al., 2017):

- Realizar *screening* periódico após o TH, com determinações de AFP e imagem de tórax e abdome, a fim de diagnosticar precocemente a RT.

- Após a RT, considerar uso de inibidores da mTOR e redução das doses de imunossupressores, principalmente dos inibidores de calcineurina.
- Ressecar a lesão recorrente, sempre que possível.
- Na impossibilidade de ressecção de lesões hepáticas, considerar radiofrequência, quimioembolização ou radioembolização.
- Nos casos de re-recorrência ou irressecáveis, considerar o uso de sorafenib.

2.5 As galectinas

2.5.1 Estrutura e funções

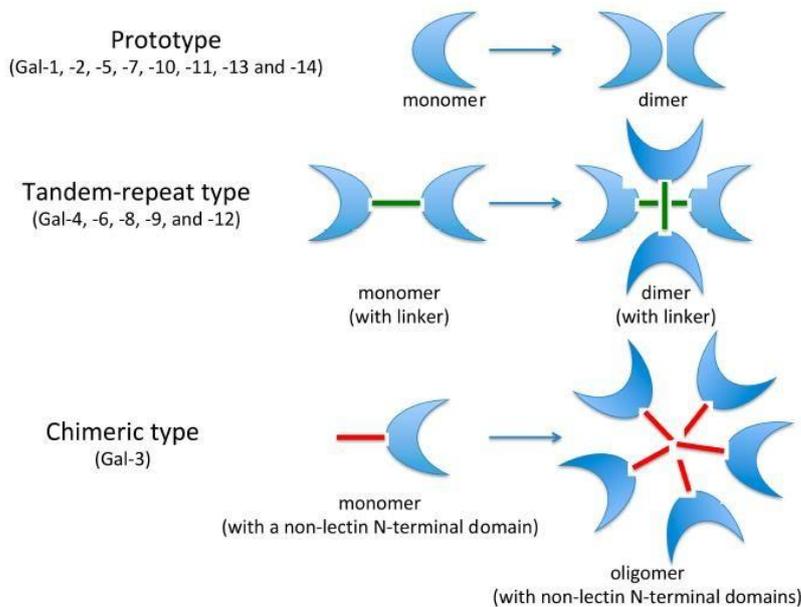
As lectinas são proteínas ligadoras de carboidratos. Dentre elas, as galectinas são uma família de lectinas de origem animal que reconhecem β -galactosídeos, sendo amplamente expressas nas células humanas, onde exercem funções biológicas pleiotrópicas. Estão envolvidas em muitos aspectos da fisiologia, como inflamação, resposta imune, migração celular, autofagia e sinalização, e associadas a doenças como fibrose, câncer e cardiopatia (JOHANNES; JACOB; LEFFLER, 2018). Ancestrais das galectinas são detectados em esponjas e nematódeos. Com a evolução do reino animal, a família das galectinas se expandiu, sendo identificados 15 tipos de galectinas em mamíferos (YANG; RABINOVICH; LIU, 2008). As galectinas não possuem receptores específicos, mas se ligam a resíduos de galactose de glicoproteínas membranares, como as integrinas, e da matriz extracelular, como laminina e fibronectina (RABINOVICH et al., 2007).

São pequenas proteínas solúveis citoplasmáticas que podem ser translocadas para o núcleo da célula ou secretadas para o meio extracelular por vias não clássicas independentes dos complexos de Golgi, alcançando seus ligantes galactosídeos. O padrão de expressão das galectinas varia de acordo com o tipo de célula e tecido (JOHANNES; JACOB; LEFFLER, 2018). Elas podem ser classificadas em três grupos, de acordo com o número de domínios de reconhecimento de carboidratos (DRC) (Figura 4) (SCIACCHITANO et al., 2018):

- Galectinas protótipo com um único DRC, que formam homodímeros não covalentes. Pertencem a esse grupo: Gal1, Gal2, Gal5, Gal7, Gal10, Gal11, Gal13, Gal14 e Gal15.
- Galectinas “*tandem-repeat*”, com dois DRC. São elas: Gal4, Gal6, Gal8, Gal9 e Gal12.

- Galectinas tipo quimera. O único membro desse grupo é a Gal3, que tende a formar pentâmeros. Possui uma região N-terminal estendida composta de segmentos curtos de aminoácidos repetidos, conectada a um DRC C-terminal.

Figura 4 - Estrutura dos membros da família das galectinas, classificados de acordo com o número de domínios de reconhecimento de carboidratos (DRC)*.

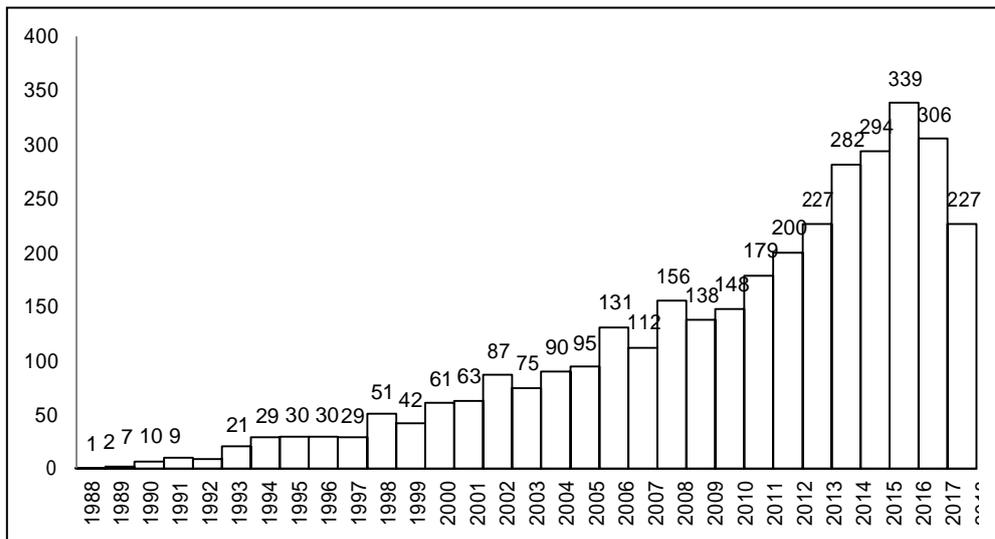


Fonte: Sciacchitano et al, 2018.

* As galectina protótipo possuem apenas um DRC, as *tandem-repeat* possuem dois DRC conectados por um ligante não-conservado e a quimérica possui um DRC e um domínio N-terminal não-lectina, que se associam formando pentâmeros.

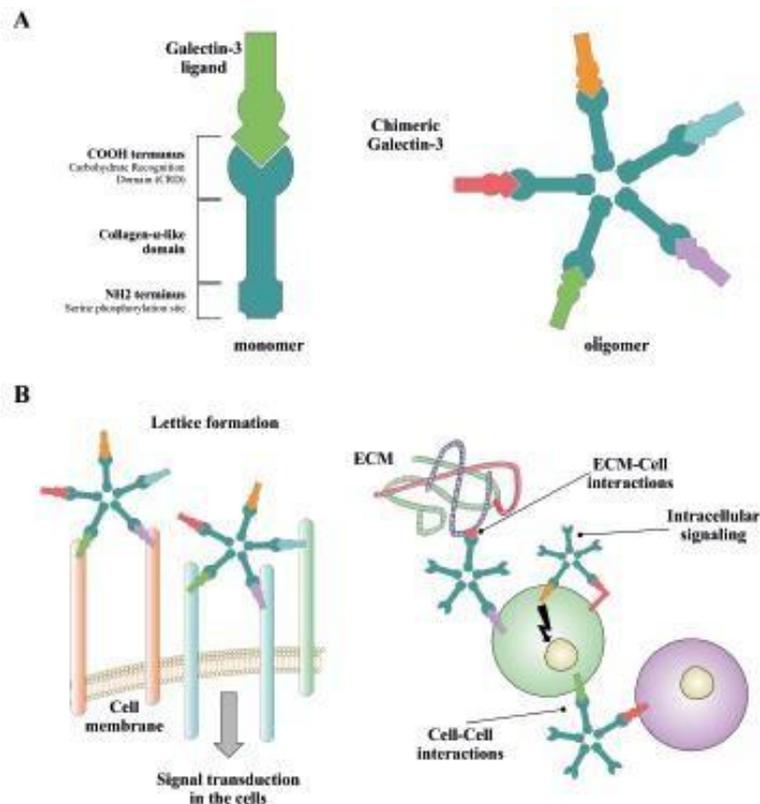
A galectina 3 (Gal3) é o membro da família mais bem estudado até o momento (Figura 5). É uma proteína de 35 kDa codificada pelo gene LGALS3, situado no cromossomo 14. Sua molécula é composta por três regiões estruturais distintas: a porção N-terminal que contém um sítio de fosforilação, importante para a regulação da sinalização intracelular; um domínio colágeno-like que pode ser clivado pelas metaloproteases e a porção C-terminal onde se localiza um domínio de reconhecimento de carboidratos (DRC). Após a ligação com carboidratos multivalentes, a Gal3 pode se oligomerizar ou formar uma rede pentamérica na superfície da célula (Figura 6) (RADOSAVLJEVIC et al., 2016).

Figura 5 - Número de artigos publicados a cada ano abordando a galectina 3 (1988 – 2018)



Fonte: Pubmed, consulta em 22/07/2018

Figura 6 - Representação esquemática da estrutura da galectina 3, sob suas diversas formas



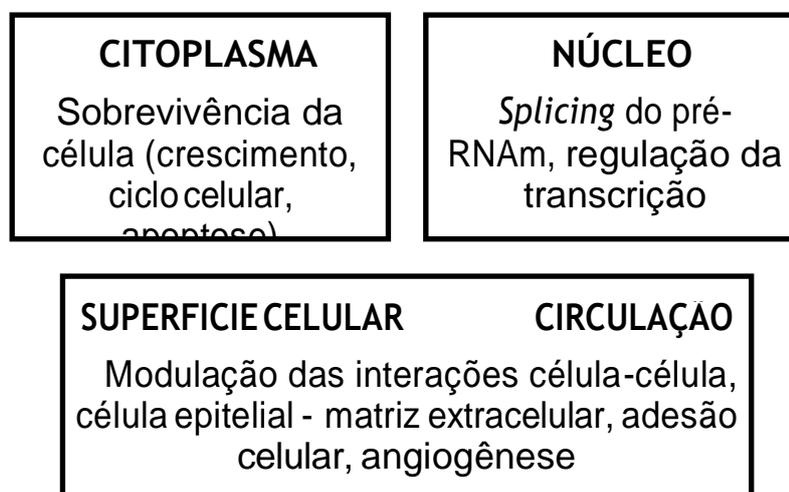
Fonte: RADOSAVLJEVIC et al, 2016.

Legenda: A esquerda) forma monomérica; A direita) forma oligomérica, ligando-se através da região N-terminal; B esquerda) rede pentamérica na superfície celular ligando-se a glicoproteínas; B direita) modulação das vias de sinalização intracelular e das interações célula-célula e célula-matriz extracelular.

A Gal3 pode ser encontrada em diversos tecidos do corpo humano, incluindo células do sistema imune, células epiteliais, endoteliais e neurônios sensitivos, sendo mais abundante durante a embriogênese e o desenvolvimento que durante a idade adulta. Tem localização predominantemente citoplasmática, mas pode ser transportada para o núcleo, membrana celular e secretada para fluidos biológicos. A função desta proteína varia de acordo com sua localização: no citoplasma é importante para a sobrevivência da célula, no núcleo promove o *splicing* do pré-RNA_m e regula a transcrição gênica, enquanto no meio extracelular modula as interações entre as células (Figura 7) (DONG et al., 2017)(SCIACCHITANO et al., 2018).

Por também ser expressa nas células imunes, a Gal3 assume diversas atividades imunomoduladoras, como quimiotaxia, regulação da proliferação e sobrevivência celular, estimulação da fagocitose pelos macrófagos, controle das respostas Th1 e Th2, estimulação da produção de citocinas pelos macrófagos, indução da apoptose de monócitos e linfócitos T (RADOSAVLJEVIC et al., 2016).

Figura 7 - Funções da galectina 3, de acordo com sua localização na célula



Fonte: Adaptado de DONG et al, 2018

2.5.2 A galectina 3 e as neoplasias

No campo da oncologia, as galectinas parecem exercer papel fundamental na progressão tumoral e na evasão ao controle do sistema imune, através da modulação da proliferação, das interações célula-célula e célula-matriz extracelular, da angiogênese e da resistência a apoptose (MATSUDA et al., 2008). A Gal3

influencia oncogênese, progressão do câncer e metástases através de uma variedade de mecanismos, tanto no interior quanto fora da célula. Parece atuar em vários dos “*hallmarks of cancer*”, como sinalização proliferativa sustentada, resistência aos sinais de morte celular, evasão da vigilância imune, indução da angiogênese e ativação do potencial metastático (HANAHAN; WEINBERG, 2011).

A Gal3 tem expressão heterogênea em diversos tumores, variando também sua influência no prognóstico. Nos tumores de cólon e cérebro e na leucemia mieloide aguda sua expressão está associada a pior prognóstico, enquanto no câncer gástrico parece favorecer melhor evolução. O nível sérico da Gal3 parece ser útil para determinação de prognóstico, por estar mais elevado na doença metastática e reduzir-se após ressecção do tumor (THIJSSSEN et al., 2015).

A Gal3 está envolvida em várias etapas da doença metastática, como: adesão da célula à matriz extracelular, migração e invasão, agregação das células tumorais na circulação durante a metastatização, quimioatração de células endoteliais estimulando a angiogênese, apoptose de linfócitos T e inibição de células *natural killer* (FUNASAKA; RAZ; NANGIA-MAKKER, 2014)(FARHAD; ROLIG; REDMOND, 2018).

2.5.3 Relação da galectina 3 com as doenças hepáticas

No fígado normal, a Gal3 é expressa nas células de Kupffer e nas células epiteliais dos ductos biliares, enquanto que os hepatócitos costumam não sintetizar essa galectina. Já no fígado cirrótico, a Gal3 também é expressa nos hepatócitos periportais ou na periferia dos nódulos de regeneração (HSU et al., 1999).

Estudos experimentais sugerem que a Gal3 estimule a proliferação das células estreladas hepáticas e a ativação de miofibroblastos, concorrendo para a evolução da fibrose hepática (HENDERSON et al., 2006). Nos indivíduos normais, a Gal3 é produzida pelo cólon, ductos biliares e tecido adiposo visceral, sendo clareada pelo fígado, já que sua concentração na veia porta costuma ser maior que nas veias hepáticas (EISA et al., 2015).

Wanninger e colaboradores estudando pacientes com cirrose alcoólica durante o implante de shunt portossistêmico transjugular intra-hepático (TIPS) observaram concentrações mais elevadas de Gal3 nas veias hepáticas que na veia porta, situação oposta à observada em pacientes não cirróticos (WANNINGER et al., 2011). Quando comparados a controles saudáveis, os cirróticos apresentam níveis

séricos mais elevados de Gal3, sendo esses significativamente mais altos naqueles com fibrose avançada, ascite e disfunção hepática (Child B e C). Esses achados sugerem que na cirrose ocorre tanto redução do *clearance* quanto aumento da síntese hepática de Gal3 (WANNINGER et al., 2011)(EISA et al., 2015)(GUDOWSKA et al., 2015)(ULU et al., 2015).

Alguns estudos têm avaliado a participação da Gal3 na fisiopatologia da esteatohepatite não-alcoólica (EHNA). Estudo com camundongos *knockout* para Gal3 e expostos a dieta obesogênica sugeriu que esta galectina atenua a esteatose, mas promove a injúria hepática, inflamação e fibrose, pela via da interleucina 33 (JEFTIC et al., 2015).

Recentemente foram apresentados os resultados de um estudo de intervenção fase 2 com o GR-MD-02, que é uma droga que se liga à Gal3, inibindo sua atuação. Pacientes portadores de cirrose por esteatohepatite não alcoólica (EHNA) na fase compensada foram randomizados para receber infusões quinzenais da droga ou placebo por 52 semanas. No grupo que utilizou a droga, foi observada regressão da balonização dos hepatócitos ao final do tratamento, assim como redução da pressão portal e menor surgimento de varizes esofágicas nos pacientes com hipertensão portal leve, inaugurando uma linha de pesquisa sobre terapia anti-Gal3 nas doenças hepáticas (CHALASANI et al., 2018).

2.5.4 Relação da galectina 3 com o CHC

Estudos *in vitro*, com culturas de células de CHC têm trazido contribuições para a compreensão do mecanismo de ação da Gal3 na oncogênese do CHC. Hu e colaboradores estudaram o processo de apoptose induzido pelo fator de crescimento epidérmico, encontrando que ele é dependente da Gal3. A exposição da célula ao referido fator levou a redução do crescimento celular e indução de apoptose, enquanto promoveu redução da expressão da Gal3 no citoplasma, preservando a expressão nuclear. Este achado corroborou a ideia que a Gal3 citoplasmática protege a célula da apoptose, enquanto que a Gal3 nuclear participa da indução da apoptose (HU et al., 2012).

Um estudo chinês bloqueou a síntese de Gal3 em células de linhagem de CHC, observando *in vitro* menor taxa de crescimento celular, redução da capacidade de formar colônias e das capacidades de migração e invasão (ZHENG et al., 2014). Estes achados foram confirmados por outro estudo, em que os autores

adicionalmente encontraram redução da apoptose após indução da expressão de Gal3 pela célula, concluindo que a Gal3 tem ação anti-apoptótica, via inibição de vias pró-apoptóticas, como a da caspase 3/9 (JIANG et al., 2014).

Outros experimentos com culturas de células de CHC demonstraram a interação da Gal3 com outras moléculas, como a anexina 7 e a semaforina 3A, promovendo proliferação, invasão e metastatização tumoral (SONG et al., 2014b)(LI et al., 2017).

Estudos em modelos animais expostos a carcinógenos demonstraram as propriedades pró-oncogênicas da Gal3 no CHC. Um estudo experimental em camundongos expostos a dietilnitrosamina (DEN) evidenciou aumento progressivo da concentração hepática da proteína e do RNAm da Gal3 durante o processo de oncogênese, tanto no núcleo quanto no citoplasma das células (MOHAFAZ, O.M.M.; EL-AZIZ, M.A.; EL-GHANY, 2011). Utilizando um modelo murino Gal3 *knockout* exposto a DEN, Serizawa e colaboradores observaram desenvolvimento de menor carga tumoral, menor frequência de invasão vascular e fenótipo menos agressivo, com base em marcadores de invasão e proliferação celular (SERIZAWA et al., 2015).

A literatura ainda é escassa de estudos em seres humanos sobre a interação entre a Gal3 e o CHC. Autores orientais descreveram expressão tecidual da Gal3 em 65 a 81,8% dos casos de CHC submetidos a ressecção cirúrgica, sendo a marcação de intensidade muito variável e principalmente citoplasmática (HSU et al., 1999) (MATSUDA et al., 2008) (JIANG et al., 2014).

Ainda é controverso se o nível sérico de Gal3 pode ser útil como marcador diagnóstico de CHC. Os níveis de Gal3 são mais elevados em pacientes com CHC que em pessoas saudáveis, mas os resultados são discordantes quando comparados com os de pacientes cirróticos sem CHC. Matsuda e colaboradores encontraram níveis séricos de Gal3 mais elevados em pacientes com CHC, sendo associados à presença de invasão vascular (MATSUDA et al., 2008). No entanto, outros autores não encontraram diferença entre os níveis de Gal3 em cirróticos com e sem CHC (EISA et al., 2015) (ULU et al., 2015). O grupo egípcio encontrou associação entre o nível sérico de Gal3 e a presença de invasão tumoral da porta e metástases a distância, demonstrando também redução do nível após cirurgia de ressecção (EISA et al., 2015).

Um estudo japonês analisou a expressão tecidual de Gal3 em fígados com

CHC submetidos a ressecção cirúrgica, encontrando associação da positividade da marcação com pior grau de diferenciação celular e presença de invasão vascular e metástases intra-hepáticas. Observaram ainda que os pacientes com tumores Gal3 positivos apresentavam recorrência tumoral mais precocemente, com sobrevida livre de recorrência ao final do primeiro ano significativamente menor (44,1% versus 77,8%). A expressão nuclear foi especialmente deletéria, tendo sido apontada, na análise multivariada, como fator independente na predição de mortalidade (MATSUDA et al., 2008).

Jiang e colaboradores, estudando 165 chineses submetidos a ressecção de CHC, não detectaram associação da expressão tumoral da Gal3 com características histológicas do tumor, como tamanho e grau de diferenciação, mas demonstraram redução da sobrevida global. Também estimaram a densidade de vasos intratumorais através da imuno-histoquímica para CD34, que marca as células endoteliais, encontrando associação desta com a expressão de Gal3, o que corroborou *in vivo* a indução de angiogênese pela Gal3 (JIANG et al., 2014).

Resultados promissores vieram de um estudo chinês com culturas de células tratadas com Gal3c recombinante, um produto da clivagem da Gal3 que se liga aos glicoconjugados da membrana celular, impedindo a ligação da Gal3 com a integrina e assim inibindo sua ação. Nesse estudo foi observado que as células tratadas apresentaram redução da viabilidade e também menor capacidade de invasão e migração, com resposta proporcional à concentração e tempo de estimulação pelo rGal3c (WANG et al., 2017).

O quadro 3 apresenta um resumo dos estudos disponíveis que associam a Gal3 com o CHC. Os resultados citados apontam para a possibilidade de usar a Gal3 como marcador de prognóstico e possível alvo terapêutico no CHC. No entanto, os estudos em humanos ainda são escassos, principalmente no mundo Ocidental, onde a etiologia e comportamento do CHC parece ser diferente. Também ainda não há estudos sobre a associação da Gal3 com o prognóstico após transplante por CHC.

Quadro 3 – Resumo dos estudos disponíveis sobre a associação entre a galectina 3 e o carcinoma hepatocelular.

Estudo	Resumo dos resultados
Estudos experimentais com culturas de células de CHC	
Hu et al, 2012	Apoptose induzida pelo fator de crescimento epidérmico é dependente da Gal3
Zheng et al, 2014	Gal3 associada a processos de proliferação celular, migração e invasão
Jiang et al, 2014	No experimento <i>in vitro</i> : Gal3 associada a aumento da taxa de proliferação, apoptose, migração e invasão tumoral.
Song et al, 2014	Gal3 e anexina A7 mais expressas na linhagem de células de CHC com maior potencial metastático. Quando seus genes eram bloqueados, as capacidades de proliferação, migração e invasão eram significativamente reduzidas.
Li et al, 2017	Semaforina 3A promove a proliferação e invasão do CHC através da facilitação de várias proteínas, dentre elas, a Gal3.
Wang et al, 2017	Gal3c recombinante liga-se a células de linhagem de CHC no mesmo sítio de ligação da Gal3, levando a redução da viabilidade das células tumorais e da capacidade de invasão e migração.
Estudos experimentais em modelos animais	
Mohafez et al, 2011	Camundongos expostos a carcinógeno expressaram mais Gal3, tanto no núcleo quanto no citoplasma das células, que os controles.
Serigawa et al, 2015	Camundongos <i>knockdown</i> para Gal3 desenvolveram menor carga tumoral, menos invasão vascular e fenótipo menos agressivo quando expostos a carcinógeno.
Estudos em seres humanos	
Hsu et al, 1999	Estudo com amostras de fígado submetidos a ressecção mostrou que no fígado normal a Gal3 é expressa nas células de Kupffer e no epitélio ductal, enquanto os hepatócitos não eram marcados. Nos fígados cirróticos, a Gal3 era expressa nos hepatócitos da periferia dos nódulos regenerativos. A marcação do CHC foi variável, com 76% dos tumores positivos.
Matsuda et al, 2008	Estudo com amostras de ressecção de CHC, onde 65% dos tumores foram positivos para Gal3. Associação entre a expressão de Gal3 e o grau de diferenciação e invasão vascular, menor sobrevida global e recorrência tumoral mais precoce.
Jiang et al, 2014	81,8% dos tumores apresentavam marcação forte pela Gal3, sem associação com características histológicas clássicas, mas associado a maior densidade vascular no tumor e menor sobrevida.
Eisa et al, 2015	Nível sérico de Gal3 nos pacientes com CHC foram maiores que os dos controles, mas semelhantes aos dos cirróticos. Entre os pacientes com CHC, o nível de Gal3 era mais elevado nos com doença metastática e invasão portal.
Ulu et al, 2015	Nível sérico de Gal3 dos pacientes com CHC foi maior que os de pacientes com hepatite, mas semelhante aos dos portadores de cirrose.

Fonte: Autora
CHC, carcinoma hepatocelular; Gal3, galectina 3

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar a associação entre a expressão tecidual de galectina 3 em fígados de pacientes com carcinoma hepatocelular (CHC) submetidos a transplante hepático e a etiologia da doença hepática, o grau de diferenciação celular, a presença de invasão vascular, o estadiamento anátomo-patológico, a recorrência tumoral, a apresentação clínica após a recorrência e a sobrevida .

3.2 Objetivos específicos

1. Determinar a frequência de expressão tecidual de galectina 3 em fígados explantados por CHC, comparando-a entre pacientes transplantados por CHC secundário a hepatites virais e transplantados por CHC de outras etiologias.
2. Analisar a associação entre a expressão tecidual de galectina 3 e achados anátomo-patológicos do explante, como diâmetro e número dos nódulos, invasão vascular, grau de diferenciação celular e estadiamento tumoral.
3. Determinar a incidência de recorrência tumoral após transplante hepático por CHC, geral e estratificada por etiologia da doença de base e por expressão tecidual de galectina 3.
4. Analisar o impacto da expressão tecidual de galectina 3 no explante sobre a recorrência do CHC no pós-transplante.
5. Determinar a sobrevida livre de recorrência tumoral em um e três anos na população geral de transplantados por CHC e analisar sua associação com a expressão de galectina 3 no explante.
6. Descrever a apresentação clínica e os fatores associados à sobrevida dos pacientes que desenvolveram recorrência do CHC após transplante hepático.
7. Analisar a influência da expressão tecidual da galectina 3 sobre apresentação clínica da recorrência do CHC após transplante hepático.

4 CASUÍSTICA E MÉTODOS

4.1 Desenho do estudo, local e período

Coorte ambispectivo, iniciado em novembro de 2014, incluindo os pacientes com CHC submetidos a transplante na Unidade de Transplante de Fígado (UTF) dos Hospitais Oswaldo Cruz e Jayme da Fonte (HUOC/HJF), Recife, Pernambuco, entre 1999 e 31/12/2016, para avaliar a recorrência tumoral e a sobrevida.

Os materiais dos explantes foram submetidos a análise histopatológica para pesquisa dos fatores de mau prognóstico e também a imuno-histoquímica (IHQ) para Gal3.

No componente retrospectivo, foram colhidos dados sobre possível recorrência tumoral e sobrevida, através de avaliação clínica dos sobreviventes, análise de prontuários, contato com paciente, médico assistente ou familiar ou por consulta a dados do atestado de óbito (nesta ordem de prioridade).

No componente prospectivo do estudo, os pacientes foram seguidos pessoalmente pelo pesquisador a partir de novembro de 2014, por um período mínimo de um ano, com término da coorte em 31/12/2017.

Nos atendimentos clínicos, foram colhidas informações demográficas, sobre a hepatite C, sobre a evolução clínica e foi realizada a monitorização da recorrência tumoral, conforme estipulado em protocolo pré-definido.

4.2 População

Pacientes com CHC submetidos a transplante hepático pela equipe da Unidade de Transplante de Fígado (UTF) dos Hospitais Oswaldo Cruz e Jayme da Fonte (HUOC/HJF), Recife, Pernambuco, entre 1999 e 31/12/2016.

4.2.1 Critérios de inclusão:

Foram incluídos os pacientes submetidos a transplante pela equipe da Unidade de Transplante de Fígado do HUOC/HJF entre 1999 e 31/12/2016, com diagnóstico anátomo-patológico da variante clássica do CHC.

4.2.2 Critérios de exclusão:

Foram excluídos os casos em que não havia disponibilidade de material

parafinado do explante para realização da análise IHQ e os que apresentavam necrose extensa da lesão neoplásica que compromettesse a avaliação da marcação IHQ.

Os pacientes sobre os quais não se obteve informações a respeito do desenvolvimento de recorrência tumoral após análise dos prontuários, tentativas de contato com familiares ou médico assistente e consulta a atestados de óbito foram excluídos da análise de sobrevida.

4.3 Definição e categorização das variáveis

4.3.1 Variáveis dependentes (desfechos)

a) Recorrência tumoral após transplante hepático – foi definida através de pelo menos um dos seguintes critérios (em ordem de prioridade):

- Confirmação histológica de recorrência de CHC em qualquer órgão.
- Surgimento de lesão em estudo de imagem, sugestiva de recorrência hepática de CHC.
- Surgimento de nova lesão em ressonância (ou tomografia) de abdome, tomografia de tórax ou cintilografia óssea, sugestiva de metástase extra-hepática de CHC.
- Elevação progressiva da AFP associada a quadro clínico sugestivo de recorrência tumoral (síndrome consumptiva).
- Informação de prontuário ou obtida de médico assistente quanto à RT, para pacientes já falecidos.
- Existência do diagnóstico de recorrência do CHC em atestado de óbito.

A data da recorrência foi definida como a data do exame de imagem que identificou pela primeira vez a lesão diagnosticada como RT.

A RT foi categorizada quanto a:

- Localização: hepática, extra-hepática e a combinação das duas.
- Cronologia: precoce (nos primeiros 12 meses após transplante) ou tardia (após o primeiro ano).

b) Óbito – a informação sobre a data e causa do óbito foi obtida através da consulta ao prontuário ou ao Sistema de Informação de Mortalidade (SIM).

Com base nessas datas, foram estimadas:

- Sobrevida livre de recorrência (SLR): intervalo em meses entre a data do transplante hepático e a data da RT ou a data final de acompanhamento.
- Sobrevida após recorrência: intervalo em meses entre a data da RT e a data final de acompanhamento.
- Sobrevida após transplante: intervalo em meses entre a data do transplante e a data final de acompanhamento, utilizada apenas nos pacientes que desenvolveram RT.

A data final de acompanhamento foi definida como uma das seguintes possibilidades: data do desenvolvimento do desfecho, data do óbito, data da última consulta (nos casos em que houve perda de seguimento), data do último exame de imagem (caso esta fosse mais de seis meses antes da última consulta) ou 31/12/2017, para os pacientes que permaneceram em acompanhamento regular.

Foram consideradas razões para censura: óbito por outras causas, ausência de sinais de RT até o final do acompanhamento do paciente e perda de seguimento.

4.3.2 Variáveis independentes

- a) Doença de base - etiologia da doença associada ao CHC, com base em informações clínicas e/ou histopatologia do explante. Categorizada em hepatite C, hepatite B ou causas não virais.
- b) Número de nódulos - número de nódulos viáveis de CHC encontrados no fígado explantado. Categorizado em: menor ou igual a três e maior que três.
- c) Tamanho do maior nódulo - maior diâmetro (em cm) do maior nódulo viável, pela análise do explante. Categorizado como maior ou menor que 5,0cm.
- d) Invasão vascular - presença de êmbolos neoplásicos no fígado explantado. Categorizada como ausente, microvascular ou macrovascular. Foi considerada como macrovascular, a invasão de vaso com parede muscular.
- e) Grau de diferenciação tumoral – classificados de acordo com os critérios da Organização Mundial de Saúde (THEISE et al., 2010). Categorizado em: bem / moderadamente diferenciado ou mal diferenciado.
- f) Estadiamento tumoral – baseado na análise do explante, de acordo com os critérios de Milão (MAZZAFERRO et al., 1996). Categorizado como dentro de critérios (lesão única menor que 5,0 cm ou até três nódulos com até 3,0 cm cada, na ausência de invasão macrovascular) ou fora de critérios.

g) Expressão tecidual de galectina 3 – expressão de Gal3 por IHQ nas células tumorais. Definida como positiva quando mais de 5% das células eram marcadas.

4.3.3 Covariáveis (variáveis de confundimento)

O quadro 4 apresenta as covariáveis, com suas definições e categorizações

Quadro 4 – Definição e categorização das covariáveis analisadas

Nome da variável	Definição	Categorização
Sexo	Sexo biológico	Masculino / feminino
Idade	Anos completos na data do transplante	Categorizada em maior ou menor que 60 anos
MELD	Escore MELD calculado na data do transplante	Categorizado em maior ou menor que 12
Alfa fetoproteína	Último valor de alfa fetoproteína antes da realização do transplante	Categorizada em maior ou menor que 10 ng/ml
Tratamento ponte	Foi realizado algum tipo de tratamento antitumoral no período entre o diagnóstico e o transplante?	Varável dicotômica: sim ou não
“Downstaging”	Entre os pacientes com tumores inicialmente avançados, foi obtida redução da massa tumoral com algum tratamento ponte, chegando a atingir os critérios de Milão?	Varável dicotômica: sim ou não
Linfócitos pré-transplante	Contagem de linfócitos no hemograma colhido no pré-transplante imediato	Categorizada em maior ou menor que 1000 células/mm ³
Tempo de lista de espera	Valor em dias entre a inclusão na lista de espera de transplante hepático (conforme informado pelo Sistema Nacional de Transplantes - SNT) e a realização do mesmo. Nos pacientes que já estavam listados antes da detecção do nódulo, foi considerado o intervalo entre a data de concessão de situação especial pela	Categorizado como maior ou menor que 90 dias

		Câmara Técnica e a data do transplante. Foram excluídos do cálculo os pacientes com tumores incidentais.	
Tempo de isquemia fria	de	Tempo transcorrido (em minutos) entre o clampeamento da aorta do doador na cirurgia de captação e a retirada do enxerto do gelo, antes da implantação no receptor.	Categorizado em maior ou menor que 600 minutos
Tempo de isquemia quente	de	Tempo transcorrido (em minutos) entre a retirada do enxerto do gelo e a reperfusão portal na cirurgia do receptor	Categorizado como maior ou menor que 50 minutos
Idade do doador		Valor, em anos, da idade do doador, conforme informado pelo SNT	Categorizada como maior ou menor que 60 anos
Hemotransfusão		Foi realizada transfusão de hemoderivados durante o transplante?	Varável dicotômica: sim ou não
Reconstrução venosa		Técnica utilizada para a anastomose do enxerto com a veia cava inferior	Convencional / <i>Piggyback</i>
Uso de inibidores da mTOR		Houve uso de sirolimus ou everolimus no esquema de imunossupressão após o transplante?	Varável dicotômica: sim ou não
Nível de tacrolimus (ng/ml)		Maior valor do nível sérico do tacrolimus no primeiro mês após o transplante	Categorizado como maior ou menor que 10 ng/ml
Linfócitos primeiro mês		Contagem de linfócitos ao final do primeiro mês pós-transplante	Categorizada como maior ou menor que 500/mm ³
Tratamento da recorrência tumoral	da	Modalidade de tratamento da recorrência tumoral	Categorizada em terapia locorregional (TLR), sistêmica ou a combinação delas

4.4 Operacionalização da pesquisa e técnicas

4.4.1 Métodos e procedimentos para coleta dos dados

Foi preenchido um formulário para cada caso, incluindo dados clínicos, histopatológicos e imunohistoquímicos (APÊNDICE A). A forma de coleta dos dados para preenchimento do formulário protocolar diferiu de acordo com o componente retrospectivo ou prospectivo do caso.

- Caso retrospectivo – a coleta foi feita através das seguintes modalidades, em prioridade decrescente:
 - Atendimento clínico do paciente, com sua inclusão no protocolo de seguimento descrito abaixo.
 - Análise de dados de prontuário.
 - Contato telefônico ou via correio eletrônico com paciente, médico assistente ou familiar.
 - Análise de atestados de óbito, através de consulta ao SIM.
- Atendimento clínico através de um protocolo padronizado de acompanhamento, utilizado tanto para os casos transplantados após novembro de 2014, quanto para os previamente transplantados que foram incluídos no protocolo de acompanhamento.
 - Avaliação clínica pré-transplante
 - Acompanhamento após transplante para monitorização de recidiva tumoral, por um período mínimo de um ano, de acordo com o seguinte protocolo:
 - Dosagem sérica de AFP, tomografia computadorizada (TC) de tórax e exame de imagem de abdome superior (ressonância com gadolínio ou TC com contraste, de acordo com as peculiaridades de cada caso): a cada seis meses até o fim do segundo ano e depois anualmente até o fim do quarto ano.
 - Cintilografia óssea – quando havia indícios de recorrência tumoral ou queixas sugestivas.
 - Antecipação dos exames programados ou solicitação de outros, caso tenham surgido dados clínicos ou laboratoriais suspeitos de recorrência tumoral.

4.4.2. Análise anátomo-patológica do explante

O fígado explantado foi fixado em formol a 10%, e após pesagem, medição e aquisição de imagens fotográficas, foi submetido a cortes transversais com 1,0 a 1,5 cm de espessura, para pesquisa de nódulos tumorais, ocasião em que estes eram contados e medidos. Cortes histológicos foram preparados do parênquima hepático e de cada nódulo, interessando principalmente a periferia da lesão. Após processamento histológico de rotina, as lâminas foram submetidas a coloração pela técnicas de hematoxilina-eosina, tricrômio de Masson e Pearls. A análise microscópica, feita pelo mesmo patologista, determinou a natureza neoplásica do nódulo, a presença de invasão vascular e o grau de diferenciação celular segundo a classificação da Organização Mundial de Saúde de 2010 (THEISE *et al.*, 2010). Apenas os nódulos com células tumorais viáveis foram considerados para análise estatística, dessa forma, os nódulos com necrose total não foram contabilizados.

4.4.3. Análise da expressão tecidual da galectina 3

Foram realizados cortes histológicos com 6 µm de espessura das amostras preservadas em blocos de parafina, que, depois de aparados em lâminas silanizadas, foram desparafinizados com xilol e reidratados em banhos de álcool a 100, 95 e 70%, sucessivamente. Foi utilizado o kit de revelação Spring reveal® (Spring Bioscience Corporation, Pleasanton, EUA). Após aquecimento da lâmina com tampão citrato pH 6,0, por 30 minutos, foi realizada inibição da peroxidase endógena com peróxido de hidrogênio e posteriormente incubação do material com anticorpo monoclonal IgG mouse anti-galectina 3, clone H-5 SC 374253 (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, EUA), na concentração de 1:300, por 16 horas a 4°C. Em seguida, as lâminas foram lavadas em PBS e incubadas sucessivamente com o anticorpo secundário por 12 minutos e o terciário por 16 minutos. Após nova lavagem com PBS, adicionava-se a diaminobenzidina (DAB) e seu substrato para revelação da reação, e finalmente realizava-se contra-coloração com hematoxilina e montagem final da lâmina com lamínula.

A análise das lâminas de imuno-histoquímica foi realizada por patologista único que desconhecia os detalhes clínicos do caso. A expressão tecidual da galectina 3 foi categorizada como negativa (quando menos de 5% das células eram marcadas) ou positiva. Quando positiva, era classificada de acordo com a intensidade de marcação e com o percentual de células tumorais marcadas. Nos

casos positivos, foi analisado o padrão de marcação na célula: citoplasmático e/ou nuclear. Também foi analisado se houve marcação pela galectina 3 nos ductos e do parênquima hepático não tumoral.

4.5 Análise estatística

Inicialmente os dados foram agrupados sob a forma de medidas de tendência central e proporções. Para comparação de proporções o qui-quadrado de Pearson e, quando necessário, o teste exato de Fisher.

Para verificação da associação entre a expressão de Gal3 e as características clínicas e histológicas, foram calculadas as razões de chance (*Odds Ratio*) brutas e ajustadas após regressão logística múltipla, sendo reportadas com intervalos de confiança de 95%.

Foi calculada a taxa de incidência de recorrência tumoral após transplante e a sobrevida livre de recorrência em um e três na coorte global e em subgrupos definidos com e sem as exposições de risco.

As probabilidades de sobrevida foram estimadas pelo método de Kaplan-Meier e comparadas usando o teste de log-rank. As razões de risco (*hazard ratios*) uni e multivariadas para fatores associados à RT e ao óbito por esta causa foram determinadas pelos modelos de regressão proporcional de Cox e reportados com intervalos de confiança de 95%.

A probabilidade máxima de erro para rejeição da hipótese nula foi considerada como de 5% ($p < 0,05$). Os dados foram armazenados em planilhas Microsoft Excel® 2010 e a análise estatística foi realizada com o pacote *Survival* do programa R para Windows, versão 3.2.2 – 2015 – *R Foundation for Statistical Computing*.

5 QUESTÕES ÉTICAS

Este estudo obedeceu às normas da Declaração de Helsinki. A coleta de dados só foi iniciada após a aprovação do projeto pelos Comitês de Ética e Pesquisa em Seres Humanos do Centro de Ciências da Saúde da UFPE (CAAE 34576814.0.0000.5208 - ANEXO A) e do Complexo Hospitalar HUOC/PROCAPE (CAAE 34576814.0.3002.5192 – ANEXO B) e o cronograma foi devidamente cumprido. Os pacientes foram informados das etapas do estudo e, após todos os esclarecimentos necessários, e para sua inclusão, assinaram termo de consentimento livre e esclarecido (APÊNDICE B).

No caso de pacientes que já haviam falecido ou com os quais não se conseguiu contato, a análise dos prontuários foi realizada mediante autorização do Coordenador da Unidade de Transplante de Fígado (ANEXO C).

Os pacientes não foram expostos a risco adicional, já que os exames de imagem para rastreio da RT já são indicados em todo paciente submetido a TH para tratamento do CHC e o material para IHQ foi o fígado explantado, descartando a necessidade de biopsia percutânea. Para reduzir o desconforto potencialmente causado ao paciente pela participação na pesquisa, foi assegurado que a recusa em participar do estudo não implicaria prejuízo ao seu acompanhamento e tratamento na Unidade de Transplante de Fígado.

Os pesquisadores assinaram termo de confidencialidade (anexado à Plataforma Brasil), se comprometendo a manter sigilo sobre as informações pessoais dos pacientes e a manusear com cuidado prontuários e o material parafinado do explante, para evitar extravio e perda de dados.

Não houve benefícios diretos para os pacientes, entretanto como benefícios indiretos os resultados desta pesquisa poderão ser empregados para identificar um subgrupo com maior risco de RT, a quem poderá ser oferecido um acompanhamento diferenciado para monitorização da recorrência.

Os dados coletados nesta pesquisa (formulários) ficarão armazenados em pastas de arquivo e computador pessoal, sob a responsabilidade da pesquisadora, no endereço: Departamento de Medicina Clínica do CCS/UFPE, Av. Prof. Moraes Rego, s/n cidade Universitária - Recife/PE - 50.670.901, pelo período de cinco anos.

6 RESULTADOS

6.1 ARTIGO 1 - Expressão tecidual de Galectina 3 como fator de risco para recorrência do carcinoma hepatocelular após transplante hepático

INTRODUÇÃO

O câncer de fígado é a sexta neoplasia mais frequente no mundo e a quarta causa de óbito por câncer (1). Estima-se que em 2015 tenham ocorrido 810.000 óbitos por essa condição (2). Nas últimas décadas, a incidência vem em queda em regiões como China e África subsaariana, mas em ascensão em áreas como América do Norte e Europa. Esta tendência é decorrente das campanhas de vacinação contra a Hepatite B nos países orientais e do aumento do número de casos secundários a hepatite C e doença gordurosa não alcoólica nos países ocidentais (1).

O carcinoma hepatocelular (CHC) é responsável por cerca de 80% dos casos de câncer de fígado (3). A maioria dos casos de CHC se desenvolve em fígados cirróticos, criando uma situação ímbar, em que os métodos de estadiamento e programação terapêutica devem levar em consideração tanto as características do tumor quanto a função hepática. O transplante hepático (TH) é considerado a melhor opção terapêutica para o CHC no fígado cirrótico, pois trata ao mesmo tempo a neoplasia e a doença hepática subjacente (4).

Nos últimos anos, o CHC foi responsável por 12 a 18,5% das indicações de transplante em centros europeus e norte-americanos (5) (6). Apesar do uso de critérios restritivos, baseados em dados morfológicos, para a seleção de candidatos ao TH, recorrência tumoral (RT) ainda ocorre em 10 a 20% dos casos (7). A identificação de fatores de risco para RT que traduzam o comportamento biológico do tumor torna-se importante para a programação de medidas profiláticas e terapêuticas.

As galectinas são glicoproteínas amplamente expressas nas células dos mamíferos e com propriedades pleiotrópicas diversas. A galectina 3 (Gal3) é uma das mais bem estudadas e tem sido associada a várias condições clínicas e a processos patológicos ligados ao desenvolvimento e proliferação do câncer (8).

Estudos in vitro mostraram associação da Gal3 com estímulo à proliferação celular e angiogênese, inibição da apoptose e aumento das capacidades de

migração e invasão de células de CHC (9) (10) (11) (12) (13). Dois estudos orientais após ressecção de CHC demonstraram associação entre expressão tecidual da Gal3 e redução da sobrevida global e livre de recorrência (11)(14). No entanto, ainda não há dados sobre a influência da expressão de Gal3 no prognóstico do CHC na população ocidental, nem sobre sua associação com a RT após TH.

O objetivo deste estudo de coorte é avaliar a expressão de Gal3 pelo CHC em fígados explantados e analisar a associação com características histológicas de mau prognóstico, risco de RT e sobrevida livre de recorrência (SLR), em pacientes submetidos a TH para tratamento do CHC em uma unidade de referência do Nordeste brasileiro.

PACIENTES E MÉTODOS

Desenho do estudo e população

Trata-se de estudo de coorte ambispectivo, iniciado em novembro de 2014, no qual foram incluídos os pacientes submetidos a transplante pela equipe da Unidade de Transplante de Fígado (UTF) dos Hospitais Oswaldo Cruz e Jayme da Fonte, Recife, Pernambuco, Brasil, entre 1999 e 2016. O acompanhamento mínimo após o transplante foi de 12 meses, com término da coorte em 31/12/2017.

Foram selecionados os pacientes nos quais foi identificada a variante clássica do CHC na análise anátomo-patológica do explante. Foram considerados critérios de exclusão: indisponibilidade de material parafinado do explante para análise imuno-histoquímica (IHQ) e presença de necrose extensa da lesão neoplásica que compromettesse a avaliação da expressão da Gal3 pelo tumor.

Coleta de dados

Para avaliar a ocorrência de RT e a sobrevida, os pacientes incluídos no componente prospectivo foram acompanhados segundo um protocolo específico, com dosagens de alfa fetoproteína (AFP), tomografia de tórax e exame de imagem de abdome (tomografia ou ressonância magnética, de acordo com as peculiaridades de cada caso) a cada seis meses nos dois primeiros anos e anualmente a partir de então. Cintilografia óssea foi realizada nos casos de RT ou na presença de queixas ou imagens suspeitas. Os pacientes transplantados antes de novembro de 2014 foram incluídos no protocolo de acompanhamento a partir daquela data, quando isso não foi possível, os dados foram coletados através da análise de prontuário,

informação do médico assistente ou consulta a atestado de óbito.

Questões éticas

O projeto obedeceu aos princípios da Declaração de Helsinki. A coleta de dados teve início após aprovação do projeto pelos Comitês de Ética em Pesquisa envolvendo Seres Humanos do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco (CAAE 34576814.0.0000.5208) e do Hospital Universitário Oswaldo Cruz (CAAE 34576814.0.3002.5192). Antes da inclusão no protocolo, os pacientes assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Quando o paciente havia falecido ou estava inacessível, as informações foram colhidas por análise de prontuários ou atestados de óbitos, sob autorização da chefia dos setores competentes.

Análise dos explantes

Os explantes foram submetidos a análise histopatológica convencional e a IHQ para Gal3. O fígado explantado foi submetido a cortes transversais com 1,0 a 1,5 cm de espessura, para detecção, contagem e medição dos nódulos tumorais. A análise microscópica, feita pelo mesmo patologista, determinou a natureza neoplásica do nódulo, a presença de necrose e invasão vascular e o grau de diferenciação celular de acordo com os critérios da Organização Mundial de Saúde. Apenas os nódulos com células tumorais viáveis foram considerados para análise, dessa forma, os nódulos com necrose total não foram contabilizados. O estadiamento tumoral foi baseado nos critérios de Milão (CM) (7).

Para **análise da expressão tecidual da galectina 3 por IHQ** foram realizados cortes histológicos com 6 µm de espessura dos blocos de parafina armazenados que, depois de aparados em lâminas silanizadas, foram desparafinizados com xilol e reidratados em álcool. A recuperação antigênica foi realizada com tampão citrato pH 6,0, aquecido por 30 minutos. Em seguida, foi realizada a inibição da peroxidase endógena e incubação com anticorpo monoclonal IgG mouse anti-galectina 3, clone H-5 SC 374253 (*Santa Cruz Biotechnology*, Dallas, EUA), na diluição de 1:300, por 16 horas a 4°C. Na etapa seguinte, as lâminas foram lavadas e incubadas sucessivamente com anticorpo secundário e terciário (kit *Spring reveal®* da *Spring Biosciences Corporation*, Pleasanton, EUA). A revelação foi feita com diaminobenzidina e a contra-coloração com hematoxilina.

Para reduzir o risco de viés de aferição, a análise da IHQ foi realizada por patologista único que desconhecia os aspectos clínicos do caso. Para evitar que o conhecimento do resultado da IHQ incluísse um viés no acompanhamento do paciente, esta análise só foi executada após o término do acompanhamento da coorte.

Definição e categorização de variáveis

Recorrência tumoral foi definida por um dos seguintes critérios (em ordem de prioridade): confirmação histológica de recorrência de CHC em qualquer órgão, surgimento de lesão em estudo de imagem sugestiva de recorrência hepática ou metástase extra-hepática de CHC, elevação progressiva da AFP associada a quadro clínico sugestivo de RT, informação de prontuário ou de atestado de óbito. A data do exame de imagem que identificou pela primeira vez a lesão posteriormente diagnosticada como RT foi considerada como a data da RT. A recorrência foi categorizada em precoce ou tardia se identificada durante ou após o primeiro ano pós-transplante.

Sobrevida livre de recorrência (SLR) foi definida como o intervalo em meses entre o TH e a data final de cada caso – data da RT, data do óbito por outra causa, data da última consulta ou 31/12/2017 para os pacientes que permaneceram em acompanhamento até o final da coorte.

A **expressão tecidual da Gal3** foi categorizada como negativa (quando menos de 5% das células eram marcadas) ou positiva. Quando positiva, foi classificada de acordo com a intensidade de marcação, com o percentual de células tumorais marcadas e com o local de marcação.

As informações coletadas incluíram sexo, idade na data do TH, valor do MELD, valor da última dosagem sérica de AFP antes do TH, contagem de linfócitos em hemograma colhido no pré-operatório imediato e realização de tratamento ponte antes do TH. A etiologia da hepatopatia foi categorizada como causas virais (hepatites B ou C) ou não virais.

O tempo de lista de espera foi definido como o intervalo em dias entre a inscrição do paciente no Sistema Nacional de Transplantes e a data da cirurgia. Nos pacientes que já estavam listados antes da detecção do nódulo, foi considerado o intervalo em dias entre a data de concessão de pontuação especial e o TH. Os pacientes com tumores incidentais foram excluídos da análise de tempo de lista.

As informações referentes à cirurgia foram tempos de isquemia fria e quente, idade do doador, realização de hemotransfusão no intra-operatório e técnica de anastomose venosa. No pós-transplante foram investigados uso de inibidores da mTOR no esquema de imunossupressão, maior valor do nível sérico do tacrolimus no primeiro mês após o transplante e contagem de linfócitos ao final do primeiro mês.

Análise estatística

Inicialmente os dados foram agrupados sob a forma de medidas de tendência central e proporções. As variáveis quantitativas foram categorizadas de acordo com o valor de referência do método laboratorial, valores medianos ou critérios pré-estabelecidos. Para comparação de proporções foi utilizado o teste do qui-quadrado de Pearson e, quando necessário, o teste exato de Fisher. Para verificação da associação das características clínicas e histológicas com a expressão tecidual de Gal3 foi calculada a razão de chances (*odds ratio*) bruta e ajustada após regressão logística múltipla, sendo reportadas com intervalos de confiança de 95%.

Foi calculada a taxa de incidência de RT e a SLR em um e três anos após transplante na coorte global e em subgrupos definidos com e sem as exposições de risco. Como a invasão vascular se comportou como variável interveniente na relação entre a expressão de Gal3 e a RT, foi criada uma variável composta associando os resultados das duas variáveis originais. As probabilidades de SLR foram estimadas pelo método de Kaplan-Meier e comparadas usando o teste de log-rank. As razões de risco (*hazard ratios*) uni e multivariadas para fatores associados à RT foram determinadas pelos modelos de regressão proporcional de Cox e reportadas com intervalos de confiança de 95%.

A probabilidade máxima de erro para rejeição da hipótese nula foi considerada como de 5% ($p < 0,05$). Os dados foram digitados em planilhas Microsoft Excel® 2010 e a análise estatística foi realizada com o pacote *Survival* do programa R para Windows, versão 3.2.2 – (2015 – *R Foundation for Statistical Computing*).

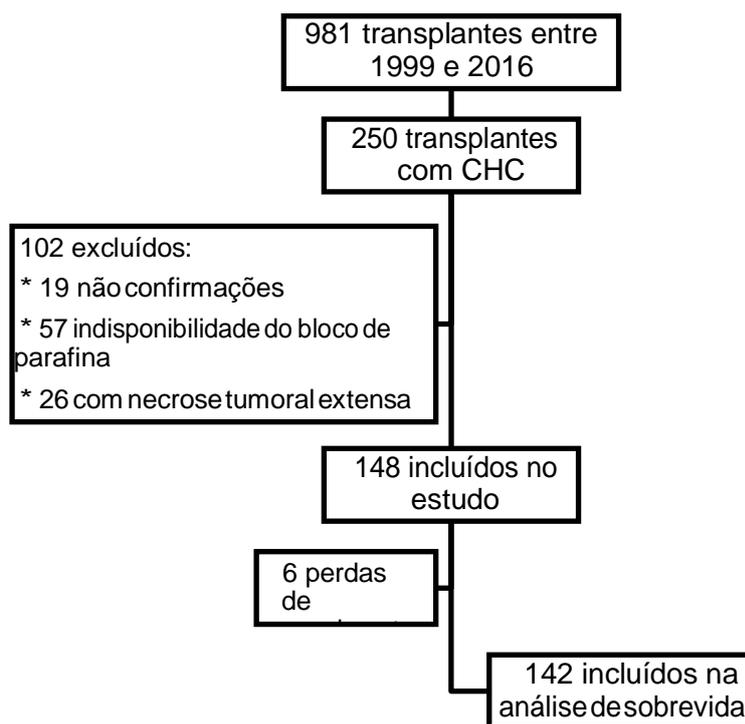
RESULTADOS

População de estudo

Entre 1999 e 2016, a equipe da UTF realizou 981 transplantes, sendo o CHC a indicação de 250 deles (25,48%). Em 19 destes casos (7,6%), o diagnóstico de

CHC não foi confirmado após análise do explante. O bloco de parafina não estava disponível em 57 casos e em 26 havia necrose extensa da lesão, o que impediu a realização da IHQ, restando 148 casos para inclusão no estudo. Não foi possível definir o desfecho em seis casos dos quais foi perdido o seguimento, sendo estes excluídos da análise de sobrevida (Figura S1).

Figura S1 – Fluxograma de seleção da população de estudo



CHC, carcinoma hepatocelular

As características clínicas dos pacientes transplantados por CHC são apresentadas na Tabela 1. A idade variou de 42 a 75 anos (mediana de 63 anos). A maioria da amostra foi representada por pacientes do sexo masculino (78,4%), portadores de hepatite C (52%), com mais de 60 anos (58,1%) e com AFP maior que 10 ng/ml (65,7%). O tempo de lista de espera variou de três a 975 dias, com mediana de 84 dias, sendo que 75 pacientes (52,4%) foram transplantados menos de 90 dias após a listagem. Informações sobre tratamento antitumoral antes do TH (tratamento ponte) estavam disponíveis em 131 pacientes, dos quais 102 (77,9%) realizaram algum tratamento, sendo que 98 (96,1%) foram submetidos a quimioembolização transarterial isoladamente ou em associação a outras modalidades. Dezoito pacientes (12,2%) foram inscritos para transplante após obter

redução de massa tumoral com o tratamento ponte (*downstaging*). Menos de 10% dos casos contaram com tempo de isquemia fria maior que 600 minutos, tempo de isquemia quente maior que 50 minutos ou doador com mais de 60 anos. Hemotransfusão foi realizada durante o ato operatório em 74 pacientes (56,1%). A técnica convencional para anastomose das veias hepáticas foi empregada em 69,5% dos casos.

De acordo com a análise do explante, 50 pacientes (33,8%) apresentavam tumores além dos critérios de Milão, sendo que em 29 casos (19,7%) havia mais que três nódulos e em 20 (13,6%), o diâmetro do maior nódulo era superior a 5 cm. Invasão vascular estava presente em 73 casos (53,7%), sendo que em 13 (9,6%) havia invasão de grandes vasos. Apenas sete casos (5%) apresentavam tumores mal diferenciados.

No pós-operatório, foi utilizado esquema de imunossupressão baseado em inibidor de calcineurina na maioria dos pacientes, enquanto 23 pacientes (20,7%) usaram inibidor da mTOR, isoladamente ou de forma combinada. Informação sobre o nível de tacrolimus no primeiro mês estava disponível em 119 pacientes, sendo maior que 10ng/ml em 65 (54,6%) deles. Linfopenia grave (menos que 500 células/mm³) foi raramente observada.

Tabela 1 – Características clínicas, laboratoriais e histológicas de 148 pacientes submetidos a transplante hepático para tratamento do CHC.

Características	Número (%)
Pré-operatórias	
Idade maior que 60 anos	86 (58,1%)
Sexo masculino	116 (78,4%)
Etiologia da doença hepática	
Hepatite C	77 (52,0%)
Hepatite B	15 (10,2%)
Causas não virais	56 (37,8%)
MELD maior que 12 (n=140)	56 (40,0%)
AFP acima de 10 ng/ml (n=134) *	88 (65,7%)
Tratamento ponte (n = 131)	102 (77,9%)
Casos de “ <i>downstaging</i> ”	18 (12,2%)
Contagem de linfócitos menor que 1000/mm ³ (n = 139) **	56 (40,3%)
Tempo de lista de espera maior que 90 dias (n = 143)	68 (47,6%)
Perioperatórias	
Isquemia fria maior que 600 minutos (n = 140)	13 (9,3%)
Isquemia quente maior que 50 minutos (n = 131)	13 (9,9%)
Idade do doador maior que 60 anos (n = 145)	14 (9,7%)
Hemotransfusão (n = 132)	74 (56,1%)
Técnica de anastomose das veias hepáticas (n = 141)	
Convencional	98 (69,5%)
<i>Piggyback</i>	43 (30,5%)
Histopatológicas	
Estadiamento fora dos critérios de Milão	50 (33,8%)
Casos com mais de três nódulos	29 (19,7%)
Diâmetro do maior nódulo acima de 5 cm	20 (13,6%)
Invasão vascular (n = 136)	
Ausente	63 (46,3%)
Microvascular	60 (44,1%)
Macrovascular	13 (9,6%)
Grau de diferenciação do tumor (n = 141)	
Bem/moderadamente diferenciado	134 (95,0%)
Mal diferenciado	7 (5,0%)
Necrose tumoral parcial	80 (54,8%)
Pós-operatórias	
Uso de inibidores da mTOR (n = 113)	23 (20,7%)
Nível de tacrolimus no primeiro mês acima de 10 ng/ml (n = 119) §	65 (54,6%)
Contagem de linfócitos menor que 500/mm ³ (n = 117) ¶	6 (5,1%)

CHC, carcinoma hepatocelular; MELD, *model for end stage liver disease*; AFP, alfa fetoproteína.

* Último valor da AFP antes do transplante.

** Contagem de linfócitos no hemograma colhido imediatamente antes do transplante

§ Maior valor do nível sérico de tacrolimus no primeiro mês após transplante

¶ Contagem de linfócitos ao final do primeiro mês pós-transplante

Expressão tecidual de galectina 3

A análise da IHQ para Gal3 mostrou marcação das células ductais em 83,9% das amostras e dos hepatócitos na periferia dos nódulos de regeneração em 60,4% dos casos.

A expressão de Gal3 nos nódulos tumorais foi heterogênea, variando de intensidade em distintas regiões do tumor. Trinta e seis dos 148 tumores analisados (24,3%) expressavam a Gal3 no citoplasma, sendo que em cinco desses (13,9%) também havia expressão nuclear. A Figura 1 apresenta alguns exemplos de microfotografias de CHC marcados para Gal3 por IHQ, enquanto a Tabela 2 relaciona as características de expressão da Gal3.

Dentre os 73 tumores que apresentavam invasão vascular, 24 (32,9%) expressavam Gal3, o que foi observado em oito (12,7%) dos 63 tumores sem invasão vascular.

Figura 1 – Microfotografias de lâminas de imunohistoquímica para galectina 3 em fígados explantados por carcinoma hepatocelular: A) Nódulo tumoral expressando Gal3 em mais de 50% das células (40x); B) Marcação heterogênea para Gal3 no tumor, com áreas de forte marcação e outras com marcação discreta (40x); C) Células ductais marcadas pela Gal3 (cabeças de seta, 100x); D) CHC com marcação intensa pela Gal3, mostrando também marcação nuclear (seta,100x).

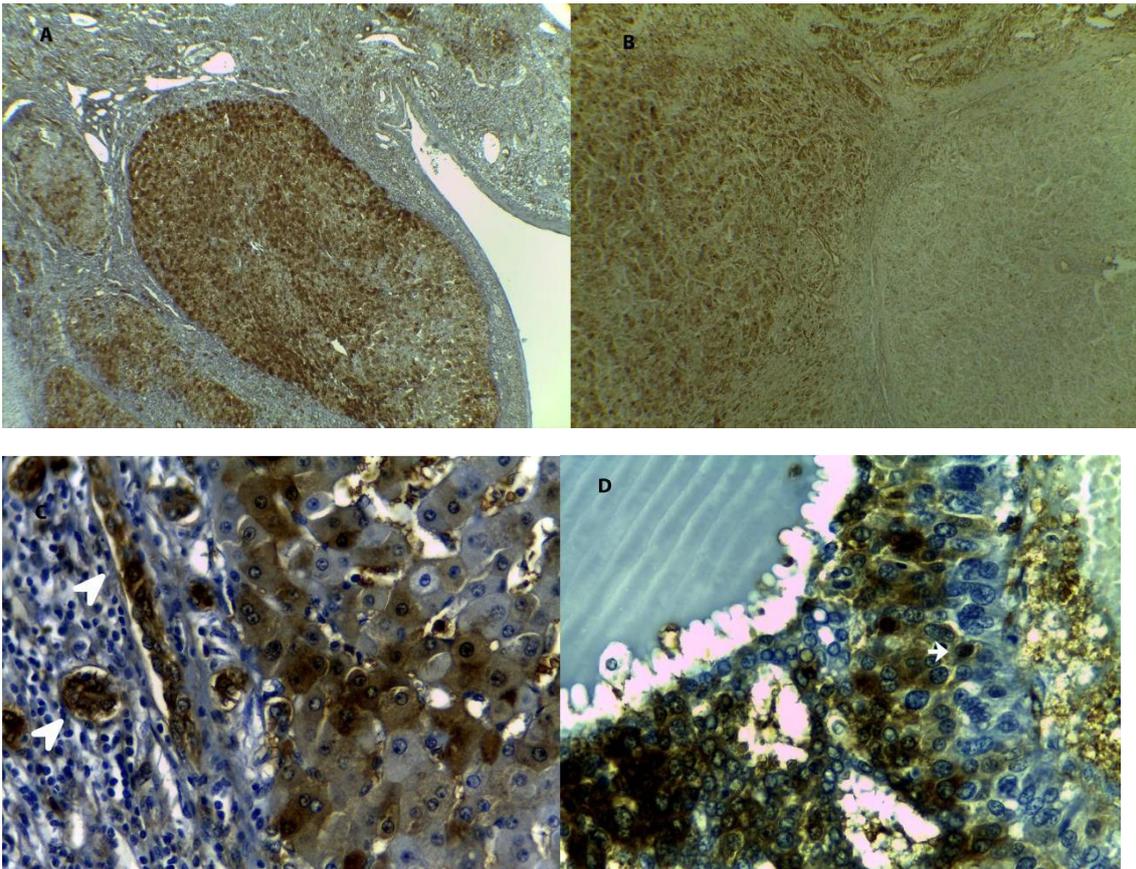


Tabela 2 – Características da expressão de galectina 3 por IHQ nos nódulos tumorais, em 148 pacientes submetidos a transplante hepático para tratamento de CHC

Características	Número (%)
Expressão de Gal3 pelo CHC	
Negativa	112 (75,7%)
Positiva	36 (24,3%)
Percentual de células tumorais marcadas por Gal3	
< 5%	112 (75,7%)
5 a 25%	19 (12,8%)
25 a 50%	10 (6,8%)
> 50%	7 (4,7%)
Intensidade de marcação nos nódulos tumorais	
Negativa	112 (75,7%)
Fraca	6 (4,0%)
Moderada	12 (8,1%)
Intensa	18 (12,2%)
Expressão Citoplasmática de Gal3	
Negativa	112 (75,7%)
Positiva	36 (24,3%)
Expressão Nuclear de Gal3	
Negativa	143 (96,6%)
Positiva	5 (3,4%)
Variável combinada (Gal3 invasão vascular) (n=136)*	
Invasão vascular ausente / Gal3 negativa	55 (40,4%)
Invasão vascular ausente / Gal3 positiva	8 (5,9%)
Invasão vascular presente / Gal3 negativa	49 (36,0%)
Invasão vascular presente / Gal3 positiva	24 (17,7%)

Gal3, galectina 3; IHQ, imuno-histoquímica; CHC, carcinoma hepatocelular

* Em seis casos não havia informação sobre a presença de invasão vascular

Associação entre a expressão tecidual da Gal3 e características clínico-histológicas do CHC

A tabela 3 apresenta os resultados da associação entre a expressão de Gal3 e as características clínico-histológicas do CHC. A expressão tumoral da Gal3 foi mais frequentemente observada nos pacientes portadores de Hepatite B que nas outras etiologias (OR 3,14; IC95% 1,05 – 9,38; p = 0,033). Por outro lado, não foi observada associação entre a expressão de Gal3 e a hepatite C.

A expressão de Gal3 foi associada à presença de invasão vascular (OR 3,37; IC95% 1,39 – 8,18; p = 0,006) e ao estadiamento tumoral além dos critérios de Milão

(OR 2,5; IC95% 1,16 – 5,4; $p = 0,018$). Houve uma tendência à associação entre a expressão da proteína e o grau de diferenciação celular (OR 4,43; IC95% 0,94 – 20,87; $p = 0,06$), mas não com o número e tamanho dos nódulos individualmente.

A análise multivariada por regressão logística confirmou a associação independente entre a expressão da Gal3 e Hepatite B (OR 3,42; IC95% 1,06 – 11,02; $p = 0,039$) e invasão vascular (OR 3,49; IC95% 1,24 – 9,79; $p = 0,018$).

Dentre os pacientes com tumores Gal3-positivos, 19,4% eram portadores de hepatite B, o que ocorria em 7,1% dos Gal3-negativos. Invasão vascular foi observada em 75% dos tumores Gal3-positivos e em 47,1% dos Gal3-negativos (Figura 02).

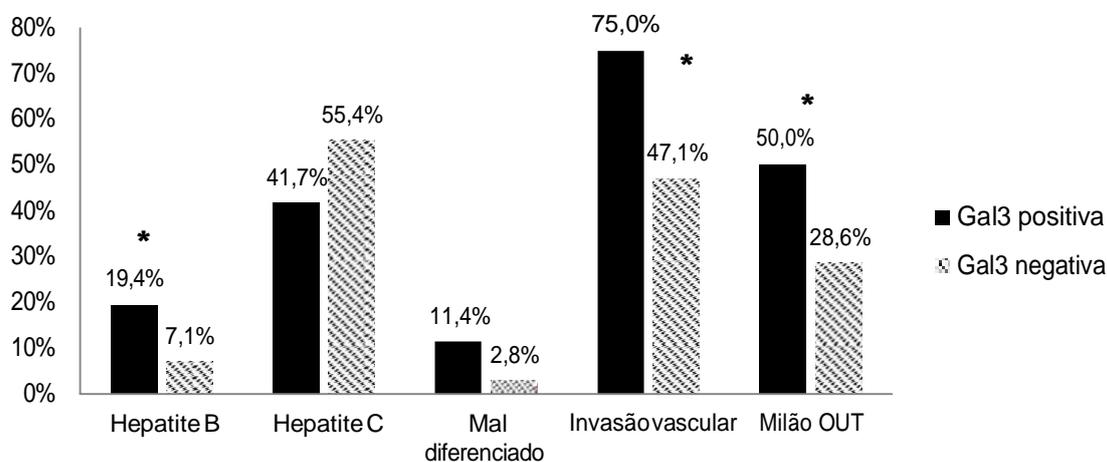
Tabela 3 – Associação entre características clínico-histológicas e a expressão tumoral da Gal3 em 148 pacientes submetidos a transplante hepático para tratamento do CHC

Característica	Galectina 3		OR bruto (IC 95%)	p	OR ajustado (IC 95%)	p*
	Positiva (n/%)	Negativa (n/%)				
Hepatite B						
Negativo	29 (80,6%)	104 (92,9%)	1	-		
Positivo	7 (19,4%)	8 (7,1%)	3,14(1,05-9,38)	0,033	3,42 (1,06-11,02)	0,039
Hepatite C						
Negativo	21 (58,3%)	50 (44,6%)	1	-		
Positivo	15 (41,7%)	62 (55,4%)	0,58(0,27-1,23)	0,156		
Diâmetro maior nódulo						
Menor ou igual a 5cm	30 (83,3%)	97 (86,6%)	1	-		
Maior que 5 cm	6 (16,7%)	14 (12,5%)	1,38(0,49-3,92)	0,54		
Missing	-	1 (0,9%)				
Número de nódulos						
Menor ou igual a 3	28 (77,8%)	90 (80,4%)	1	-		
Maior que 3	8 (22,2%)	21 (18,7%)	1,22(0,49-3,07)	0,66		
Missing	-	1 (0,9%)				
Grau de diferenciação						
Bem/moderado	31 (86,1%)	103 (91,9%)	1	-		
Mal diferenciado	4 (11,1%)	3 (2,7%)	4,43(0,94-20,87)	0,06	5,08 (0,97-26,7)	0,055
Missing	1 (2,8%)	6 (5,4%)				
Invasão vascular						
Ausente	8 (22,2%)	55 (49,1%)	1	-		
Presente	24 (66,7%)	49 (43,7%)	3,37 (1,39-8,18)	0,006	3,49 (1,24-9,79)	0,018
Missing	4 (11,1%)	8 (7,2%)				
Estadiamento por CM						
Dentro dos critérios	18 (50,0%)	80 (71,4%)	1	-		
Além dos critérios	18 (50,0%)	32 (28,5%)	2,5 (1,16-5,4)	0,018	1,2 (0,47-3,05)	0,7

Gal3, galectina 3; CHC, carcinoma hepatocelular; OR, *odds ratio*; CM, critérios de Milão

* Regressão logística múltipla incluindo as variáveis: hepatite B, grau de diferenciação, invasão vascular e estadiamento por critérios de Milão

Figura 2 - Associação entre a expressão tecidual da Gal3 e a etiologia da doença de base e os achados histológicos do explante, em 148 pacientes submetidos a TH para tratamento do CHC



Gal3, galectina 3; TH, transplante hepático; CHC, carcinoma hepatocelular
* $p < 0,05$

Recorrência tumoral

Ao término da coorte, o tempo médio de acompanhamento após o TH foi de 33 meses, variando de um dia a 10,2 anos. Durante este seguimento, foram observados 31 casos de RT, configurando taxa de incidência de RT de 7,92 casos/100 pessoas-ano (IC 95% 5,57 – 11,3). Quando os pacientes foram estratificados de acordo com a etiologia da hepatopatia de base, a incidência de RT foi 11,8/100 pessoas-ano (IC95% 4,9-28,3) nos pacientes com hepatite B; 10,0/100 pessoas-ano (IC 95% 6,5-15,3) nos pacientes com hepatite C e 3,6/100 pessoas-ano (IC 95% 1,5-8,6) nos com doenças não virais. Quando estratificados de acordo com a expressão tecidual de Gal3, a incidência de RT foi de 16,2/100 pessoas-ano (IC 95% 9,2 – 28,6) nos pacientes com tumores Gal3 positivos contra 5,98/100 pessoas-ano (IC 95% 3,82 – 9,38) nos com tumores Gal3 negativos (Tabela S1).

Tabela S1 - Densidade de incidência de recorrência tumoral global e segundo a expressão tecidual de Gal3 e a doença de base, em 142 pacientes com CHC submetidos a transplante hepático

Condições	Número de pacientes	Número de recorrência tumoral	Densidade de incidência (100 pessoas-ano)*	IC 95%
Todos os pacientes**	142	31	7,92	5,57 – 11,30
Galectina 3				
Negativa	109	19	5,98	3,82 – 9,38
Positiva	33	12	16,20	9,21 – 28,6
Etiologia da doença de base				
Hepatite C	76	21	10,00	6,52 – 15,30
Hepatite B	15	5	11,80	4,90 – 28,30
Causas não virais	51	5	3,60	1,50 – 8,64

Gal3, galectina 3; CHC, carcinoma hepatocelular

*Tempo médio de acompanhamento = 33 meses (mínimo de 1 dia e máximo de 10,2 anos)

** 6 pacientes com perda de seguimento

Fatores de risco para recorrência tumoral

A tabela 4 apresenta os resultados da análise univariada dos fatores de risco para recorrência tumoral. Foi observada associação entre RT e as seguintes características: etiologia viral (HR 3,12; IC95% 1,20 – 8,12; $p = 0,02$), tempo de lista maior que 90 dias (HR 4,95; IC95% 2,02 – 12,10; $p < 0,001$), número de nódulos acima de três (HR 3,05; IC95% 1,46 – 6,36; $p = 0,003$), diâmetro do maior nódulo superior a 5 cm (HR 3,21; IC95% 1,43 – 7,23; $p = 0,005$), presença de invasão vascular (HR 5,71; IC95% 2,32 – 14,07; $p < 0,001$), expressão tecidual de Gal3 (HR 2,55; IC95% 1,24 – 5,28; $p = 0,011$) e estadiamento além dos critérios de Milão (HR 3,58; IC95% 1,76 – 7,28; $p < 0,001$). Quanto à variável combinada expressão de Gal3/invasão vascular, observou-se associação com a RT tanto no grupo Gal3 negativa/invasão presente (HR 4,63; IC95% 1,65 – 13,02; $p = 0,003$) quanto no grupo Gal3 positiva/invasão presente (HR 9,30; IC95% 3,14 – 27,49; $p < 0,001$).

Tabela 4 - Fatores associados à recorrência tumoral, em 142 pacientes submetidos a transplante hepático para tratamento do CHC

Características	HR (IC 95%)	p
Pré-operatórios		
Idade: maior que 60 anos	0,79 (0,39 - 1,61)	0,520
Sexo: Masculino	2,46 (0,75 - 8,11)	0,138
MELD: maior que 12 pontos	0,70 (0,34 - 1,47)	0,346
Etiologia: viral	3,12 (1,20 - 8,12)	0,020
AFP: maior que 10ng/ml *	1,93 (0,86 - 4,30)	0,110
Terapia ponte	1,90 (0,66 - 5,47)	0,234
Tempo de lista: maior que 90 dias	4,95 (2,02 - 12,1)	<0,001
Perioperatórias		
Tempo de isquemia fria maior que 600 minutos	1,0 (0,30 - 3,30)	0,997
Tempo de isquemia quente: maior que 50 minutos	0,45 (0,06 - 3,29)	0,429
Idade do doador: maior que 60 anos	1,81 (0,69 - 4,74)	0,228
Hemotransfusão	1,14 (0,54 - 2,39)	0,729
Tipo de anastomose venosa (convencional/piggyback)	1,20 (0,55 - 2,60)	0,649
Histopatológicas		
Número de nódulos: mais de três nódulos	3,05 (1,46 - 6,36)	0,003
Diâmetro do maior nódulo: maior que 5 cm	3,21 (1,43 - 7,23)	0,005
Tumor mal diferenciado	1,53 (0,46 - 5,07)	0,482
Invasão vascular: presente	5,71 (2,32 - 14,07)	<0,001
Estadiamento: além dos critérios de Milão	3,58 (1,76 - 7,28)	<0,001
Expressão de galectina3 pelo tumor	2,55 (1,24 - 5,28)	0,011
Necrose do tumor: parcial	2,07 (0,91 - 4,68)	0,079
Variável combinada (Gal3/invasão vascular)		
Gal3 negativa/invasão vascular ausente	1	
Gal3 positiva/invasão vascular ausente	1,22 (0,14 - 10,43)	0,857
Gal3 negativa/invasão vascular presente	4,63 (1,65 - 13,02)	0,003
Gal3 positiva/invasão vascular presente	9,30 (3,14 - 27,49)	<0,001
Pós-operatórias		
Contagem de linfócitos: menor que 500/mm ³ ¶	1,40 (0,33 - 5,91)	0,645
Nível sérico de tacrolimus: acima de 10ng/ml §	0,71 (0,35 - 1,43)	0,343
Uso de inibidor da mTOR	1,56 (0,69 - 3,54)	0,282

CHC, carcinoma hepatocelular; HR, *hazard ratio*; IC 95%, intervalo de confiança de 95%; MELD, *model for end stage liver disease*; AFP, alfa fetoproteína; Gal3, galectina 3

* Último valor da AFP antes do transplante.

¶ Contagem de linfócitos ao final do primeiro mês pós-transplante

§ Maior valor do nível sérico de tacrolimus no primeiro mês após transplante

A sobrevida livre de recorrência (SLR) estimada em um e três anos para a população global foi de 86,1% e 73,3%, respectivamente. Os pacientes com tumores Gal3-positivos apresentaram estimativa de SLR em um e três anos de 62,3% e

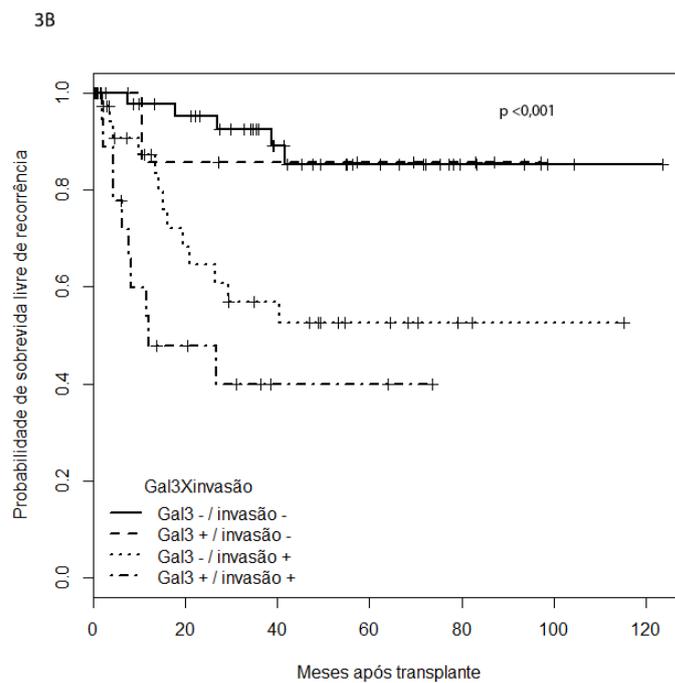
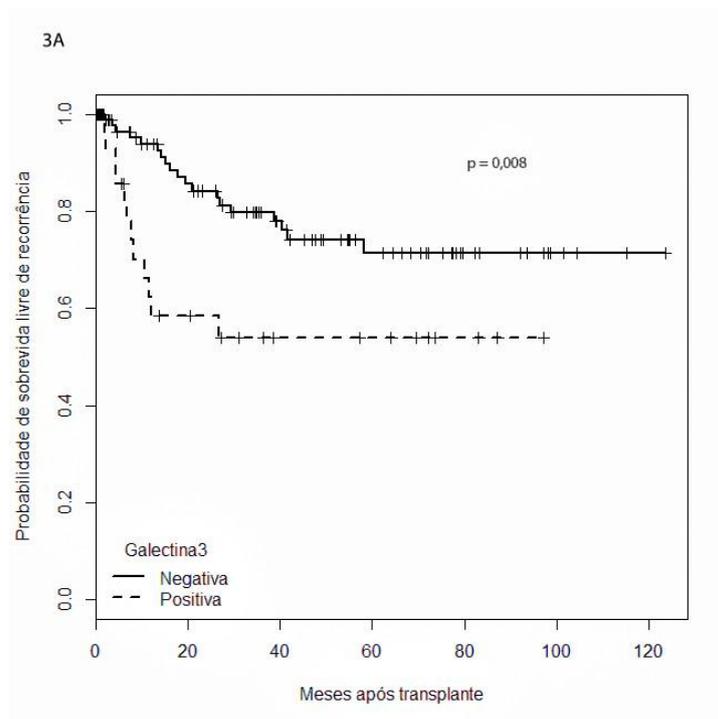
53,9%, enquanto 93,9% e 79,7% dos pacientes com tumores Gal3-negativos permaneciam livres de RT ao final do primeiro e terceiro anos pós-transplante. O subgrupo que apresentava simultaneamente expressão de Gal3 e invasão vascular teve estimativa de SLR em um e três anos de 53,8% e 39,9%, respectivamente, em comparação a 97,7% e 92,5%, respectivamente, no grupo com ausência de ambas as características. As estimativas de SLR de acordo com os outros fatores de risco da análise univariada são apresentadas na tabela S2 e as curvas de Kaplan-Meier para estimativa de SLR estão representadas na figura 3.

Tabela S2 – Sobrevida livre de recorrência do CHC ao final do primeiro e terceiro ano após transplante hepático, global e segundo os fatores de risco de recorrência tumoral

Característica	SLR primeiro ano % (IC95%)	SLR terceiro ano % (IC95%)
População global	86,1% (79,8 – 92,9%)	73,3% (65,1 – 82,6%)
Expressão de galectina 3		
Negativa	93,9% (88,8 - 99,2%)	79,7% (71,0 - 89,5%)
Positiva	62,3% (46,3 – 83,9%)	53,9% (37,7 – 77,3%)
Etiologia		
Causas não virais	94,7% (87,9 – 100,0%)	84,3% (72,4 – 98,2%)
Hepatite B ou C	81,2% (72,5 – 91,0%)	66,8% (56,3 – 79,3%)
Tempo de lista de espera		
Menor que ou igual a 90 dias	98,0% (94,2 – 100,0%)	87,0% (77,8 – 97,3%)
Maior que 90 dias	73,2% (62,1 – 86,3%)	60,4% (48,2 – 75,7%)
Número de nódulos		
Menor que ou igual a três	90,8% (84,9 – 97,1%)	77,5% (68,8 – 87,3%)
Maior que três	65,1% (47,1 – 89,9%)	54,2% (35,9 – 81,8%)
Diâmetro do maior nódulo		
Menor que ou igual a 5 cm	88,1%(81,8 – 95,0%)	77,5% (69,2 – 86,7%)
Maior que 5 cm	72,7% (52,8 – 100,0%)	41,5% (20,3 – 85,0%)
Invasão vascular pelo tumor		
Ausente	96,0% (90,7 – 100,0%)	91,6% (84,0 – 99,9%)
Microvascular	82,6% (71,6 – 95,3%)	55,8% (41,6 – 75,0%)
Macrovascular	40,0% (17,1 – 93,8%)	26,7% (8,3 – 85,8%)
Variável combinada (Gal3/invasão vascular)		
Gal3 negativa/invasão vascular ausente	97,7%(93,4 – 100,0%)	92,5%(84,7 – 100,0%)
Gal3 positiva/invasão vascular ausente	85,7%(63,3 – 100,0%)	85,7%(63,3 – 100,0%)
Gal3 negativa/invasão vascular presente	87,3%(76,3 – 99,8%)	56,9%(41,0 – 78,9%)
Gal3 positiva/invasão vascular presente	53,8%(34,7 – 83,5%)	39,9%(21,6 – 73,5%)
Estadiamento tumoral		
Dentro dos critérios de Milão	93,1% (87,4 – 99,1%)	82,4% (73,8 – 92,0%)
Além dos critérios de Milão	71,2% (57,5 – 88,2%)	53,2% (38,1 – 74,4%)

CHC, carcinoma hepatocelular; SLR, sobrevida livre de recorrência; IC95%, intervalo de confiança de 95%

Figura 3 – Curvas de Kaplan-Meier para estimativa de sobrevida livre de recorrência tumoral em 142 pacientes submetidos a transplante hepático para tratamento do CHC: 3A) de acordo com a expressão tecidual de Gal3, p log-rank = 0,008; 3B) de acordo com a variável combinada Gal3/invasão vascular, p log-rank < 0,001.



Foram selecionadas para inclusão nos modelos de regressão proporcional de Cox, as variáveis com $p < 0,05$ na análise univariada, exceto tamanho e número dos nódulos, por já serem representados nos critérios de Milão. Os resultados da análise multivariada são apresentados na Tabela 5. Estadiamento tumoral além dos CM (HR 2,36; IC95% 1,04 – 5,35; $p = 0,04$), tempo de lista maior que 90 dias (HR 4,13; IC95% 1,64 – 10,36; $p = 0,002$) e etiologia viral da hepatopatia (HR 2,76; IC95% 1,01 – 7,55; $p = 0,047$) mostraram associação independente com a RT. A coexistência de expressão de Gal3 e invasão vascular elevou de forma independente o risco de RT (HR 5,88; IC95% 1,81 – 19,12; $p = 0,003$), enquanto a presença de invasão na ausência da expressão de Gal3 apresentou apenas uma tendência à significância (HR 2,63; IC95% 0,89 – 7,76; $p = 0,08$). A expressão de Gal3 na ausência de invasão vascular não teve impacto sobre o risco de RT.

Tabela 5 - Modelo multivariado dos fatores de risco associados à recorrência tumoral em 142 pacientes submetidos a transplante hepático para tratamento do CHC.

Características	HR_{ajustado} (IC 95%)	p*
Variável combinada Gal3/ invasão vascular		
Gal3 negativa/invasão vascular ausente	1	
Gal3 positiva/invasão vascular ausente	1,21(0,14 - 10,45)	0,863
Gal3 negativa/invasão vascular presente	2,63 (0,89 - 7,76)	0,080
Gal3 positiva/invasão vascular presente	5,88 (1,81 - 19,12)	0,003
Estadiamento tumoral		
Dentro dos critérios de Milão	1	-
Além dos critérios de Milão	2,36 (1,04 - 5,35)	0,040
Tempo em lista de espera		
Menor que ou igual a 90 dias	1	-
Maior que 90 dias	4,13 (1,64 - 10,36)	0,002
Etiologia		
Causas não virais	1	-
Hepatite viral (B ou C)	2,76 (1,01 - 7,55)	0,047

CHC, carcinoma hepatocelular; HR, *hazard ratio*; IC95%, intervalo de confiança de 95%, Gal3, galectina 3

* Regressão proporcional de Cox

DISCUSSÃO

Até onde se sabe, este é o primeiro estudo a analisar o impacto da expressão tecidual da Gal3 sobre a recorrência do CHC após transplante hepático. Este estudo encontrou associação entre expressão tumoral da Gal3 e redução da sobrevida livre de recorrência após transplante, efeito aparentemente mediado pela invasão vascular. A coexistência de invasão vascular e expressão de Gal3 trouxe efeito sinérgico, marcante e independente no aumento do risco de recorrência do CHC em pacientes submetidos a transplante hepático em um centro de referência no nordeste do Brasil.

A Gal3 participa de diversos processos biológicos, como os de fibrogênese e oncogênese. A função desta proteína varia de acordo com sua localização. No citoplasma é importante para a sobrevivência da célula, no núcleo promove o *splicing* do pré-RNA e regula a transcrição gênica, enquanto no meio extracelular modula as interações entre as células (8, 15).

A Gal3 está envolvida em várias etapas da doença metastática, como adesão da célula à matriz extracelular, migração e invasão, agregação das células tumorais na circulação durante a metastatização, estímulo à angiogênese, apoptose de linfócitos T e inibição de células *natural killer* (16,17).

Hsu e colaboradores, estudando amostras de fígado normal, encontraram expressão de Gal3 apenas nos ductos biliares e nas células de Kuppfer, enquanto nas amostras de fígado cirrótico também havia expressão de Gal3 nos hepatócitos localizados na periferia dos nódulos de regeneração (18). Na presente casuística, a expressão de Gal3 pôde ser observada nas células ductais de 83,9% dos casos e nos hepatócitos na periferia dos nódulos regenerativos em 60,4% das amostras.

Na ausência de doença hepática, os níveis séricos de Gal3 são mais elevados na veia porta que nas veias hepáticas, sugerindo que esta proteína seja clareada pelo fígado. No entanto, pacientes com cirrose tendem a apresentar níveis mais elevados da Gal3 nas veias hepáticas e na circulação sistêmica, achado inversamente relacionado à função hepática, sugerindo que o fígado cirrótico tanto sintetiza quanto reduz a eliminação da Gal3 (19).

Expressão de Gal3 foi observada em 24,3% dos tumores na presente amostra, frequência significativamente menor que as descritas em três estudos de CHC submetidos a ressecção cirúrgica, que encontraram 65% a 81,8% de positividade (11,14,18). Existem diferenças marcantes entre as populações desses

estudos e a incluída neste material, pois eram pacientes orientais, com predomínio de hepatite B e submetidos a ressecção, o que provavelmente reflete doença hepática menos avançada. Embora os estudos anteriores não tenham encontrado diferença na expressão de Gal3 de acordo com a etiologia da doença hepática de base, no presente estudo foi detectada associação independente com a hepatite B. A baixa frequência de hepatite B nesta amostra (10,2%) pode justificar a menor proporção de expressão de Gal3 observada.

Estudos *in vitro* mostraram que a inibição da expressão de Gal3 acarretava redução significativa das capacidades de proliferação, migração e invasão da célula tumoral (10-12). Serizawa e colaboradores expuseram camundongos a carcinógeno, observando nos animais *knockdown* para Gal3 o desenvolvimento de CHC de menor volume, com menos invasão vascular e melhor grau de diferenciação, quando comparados aos camundongos selvagens (20). Os resultados desses estudos sugerem que a capacidade de invasão vascular é mediada pela Gal3. O presente estudo detectou associação independente entre expressão de Gal3 e presença de invasão vascular em pacientes com CHC submetidos a TH, confirmando *in vivo* os achados de estudos experimentais.

A literatura é pobre em estudos que analisem a associação entre a expressão de Gal3 e o prognóstico após TH por CHC. Matsuda e colaboradores, estudando 52 japoneses submetidos a ressecção de CHC, observaram que os tumores Gal3-positivos recorreram em fase mais precoce durante o acompanhamento (14). Jiang e colaboradores, estudando 165 chineses também submetidos a ressecção de CHC, encontraram associação significativa entre expressão de Gal3 e redução da sobrevida global, embora não tenha havido aumento da taxa de recorrência tumoral (11).

Na presente casuística, não foi detectada associação entre expressão de Gal3 e risco de RT na ausência de invasão vascular, enquanto a invasão vascular na ausência de expressão de Gal3 apresentou tendência a associação com a RT. Por outro lado, a combinação de invasão vascular e expressão de Gal3 aumentou de forma marcante e independente o risco de RT (HR 5,88). A análise destes dados, associada aos conhecimentos oriundos dos estudos experimentais, sugere que a invasão vascular pode ser o mecanismo através do qual a Gal3 induz RT.

A expressão de Gal3 parece potencializar a influência deletéria da invasão vascular, sugerindo que esta proteína possa atuar em outras etapas do processo

carcinogênico. A partir dos resultados de estudos experimentais, acredita-se que a Gal3 estimule a migração celular e a adesão ao endotélio, o que facilitaria o ancoramento da célula tumoral no órgão à distância (21).

Um estudo com culturas de células de CHC tratadas com Gal3c recombinante, que impede a ligação da Gal3 com a integrina e assim inibe sua ação, levou a redução da viabilidade celular e das capacidades de invasão e migração (22). Outra droga anti-Gal3, GR-MD-02, foi utilizada em pacientes com cirrose por doença gordurosa não alcoólica e hipertensão porta, determinando regressão da balonização de hepatócitos e redução da pressão portal, com bom perfil de segurança (23). Esses estudos promissores abrem uma linha de pesquisa sobre a Gal3 como alvo terapêutico no CHC.

Este estudo possui limitações inerentes aos estudos de coorte. Diante do longo intervalo de tempo transcorrido entre os primeiros transplantes e o início do estudo, muitos blocos parafinados não foram localizados. Além disso, vários pacientes haviam sido submetidos a terapias ponte antes do transplante que levaram a necrose tumoral extensa, inviabilizando a realização da IHQ. Desta forma, a incidência de RT detectada neste estudo talvez esteja superestimada, pois os casos com necrose tumoral completa que foram excluídos provavelmente determinariam melhor prognóstico. Como a UTF é um centro de referência para transplantes na região, muitos pacientes eram procedentes de outros estados, dificultando o seguimento e a consulta aos atestados de óbito, o que levou à exclusão de mais seis casos por desconhecimento do desfecho.

Em conclusão, os dados apresentados demonstraram associação entre expressão tecidual de galectina 3 e invasão vascular, em pacientes com carcinoma hepatocelular submetidos a transplante hepático. Expressão de galectina 3 e invasão vascular apresentaram efeito sinérgico sobre o aumento do risco de recorrência do carcinoma hepatocelular após transplante, determinando redução da sobrevida livre de recorrência. Estudos posteriores são necessários para avaliar as possíveis aplicações deste conhecimento no manejo dos pacientes com CHC. A galectina 3 pode vir a ser um alvo terapêutico para estratégias que visem a prevenção ou tratamento da recorrência do CHC após transplante hepático.

REFERÊNCIAS

1. Akinyemiju T, Abera S, Ahmed M, Alam N, Alemayohu MA, et al. The Burden of Primary Liver Cancer and Underlying Etiologies From 1990 to 2015 at the Global, Regional, and National Level: Results From the Global Burden of Disease Study 2015. *JAMA Oncol.* 2017 Dec 1;3(12):1683–91. DOI 10.1001/jamaoncol.2017.3055
2. Wang H, Naghavi M, Allen C, Barber RM, Carter A, Casey DC, et al. Global, regional, and national life expectancy, all-cause mortality, and cause-specific mortality for 249 causes of death, 1980–2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. *Lancet.* 2016;388(10053):1459–544. DOI 10.1016/S0140-6736(16)31012-1
3. Petrick JL, Braunlin M, Laversanne M, Valery PC, Bray F, McGlynn KA. International trends in liver cancer incidence, overall and by histologic subtype, 1978-2007. *Int J Cancer.* 2016 Oct 1;139(7):1534–45. DOI 10.1002/ijc.30211
4. Galle PR, Forner A, Llovet JM, Mazzaferro V, Piscaglia F, Raoul J, et al. EASL Clinical Practice Guidelines: Management of hepatocellular carcinoma. *J Hepatol.* 2018 Jul;69(1):182–236. DOI 10.1016/j.jhep.2018.03.019
5. Adam R, Karam V, Delvart V, O’Grady J, Mirza D, Klempnauer J, et al. Evolution of indications and results of liver transplantation in Europe. A report from the European Liver Transplant Registry (ELTR). *J Hepatol.* 2012;57(3):675–88. DOI 10.1016/j.jhep.2012.04.015
6. Yang JD, Larson JJ, Watt KD, Allen AM, Wiesner RH, Gores GJ, et al. Hepatocellular Carcinoma Is the Most Common Indication for Liver Transplantation and Placement on the Waitlist in the United States. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2017;15(5):767–775.e3. DOI 10.1016/j.cgh.2016.11.034
7. Mazzaferro V, Regalia E, Doci R, Andreola S, Pulvirenti A, Bozzetti F, et al. Liver Transplantation for the treatment of small Hepatocellular Carcinomas in Patients With Cirrhosis. *N Engl J Med.* 1996;334(11):693–9. DOI 10.1056/NEJM199603143341104

8. Sciacchitano S, Lavra L, Morgante A, Ulivieri A, Magi F, De Francesco GP, et al. Galectin-3: One Molecule for an Alphabet of Diseases, from A to Z. *Int J Mol Sci*. 2018 Jan 26;19(2):E379. DOI 10.3390/ijms19020379
9. Hu Z, Jiang X, Xu Y, Lu N, Wang W, Luo J, et al. Downregulation of galectin-3 by EGF mediates the apoptosis of HepG2 cells. *Mol Cell Biochem*. 2012 Oct 4;369(1–2):157–65. DOI 10.1007/s11010-012-1378-8
10. Zheng D, Hu Z, He F, Gao C, Xu L, Zou H, et al. Downregulation of galectin-3 causes a decrease in uPAR levels and inhibits the proliferation, migration and invasion of hepatocellular carcinoma cells. *Oncol Rep*. 2014 Jul;32(1):411–8. DOI 10.3892/or.2014.3170
11. Jiang S-S, Weng D-S, Wang Q-J, Pan K, Zhang Y-J, Li Y-Q, et al. Galectin-3 is associated with a poor prognosis in primary hepatocellular carcinoma. *J Transl Med*. 2014 Sep 27;12(1):273–87. DOI 10.1186/s12967-014-0273-3
12. Song L, Tang J, Owusu L, Sun M, Wu J, Zhang J. Galectin-3 in cancer. *Clin Chim Acta*. 2014 Apr;431:185–91. DOI 10.1016/j.cca.2014.01.019
13. Li X, Chen Q, Yin D, Shi S, Yu L, Zhou S, et al. Novel role of semaphorin 3A in the growth and progression of hepatocellular carcinoma. *Oncol Rep*. 2017 Jun;37(6):3313–20. DOI 10.3892/or.2017.5616
14. Matsuda Y, Yamagiwa Y, Fukushima K, Ueno Y, Shimosegawa T. Expression of galectin-3 involved in prognosis of patients with hepatocellular carcinoma. *Hepatol Res*. 2008;38(11):1098–111. DOI 10.1111/j.1872-034X.2008.00387.x
15. Dong R, Zhang M, Hu Q, Zheng S, Soh A, Zheng Y, et al. Galectin-3 as a novel biomarker for disease diagnosis and a target for therapy (Review). *Int J Mol Med*. 2017 Dec 5;41(2):599–614. DOI 10.3892/ijmm.2017.3311
16. Funasaka T, Raz A, Nangia-Makker P. Galectin-3 in angiogenesis and metastasis. *Glycobiology*. 2014 Oct 1;24(10):886–91. DOI 10.1093/glycob/cwu086
17. Farhad M, Rolig AS, Redmond WL. The role of Galectin-3 in modulating tumor growth and immunosuppression within the tumor microenvironment.

- Oncoimmunology. 2018 Jun 3;7(6):e1434467-1–8. DOI 10.1080/2162402X.2018.1434467
18. Hsu D, Dowling CA, Jeng G, Chen J, Yang R, Liu F. Galectin-3 Expression Is Induced in Cirrhotic Liver and Hepatocellular Carcinoma. *Int J cancer*. 1999;81(4):519–26.
 19. Wanninger J, Weigert J, Wiest R, Bauer S, Karrasch T, Farkas S, et al. Systemic and hepatic vein galectin-3 are increased in patients with alcoholic liver cirrhosis and negatively correlate with liver function. *Cytokine*. 2011 Sep;55(3):435–40. DOI 10.1016/j.cyto.2011.06.001
 20. Serizawa N, Tian J, Fukada H, Baghy K, Scott F, Chen X, et al. Galectin 3 regulates HCC cell invasion by RhoA and MLCK activation. *Lab Invest*. 2015 Oct 6;95(10):1145–56. DOI 10.1038/labinvest.2015.77
 21. Chen C, Duckworth CA, Zhao Q, Pritchard DM, Rhodes JM, Yu LG. Increased circulation of galectin-3 in cancer induces secretion of metastasis-promoting cytokines from blood vascular endothelium. *Clin Cancer Res*. 2013;19(7):1693–704. DOI 10.1158/1078-0432.CCR-12-2940
 22. Wang M, Tian F, Ying W, Qian X. Quantitative proteomics reveal the anti-tumour mechanism of the carbohydrate recognition domain of Galectin-3 in Hepatocellular carcinoma. *Sci Rep*. 2017 Dec 12;7(1):5189. DOI 10.1038/s41598-017-05419-5
 23. Chalasani N, Garcia-Tsao G, Goodman Z, Lawitz E, Abdelmalek M, Rinella M, et al. A multicenter, randomized, double-blind, PLB-controlled trial of Galectin-3 inhibitor (GR-MD-02) in patients with NASH cirrhosis and portal hypertension. *J Hepatol*. 2018 Apr;68(sup1):S100–1. DOI 10.1016/S0168-8278(18)30420-3

6.2 ARTIGO 2 - Expressão tecidual de Galectina 3 e a apresentação clínica da recorrência do carcinoma hepatocelular após transplante hepático

INTRODUÇÃO

As experiências iniciais com o transplante hepático (TH) para o tratamento do carcinoma hepatocelular (CHC) foram desanimadoras. Em 1996, Mazzaferro e cols descreveram sobrevida em cinco anos de 75% para os pacientes que obedeciam aos critérios de Milão (1), tornando o transplante hepático (TH) a melhor opção terapêutica para casos selecionados de CHC irresssecável. Apesar do emprego desses critérios, recorrência tumoral (RT) ainda se desenvolve em 10 a 20% dos casos(2).

A recorrência do CHC após TH é condição de péssimo prognóstico, com sobrevida em torno de um ano e sem protocolo de tratamento bem definido (3). A literatura é escassa em estudos que investiguem os fatores preditivos de sobrevida após a RT, que parece ser influenciada tanto pelo comportamento biológico do tumor quanto por características do receptor.

A galectina 3 (Gal3) é uma proteína ligadora de carboidratos que está envolvida em vários mecanismos de oncogênese, como estímulo às capacidades de proliferação, invasão, migração e adesão das células tumorais (4) . Estudos preliminares em pacientes submetidos à ressecção de CHC encontraram associação entre expressão tecidual da Gal3 e prognóstico desfavorável (5,6).

O objetivo deste estudo é descrever a evolução clínica de pacientes que desenvolveram recorrência do CHC após transplante, analisando a influência da expressão tecidual de galectina 3 sobre a apresentação clínica e a sobrevida.

MÉTODOS

Desenho do estudo e população

Uma coorte ambispectiva iniciada em 2014 avaliou todos os pacientes com CHC submetidos a TH pela Unidade de Transplante de Fígado dos Hospitais Oswaldo Cruz e Jayme da Fonte (Recife, Pernambuco, Brasil) entre 1999 e 31/12/2016. Os pacientes foram acompanhados por um período mínimo de um ano após o TH, identificando-se 36 casos de RT, que foram incluídos de forma consecutiva no presente estudo. Os pacientes foram acompanhados por um período mínimo de um ano após o TH.

Coleta das informações basais e relacionadas ao tratamento

A partir de 2014, os pacientes transplantados foram incluídos em protocolo de acompanhamento para monitorização de RT, que era composto por exame de imagem de abdome e tomografia de tórax, a cada seis meses nos dois primeiros anos e depois anualmente. Nos casos em que o óbito ocorreu antes do início do estudo, as informações foram colhidas por revisão dos prontuários ou consulta aos atestados de óbito, sob a autorização das chefias dos setores competentes.

Recorrência tumoral foi definida por um dos seguintes critérios (em ordem de prioridade): confirmação histológica de recorrência de CHC em qualquer órgão, surgimento de lesão em estudo de imagem sugestiva de recorrência hepática ou metástase extra-hepática de CHC, elevação progressiva da AFP associada a quadro clínico sugestivo de RT (síndrome consumptiva), informação de prontuário ou de atestado de óbito. A data da RT foi definida como a data do exame de imagem que identificou pela primeira vez a lesão diagnosticada posteriormente como recorrência e esta foi considerada precoce quando identificada dentro dos primeiros 12 meses após o TH.

Após o diagnóstico de RT em qualquer órgão, os pacientes foram submetidos a avaliação periódica, incluindo dosagem de AFP, exame de imagem de tórax e abdome e cintilografia óssea. A modalidade terapêutica foi determinada para cada caso segundo os critérios do médico assistente, já que não existe protocolo padronizado. Os tratamentos realizados para a RT foram classificados em terapia locorregional (TLR), que inclui ressecção cirúrgica, quimioembolização e ablação por radiofrequência e terapia sistêmica, representada pelo uso de sorafenib e/ou quimioterapia. Sempre que possível, os pacientes foram submetidos à ressecção cirúrgica das lesões neoplásicas. Nos últimos anos, após o diagnóstico de RT, procurou-se incluir o uso de inibidores da mTOR no esquema de imunossupressão.

A data final do seguimento foi definida como a data do óbito ou 31/12/2017 para os pacientes que continuavam em acompanhamento. A sobrevida após transplante foi definida como o intervalo em meses entre a data do transplante e a data final de seguimento. A sobrevida após recorrência foi definida como o intervalo em meses entre a data da RT e a data final de seguimento.

As variáveis basais estudadas incluíram sexo, idade, etiologia da hepatopatia, último valor sérico da alfa fetoproteína (AFP) antes do TH, dados da análise

histopatológica do explante (número e tamanho dos nódulos, invasão vascular, grau de diferenciação celular e estadiamento segundo os critérios de Milão), expressão tumoral de galectina 3 e uso de inibidores da mTOR. Após a recorrência, foram coletadas informações sobre tempo de diagnóstico, nível sérico da AFP, primeiro órgão acometido, localização da RT, esquema de imunossupressão após a RT e tratamentos realizados para a RT. Foram incluídas as variáveis cujos resultados estavam disponíveis em pelo menos 80% dos casos.

Análise do explante

Os explantes foram submetidos a análise histopatológica convencional e a imunohistoquímica para galectina 3. O fígado explantado foi submetido a cortes transversais com 1,0 a 1,5 cm de espessura, para detecção, contagem e medição dos nódulos tumorais. A análise microscópica, realizada pelo mesmo patologista, determinou a natureza neoplásica do nódulo, a presença de invasão vascular e o grau de diferenciação celular. Apenas os nódulos com células tumorais viáveis foram considerados para análise, dessa forma, os nódulos com necrose total não foram contabilizados. O estadiamento tumoral foi baseado nos critérios de Milão (CM) (1).

Para análise da expressão tecidual da galectina 3 por IHQ, foram realizados cortes histológicos com 6µm de espessura dos blocos de parafina armazenados que, depois de aparados em lâminas silanizadas, foram desparafinizados com xilol e reidratados em álcool. A recuperação antigênica foi realizada com tampão citrato pH 6,0, aquecido por 30 minutos. Em seguida, foi realizada a inibição da peroxidase endógena e incubação com anticorpo monoclonal IgG mouse anti-galectina 3, clone H-5 SC 374253 (*Santa Cruz Biotechnology*, Dallas, EUA), na diluição de 1:300, por 16 horas a 4°C. Na próxima etapa, as lâminas foram lavadas e incubadas sucessivamente com anticorpo secundário e terciário (kit *Spring reveal®*, *Spring Biosciences Corporation*, Pleasanton, EUA). A revelação foi feita com diaminobenzidina (DAB) e a contracoloração com hematoxilina. Na tentativa de reduzir o possível viés de aferição, a análise da IHQ foi realizada por patologista único que desconhecia os aspectos clínicos do caso. A análise da IHQ só foi executada após o término do acompanhamento da coorte, para evitar que o conhecimento do seu resultado determinasse um viés de detecção no acompanhamento do paciente.

Questões éticas

O estudo foi realizado de acordo com a Declaração de Helsinki de 1975. A coleta de dados teve início após aprovação do projeto pelos Comitês de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco e do Hospital Universitário Oswaldo Cruz e os pacientes assinaram Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Análise estatística

Inicialmente os dados foram agrupados sob a forma de medidas de tendência central e proporções. As variáveis quantitativas foram categorizadas de acordo com o valor de referência do método laboratorial (AFP), mediana de valores (idade) ou critérios pré-estabelecidos (características do tumor que compõem os critérios de Milão). Para comparação de proporções foi utilizado o teste do qui-quadrado de Pearson e, quando necessário, o teste exato de Fisher. Para verificação da associação entre as características clínico-histológicas e as variáveis de desfecho, foram calculadas as razões de chance (*odds ratios*) brutas e ajustadas após regressão logística múltipla, sendo reportadas com intervalos de confiança de 95%.

As probabilidades de sobrevida após transplante foram estimadas pelo método de Kaplan-Meier e comparadas usando o teste de *log-rank*. As razões de risco (*hazard ratios*) uni e multivariadas para fatores associados à mortalidade após transplante foram calculadas pelos modelos de regressão proporcional de Cox e reportadas com intervalos de confiança de 95%.

A probabilidade máxima de erro para rejeição da hipótese nula foi considerada como 5% ($p < 0,05$). Os dados foram digitados em planilhas Microsoft Excel® 2010 e a análise estatística foi realizada com o pacote *Survival* do programa R para Windows®, versão 3.2.2 (2015 – *R Foundation for Statistical Computing*).

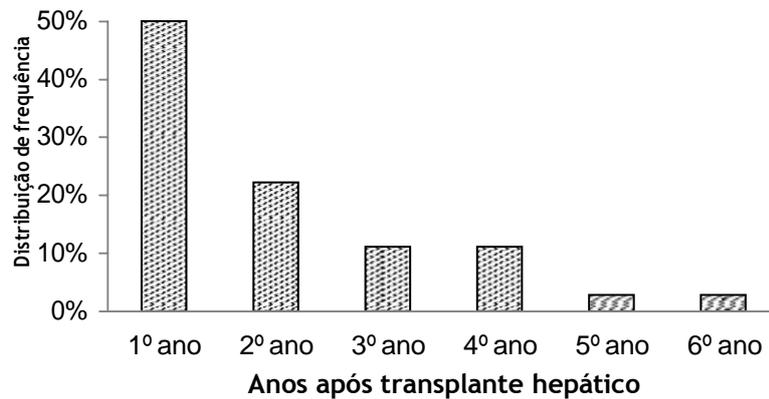
RESULTADOS

População de estudo

Entre 1999 e 2016 foram realizados 250 TH para tratamento do CHC pela Unidade de Transplante de Fígado do Hospital Oswaldo Cruz. Foram excluídos 38 desses casos, 19 pela indisponibilidade do laudo histopatológico do explante e 19 pela não confirmação do diagnóstico pré-operatório de CHC. Dentre estes, foram identificados e incluídos neste estudo 36 casos de recorrência tumoral, após acompanhamento mediano de 29,3 meses (5,43 recorrências por 100 pessoas-ano; IC95% 2,4 - 11,7). Foram colhidas informações sobre o acompanhamento destes 36 pacientes até o óbito ou até o final do período do estudo, não tendo havido perdas de seguimento. A tabela 1 apresenta a população de pacientes com RT, composta por uma maioria de homens (88,9%), portadores de hepatite C (61,2%), com idade mediana de 60 anos. A maioria destes apresentava níveis de AFP no pré-TH acima de 10ng/ml (80,6% dos casos), tumores além dos critérios de Milão (63,9%), bem ou moderadamente diferenciados (90,9%) e com invasão vascular (75,8%). A IHQ para Gal3 foi realizada em 31 casos, sendo positiva em 12 deles (38,7%). Em cinco casos, a IHQ para Gal3 não pôde ser realizada, quatro deles por indisponibilidade do bloco de parafina e um por ausência de células tumorais viáveis no explante (Tabela 1).

Perfil clínico e tratamento da recorrência tumoral

As informações relativas à recorrência do CHC após transplante são descritas na Tabela 1. A RT foi identificada de 1,8 a 69 meses após o TH, com mediana de 13,8 (IC95% 10,5 - 26,7) meses, tendo sido precoce em 50% dos casos. Dez (27,8%) das 36 RT foram diagnosticadas após o segundo ano pós-TH (Figura 1). Após a RT, a AFP apresentava-se acima de 10 ng/ml em 60,6% dos casos. Os primeiros órgãos acometidos pela RT foram fígado (22,2%), pulmão (25,0%), osso (25,0%) e outros (27,8%). Dois pacientes (5,6%) apresentaram RT restrita ao enxerto, enquanto 16 (44,4%) apresentaram apenas acometimento extra-hepático e 18 (50%) desenvolveram RT tanto no enxerto quanto extra-hepática.

Figura 1 - Ano de diagnóstico da recorrência do CHC após o transplante**hepático**

Em 18 casos (50%) ocorreu metástase no enxerto, em 17 (47,2%) no pulmão, em 17 (47,2%) no osso, em 12 (33,3%) no linfonodo, em 6 (16,7%) na adrenal, em dois (5,5%) na parede abdominal e torácica, em dois (5,5%) no cérebro, em dois (5,5%) no peritônio e em um (2,8%) no baço. Vinte e cinco pacientes (69,4%) apresentaram mais de um sítio de RT. Três dos 17 pacientes com metástases ósseas apresentaram lesão vertebral com paraplegia por compressão medular.

Quanto ao tratamento realizado após o diagnóstico da RT, 50% dos casos foram submetidos a terapia de suporte apenas ou não houve tempo hábil para instituição de tratamento. Dez pacientes (27,8%) foram submetidos a uma ou mais modalidades de terapia loco-regional (TLR), tais como segmentectomia pulmonar (3), quimioembolização transarterial (3), adrenalectomia (2), ressecção óssea (2), radiofrequência em lesão hepática e/ou adrenal (2), ressecção de tumor na parede abdominal (1), ressecção hepática (1) e esplenectomia (1). Dezesete pacientes (47,2%) receberam uma ou mais modalidades de terapia sistêmica, sendo elas sorafenib (17) e quimioterapia (4). Nove casos (25,0%) receberam combinação de terapia locorregional e sistêmica. Drogas inibidoras da mTOR foram utilizadas no esquema imunossupressor em 14 (38,9%) pacientes após a RT.

Tabela 1 – Características clínico-histológicas de 36 pacientes que desenvolveram recorrência do CHC após transplante hepático

Característica	Número (%)
Antes do diagnóstico da recorrência tumoral	
Sexo masculino	32 (88,9%)
Idade maior que 60 anos ao transplante	18 (50,0%)
Etiologia da doença hepática	
Hepatite C	22 (61,2%)
Hepatite B	7 (19,4%)
Causas não virais	7 (19,4%)
AFP maior que 10 ng/ml no pré-transplante	29 (80,6%)
Tamanho do maior nódulo tumoral acima de 5 cm	8 (22,9%)
Mais de três nódulos tumorais	12 (34,3%)
Invasão tumoral vascular (n = 33) §	25 (75,8%)
Tumor mal diferenciado (n= 33) ¶	3 (9,1%)
Estadiamento além dos critérios de Milão	23 (63,9%)
Expressão tumoral de galectina 3 (n = 31) ¥	12 (38,7%)
Uso de inibidores da mTOR antes da RT	7 (19,4%)
Após o diagnóstico da recorrência tumoral	
Tempo do diagnóstico da RT	
Precoce	18 (50,0%)
Tardio	18 (50,0%)
Nível de AFP após RT maior que 10 ng/ml (n=33) £	20 (60,6%)
Primeiro órgão acometido pela recorrência tumoral	
Fígado	8 (22,2%)
Pulmão	9 (25,0%)
Osso	9 (25,0%)
Outros	10 (27,8%)
Localização da recorrência tumoral	
Apenas hepática	2 (5,6%)
Extra-hepática	16 (44,4%)
Ambas	18 (50,0%)
Recorrência no enxerto em qualquer momento	18 (50,0%)
Metástase pulmonar em qualquer momento	17 (47,2%)
Metástase óssea em qualquer momento	17 (47,2%)
Uso de inibidor da mTOR após a recorrência	14 (38,9%)
Tratamento realizado	
Terapia de suporte	18 (50,0%)
Terapia sistêmica isolada	8 (22,2%)
Terapia locorregional isolada	1 (2,8%)
Combinação de terapias locorregional e sistêmica	9 (25,0%)

CHC, carcinoma hepatocelular; AFP, alfa fetoproteína; RT, recorrência tumoral

§ Informação sobre invasão vascular era indisponível em três laudos anátomo-patológicos

¶ Informação sobre o grau de diferenciação era indisponível em três laudos anátomo-patológicos

¥ Análise IHQ para galectina 3 não realizada em cinco casos: quatro por indisponibilidade do material parafinado e um por ausência de células tumorais viáveis no explante

£ Resultado de nível de AFP após a RT não disponível em três prontuários

Associação entre a expressão tecidual da galectina 3 e tempo e local da RT

Analisando a associação da expressão de Gal3 com características da RT, observou-se que 11 (91,7%) dos 12 pacientes cujos tumores expressavam Gal3 desenvolveram RT antes do final do primeiro ano pós-transplante (RT precoce), o que ocorreu em 5 (26,3%) dos 19 pacientes cujos tumores não expressavam Gal3. A tabela 2 apresenta as associações entre o tempo de diagnóstico da RT e as características clínico-histológicas. Foi observada associação entre a expressão tecidual de Gal3 e o desenvolvimento de RT precoce, tanto na análise univariada (OR 30,8; IC95% 3,1-303,4; $p < 0,001$), quanto após ajuste multivariado (OR 24,4; IC95% 2,1-278,2; $p = 0,01$).

Dez (83,3%) dos 12 pacientes com tumores Gal3-positivos desenvolveram metástases pulmonares durante o tempo de acompanhamento pós-RT, o que ocorreu em 6 (31,6%) dos 19 pacientes com tumores Gal3-negativos. A tabela 3 apresenta os fatores associados ao desenvolvimento de metástases pulmonares como recorrência do CHC após-transplante. A expressão de Gal3 foi associada à ocorrência de metástases pulmonares, tanto na análise univariada (OR 10,83; IC95% 1,8-65,5; $p = 0,009$) quanto após ajuste multivariado (OR 7,62; IC95% 1,15-50,5, $p = 0,03$). Não foi identificada associação da expressão de Gal3 com outros sítios de RT. RT no enxerto se desenvolveu em 33,3% dos pacientes com tumores Gal3-positivos e em 63,1% dos Gal3-negativos (OR 0,29; IC95% 0,06 – 1,33) e metástases ósseas em 58,3% dos Gal3-positivos e 42,1% dos Gal3-negativos (OR 1,92; IC95% 0,44 – 8,33).

Tabela 2 - Fatores associados à recorrência tumoral precoce após transplante hepático

Característica	Tempo da Recorrência		OR (IC95%)	p	OR ajustado (IC95%)	P
	Precoce	Tardia				
Expressão de Gal3						
Negativa	5 (27,8%)	14(77,8%)	1		1	
Positiva	11 (61,1%)	1 (5,5%)	30,8(3,1-303,4)	<0,00	24,4(2,1-278,2)	0,01
Missing	2 (11,1%)	3 (16,7%)		1		
Invasão vascular						
Ausente	2 (11,1%)	6 (33,4%)	1		1	
Presente	15 (83,4%)	10(55,5%)	4,5(0,75-26,9)	0,08	6,5(0,3-128,2)	0,22
Missing	1 (5,5%)	2 (11,1%)				
Estadiamento tumoral						
Dentro dos CM	5 (27,8%)	8 (44,4%)	1			
Além dos CM	13 (72,2%)	10(55,6%)	2,1(0,5-8,3)	0,30		
AFP pré-transplante						
≤ 10 ng/ml	3 (16,7%)	5 (27,8%)	1			
> 10 ng/ml	15 (83,3%)	13(72,2%)	1,9(0,4-5,4)	0,43		
Grau de diferenciação						
Bem/moderado	16 (88,9%)	14(77,8%)	1			
Mal	1 (5,55%)	2(11,1%)	0,4(0,04-5,36)	0,52		
Missing	1 (5,55%)	2 (11,1%)				

CHC, carcinoma hepatocelular; OR, *odds ratio*; Gal3, galectina 3; CM, critérios de Milão; AFP, alfa fetoproteína

Tabela 3 - Fatores associados à ocorrência de metástase pulmonar em pacientes que desenvolveram recorrência do CHC após transplante hepático

Característica	Metástase pulmonar		OR (IC95%)	p	OR ajustado (IC95%)	p
	Presente	Ausente				
Expressão de Gal3						
Negativa	6 (35,3%)	13(68,5%)	1		1	
Positiva	10(58,8%)	2 (10,5%)	10,83(1,8-65,5)	0,009	7,62(1,15-50,5)	0,03
Missing	1 (5,9%)	4 (21,0%)				
Invasão vascular						
Ausente	2 (12,5%)	6 (31,5%)	1		1	
Presente	14 (87,5%)	11(58,0%)	3,82(0,64-22,7)	0,14	5,32(0,41-68,8)	0,20
Missing	1 (5,9%)	2 (10,5%)				
Estadiamento tumoral						
Dentro dos CM	6 (35,3%)	7 (36,8%)	1			
Além dos CM	11 (64,7%)	12 (63,2%)	1,07(0,27-4,2)	0,92		
AFP pré-transplante						
≤ 10 ng/ml	4 (23,5%)	4 (21,1%)	1			
> 10 ng/ml	13 (76,5%)	15(78,9%)	0,87(0,18-4,2)	0,85		
Grau de diferenciação						
Bem/moderado	15 (88,2%)	15(79,0%)	1			
Mal	1 (5,9%)	2 (10,5%)	0,5(0,04-6,12)	0,58		
Missing	1 (5,9%)	2 (10,5%)				

CHC, carcinoma hepatocelular; OR, *odds ratio*; Gal3, galectina 3; CM, critérios de Milão; AFP, alfa fetoproteína

Mortalidade após transplante

Após uma mediana de tempo de seguimento pós-transplante de 24,2 meses, seis pacientes permaneciam vivos (16,7%). A sobrevida após transplante variou de 3,1 a 99,4 meses, com sobrevida mediana estimada de 24,9 (IC95% 18,4 – 50,3) meses, estimando a existência de 80,5% (IC95% 68,6% – 94,6%) de sobreviventes ao final do primeiro ano após TH e 39,9% (IC95% 26,5% - 60,2%) ao final do terceiro ano.

A sobrevida após recorrência variou de 0,3 a 63,3 meses, com mediana estimada de 9,25 (IC95% 3,7 – 21,2) meses, estimando a presença de 44,1% (IC95% 30,4% - 63,9%) de pacientes vivos ao final do primeiro ano após a RT e 18,5% (IC95% 8,5 – 40,6%) ao final do terceiro ano.

A tabela 4 apresenta os fatores de risco associados à mortalidade pós-transplante em pacientes que desenvolveram recorrência do CHC. Na análise univariada, foi observada associação significativa entre a expressão de Gal3 e o maior risco de mortalidade após transplante (HR 2,93; IC 1,21 – 7,11; $p=0,018$) (Figura 2). Outro fator associado à mortalidade pós-transplante por causas tumorais foi o local da primeira recorrência. Envolvimento ósseo (HR 3,59; IC95% 1,08 – 11,97; $p=0,037$) e pulmonar (HR 3,97; IC95% 1,20 - 13,12; $p=0,024$) como primeiro local de recorrência foram associados a maior risco de óbito, quando comparados a outros sítios. Realização de terapia combinada (TLR e terapia sistêmica) foi associada a menor risco de mortalidade pós-transplante, quando comparada à terapia de suporte (HR 0,26; IC95% 0,10 – 0,70; $p=0,007$).

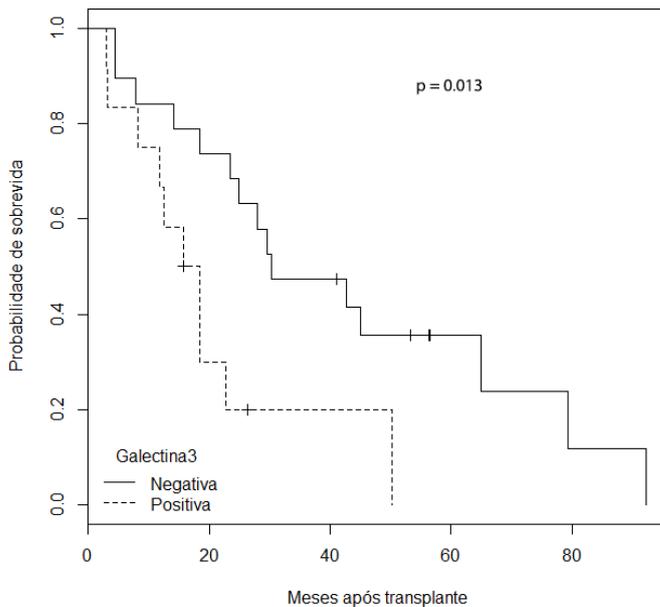
Expressão tecidual de Gal3 foi associada de forma independente à mortalidade pós-transplante (HR 3,53; IC95% 1,24 – 10,01; $p=0,018$). A realização de tratamento anti-neoplásico, seja em modalidade única (HR 0,14; IC95% 0,04 – 0,53; $p=0,003$) ou combinada (HR 0,08; IC95% 0,02 – 0,34; $p<0,001$) foi associada a um menor risco de óbito após ajuste por regressão proporcional de Cox.

Tabela 4 - Fatores associados à mortalidade após transplante em pacientes com recorrência do CHC

Características	HR (IC 95%)	p-valor	HR ajustado (IC 95%)	p-valor
Relacionadas ao transplante				
Idade: > 60 anos	0,58(0,27-1,25)	0,166		
Sexo: Masculino	0,92(0,27-3,10)	0,890		
Etiologia				
Causas não virais	1			
Hepatite C	1,92(0,63-5,83)	0,248		
Hepatite B	2,40(0,60-9,66)	0,218		
AFP pré-transplante acima de 10ng/ml	1,32(0,53-3,25)	0,552		
Tumor mal diferenciado	0,76(0,18-3,25)	0,709		
Presença de invasão vascular	2,52(0,93-6,85)	0,069		
Estadiamento além dos critérios de Milão	1,67(0,76-3,67)	0,200		
Expressão de galectina 3 pelo tumor	2,93(1,21-7,11)	0,018	3,53 (1,24-10,01)	0,018
Relacionados à recorrência tumoral				
AFP após a RT maior que 10 ng/ml	1,41(0,63-3,12)	0,402		
Local da primeira recorrência				
Outros órgãos	1		1	
Enxerto	2,90(0,83-10,10)	0,99	4,07(0,93-17,81)	0,063
Osso	3,59(1,08-11,97)	0,037	3,05(0,72-12,97)	0,130
Pulmão	3,97(1,20-13,12)	0,024	2,99(0,85-10,44)	0,087
Recorrência no enxerto	1,03(0,48-2,18)	0,940		
Metástase óssea	1,25(0,59-2,63)	0,561		
Metástase pulmonar	2,11(0,98-4,57)	0,056		
Tratamento da recorrência				
Terapia de suporte	1		1	
Monoterapia	0,49(0,20-1,22)	0,125	0,14(0,04-0,53)	0,003
Terapia combinada	0,26(0,10-0,70)	0,007	0,08(0,02-0,34)	<0,001

CHC, carcinoma hepatocelular; HR, hazard ratio; AFP, alfa fetoproteína; RT, recorrência tumoral;

Figura 2 – Curvas de Kaplan-Meier para estimativa de sobrevida após transplante em pacientes que desenvolveram recorrência do carcinoma hepatocelular, de acordo com a expressão tecidual de galectina 3, p log-rank = 0,013



DISCUSSÃO

Os resultados deste estudo sugerem que, em pacientes que desenvolveram recorrência do CHC após transplante hepático, a expressão de galectina 3 pelo tumor pode estar associada a recorrência mais precoce, metástases pulmonares e redução da sobrevida.

A RT após transplante costuma ser evento precoce. Na presente casuística, o intervalo mediano para o diagnóstico da RT foi 13,8 meses, compatível com os dados da literatura, que apontam sobrevidas livres de recorrência em torno de 12 a 15 meses (7) (8) (9) (10) (11). Especula-se que a RT precoce possa ser explicada pela existência de metástases extra-hepáticas não detectadas pelo estadiamento convencional pré-transplante ou pela existência de clones celulares circulantes que se fixam em órgãos à distância no pós-operatório. Já a RT tardia parece ser consequência da implantação de células que permaneceram latentes por um longo tempo após o transplante. (3).

Foi observada associação da expressão tecidual da Gal3 com a RT precoce. A literatura é pobre em estudos que avaliam a repercussão da expressão da Gal3 no cenário do transplante hepático. Matsuda e colaboradores, estudando pacientes submetidos a ressecção cirúrgica, já haviam descrito a associação da Gal3 com a recorrência tumoral precoce. Naquele estudo, observaram que a sobrevida livre de recorrência ao final do primeiro ano pós-ressecção foi de 77,8% nos tumores Gal3-negativos contra apenas 44,1% nos Gal3-positivos. No entanto, ao final de cinco anos, a taxa de RT foi semelhante entre os dois grupos (5).

A RT pós-transplante costuma ser um processo sistêmico. Nesta amostra, apenas 5,6% dos casos apresentaram RT restrita ao enxerto, com 50% dos casos mostrando acometimento tanto do enxerto quanto extra-hepático, fato também relatado por Roh e colaboradores, que observaram RT em múltiplos órgãos em 71% dos casos (12).

Metástases pulmonares foram observadas em 47,2% dos casos desta amostra. O pulmão é um dos principais sítios de recorrência do CHC após transplante. Sapisochin e colaboradores descreveram presença de metástase pulmonar em 42,9% dos 121 pacientes que desenvolveram RT (9). No entanto, a literatura não estudou os fatores de risco para seu desenvolvimento.

Este estudo mostrou associação marcante entre a expressão de Gal3 no CHC e o desenvolvimento de metástases pulmonares (OR 7,62). Jiang e colaboradores estudando 165 pacientes submetidos a ressecção de CHC observaram desenvolvimento de metástases à distância em 9,5% dos pacientes com tumores Gal3-positivos e em nenhum dos Gal3-negativos (6).

Alguns estudos experimentais com culturas de células de melanoma demonstraram que a Gal3 parece participar de várias etapas do processo de metastatização para o pulmão. Foi observado *in vitro* que a Gal3 estimulou a adesão da célula tumoral circulante ao endotélio, a secreção de matriz-metalopeptidases que degradam a membrana basal endotelial, a promoção da motilidade da célula metastática no parênquima pulmonar e a angiogênese (13) (14). Estudos com células de CHC para avaliar a participação da Gal3 em processos metastáticos para o pulmão são necessários para verificar se esses achados são reproduzidos neste tipo de tumor.

O presente estudo também demonstrou associação entre expressão de Gal3 e redução da sobrevida em pacientes que desenvolveram recorrência do CHC após

transplante (HR 3,53). Não há dados na literatura sobre o papel da Gal3 na sobrevida após transplante por CHC, mas alguns autores observaram redução da sobrevida de pacientes submetidos a ressecção de CHC cujos tumores expressavam Gal3 (OR entre 4,2 e 7,5) (5) (6).

Tratamento anti-neoplásico foi empregado em apenas 50% dos casos nesta amostra. Embora a realização de algum tratamento anti-neoplásico tenha se associado a melhor sobrevida, é importante analisar com cautela estes resultados, pois se trata de estudo puramente observacional e os pacientes não eram comparáveis. Por se tratar de condição incomum e de péssimo prognóstico, há escassez de estudos de intervenção randomizados sobre o tratamento da RT após transplante. Há relatos de melhores taxas de sobrevida nos pacientes submetidos a ressecção da RT, mas as lesões ressecáveis possivelmente eram mais localizadas e indolentes (9) (11). Estudos observacionais sugerem que o uso de sorafenib nas recorrências não passíveis de ressecção possa aumentar a sobrevida da RT pós-transplante (15). Estudos com a combinação de terapias cirúrgicas e medicamentosas são necessários para avaliar a superioridade de resultados quanto à sobrevida após transplante.

Resultados promissores vieram de um estudo com culturas de células de CHC tratadas com Gal3c recombinante, que impede a ligação da Gal3 com a integrina e assim inibe sua ação, levando a redução da viabilidade celular e das capacidades de invasão e migração (22). Esse estudo abre uma linha de pesquisa sobre a Gal3 como alvo terapêutico no CHC.

Em conclusão, resguardadas as limitações de um estudo observacional e com número de participantes pequeno, estes resultados sugerem que, em pacientes que desenvolvem recorrência do CHC após transplante hepático, a expressão tecidual de Gal3 pode estar associada a sinais de mau prognóstico, com maior risco de recorrência tumoral precoce, metástases pulmonares e redução de sobrevida. Estes achados sugerem a relevância da avaliação da expressão da Gal3 em fígados explantados com CHC, para identificar um subgrupo de pacientes que deveria ser submetido a programa intensivo de monitorização de recorrência tumoral e para o qual o desenvolvimento de drogas com ação anti-Gal3 poderia oferecer uma nova estratégia terapêutica.

REFERÊNCIAS

1. Mazzaferro V, Regalia E, Doci R, Andreola S, Pulvirenti A, Bozzetti F, et al. Liver Transplantation for the treatment of small Hepatocellular Carcinomas in Patients With Cirrhosis. *N Engl J Med*. 1996 Mar;334(11):693–9.
2. Mazzaferro V, Bhoori S, Sposito C, Bongini M, Langer M, Miceli R, et al. Milan criteria in liver transplantation for hepatocellular carcinoma: An evidence-based analysis of 15 years of experience. *Liver Transplant*. 2011 Oct;17(S2):S44–57.
3. De'Angelis N, Landi F, Carra MC, Azoulay D. Managements of recurrent hepatocellular carcinoma after liver transplantation: A systematic review. *World J Gastroenterol*. 2015 Oct;21(39):11185–98.
4. Song L, Tang J, Owusu L, Sun M, Wu J, Zhang J. Galectin-3 in cancer. *Clin Chim Acta*. 2014 Apr;431:185–91.
5. Matsuda Y, Yamagiwa Y, Fukushima K, Ueno Y, Shimosegawa T. Expression of galectin-3 involved in prognosis of patients with hepatocellular carcinoma. *Hepatol Res*. 2008;38(11):1098–111.
6. Jiang S-S, Weng D-S, Wang Q-J, Pan K, Zhang Y-J, Li Y-Q, et al. Galectin-3 is associated with a poor prognosis in primary hepatocellular carcinoma. *J Transl Med*. 2014 Sep 27;12(1):273–87.
7. Roayaie S, Schwartz JD, Sung MW, Emre SH, Miller CM, Gondolesi GE, et al. Recurrence of Hepatocellular Carcinoma After Liver Transplant : Patterns and Prognosis. *Liver Transplant*. 2004 Apr;10(4):534–40.
8. Toso C, Cader S, Glenda AM, Morel P, Mentha G, Kneteman NM. Factors predicting survival after post-transplant hepatocellular carcinoma recurrence. *J Hepatobiliary Pancreat Sci*. 2013 Mar;20(3):342–7.
9. Sapisochin G, Goldaracena N, Astete S, Laurence JM, Davidson D, Rafael E, et al. Benefit of Treating Hepatocellular Carcinoma Recurrence after Liver Transplantation and Analysis of Prognostic Factors for Survival in a Large Euro-American Series. *Ann Surg Oncol*. 2015 Jul 4;22(7):2286–94.
10. Nagai S, Mangus RS, Kubal CA, Ekser B, Fridell JA, Klingler KR, et al.

- Prognosis after recurrence of hepatocellular carcinoma in liver transplantation: Predictors for successful treatment and survival. *Clin Transplant*. 2015 Dec;29:1156–63.
11. Bodzin AS, Lunsford KE, Markovic D, Harlander-Locke MP, Busuttil RW, Agopian VG. Predicting Mortality in Patients Developing Recurrent Hepatocellular Carcinoma After Liver Transplantation. *Ann Surg* . 2017 Jul;266(1):118–25.
 12. Roh Y-N, David Kwon CH, Song S, Shin M, Man Kim J, Kim S, et al. The prognosis and treatment outcomes of patients with recurrent hepatocellular carcinoma after liver transplantation. *Clin Transplant*. 2014 Jan;28(1):141–7.
 13. Dange MC, Srinivasan N, More SK, Bane SM, Upadhya A, Ingle AD, et al. Galectin-3 expressed on different lung compartments promotes organ specific metastasis by facilitating arrest, extravasation and organ colonization via high affinity ligands on melanoma cells. *Clin Exp Metastasis*. 2014 Aug;31(6):661–73.
 14. Chen C, Duckworth CA, Zhao Q, Pritchard DM, Rhodes JM, Yu LG. Increased circulation of galectin-3 in cancer induces secretion of metastasis-promoting cytokines from blood vascular endothelium. *Clin Cancer Res*. 2013 Apr;19(7):1693–704.
 15. Sposito C, Mariani L, Germini A, Flores Reyes M, Bongini M, Grossi G, et al. Comparative efficacy of sorafenib versus best supportive care in recurrent hepatocellular carcinoma after liver transplantation: A case-control study. *J Hepatol*. 2013 Jul;59(1):59–66.

7 CONCLUSÕES

Os dados apresentados demonstraram associação entre expressão tecidual de galectina 3 e invasão vascular, em pacientes com carcinoma hepatocelular submetidos a transplante hepático. Expressão de galectina 3 e invasão vascular apresentaram efeito sinérgico sobre o aumento do risco de recorrência do carcinoma hepatocelular após transplante, determinando redução da sobrevida livre de recorrência.

Em pacientes que apresentaram recorrência do carcinoma hepatocelular após transplante, a expressão de galectina 3 pelo tumor se associou ao desenvolvimento de recorrência precoce e metástase pulmonar e à redução da sobrevida após transplante.

Os resultados sugerem que a galectina 3 é fator de risco para a recorrência do carcinoma hepatocelular após transplante. O desenvolvimento de drogas com ação anti-galectina 3 poderá trazer novas perspectivas para prevenção ou tratamento da recorrência do carcinoma hepatocelular após transplante hepático.

8 RECOMENDAÇÕES

Recomendamos que a metodologia desta pesquisa seja reproduzida em estudos multicêntricos, para avaliar a possibilidade de extrapolar os resultados a nível mundial.

Sugerimos também a realização de estudo que relacione o nível sérico da galectina 3 no pré-transplante com o risco de recorrência do CHC após transplante, pois este poderia se tornar mais um critério a ser utilizado na seleção de pacientes com CHC para transplante.

Por fim, sugerimos a realização de estudos utilizando drogas com ação anti-galectina 3 na prevenção ou tratamento da recorrência do CHC após transplante hepático.

REFERÊNCIAS

- ADAM, R. et al. Evolution of indications and results of liver transplantation in Europe. A report from the European Liver Transplant Registry (ELTR). **Journal of Hepatology**, v. 57, n. 3, p. 675–688, 2012.
- AGOPIAN, V. G. et al. A Novel Prognostic Nomogram Accurately Predicts Hepatocellular Carcinoma Recurrence after Liver Transplantation: Analysis of 865 Consecutive Liver Transplant Recipients. **Journal of the American College of Surgeons**, v. 220, n. 4, p. 416–427, abr. 2015.
- AGOPIAN, V. G. et al. Impact of Pretransplant Bridging Locoregional Therapy for Patients With Hepatocellular Carcinoma Within Milan Criteria Undergoing Liver Transplantation. **Annals of Surgery**, v. 266, n. 3, p. 525–535, set. 2017.
- ALTER, M.J. et al. The natural history of community-acquired hepatitis C in the United States. **The New England Journal of Medicine**, v. 327, n. 27, p. 1899–1905, 1992.
- ANRS. Lack of evidence of an effect of direct-acting antivirals on the recurrence of hepatocellular carcinoma: Data from three ANRS cohorts. **Journal of Hepatology**, v. 65, p. 734–740, 2016.
- ASHFAQ, U. A. et al. An overview of HCV molecular biology, replication and immune responses. **Virology Journal**, v. 8, n. Figure 1, p. 1–10, 2011.
- BAUSCHKE, A. et al. Validity of eleven prognostic scores with respect to intra- and extrahepatic recurrence of hepatocellular carcinoma after liver transplantation. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, v. 143, n. 12, p. 2595–2605, 2017.
- BELLI, L. S. et al. Delisting of liver transplant candidates with chronic hepatitis C after viral eradication: A European study. **Journal of Hepatology**, v. 65, n. 3, p. 524–531, 2016.
- BERENQUER, M.; SCHUPPAN, D. Progression of liver fibrosis in post-transplant hepatitis C: Mechanisms, assessment and treatment. **Journal of Hepatology**, v. 58, n. 5, p. 1028–1041, 2013.
- BERRY, K.; IOANNOU, G. N. Serum alpha-fetoprotein level independently predicts posttransplant survival in patients with hepatocellular carcinoma. **Liver Transplantation**, v. 19, n. 6, p. 634–645, jun. 2013.
- BODZIN, A. S. et al. Predicting Mortality in Patients Developing Recurrent Hepatocellular Carcinoma After Liver Transplantation. **Annals of Surgery**, v. 266, n. 1, p. 118–125, jul. 2017.
- BOZORGZADEH, A. et al. Survival outcomes in liver transplantation for hepatocellular carcinoma, comparing impact of hepatitis C versus other etiology of

cirrhosis. **Liver Transplantation**, v. 13, n. 6, p. 807–813, jun. 2007.

BRASIL, Ministério da Saúde. Portaria nº 1160 de 29 de maio de 2006. **Diário Oficial da União**, seção 1, p. 52-53, 2006

CARRILHO, F. J. et al. Clinical and epidemiological aspects of hepatocellular carcinoma in Brazil. **Clinics**, v. 65, n. 12, p. 1285–1290, 2010.

CHALASANI, N. et al. A multicenter, randomized, double-blind, PLB-controlled trial of Galectin-3 inhibitor (GR-MD-02) in patients with NASH cirrhosis and portal hypertension. **Journal of Hepatology**, v. 68, n. sup1, p. S100–S101, abr. 2018.

CHEN, C. et al. Increased circulation of galectin-3 in cancer induces secretion of metastasis-promoting cytokines from blood vascular endothelium. **Clinical Cancer Research**, v. 19, n. 7, p. 1693–1704, 2013.

CHOLONGITAS, E. et al. Mammalian target of rapamycin inhibitors are associated with lower rates of hepatocellular carcinoma recurrence after liver transplantation: a systematic review. **Transplant International**, v. 27, n. 10, p. 1039–1049, out. 2014.

CHOO QL, KUO G, WEINER AJ, OVERBY LR, BRADLEY DW, H. M. Isolation of a cDNA Clone Derived from a Blood- Borne Non-A, Non-B Viral Hepatitis Genome. **Science**, v. 244, p. 359–362, 1989.

CLAVIEN, P.-A. et al. Recommendations for liver transplantation for hepatocellular carcinoma: an international consensus conference report. **The Lancet Oncology**, v. 13, n. 1, p. e11–e22, 2012.

CONTI, F. et al. Early occurrence and recurrence of hepatocellular carcinoma in HCV-related cirrhosis treated with direct-acting antivirals. **Journal of Hepatology**, v. 65, n. 4, p. 727–733, 2016.

COSTA, P. E. G. et al. Ten-Year Experience With Liver Transplantation for Hepatocellular Carcinoma in a Federal University Hospital in the Northeast of Brazil. **Transplantation Proceedings**, v. 46, n. 6, p. 1794–1798, jul. 2014.

COURT, C. M. et al. Determination of hepatocellular carcinoma grade by needle biopsy is unreliable for liver transplant candidate selection. **Liver Transplantation**, v. 23, n. 9, p. 1123–1132, set. 2017.

DANGE, M. C. et al. Galectin-3 expressed on different lung compartments promotes organ specific metastasis by facilitating arrest, extravasation and organ colonization via high affinity ligands on melanoma cells. **Clinical and Experimental Metastasis**, v. 31, n. 6, p. 661–673, 2014.

DAVID, F. et al. Preoperative fine-needle aspiration tumour biopsy does not affect the oncologic course of patients with transplantable HCC. **Journal of Hepatology**, v. 61, n. 3, p. 589–593, 2014.

DE'ANGELIS, N. et al. Managements of recurrent hepatocellular carcinoma after liver

transplantation: A systematic review. **World Journal of Gastroenterology**, v. 21, n. 39, p. 11185–11198, 2015.

DE MARTEL, C. et al. World-wide relative contribution of hepatitis B and C viruses in hepatocellular carcinoma. **Hepatology**, v. 62, n. 4, p. 1190–1200, 2015.

DONAT, M. et al. Impact of Histological Factors of Hepatocellular Carcinoma on the Outcome of Liver Transplantation. **Transplantation Proceedings**, v. 48, n. 6, p. 1968–1977, jul. 2016.

DONATO, MF; INVERNIZZI F, ROSSI G, I. M. Interferon-free therapy of hepatitis C during wait list and post-transplant risk of hepatocellular recurrence. **Journal of Hepatology**, v. 67, p. 1340–1357, 2017.

DONG, R. et al. Galectin-3 as a novel biomarker for disease diagnosis and a target for therapy (Review). **International Journal of Molecular Medicine**, v. 41, n. 2, p. 599–614, 5 dez. 2017.

DUBAY, D. et al. Liver transplantation for advanced hepatocellular carcinoma using poor tumor differentiation on biopsy as an exclusion criterion. **Annals of Surgery**, v. 253, n. 1, p. 166–172, 2011.

DUMITRA, S. et al. Hepatitis C infection and hepatocellular carcinoma in liver transplantation: A 20-year experience. **HPB**, v. 15, n. 9, p. 724–731, 2013.

DUVOUX, C. et al. Liver transplantation for hepatocellular carcinoma: A model including α -fetoprotein improves the performance of milan criteria. **Gastroenterology**, v. 143, n. 4, p. 986–994.e3, 2012.

EISA, N. H. et al. Galectin-3 and matrix metalloproteinase-9: Perspective in management of hepatocellular carcinoma. **Journal of Oncology Pharmacy Practice**, v. 21, n. 5, p. 323–330, 24 out. 2015.

EL-SERAG, H. B. et al. Risk of hepatocellular carcinoma after sustained virological response in Veterans with hepatitis C virus infection. **Hepatology**, v. 64, n. 1, p. 130–137, 2016.

ESCARTIN, A. et al. Recurrence of Hepatocellular Carcinoma After Liver Transplantation. **Transplantation Proceedings**, v. 2310, n. 7, p. 2308–2310, 2007.

FALADE-NWULIA, O. et al. Oral direct-acting agent therapy for hepatitis c virus infection: A systematic review. **Annals of Internal Medicine**, v. 166, n. 9, p. 637–648, 2017.

FARHAD, M.; ROLIG, A. S.; REDMOND, W. L. The role of Galectin-3 in modulating tumor growth and immunosuppression within the tumor microenvironment. **Oncolmmunology**, v. 7, n. 6, p. e1434467-1–8, 3 jun. 2018.

FORNER, A.; REIG, M.; BRUIX, J. Hepatocellular carcinoma. **The Lancet**, v. 6736, n. 18, p. 1–14, 2018.

FUNASAKA, T.; RAZ, A.; NANGIA-MAKKER, P. Galectin-3 in angiogenesis and metastasis. **Glycobiology**, v. 24, n. 10, p. 886–891, 1 out. 2014.

GALLE, P. R. et al. EASL Clinical Practice Guidelines: Management of hepatocellular carcinoma. **Journal of Hepatology**, v. 69, n. 1, p. 182–236, jul. 2018.

GARVEY, P. et al. Disease outcomes in a cohort of women in Ireland infected by hepatitis C-contaminated anti-D immunoglobulin during 1970s. **Journal of Hepatology**, v. 67, n. 6, p. 1140–1147, 2017.

GEISSLER, E. K. et al. Sirolimus Use in Liver Transplant Recipients With Hepatocellular Carcinoma. **Transplantation**, v. 100, n. 1, p. 116–125, jan. 2016.

GERMANI, G. et al. Which matters most: Number of tumors, size of the largest tumor, or total tumor volume? **Liver Transplantation**, v. 17, n. S2, p. S58–S66, out. 2011.

AKINYEMIJU, T. et al. The Burden of Primary Liver Cancer and Underlying Etiologies From 1990 to 2015 at the Global, Regional, and National Level: Results From the Global Burden of Disease Study 2015. **JAMA oncology**, v. 3, n. 12, p. 1683–1691, 1 dez. 2017.

GRANT, R. C. et al. Living vs. deceased donor liver transplantation for hepatocellular carcinoma: a systematic review and meta-analysis. **Clinical Transplantation**, v. 27, n. 1, p. 140–147, jan. 2013.

GRAT, M. et al. The impact of surgical technique on the results of liver transplantation in patients with hepatocellular carcinoma. **Annals of transplantation**, v. 18, p. 448–59, 6 set. 2013.

GRAT, M. et al. Combination of morphologic criteria and α -fetoprotein in selection of patients with hepatocellular carcinoma for liver transplantation minimizes the problem of posttransplant tumor recurrence. **World Journal of Surgery**, v. 38, n. 10, p. 2698–2707, 2015.

GUDOWSKA, M. et al. Galectin-3 Concentration in Liver Diseases. **Annals of clinical and laboratory science**, v. 45, n. 6, p. 669–73, 2015.

GUERRINI, G. P. et al. Multimodal oncological approach in patients affected by recurrent hepatocellular carcinoma after liver transplantation. **European review for medical and pharmacological sciences**, v. 21, n. 15, p. 3421–3435, ago. 2017.

HALAZUN, K. J. et al. Negative Impact of Neutrophil-Lymphocyte Ratio on Outcome After Liver Transplantation for Hepatocellular Carcinoma. **Annals of Surgery**, v. 250, n. 1, p. 141–151, jul. 2009.

HAMEED, B. et al. Alpha-fetoprotein level > 1000 ng/mL as an exclusion criterion for liver transplantation in patients with hepatocellular carcinoma meeting the Milan criteria. **Liver Transplantation**, v. 20, n. 8, p. 945–951, ago. 2014.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646–674, mar. 2011.

HEIMBACH, J. K. et al. AASLD guidelines for the treatment of hepatocellular carcinoma. **Hepatology**, v. 67, n. 1, p. 358–380, 2018.

HENDERSON, N. C. et al. Galectin-3 regulates myofibroblast activation and hepatic fibrosis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 103, n. 13, p. 5060–5065, 2006.

HSU, D. et al. Galectin-3 Expression Is Induced in Cirrhotic Liver and Hepatocellular Carcinoma. **International journal of cancer**, v. 81, n. 4, p. 519–526, 1999.

HU, Z. et al. Downregulation of galectin-3 by EGF mediates the apoptosis of HepG2 cells. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 369, n. 1–2, p. 157–165, 4 out. 2012.

HWANG, S. et al. Resection of Pulmonary Metastases from Hepatocellular Carcinoma following Liver Transplantation. **World Journal of Surgery**, v. 36, n. 7, p. 1592–1602, 13 jul. 2012.

INNES, H. et al. The risk of hepatocellular carcinoma in cirrhotic patients with hepatitis C and sustained viral response: Role of the treatment regimen. **Journal of Hepatology**, v. 68, n. 4, p. 646–654, 2018.

IOANNOU, G. N.; GREEN, P. K.; BERRY, K. HCV eradication induced by direct-acting antiviral agents reduces the risk of hepatocellular carcinoma. **Journal of Hepatology**, v. 68, n. 1, p. 25–32, 2018.

JEFTIC, I. et al. Galectin-3 Ablation Enhances Liver Steatosis, but Attenuates Inflammation and IL-33-Dependent Fibrosis in Obesogenic Mouse Model of Nonalcoholic Steatohepatitis. **Molecular medicine (Cambridge, Mass.)**, v. 21, n. 1, p. 453–65, 22 maio 2015.

JIANG, S.-S. et al. Galectin-3 is associated with a poor prognosis in primary hepatocellular carcinoma. **Journal of translational medicine**, v. 12, n. 1, p. 273–287, 27 set. 2014.

JOHANNES, L.; JACOB, R.; LEFFLER, H. Galectins at a glance. **Journal of Cell Science**, v. 131, n. 9, p. jcs208884, 1 maio 2018.

JUNG, D.-H. et al. Antitumor effect of sorafenib and mTOR inhibitor in liver transplantation recipients with hepatocellular carcinoma recurrence. **Liver Transplantation**, v. 24, n. 7, p. 932-945, julho 2018.

KANWAL, F. et al. HCV Genotype 3 Is Associated With an Increased Risk of Cirrhosis and Hepatocellular Cancer in a National Sample of U.S. Veterans With HCV. **Hepatology**, v. 60, n. 1, p. 98–105, 2014.

KANWAL, F. et al. Risk of Hepatocellular Cancer in HCV Patients Treated With

Direct-Acting Antiviral Agents. **Gastroenterology**, v. 153, n. 4, p. 996–1005.e1, 2017.

KOHLI, V. et al. Antiviral therapy for recurrent hepatitis C reduces recurrence of hepatocellular carcinoma following liver transplantation. **Transplant International**, v. 25, n. 2, p. 192–200, fev. 2012.

KORNBERG, A. et al. Patients with non-[18F]fludeoxyglucose-avid advanced hepatocellular carcinoma on clinical staging may achieve long-term recurrence-free survival after liver transplantation. **Liver Transplantation**, v. 18, n. 1, p. 53–61, jan. 2012.

KORNBERG, A. et al. Extended Ischemia Times Promote Risk of HCC Recurrence in Liver Transplant Patients. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 60, n. 9, p. 2832–2839, 29 set. 2015.

KORNBERG, A.; KU, B. Long-term survival after recurrent hepatocellular carcinoma in liver transplant patients: Clinical patterns and outcome variables. **European Journal of Surgical Oncology**, v. 36, n. 3, p. 275–280, 2010.

KORNBERG, A.; SCHERNHAMMER, M.; FRIESS, H. 18F-FDG-PET for Assessing Biological Viability and Prognosis in Liver Transplant Patients with Hepatocellular Carcinoma. **Journal of Clinical and Translational Hepatology**, v. 5, n. 3, p. 224–234, 28 set. 2017.

KULIK, L. et al. Therapies for patients with hepatocellular carcinoma awaiting liver transplantation: A systematic review and meta-analysis. **Hepatology**, v. 67, n. 1, p. 381–400, jan. 2018.

LAI, Q. et al. Alpha-fetoprotein and modified response evaluation criteria in solid tumors progression after locoregional therapy as predictors of hepatocellular cancer recurrence and death after transplantation. **Liver Transplantation**, v. 13, n. 3, p. 1108–1118, maio 2013.

LANINI, S. et al. Hepatitis C: global epidemiology and strategies for control. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 22, n. 10, p. 833–838, 2016.

LEE, M. H. et al. Hepatitis C virus seromarkers and subsequent risk of hepatocellular carcinoma: Long-term predictors from a community-based cohort study. **Journal of Clinical Oncology**, v. 28, n. 30, p. 4587–4593, 2010.

LEWIN, S. M. et al. Liver transplantation recipients with nonalcoholic steatohepatitis have lower risk hepatocellular carcinoma. **Liver Transplantation**, v. 23, n. 8, p. 1015–1022, ago. 2017.

LI, C. et al. Scoring Selection Criteria Including Total Tumour Volume and Pretransplant Percentage of Lymphocytes to Predict Recurrence of Hepatocellular Carcinoma after Liver Transplantation. **PLoS ONE**, v. 8, n. 8, p. e72235, 21 ago. 2013.

LI, M. et al. High Hepatitis B Virus DNA Level in Serum before Liver Transplantation Increases the Risk of Hepatocellular Carcinoma Recurrence. **Digestion**, v. 84, n. 2, p. 134–141, 2011.

LI, X. et al. Novel role of semaphorin 3A in the growth and progression of hepatocellular carcinoma. **Oncology Reports**, v. 37, n. 6, p. 3313–3320, jun. 2017.

LIU, B. et al. Excessive intraoperative blood loss independently predicts recurrence of hepatocellular carcinoma after liver transplantation. **BMC Gastroenterology**, v. 15, n. 1, p. 138, 15 dez. 2015.

LLOVET, J. M. et al. Sorafenib in Advanced Hepatocellular Carcinoma. **New England Journal of Medicine**, v. 359, n. 4, p. 378–390, 24 jul. 2008.

LOPEZ, K. T.; KUWADA, S. K.; WONG, L. L. Consequences of needle tract seeding of hepatocellular cancer after liver transplant. **Clinical Transplantation**, v. 27, n. 4, p. E400–E406, jul. 2013.

MAKAROVA-RUSHER, O. V. et al. Population attributable fractions of risk factors for hepatocellular carcinoma in the United States. **Cancer**, v. 122, n. 11, p. 1757–1765, 2016.

MANGUS, R. S. et al. Use of the piggyback hepatectomy technique in liver transplant recipients with hepatocellular carcinoma. **Transplantation**, v. 85, n. 10, p. 1496–1499, 2008.

MARTIN, R. C. G. et al. Sorafenib use for recurrent hepatocellular cancer after resection or transplantation: Observations from a US regional analysis of the GIDEON registry. **The American Journal of Surgery**, v. 213, n. 4, p. 688–695, abr. 2017.

MATHUR, A. et al. Obesity portends increased morbidity and earlier recurrence following liver transplantation for hepatocellular carcinoma. **HPB**, v. 15, n. 7, p. 504–510, jul. 2013.

MATSUDA, Y. et al. Expression of galectin-3 involved in prognosis of patients with hepatocellular carcinoma. **Hepatology Research**, v. 38, n. 11, p. 1098–1111, 2008.

MAZZAFERRO, V. et al. Liver Transplantation for the treatment of small Hepatocellular Carcinomas in Patients With Cirrhosis. **The New England Journal of Medicine**, v. 334, n. 11, p. 693–699, 1996.

MAZZAFERRO, V. et al. Predicting survival after liver transplantation in patients with hepatocellular carcinoma beyond the Milan criteria: a retrospective, exploratory analysis. **The Lancet Oncology**, v. 10, n. 1, p. 35–43, 2009.

MAZZAFERRO, V. et al. Milan criteria in liver transplantation for hepatocellular carcinoma: An evidence-based analysis of 15 years of experience. **Liver Transplantation**, v. 17, n. S2, p. S44–S57, out. 2011.

MEHTA, N. et al. Validation of a Risk Estimation of Tumor Recurrence After Transplant (RETREAT) Score for Hepatocellular Carcinoma Recurrence After Liver Transplant. **JAMA Oncology**, v. 3, n. 4, p. 493-500, 2017.

MEHTA, N. et al. Wait Time of Less Than 6 and Greater Than 18 Months Predicts Hepatocellular Carcinoma Recurrence After Liver Transplantation. **Transplantation**, v. 101, n. 9, p. 2071–2078, set. 2017.

MENON, K. V.; HAKEEM, A. R.; HEATON, N. D. Meta-analysis: recurrence and survival following the use of sirolimus in liver transplantation for hepatocellular carcinoma. **Alimentary Pharmacology & Therapeutics**, v. 37, p.411-419, 2013.

MERANI, S. et al. The impact of waiting list alpha-fetoprotein changes on the outcome of liver transplant for hepatocellular carcinoma. **Journal of Hepatology**, v. 55, n. 4, p. 814–819, 2011.

MESSINA, J. P. et al. Global distribution and prevalence of hepatitis C virus genotypes. **Hepatology**, v. 61, n. 1, p. 77–87, 2015.

MITCHELL, D. G. et al. LI-RADS (Liver Imaging Reporting and Data System): Summary, discussion, and consensus of the LI-RADS Management Working Group and future directions. **Hepatology**, v. 61, n. 3, p. 1056–1065, 2015.

MOHAFAZ, O.M.M.; EL-AZIZ, M.A.; EL-GHANY, A. A. The expression pattern of Galectin-3 in the rat Hepatocellular Carcinoma. **Bulletin of Pharmaceutical Sciences**, v. 34, n. 2, p. 181–187, 2011.

MONTALVÁ, E. M. et al. Prognostic Value of Pre-transplantation Serum Alpha-Fetoprotein Levels in Hepatocellular Carcinoma Recurrence. **Transplantation Proceedings**, v. 48, n. 9, p. 2966–2968, 2016.

MORGAN, R. L. et al. Eradication of Hepatitis C Virus Infection and the Development of Hepatocellular Carcinoma. **Annals of Internal Medicine**, v. 158, n. 5, p. 329-337, 5 mar. 2013.

MOTOMURA, T. et al. Neutrophil-lymphocyte ratio reflects hepatocellular carcinoma recurrence after liver transplantation via inflammatory microenvironment. **Journal of Hepatology**, v. 58, n. 1, p. 58–64, 2013.

NAGAI, S. et al. Peritransplant lymphopenia is a novel prognostic factor in recurrence of hepatocellular carcinoma after liver transplantation. **Transplantation**, v. 97, n. 6, p. 694–701, 2014.

NAGAI, S. et al. Prognosis after recurrence of hepatocellular carcinoma in liver transplantation: Predictors for successful treatment and survival. **Clinical Transplantation**, v. 29, p. 1156–1163, 2015a.

NAGAI, S. et al. Ischemia time impacts recurrence of hepatocellular carcinoma after liver transplantation. **Hepatology**, v. 61, n. 3, p. 895–904, mar. 2015b.

NELSON, P. K. et al. Global epidemiology of hepatitis B and hepatitis C in people who inject drugs: Results of systematic reviews. **The Lancet**, v. 378, n. 9791, p. 571–583, 2011.

NKONTCHOU, G. et al. HCV genotype 3 is associated with a higher hepatocellular carcinoma incidence in patients with ongoing viral C cirrhosis. **Journal of Viral Hepatitis**, v. 18, n. 10, p. e516-e522, 2011.

OTTO, G. et al. How to decide about liver transplantation in patients with hepatocellular carcinoma: Size and number of lesions or response to TACE? **Journal of Hepatology**, v. 59, n. 2, p. 279–284, ago. 2013.

PARK, M.-S. et al. Living-Donor Liver Transplantation Associated With Higher Incidence of Hepatocellular Carcinoma Recurrence Than Deceased-Donor Liver Transplantation. **Transplantation Journal**, v. 97, n. 1, p. 71–77, jan. 2014.

PAWLIK, T. M. et al. Preoperative assessment of hepatocellular carcinoma tumor grade using needle biopsy: Implications for transplant eligibility. **Annals of Surgery**, v. 245, n.3, p.435-442, 2007.

PÉPIN, J. et al. Evolution of the global burden of viral infections from unsafe medical injections, 2000-2010. **PLoS ONE**, v. 9, n. 6, p. 1–8, 2014.

PÉREZ SABORIDO, B. et al. Does Preoperative Fine Needle Aspiration-Biopsy Produce Tumor Recurrence in Patients Following Liver Transplantation for Hepatocellular Carcinoma? **Transplantation Proceedings**, v. 37, n. 9, p. 3874–3877, nov. 2005.

PETRICK, J. L. et al. International trends in liver cancer incidence, overall and by histologic subtype, 1978-2007. **International Journal of Cancer**, v. 139, n. 7, p. 1534–1545, 1 out. 2016.

RABINOVICH, G. A. et al. An Emerging Role for Galectins in Tuning the Immune Response: Lessons from Experimental Models of Inflammatory Disease, Autoimmunity and Cancer. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 66, n. 2–3, p. 143–158, ago. 2007.

RADOSAVLJEVIC, G. D. et al. The two faces of Galectin-3: roles in various pathological conditions. **Serbian Journal of Experimental Clinical Research**, v. 112, n. 173, p. 187–198, 2016.

REIG, M. et al. Unexpected high rate of early tumor recurrence in patients with HCV-related HCC undergoing interferon-free therapy. **Journal of Hepatology**, v. 65, n. 4, p. 719–726, 2016.

RINGE B, PICHLMAYR R, WITTEKIND C, T. G. Surgical Treatment os Hepatocellular Carcinoma: expeirence with Liver Resection and Transplantation em 198 patients. **World Journal of Surgery**, v. 15, p. 270–285, 1991.

ROYAIE, S. et al. Recurrence of Hepatocellular Carcinoma After Liver Transplant :

Patterns and Prognosis. **Liver Transplantation**, v. 10, n. 4, p. 534–540, 2004.

RODRÍGUEZ-PERÁLVAREZ, M. et al. Reduced exposure to calcineurin inhibitors early after liver transplantation prevents recurrence of hepatocellular carcinoma. **Journal of Hepatology**, v. 59, n. 6, p. 1193–1199, dez. 2013.

RODRÍGUEZ-PERÁLVAREZ, M.; DE LA MATA, M.; BURROUGHS, A. K. Liver transplantation: Immunosuppression and oncology. **Current Opinion in Organ Transplantation**, v. 19, n. 3, p. 253–260, 2014.

ROH, Y.-N. et al. The prognosis and treatment outcomes of patients with recurrent hepatocellular carcinoma after liver transplantation. **Clinical Transplantation**, v. 28, n. 1, p. 141–147, jan. 2014.

SÁ, G. P. D. et al. Liver Transplantation for Carcinoma Hepatocellular in São Paulo: 414 Cases By the Milan/Brazil Criteria. **ABCD - Arquivos Brasileiros de Cirurgia Digestiva**, v. 29, n. 4, p. 240–245, 2016.

SAAB, S. et al. Sorafenib as adjuvant therapy for high-risk hepatocellular carcinoma in liver transplant recipients: feasibility and efficacy. **Experimental and clinical transplantation**, v. 8, n. 4, p. 307–13, dez. 2010.

SADLER, E. M. et al. Liver Transplantation for NASH-Related Hepatocellular Carcinoma Versus Non-NASH Etiologies of Hepatocellular Carcinoma. **Transplantation**, v. 102, n. 4, p. 640–647, abr. 2018.

SAMOYLOVA, M. L. et al. Time to Transplantation as a Predictor of Hepatocellular Carcinoma Recurrence After Liver Transplantation. **Liver Transplantation**, v. 20, n. 8, p. 937–944, 2014.

SANGIOVANNI, A. et al. The natural history of compensated cirrhosis due to hepatitis C virus: A 17-year cohort study of 214 patients. **Hepatology**, v. 43, n. 6, p. 1303–1310, 2006.

SAPISOCHIN, G. et al. Benefit of Treating Hepatocellular Carcinoma Recurrence after Liver Transplantation and Analysis of Prognostic Factors for Survival in a Large Euro-American Series. **Annals of Surgical Oncology**, v. 22, n. 7, p. 2286–2294, 4 jul. 2015.

SATAPATHY, S. K. et al. No apparent benefit of preemptive sorafenib therapy in liver transplant recipients with advanced hepatocellular carcinoma on explant. **Clinical transplantation**, v. 32, n. 5, p. e13246, maio 2018.

SCHLANSKY, B. et al. Waiting time predicts survival after liver transplantation for hepatocellular carcinoma: A cohort study using the United Network for Organ Sharing registry. **Liver Transplantation**, v. 20, n. 9, p. 1045–1056, set. 2014.

SCIACCHITANO, S. et al. Galectin-3: One Molecule for an Alphabet of Diseases, from A to Z. **International journal of molecular sciences**, v. 19, n. 2, p. E379, 26 jan. 2018.

SEEFF, L. B. The history of the “natural history” of hepatitis C (1968-2009). **Liver International**, v. 29, n. SUPPL. 1, p. 89–99, 2009.

SEEHOFER, D. et al. Blood Transfusions and Tumor Biopsy May Increase HCC Recurrence Rates after Liver Transplantation. **Journal of Transplantation**, v. 2017, p. 1–9, 2017.

SERIZAWA, N. et al. Galectin 3 regulates HCC cell invasion by RhoA and MLCK activation. **Laboratory Investigation**, v. 95, n. 10, p. 1145–1156, 6 out. 2015.

SHARMA, P. et al. Incidence and risk factors of hepatocellular carcinoma recurrence after liver transplantation in the MELD Era. **Digestive Diseases and Sciences**, 2012.

SIEGEL, A. B. et al. Diabetes, body mass index, and outcomes in hepatocellular carcinoma patients undergoing liver transplantation. **Transplantation**, 2012.

SINGAL, A. G.; PILLAI, A.; TIRO, J. Early Detection, Curative Treatment, and Survival Rates for Hepatocellular Carcinoma Surveillance in Patients with Cirrhosis: A Meta-analysis. **PLoS Medicine**, v. 11, n. 4, 2014.

SONG, L. et al. Galectin-3 in cancer. **Clinica Chimica Acta**, v. 431, p. 185–191, abr. 2014a.

SONG, L. et al. Annexin A7 and its binding protein galectin-3 influence mouse hepatocellular carcinoma cell line *in vitro*. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 68, n. 3, p. 377–384, abr. 2014b.

SPOSITO, C. et al. Comparative efficacy of sorafenib versus best supportive care in recurrent hepatocellular carcinoma after liver transplantation: A case-control study. **Journal of Hepatology**, v. 59, n. 1, p. 59–66, jul. 2013.

STANAWAY, J. D. et al. The global burden of viral hepatitis from 1990 to 2013: findings from the Global Burden of Disease Study 2013. **The Lancet**, v. 388, n. 10049, p. 1081–1088, 2016.

TAKADA, Y. et al. Significance of preoperative fluorodeoxyglucose-positron emission tomography in prediction of tumor recurrence after liver transplantation for hepatocellular carcinoma patients: a Japanese multicenter study. **Journal of Hepato-Biliary-Pancreatic Sciences**, 2017.

TEMPLETON, A. J. et al. Prognostic role of neutrophil-to-lymphocyte ratio in solid tumors: A systematic review and meta-analysis. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 106, n. 6, p. 1–11, 2014.

TENG, C.-L. et al. Sorafenib for hepatocellular carcinoma patients beyond Milan criteria after orthotopic liver transplantation: a case control study. **World Journal of Surgical Oncology**, v. 10, n. 1, p. 41-48, 2012.

THEIN, H. H. et al. Estimation of stage-specific fibrosis progression rates in chronic

hepatitis C virus infection: A meta-analysis and meta-regression. **Hepatology**, v. 48, n. 2, p. 418–431, 2008.

THEISE N.D.; CURADO M.P.; FRANCESCHI S. Hepatocellular carcinoma. In: Bosman FT, Carneiro F, Hruban RH, Theise ND. **WHO classification of tumours of the digestive system**. WHO Press, Geneva, p. 205-216, 2010

THIJSSSEN, V. L. et al. Galectin expression in cancer diagnosis and prognosis: A systematic review. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer**, v. 1855, n. 2, p. 235–247, abr. 2015.

THRIFT, A. P.; EL-SERAG, H. B.; KANWAL, F. Global epidemiology and burden of HCV infection and HCV-related disease. **Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology**, v. 14, n. 2, p. 122–132, 2017.

THULUVATH, P. J. et al. Survival after liver transplantation for hepatocellular carcinoma in the model for end-stage liver disease and pre-model for end-stage liver disease eras and the independent impact of hepatitis C virus. **Liver Transplantation**, v. 15, n. 7, p. 754–762, jul. 2009.

TOSO, C. et al. Factors predicting survival after post-transplant hepatocellular carcinoma recurrence. **Journal of Hepatobiliary Pancreatic Sciences**, v. 20, n. 3, p. 342–347, 2013.

TOSO, C. et al. Total Tumor Volume and Alpha-Fetoprotein for Selection of Transplant Candidates With Hepatocellular Carcinoma: A Prospective Validation. **Hepatology**, v. 62, n. 1, p. 158–165, 2015.

TZARTZEVA, K. et al. Surveillance Imaging and Alpha Fetoprotein for Early Detection of Hepatocellular Carcinoma in Patients With Cirrhosis: A Meta-analysis. **Gastroenterology**, v. 154, n. 6, p. 1706–1718.e1, 2018.

ULU, M. et al. Prognostic significance of serum galectin-3 levels in patients with hepatocellular cancer and chronic viral hepatitis. **Saudi Journal of Gastroenterology**, v. 21, n. 1, p. 47, 2015.

VAGEFI, P. A. et al. Potential role of the donor in hepatocellular carcinoma recurrence after liver transplantation. **Liver Transplantation**, v. 21, n. 2, p. 187–194, fev. 2015.

VASAVADA, B. B.; CHAN, C. L. Rapid fibrosis and significant histologic recurrence of hepatitis C after liver transplant is associated with higher tumor recurrence rates in hepatocellular carcinomas associated with hepatitis C virus-related liver disease: a single center retrospective. **Experimental and clinical transplantation**, v. 13, n. 1, p. 46–50, fev. 2015.

VIBERT, E. et al. Progression of alphafetoprotein before liver transplantation for hepatocellular carcinoma in cirrhotic patients: A critical factor. **American Journal of Transplantation**, v. 10, n. 1, p. 129–137, 2010.

WAGHRAY, A. et al. Safety and efficacy of sorafenib for the treatment of recurrent hepatocellular carcinoma after liver transplantation. **Clinical Transplantation**, v. 27, n. 4, p. 555–561, jul. 2013.

WANG, H. et al. Global, regional, and national life expectancy, all-cause mortality, and cause-specific mortality for 249 causes of death, 1980–2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. **The Lancet**, v. 388, n. 10053, p. 1459–1544, 2016.

WANG, M. et al. Quantitative proteomics reveal the anti-tumour mechanism of the carbohydrate recognition domain of Galectin-3 in Hepatocellular carcinoma. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 5189, 12 dez. 2017.

WANNINGER, J. et al. Systemic and hepatic vein galectin-3 are increased in patients with alcoholic liver cirrhosis and negatively correlate with liver function. **Cytokine**, v. 55, n. 3, p. 435–440, set. 2011.

WAZIRY, R. et al. Hepatocellular carcinoma risk following direct-acting antiviral HCV therapy: A systematic review, meta-analyses, and meta-regression. **Journal of Hepatology**, v. 67, n. 6, p. 1204–1212, 2017.

WESTBROOK, R. H.; DUSHEIKO, G. Natural history of hepatitis C. **Journal of Hepatology**, v. 61, n. 1, p. S58–S68, 2014.

WU, T.-J. et al. Liver Transplantation in Patients with Hepatitis B Virus-Related Hepatocellular Carcinoma: The Influence of Viral Characteristics on Clinical Outcome. **Annals of Surgical Oncology**, 2013.

XIAO, W.-K. et al. Prognostic significance of neutrophil-lymphocyte ratio in hepatocellular carcinoma: a meta-analysis. **BMC Cancer**, 2014.

XU, M. et al. Neoadjuvant Locoregional Therapy and Recurrent Hepatocellular Carcinoma after Liver Transplantation. **Journal of the American College of Surgeons**, v. 225, n. 1, p. 28–40, jul. 2017.

YANG, J. D. et al. Direct acting antiviral therapy and tumor recurrence after liver transplantation for hepatitis C-associated hepatocellular carcinoma. **Journal of Hepatology**, v. 65, n. 4, p. 859–860, 2016.

YANG, J. D. et al. Hepatocellular Carcinoma Is the Most Common Indication for Liver Transplantation and Placement on the Waitlist in the United States. **Clinical Gastroenterology and Hepatology**, v. 15, n. 5, p. 767–775.e3, 2017.

YANG, R.-Y.; RABINOVICH, G. A.; LIU, F.-T. Galectins: structure, function and therapeutic potential. **Expert Reviews in Molecular Medicine**, v. 10, p. e17, 13 dez. 2008.

YAO, F. Y. et al. Liver transplantation for hepatocellular carcinoma: Expansion of the tumor size limits does not adversely impact survival. **Hepatology**, v. 33, n. 6, p. 1394–1403, 2001.

YAO, F. Y. et al. Downstaging of hepatocellular cancer before liver transplant: Long-term outcome compared to tumors within Milan criteria. **Hepatology**, v. 61, n. 6, p. 1968–1977, jun. 2015.

YOO, T. et al. Peri-Transplant Change in AFP Level: a Useful Predictor of Hepatocellular Carcinoma Recurrence Following Liver Transplantation. **Journal of Korean medical science**, v. 31, n. 7, p. 1049–1054, 2016.

ZANETTO, A. et al. Dropout rate from the liver transplant waiting list because of hepatocellular carcinoma progression in hepatitis C virus-infected patients treated with direct-acting antivirals. **Liver Transplantation**, v. 23, n. 9, p. 1103–1112, set. 2017.

ZHANG, B. H.; YANG, B. H.; TANG, Z. Y. Randomized controlled trial of screening for hepatocellular carcinoma. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, v. 130, n. 7, p. 417–422, 2004.

ZHENG, D. et al. Downregulation of galectin-3 causes a decrease in uPAR levels and inhibits the proliferation, migration and invasion of hepatocellular carcinoma cells. **Oncology Reports**, v. 32, n. 1, p. 411–418, jul. 2014.

ZHENG, S.-S. et al. Liver Transplantation for Hepatocellular Carcinoma: Hangzhou Experiences. **Transplantation**, v. 85, n. 12, p. 1726–1732, 27 jun. 2008.

APÊNDICE A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Convidamos o Sr(a). a participar da pesquisa “EXPRESSÃO TECIDUAL DE GALECTINAS COMO FATOR DE RISCO PARA RECORRÊNCIA TUMORAL APÓS TRANSPLANTE HEPÁTICO POR HEPATOCARCINOMA SECUNDÁRIO A HEPATITE C”, sob responsabilidade do pesquisador NORMA ARTEIRO FILGUEIRA, sob orientação da Professora HELOÍSA RAMOS LACERDA DE MELO, que tem por objetivo: Avaliar a associação da expressão tecidual de galectinas em fígados explantados com a recorrência do carcinoma hepatocelular (CHC) pós-transplante. Ou seja, iremos pesquisar no fígado que será retirado por ocasião do transplante determinadas substâncias e avaliar se isso poderá identificar pacientes com maior risco de apresentar recidiva do tumor após o transplante.

Ressaltamos que a possível recusa em participar desse estudo, no início ou em qualquer momento da realização do mesmo, não prejudicará em nada o seu tratamento e acompanhamento na Unidade de Transplante de Fígado, nem terá nenhuma interferência na sua inscrição na lista de espera para transplante hepático.

A realização deste trabalho seguirá as seguintes etapas:

- Preenchimento de questionário com base nos dados da sua doença e nos exames realizados
- Análise do material do fígado explantado (retirado por ocasião do transplante), através de histopatologia e imuno-histoquímica.
- Acompanhamento após o transplante, através de consultas médicas periódicas com a pesquisadora e realização de exames do protocolo habitual de acompanhamento do paciente transplantado para tratamento do carcinoma hepatocelular.

Quanto aos riscos e desconfortos, o Sr(a). poderá se sentir constrangido(a) em prestar informações sobre seus sintomas e dados da sua doença e poderá ficar ansioso(a) pela realização de exames de acompanhamento. Caso o(a) Sr(a). venha a sentir algo dentro desses padrões, comunique ao pesquisador para que sejam tomadas as devidas providências, como receber orientações, em qualquer momento, sobre a necessidade de realizar os exames de acompanhamento e a garantia de confidencialidade sobre os dados fornecidos.

Os benefícios esperados com o resultado desta pesquisa são identificar uma forma de prever que pacientes poderão apresentar recorrência do tumor após o transplante, para que esses possam ser melhor acompanhados e tratados.

Esclarecemos que manteremos em anonimato, sob sigilo absoluto, durante e após o término do estudo, todos os dados que possam lhe identificar, usando apenas, para divulgação, os dados inerentes ao desenvolvimento do estudo. Informamos também que após o término da pesquisa, serão destruídos de todo e qualquer tipo de mídia que possa vir a identificá-lo tais como filmagens, fotos, gravações, etc., não restando nada que venha a comprometer o anonimato de sua participação agora ou futuramente.

O(A) senhor(a) terá os seguintes direitos: a garantia de esclarecimento e resposta a qualquer pergunta; a liberdade de abandonar a pesquisa a qualquer momento sem prejuízo para si ou para seu tratamento; a garantia de que em caso de haver algum dano a sua pessoa, os prejuízos serão assumidos pelos pesquisadores ou pela instituição responsável, inclusive acompanhamento médico e hospitalar. Caso haja gastos adicionais, os mesmos serão absorvidos pelo pesquisador.

Nos casos de dúvidas e esclarecimentos o(a) senhor(a) deve procurar os pesquisadores a) Norma Arteiro Filgueira, na Unidade de Transplante de Fígado do Hospital Universitário Oswaldo Cruz, Pavilhão Amaury de Medeiros, situado na Rua Arnóbio Marques, 310, Santo Amaro, Recife – PE, CEP 50100-130, telefone (81) 31841484, pelo e-mail (norma.arteiro@hotmail.com) ou pelo celular (81-82457702) e 2) Heloísa Ramos Lacerda de Melo, pelo e-mail (helramos@terra.com.br).

Caso suas dúvidas não sejam resolvidas pelos pesquisadores ou seus direitos sejam negados, favor recorrer ao Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da UFPE no endereço: Avenida da Engenharia s/n – 1º Andar, sala 4 - Cidade Universitária, Recife-PE, CEP: 50740-600, Tel.: (81) 2126.8588 – e-mail: cepccs@ufpe.br ou ao Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade de Pernambuco, localizado à Av. Agamenon Magalhães, S/N, Santo Amaro, Recife-PE, telefone 81-3183-3775 ou ainda através do e-mail comite.etica@upe.br.

Consentimento Livre e Esclarecido

Eu _____, após ter recebido todos os esclarecimentos e ciente dos meus direitos, concordo em participar desta pesquisa, bem como autorizo a divulgação e a publicação de toda informação por mim transmitida, exceto dados pessoais, em publicações e eventos de caráter científico. Desta forma, assino este termo, juntamente com o pesquisador, em duas vias de igual teor, ficando uma via sob meu poder e outra em poder do(s) pesquisador (es).

Local: Data: // / ____

Dra. Norma Arteiro Filgueira

APÊNDICE B – FORMULÁRIO DE COLETA DE DADOS

FORMULÁRIO DE COLETA DE DADOS					
PRONTUARIO		SEXO: MASC FEM		DT NASC:	
NOME					
ENDEREÇO			TELEFONES		
MÉDICO ASSISTENTE					
CLASSSGNEA: 1-A, 2-B, 3-O, 4-AB			PROCEDÊNCIA:		
ETIOLOGIA					
DATA DGTCO CHC		DATA LISTAGEM		DATA TX	
COMORBIDADES: DMHAS OBESIDADE TABAGISMO					
DA HEPATITE C:					
GENÓTIPO: 1 2 3 S/I			TTOPREVIO: SIM NÃO S/I		
VIREMIA NO TX: SIM NÃO S/I					
DOS EXAMES PRÉ-TX:					
PRIMEIRA IMAGEM: CT RM ART			DATA:		
Nº NODULOS			TAMANHO MAIOR NÓD:		
INVASÃO VASC OU EXTRA-HEP: SIM NÃO S/I				MILÃO:	
ULTIMA IMAGEM: CT RM ART			DATA:		
Nº NODULOS			TAMANHO MAIOR NÓD:		
INVASÃO VASC OU EXTRA-HEP: SIM NÃO DESC				MILÃO:	
ALFAFETO:	1. DATA		RESULTADO		
	2. DATA		RESULTADO		
	3. DATA		RESULTADO		
CINTILO OSSEA:	DATA		RESULTADO		
TCTORAX:	DATA		RESULTADO		
BIOPSIA TU:	SIM	NÃO	PERCUT	LAPAROSC	RESULTADO
DO TRATAMENTO PRE-TX:					
TRATPONTE? SIM NÃO S/I					
RESSECÇÃO	DATA		HISTOLÓGICO		
TACE	Nº SESSÕES		DATA ÚLTIMA		
SORAFENIB	DOSE		DURAÇÃO		
ALCOOLIZAÇÃO	Nº SESSÕES		DATA ÚLTIMA		
RADIOFREQ	Nº SESSÕES		DATA ÚLTIMA		
DOWNSTAGING? SIM NÃO S/I					
DO DOADOR:		CADÁVER		INTERVIVOS	IDADE

CAUSA MORTIS		PROCEDENCIA	
DO RECEPTOR: LINFOCITOS		MELD PURO	
TEMPO ISQFRIA		TEMPO CIRURGICO	
RECONST VASC: CONV PIGGYBACK		TRANSFUSÃO: SIM NÃO	
DO EXPLANTE: CONFIRMOU CHC: SIM NÃO			
Nº NODULOS:		DIST NÓD: UNILOBAR BILOBAR	
TAMANHO MAIOR NÓD:		SOMA NÓD:	
DIFERENCIAÇÃO: BEM MED MAL INDIF		INVASÃO VASC:	
NÓD DISPLÁSICOS: SIM NÃO		MILÃO: IN OUT	
DA GALECTINA 3:			
NEGATIVO		POSITIVO	
DUCTOS:		PARÊNQUIMA:	
PERCENTUAL DE MARCAÇÃO:		GRAU DE MARCAÇÃO:	
INTENSIDADE DE MARCAÇÃO:		PADRÃO:	
PÓS-TRANSPLANTE:			
LINFOCITOS 1ºM:		FK 1ºMÊS	
TRATAMENTO HCV:			
USO DE INIB MTOR:			
AFP		USG	
CT TORAX			
6º MÊS			
12º MÊS			
18º MÊS			
24º MÊS			
ABDOME:	DATA	TIPO: CT RM	
	DATA	TIPO: CT RM	
	DATA	TIPO: CT RM	
	DATA	TIPO: CT RM	
DO DESFECHO: RECORRÊNCIA TUMORAL: SIM NÃO QUANDO?			
LOCAL RECORRÊNCIA		ÚLTIMO CONTATO:	
ÓBITO: DATA		CAUSA	
STATUS FINAL:	PERDA DE SEGUIMENTO	ÓBITO TUMOR	ÓBITO
	OUTRO		
	VIVO SEM TUMOR	VIVO COM TUMOR	

APÊNDICE C – RESULTADOS SUPLEMENTARES

Figura 1 – Estados federativos de procedência dos pacientes com CHC submetidos a transplante hepático



Fonte: A autora

Tabela 1 - Etiologia da doença hepática de base de 148 pacientes com CHC submetidos a transplante hepático

Etiologia	Número	%
Hepatite C	61	41,2
Cirrose alcoólica	27	18,2
Doença hepática gordurosa não alcoólica	19	12,8
Associação de hepatite C e doença alcoólica	16	10,8
Hepatite B	15	10,1
Cirrose criptogênica	6	4,1
Outros	4	2,8
Total	148	100,0

Tabela 2 - Características da hepatite C em pacientes com CHC submetidos a transplante hepático

Característica	Número	%
Pacientes com hepatite C	77	100%
Genótipo		
1	34	44,1%
2	1	1,3%
3	19	24,7%
Missing	23	29,9%
Tratamento antiviral prévio		
Sim	39	50,6%
Não	24	31,2%
Missing	14	18,2%
Viremia por ocasião do transplante		
Sim	59	76,6%
Não	8	10,4%
Missing	10	13,0%
Tratamento antiviral após transplante		
Esquemas à base de interferon	1	1,3%
Esquemas com drogas antivirais de ação direta	27	35,1%
Sem tratamento	48	62,3%
Missing	1	1,3%

Tabela 3 - Informações relativas ao procedimento cirúrgico de pacientes com CHC submetidos a transplante hepático

Característica	Mediana
Tempo de fila de espera	84 dias
Tempo cirúrgico	315 minutos
Tempo de isquemia fria	384 minutos
Tempo de isquemia quente	36 minutos
Idade do doador	42 anos

Tabela 4 – Relação dos pacientes com CHC submetidos a transplante hepático, que apresentam tumores Gal3-positivos

NOME	SEXO	IDADE	ETIOLOGIA	INV	CM	RT	STATUS FINAL	SG	SLR	PERC	MARCAÇÃO
JFS	M	62	ALCOOL	SIM	OUT	SIM	OBITO TUMOR	3,1	1,9	25-50%	MODERADA
AFS	M	64	ALCOOL	SIM	IN	S/I	PERDA DE SEGUIMENTO	13,3	13,3	5-25%	MODERADA
APMA	M	55	ALCOOL	SIM	OUT	NÃO	VIVO SEM TUMOR	36,4	36,4	5-25%	MODERADA
BPN	M	48	ALCOOL	NÃO	IN	S/I	PERDA DE SEGUIMENTO	41,4	41,4	5-25%	MODERADA
MMPC	M	64	ALCOOL	NÃO	IN	NÃO	VIVO SEM TUMOR	57,3	57,3	25-50%	INTENSA
ETCM	M	66	ALCOOL	SIM	OUT	S/I	PERDA DE SEGUIMENTO	61,6	49,7	5-25%	MODERADA
MAGN	M	58	ALCOOL	NÃO	IN	NÃO	VIVO SEM TUMOR	69,5	69,5	5-25%	INTENSA
VDS	M	63	ALCOOL	S/I	OUT	NÃO	OBITO OUTRO	72,2	72,2	5-25%	FRACA
EMC	M	62	CRIPTO	S/I	OUT	NÃO	OBITO OUTRO	1,1	1,1	5-25%	FRACA
JPPN	M	54	EHE	SIM	IN	SIM	OBITO TUMOR	50,3	26,7	25-50%	INTENSA
EAO	M	65	HBV	SIM	OUT	SIM	OBITO TUMOR	11,8	8,1	> 50%	INTENSA
MGM	F	49	HBV	SIM	IN	SIM	VIVO COM TUMOR	15,8	4,3	25-50%	INTENSA
AA	M	66	HBV	SIM	OUT	SIM	OBITO TUMOR	18,5	11,5	25-50%	INTENSA
ELO	M	67	HBV	SIM	OUT	SIM	OBITO TUMOR	22,7	4,4	5-25%	INTENSA
JRS	M	54	HBV	SIM	IN	SIM	VIVO COM TUMOR	26,4	7,7	5-25%	INTENSA
MCS	F	74	HBV	NÃO	IN	NÃO	VIVO SEM TUMOR	87,2	87,2	5-25%	INTENSA
JES	M	50	HBV	NÃO	IN	NÃO	VIVO SEM TUMOR	97,2	97,2	25-50%	INTENSA
CAPM	M	60	HCV	SIM	IN	NÃO	OBITO OUTRO	0	0	5-25%	INTENSA
AMGS	F	68	HCV	SIM	IN	NÃO	OBITO OUTRO	0,1	0,1	> 50%	INTENSA
LCMD	M	67	HCV	SIM	OUT	NÃO	OBITO OUTRO	0,2	0,2	5-25%	MODERADA
MGPSR	M	59	HCV	SIM	OUT	SIM	OBITO TUMOR	3,2	2,2	> 50%	FRACA
JSM	M	54	HCV	S/I	OUT	NÃO	OBITO OUTRO	5,5	5,5	5-25%	INTENSA
JRSA	F	66	HCV	NÃO	IN	SIM	OBITO TUMOR	12,6	10,5	5-25%	FRACA
GRS	M	52	HCV	SIM	OUT	SIM	OBITO TUMOR	15,8	12,1	> 50%	INTENSA
MEFS	F	60	HCV	SIM	IN	SIM	OBITO TUMOR	18,4	6,3	5-25%	MODERADA
LMS	F	58	HCV	SIM	OUT	NÃO	VIVO SEM TUMOR	30,9	30,9	25-50%	FRACA
LCA	F	59	HCV	SIM	IN	NÃO	VIVO SEM TUMOR	73,5	73,5	5-25%	MODERADA
JFF	M	63	HCV	NÃO	IN	NÃO	VIVO SEM TUMOR	83,1	83,1	25-50%	INTENSA
GVS	M	62	HCV + ALC	SIM	IN	NÃO	OBITO OUTRO	0,5	0,5	5-25%	MODERADA
RMS	F	44	HCV + ALC	SIM	OUT	NÃO	OBITO OUTRO	6	6	25-50%	INTENSA
JCC	M	54	HCV + ALC	S/I	OUT	SIM	OBITO TUMOR	8,2	6,8	> 50%	INTENSA
LCPM	M	57	HCV + ALC	SIM	OUT	NÃO	VIVO SEM TUMOR	20,5	20,5	5-25%	MODERADA
JBFQ	M	68	DHGNA	SIM	OUT	NÃO	VIVO SEM TUMOR	13,7	13,7	25-50%	MODERADA
FJS	M	73	DHGNA	NÃO	IN	NÃO	VIVO SEM TUMOR	27,1	27,1	> 50%	FRACA
CAFA	M	49	DHGNA	SIM	IN	NÃO	VIVO SEM TUMOR	38,5	38,5	> 50%	INTENSA
MAAC	M	58	DHGNA	SIM	OUT	NÃO	VIVO SEM TUMOR	64,1	64,1	5-25%	MODERADA

CHC, carcinoma hepatocelular; Gal3, galectina 3; INV, invasão vascular; CM, critérios de Milão; RT, recorrência tumoral; SG, sobrevida global (em meses); SLR, sobrevida livre de recorrência (em meses); PERC, percentual de células marcadas pela Gal3; CRIPTO, cirrose criptogênica; EHE, esquistossomose hepatoesplênica; HBV, hepatite B; HCV, hepatite C; HCV+ALC, hepatite C + álcool; DHGNA, doença hepática gordurosa não alcoólica; S/I, sem informações

Tabela 5 – Relação dos pacientes com CHC que desenvolveram recorrência tumoral após transplante hepático

NOME	ETIOL	SEXO	IDADE	AFP PRÉ	CM	INV	TEMPREC	LOCREC	AFP PÓS	PULM	OSSO	GAL3	SG	SLR
ABG	ALCOOL	M	52	681	OUT	NÃO	PRECOCE	EXTRA	41	NÃO	SIM	-	13	2,7
AAS	HCV	M	54	365	OUT	SIM	PRECOCE	EXTRA	11693	NÃO	SIM	NEG	4,5	2
AAS	HBV	M	66	27	OUT	SIM	PRECOCE	AMBOS	7752	SIM	SIM	POS	18,5	7
AFN	ALCOOL	M	58	1749	OUT	SIM	PRECOCE	AMBOS	4	SIM	NÃO	NEG	4,5	2,7
CAM	HCV	M	62	8	OUT	SIM	PRECOCE	AMBOS	2	SIM	NÃO	NEG	56,5	52,3
CRS	HCV	M	59	14	IN	NÃO	TARDIA	EXTRA	316	NÃO	NÃO	NEG	30,3	12,6
DIS	HCV	M	70	23	IN	SIM	PRECOCE	ENXERTO	-	NÃO	NÃO	NEG	7,9	0,4
EMM	HCV	M	67	19	OUT	SIM	TARDIA	AMBOS	6	SIM	SIM	NEG	42,7	2,4
EAO	HBV	M	64	13	OUT	SIM	PRECOCE	EXTRA	33	SIM	NÃO	POS	11,8	3,7
ELO	HBV	M	66	7537	OUT	SIM	PRECOCE	AMBOS	25400	SIM	NÃO	POS	22,7	18,3
EJS	HBV	M	62	34000	OUT	SIM	TARDIA	AMBOS	5	NÃO	NÃO	-	43,3	0,3
GRS	HCV	M	51	4	OUT	SIM	PRECOCE	EXTRA	4	SIM	NÃO	POS	15,8	3,7
GMF	HCV	M	51	25	OUT	NÃO	TARDIA	EXTRA	21	NÃO	SIM	NEG	53,3	11,8
GPB	HCV	M	67	1273	IN	NÃO	TARDIA	AMBOS	-	NÃO	SIM	NEG	45	6,4
HCL	HBV	M	55	400	OUT	SIM	PRECOCE	ENXERTO	157	NÃO	NÃO	-	18	8,1
IFS	HCV	F	52	18	IN	NÃO	TARDIA	AMBOS	2	SIM	SIM	-	73,4	59,5
JRS	HBV	M	53	11541	IN	SIM	PRECOCE	EXTRA	270	NÃO	NÃO	POS	26,4	18,6
JX	HCV	M	63	2	IN	NÃO	TARDIA	AMBOS	2	NÃO	NÃO	NEG	56,4	29,5
JBS	HCV	M	63	1730	OUT	SIM	TARDIA	EXTRA	4798	NÃO	SIM	NEG	18,5	4,7
JBC	ALCOOL	M	67	185	IN	NÃO	TARDIA	EXTRA	571	NÃO	NÃO	-	99,4	30,5
JCC	HCV	M	54	8	OUT	-	PRECOCE	EXTRA	2	SIM	SIM	POS	8,2	1,4
JFS	ALCOOL	M	62	705	OUT	SIM	PRECOCE	EXTRA	1200	NÃO	SIM	POS	3,1	1,2
JLS	ALCOOL	M	67	17	OUT	SIM	TARDIA	EXTRA	3	NÃO	NÃO	NEG	92,2	63,3
JPPN	EHE	M	54	123	IN	SIM	TARDIA	EXTRA	6407	SIM	SIM	POS	50,3	23,6
JRSA	HCV	F	65	398	IN	NÃO	PRECOCE	AMBOS	30	SIM	SIM	POS	12,6	2,2
LVS	HCV	M	67	4	OUT	-	TARDIA	AMBOS	11260	NÃO	SIM	NEG	79,4	21,2
LGN	HCV	M	59	899	OUT	SIM	TARDIA	AMBOS	425	NÃO	SIM	NEG	64,9	44,1
MJS	HCV	M	59	7	IN	SIM	TARDIA	AMBOS	5	SIM	SIM	NEG	29,6	10,1
ME	HCV	F	59	2434	IN	SIM	PRECOCE	AMBOS	70400	SIM	SIM	POS	18,4	12,1
MJPSR	HCV	M	58	58	OUT	SIM	PRECOCE	EXTRA	100	SIM	NÃO	POS	3,2	1
MGM	HBV	F	48	648	IN	SIM	PRECOCE	AMBOS	1051	SIM	SIM	POS	15,8	11,5
MCS	HCV	M	59	5	OUT	-	TARDIA	AMBOS	4	NÃO	NÃO	NEG	23,5	8,4
MLA	HCV	M	48	71	OUT	SIM	TARDIA	EXTRA	-	SIM	NÃO	NEG	14,2	0,8
NVA	HCV	M	74	6	IN	SIM	TARDIA	EXTRA	1	NÃO	NÃO	NEG	27,9	11,9
RGS	HCV	M	69	86	OUT	SIM	PRECOCE	AMBOS	11	SIM	NÃO	NEG	24,9	15
VC	ALCOOL	M	61	29	OUT	SIM	TARDIA	AMBOS	3	NÃO	NÃO	NEG	41	14,6

CHC, carcinoma hepatocelular; ETIOL, etiologia da hepatopatia de base; AFP PRÉ, valor da alfa fetoproteína antes do transplante; CM, critérios de Milão; INV, invasão vascular; TEMPREC, tempo de diagnóstico da recorrência; LOCREC, local de recorrência tumoral; AFP PÓS, valor de alfa fetoproteína após a recorrência tumoral; PULM; metástase pulmonar; OSSO, metástase óssea; GAL3, galectina 3; SG, sobrevida global em meses; SLR, sobrevida livre de recorrência em meses; HBV, hepatite B; HCV, hepatite C; EHE, esquistossomose hepatoesplênica; EXTRA, metástase extra-hepática; POS, positivo; NEG, negativo

APÊNDICE D – VERSÃO DO ARTIGO 1 EM INGLÊS

Artigo submetido ao Journal of Hepatology (Elsevier)

Title:

Galectin 3 is a Risk Factor for Hepatocellular Carcinoma Recurrence after Liver Transplantation

Authors:

Norma Arteiro Filgueira^{1,2,3}, Matheus Filgueira Bezerra⁴, Norma Thomé Jucá^{3,5}, Erika Cavalcante Maranhão⁵, Olival CI Fonseca-Neto³, Laécio Leitão³, Roberto Souza de Lemos³, Claudio Moura Lacerda³, Heloísa Ramos Lacerda^{1,2,6}

Affiliation:

¹ Tropical Medicine Post-Graduation Program, Federal University of Pernambuco

² Internal Medicine Department, Federal University of Pernambuco

³ Liver Transplantation Unit, Oswaldo Cruz Hospital, Pernambuco University

⁴ Keizo Asami Immunopathology Laboratory, Federal University of Pernambuco

⁵ Pathology Department, Hospital das Clínicas, Federal University of Pernambuco

⁶ Clinical Medicine Department, Pernambuco University

Corresponding author:

NORMA ARTEIRO FILGUEIRA, Av. Beira Rio, nº 591, apto 501, Madalena, Recife – PE, Brazil, CEP 50.610-100, Phone: 55-81-999754958, e-mail: norma.arteiro@hotmail.com

Keywords:

Hepatocellular carcinoma – Liver transplantation – Galectin 3 – Recurrence – Survival analysis – cohort studies

Grant support:

None

Disclosures:

Authors have no conflict of interest to declare

ABSTRACT

Introduction: In current clinical practice, hepatocellular carcinoma (HCC) recurrence occurs in 10 to 20% of patients submitted to liver transplantation. Post-transplant prognosis is based on traditional histopathological data, however, such approach is rather limited, since it does not consider tumour biological behaviour. Therefore, it is necessary to study potential biomarkers that may refine prognosis, improving post-transplant care and early detection of tumour recurrence. Here, we investigated galectin 3 expression in tumour cells from HCC patients submitted to liver transplantation in a Northeast Brazil referral center and evaluated its association with histological findings, tumour recurrence and recurrence free survival.

Patients and Methods: An ambispective cohort study included 142 HCC patients submitted to liver transplantation and post-transplant follow-up in a Brazilian Reference Centre. Galectin 3 expression was evaluated in tumour nodules from the explanted liver by immunohistochemistry (IHC).

Results: After a median follow-up of 33 months, tumour recurrence occurred in 31 cases (7.92/100 person-years). Galectin 3 expression in tumour cells was detected in 36 cases (24.3%) and was independently associated with vascular invasion (OR 3.49; 95% CI 1.24-9.79; $p=0.018$) and previous hepatitis B infection (OR 3.42; 95% CI 1.06 – 11.02; $p=0.039$). Galectin 3 expression, when combined to vascular invasion, was independently associated with a higher post-transplant risk of recurrence (HR 5.88; 95% IC 1.81-19.12; $p=0.003$) and shorter recurrence free survival ($p < 0.001$).

Conclusion: Results from our setting bring new insights into the synergic effect of galectin 3 and vascular invasion in increasing HCC recurrence risk after liver transplantation.

LAY SUMMARY

Liver transplantation is considered first line therapy for cirrhotic patients with unresectable Hepatocellular carcinoma (HCC). Despite use of rigid criteria for selection of candidates for liver transplantation, tumour recurrence still develops in 10 to 20% of cases. Galectin 3 is a glycoprotein that is involved in many steps of carcinogenesis. We report the results of a cohort study on the incidence of post-transplant HCC recurrence, clearly indicating that galectin 3, when combined to

vascular invasion increases risk of recurrence and decreases recurrence-free survival.

INTRODUCTION

Liver cancer is the sixth most common neoplasia in the World and the fourth cause of cancer-related death (1). In 2015 there were approximately 810,000 deaths by this condition (2). Over the last decades, liver cancer incidence decreased in developing regions, such as China and Sub-Saharan Africa, while it ascended in North America and Europe. This dynamic is mostly attributed to both hepatitis B immunization campaigns in the developing world and rise of hepatitis C and non-alcoholic fat liver disease in the occident (1).

Hepatocellular carcinoma (HCC) represents 80% of liver cancer cases (3) and typically develops from a previous cirrhotic liver. This peculiarity has a major impact in disease staging and treatment, since hepatic function must be considered together with tumour characteristics (4). Liver transplantation (LT) is considered the first line treatment for HCC in cirrhotic livers, tackling simultaneously both tumour and liver cirrhosis.

In the last years, 12 to 18% of LT were performed to treat HCC in Europeans and North-American Transplant Centre (5) (6). In an effort to improve survival with the reduced amount of available livers, there are strict morphology-based criteria to select HCC patients for LT. However, from 10 to 20% of transplanted patients still develop tumour recurrence (7), exposing the need for new markers that translate the biological behaviour of the tumour and may refine prognosis, improving prevention and treatment of recurrence.

Galectins constitute a protein family widely expressed in mammals and characterized by the capability to bind to glycopeptides containing β -galactosides. Galectin 3 (Gal3) is one of the most well studied galectin and has been associated with several clinical conditions and carcinogenesis (8).

In vitro assays demonstrated that HCC cells overexpressing Gal3 presented increased proliferation, migration and invasion and reduced apoptosis (9) (10) (11) (12) (13). Two Asiatic clinical studies found that Gal3 detection by IHC was associated with a worst survival in HCC patients submitted to tumour resection (14)

(11). To date, there are no data available for Gal3 expression in HCC patients from the Western World, nor in patients treated by LT.

The aim of this study was to evaluate Gal3 expression in tumour cells from HCC patients submitted to LT in a Northeast Brazil Referral Centre and analyse its association with histological features, tumour recurrence (TR) and recurrence free survival (RFS).

PATIENTS AND METHODS

Study design and patient population

An ambispective cohort study, started at November 2014, included patients diagnosed with the classical form of HCC and submitted to LT at Liver Transplantation Unit of Oswaldo Cruz University Hospital, Recife, Brazil, between 1999 and 2016. Cases with no available paraffin-embedded samples or no viable tumour cells in the explanted specimens were excluded. Minimum follow-up was one year, closing at December 31th, 2017.

Follow-up protocol

Patients from the prospective arm were submitted to a specific follow-up protocol, including Alpha fetoprotein (AFP) measurement, chest tomography and abdomen tomography or magnetic resonance every six months for two years and annually thereafter until the fifth year. Bone scintigraphy was performed in patients with any suspected symptom or sign of recurrence. Retrospective patients were included in the follow-up protocol after November 2014.

Ethical issues

According to the declaration of Helsinki, the study initiated only after the project's approval by the Ethical Committee of Federal University of Pernambuco (CAAE 34576814.0.0000.5208) and Oswaldo Cruz University Hospital (CAAE 34576814.0.3002.5192). Patients were included upon written informed consent. In case of deceased or inaccessible patients, clinical data was obtained from medical files or death certificates, by legal authorization.

Explanted liver analysis and Gal3 detection

The explants were submitted to conventional histopathological analysis and immunohistochemistry targeting Gal3. The explanted liver was submitted to cross-section cuts with 1.0 to 1.5 cm thickness to detect, count and measure tumour nodules. Microscopic analysis, performed by the same pathologist, determined the neoplastic nature of the node, the presence of vascular invasion and the degree of cell differentiation. Only the nodules with viable tumour cells were considered for analysis. Tumour staging was based on Milan criteria (MC) (7).

For Gal3 detection, IHC with the anti-Gal3 monoclonal antibody (mouse IgG , clone H-5 SC 374253, *Santa Cruz Biotechnology*, Dallas, EUA) diluted 1:300 was used. HCC samples embedded in paraffin were cut in 6µm thick pieces and dewaxed with xylene and rehydrated with ethanol. Immunohistochemistry was performed with *Spring reveal*® (*Spring Biosciences Corporation*, Pleasanton, EUA) according to the manufacturer instructions. Antigen retrieve was performed in citrate buffer, pH 6.0 with heat for 30 minutes. Gal3 expression was categorized in negative (less than 5% of positive cells) or positive. Positive cases were also characterized according to staining intensity, percentage of stained cells and antigen location (cytoplasmic, nuclear or both). In order to reduce the risk of bias, IHC analysis was performed by a single pathologist unaware of the clinical features from each case, only after the end of the cohort.

Variables

Tumour recurrence (TR) was defined according to the following criteria: histological identification of HCC cells in the graft or other organs, appearance of a lesion suggestive of HCC-metastasis at imaging studies, association of ascending levels of AFP with suggestive symptoms or information from medical files or death certificates. The recurrence date was defined by the first appearance of recurrent lesions in imaging exams. Early recurrence was defined as recurrence within one year post LT.

Recurrence free survival (RFS) was considered the time (in months) from LT to TR, non-cancer related death, last appointment or cohort's end. Other included clinical variables were: sex, age at transplantation, MELD value, last AFP measurement before transplant, pre-transplant lymphocyte count, bridging therapy and aetiology (viral versus non-viral). Waiting time was defined as time in days from registration in the Nacional Transplant System to LT, in case of patients who were

already in list before detecting the cancer, it was considered the time between granting MELD exception and LT. Incidental tumours were excluded from the waiting time analysis.

Surgical data, such as cold and warm ischemia time, donor's age, blood transfusion during LT and surgical technique were also evaluated. The histological variables were number of nodules, diameter of the largest nodule, differentiation grade, tumour necrosis, vascular invasion, Gal3 expression and staging according to Milan Criteria. In the post-LT period, were investigated: first month-peak tacrolimus trough concentration, use of mTOR inhibitors and lymphocyte count at the end of the first month post-LT.

Statistical analysis

Data are presented as medians or proportions. Quantitative variables were categorized according to reference value of laboratory method, median values or pre-established criteria. Categorical variables were analysed by Pearson's chi-square or Fisher's exact test and odds ratio values were adjusted by multiple logistic regression and reported with a confidence interval (CI) of 95%. Because vascular invasion showed an intervening variable behaviour in Gal3 association with recurrence, both were combined as a new variable. Recurrence free survival probabilities were estimated using Kaplan-Meier and comparisons were performed by log-rank test. Hazard ratios were determined by Cox's proportional regression and reported with a 95% CI. The maximum probability of error for rejection of the null hypothesis was set at 5% ($p < 0.05$). The data was entered into Microsoft Excel® 2010 worksheets and statistical analysis was performed with the Survival package of the R program for Windows®, version 3.2.2 (2015-R Foundation for Statistical Computing).

RESULTS

Cohort characterization

Between 1999 e 2016, the Liver Transplant Unit staff performed 981 transplants, of which, 250 (25.5%) were due to HCC. Explant analysis excluded HCC diagnosis in 19 of these cases (7.6%). Paraffin embedded samples from 57 patients were not available and 26 cases were not eligible due to extensive tumour necrosis. Therefore, 148 patients were investigated for Gal3 expression. Follow-up was lost in six cases that were excluded from survival analysis (Figure S1).

Clinical features from transplanted HCC patients are shown in Table 1. Median age at LT was 63 years and ranged from 42 to 75 years. Seventy eight percent of the patients were male, 52% had C hepatitis, 58% were older than 60 years, and 65% had AFP levels above 10 ng/ml. Waiting time ranged from three to 975 days (median 84 days) and 75 (52.4%) patients were transplanted in less than 90 days. Bridging therapy information was available in 131 patients, of which 102 (78%) received treatment prior to transplant and 98 (96%) of those were submitted to transarterial chemoembolization. Eighteen patients received transplant indication after downstaging. Less than 10% of the grafts suffered cold ischemia time longer than 600 minutes or warm ischemia time longer than 50 minutes. Blood transfusion was performed during transplant in 74 patients (56.1%).

According to explant analysis, 50 patients (33.8%) had tumour beyond Milan's criteria, of which, 29 (19.7%) had more than three nodules and in 20 (13.6%) diameter of the largest nodule was more than 5 cm. Vascular invasion was identified in 73 (53.7%) cases, of which 13 (9.6%) were macrovascular invasion. Only seven (5%) cases showed poorly-differentiated tumours.

Twenty three patients (20.7%) used mTOR inhibitors alone or combined to calcinerin inhibitor for postoperative immunosuppression. Tacrolimus levels in first month post-LT were available in 119 cases and was higher than 10ng/ml in 65 (54.6%) patients. Severe lymphopenia (less than 500 cells/mm³) was rarely observed.

Galectin 3 tissue expression

IHC analysis of non-tumour cells revealed expression of Gal3 in ductal cells of 83.9% cases (Figure 1C) and in the regenerative nodules of 60.4%, showing a periphery-oriented gradual expression profile.

Galectin 3 expression in tumour nodules was rather heterogeneous, varying in intensity in different areas of the tumour. Thirty six patients (24.3%) showed cytoplasmic expression of Gal3, while five (13.9%) had both cytoplasmic and nuclear expression.

From the 73 tumours with vascular invasion, 24 (32.9%) also expressed galectin 3, while only eight (12.7%) of the tumours without vascular invasion expressed it.

Galectin 3 expression and clinical/histological features in HCC

Table 3 presents the associations between Gal3 and HCC clinic-histological characteristics. Galectin 3 expression was more frequent in patients with Hepatitis B than other aetiologies (OR 3.14; 95% CI 1.05 – 9.38; $p = 0.033$). On the other hand, no association with Hepatitis C was observed.

Concerning histological features, Gal3 expression was associated with vascular invasion (OR 3.37; 95% CI 1.39 – 8.18; $p = 0.006$) and tumours beyond Milan criteria (OR 2.5; 95% CI 1.16 – 5.4; $p = 0.018$). Galectin 3 expression also tended to be associated with cellular differentiation (OR 4.43; 95% CI 0.94 – 20.87; $p = 0.06$), but not with diameter/number of nodules.

Multivariate analysis confirmed an independent association between Gal3 expression and hepatitis B infection (OR 3.42; 95% CI 1.06 – 11.02; $p = 0.039$) and vascular invasion (OR 3.49; 95% CI 1.24 – 9.79; $p = 0.018$). Hepatitis B infection and vascular invasion were observed in 19.4% and 75% of Gal3-positive tumours and 7.1% and 47.1% in Gal3-negative tumours, respectively (Figure 2).

Tumour recurrence

Average follow-up time after LT was 33 months, ranging from one day to 10.2 years. During the follow-up, were observed 31 cases of tumour recurrence (TR), with incidence rate of 7.92 recurrences/ 100 person-years (95% CI 5.6 – 11.3). By stratifying cases according to primary hepatic disease, RT incidence rate was 11.8/100 person-years (95% CI 4.9 – 28.3) in Hepatitis B patients, 10.0/100 person-years (95% CI 6.5-15.3) in hepatitis C patients and 3.6/100 person-years (95% CI 1.5-8.6) in non-viral cases. When stratified according to Gal3 expression, incidence rate was 16.2/100 person-years (95% CI 9.2 – 28.6) in Gal3-positive patients against 5.98/100 person-years (95% CI 3.82 – 9.38) in Gal3-negative patients (Table S1).

Tumour recurrence risk factors

Table 4 shows univariate analysis for candidate risk factors for tumour recurrence. Tumour recurrence was associated with viral aetiology (HR 3.12; 95% CI 1.20 – 8.12; $p = 0.02$), waiting time longer than 90 days (HR 4.95; 95% CI 2.02 – 12.10; $p < 0.001$), more than three nodules (HR 3.05; 95% CI 1.46 – 6.36; $p = 0.003$), main nodule diameter larger than 5 cm (HR 3.21; 95% CI 1.43 – 7.23; $p = 0.005$), vascular invasion (HR 5.71; 95% CI 2.32 – 14.07; $p < 0.001$), Gal3 expression (HR

2.55; 95% CI 1.24 – 5.28; $p = 0.011$) and tumours beyond Milan criteria (HR 3.58; 95% CI 1.76 – 7.28; $p < 0.001$).

By stratifying cases by the combined variable Gal3 expression/vascular invasion, TR was associated with both galectin 3 negative/vascular invasion positive (HR 4.63; 95% CI 1.65 – 13.02; $p = 0.003$) and galectin 3 positive/vascular invasion positive (HR 9.30; 95% CI 3.14 – 27.49; $p < 0.001$) groups.

One-year and three-years estimated recurrence-free survival (RFS) for the entire cohort was 86.1% and 73.3%, respectively. Estimated one and three years RFS were 62.3% and 53.9% for Gal3-positive patients and 93.9% and 79.7% for Gal3-negative patients. Analysis of combined variable showed that the Gal3-positive/invasion-positive group had an estimated RFS in one and three years of 53.8% and 39.9%, respectively, compared to 97.7% and 92.5% in the Gal3-negative/invasion-negative group. Table S2 presents the results of RFS according to other risk factors.

Significant variables at univariate analysis ($p < 0.05$) were then included in Cox proportional regression analysis, except for tumour size and number of nodules, since they present redundancy with Milan criteria (Table 5). Tumours beyond of Milan criteria (HR 2.36; 95% CI 1.04 – 5.35; $p = 0.04$), waiting time longer than 90 days (HR 4.13; 95% CI 1.64 – 10.36; $p = 0.002$) and viral etiology (HR 2.76; 95% CI 1.01 – 7.55; $p = 0.047$) maintained independent association with tumour recurrence.

In the multivariate analysis of Gal3 expression/vascular invasion combined, double positive patients had an increased risk for TR (HR 5.88; 95%CI 1.81 – 19.12; $p = 0.003$), while vascular invasion in absence of Gal3 expression had only a tendency to statistical significance (HR 2.63; 95% CI 0.89 – 7.76; $p = 0.08$). Galectin 3 expression in absence of vascular invasion had no impact in the risk of TR (HR 1.21; 95% CI 0.14 – 10.45; $p = 0.08$).

DISCUSSION

As far as we know, this is the first study to evaluate the impact of galectin 3 expression in HCC recurrence after liver transplantation. Here, we describe an association between Gal3 expression and increased risk of HCC recurrence, probably mediated by vascular invasion. Furthermore, the current results underscore the synergic and independent effect of combination galectin 3 - vascular invasion in post transplantation HCC recurrence.

Galectin 3 is involved in distinct biological processes such as fibrogenesis and oncogenesis and its function vary according to cellular location. In cytoplasm, Gal3 acts in cell survival, while in nucleus it regulates transcription and in the extracellular environment it modulates cell-cell interactions (8)(15). In cancer, galectin 3 plays a role in different steps of metastasis as cell adhesion to extracellular matrix, migration, invasion, chemotaxis of endothelial cells and immune scape by inhibition of T and natural killer cells (16) (17).

Hsu and colleagues described that in normal livers, only ductal and Kupffer cells expresses Gal3. In cirrhotic livers, the pattern of Gal3 expression in the regenerative nodules was an eccentric-skewed gradient, suggesting that this protein probably contributes to fibrogenesis (18). In line with these results analysis of non-tumour livers in this study revealed marked galectin 3 expression in bile ducts cells (83.9%) and in hepatocytes from regenerative nodules (60.4%)

In absence of hepatic diseases, Gal3 serum levels are higher in portal vein than in hepatic veins, suggesting that Gal3 is cleared by the liver. Intriguingly, cirrhotic patients tend to have higher levels of Gal3 in hepatic veins and systemic circulation, with an proportionally inverse relation with hepatic function, suggesting that the cirrhotic liver may both produce and decrease the elimination of Gal3 (19).

The frequency of Gal3-positive tumours in our cohort (24.3%) was smaller than those observed in three previous studies that evaluated Gal3 in HCC patients submitted to tumour resection (65% - 81.8%) (18) (14) (11). This marked difference may arise from population-based differences, as the other studies evaluated Asiatic patients, with predominantly hepatitis B-related HCC and treated by resection, what probably reflects less advanced liver disease. Although the previous studies did not describe association between Gal3 expression and aetiology of liver disease, our results show that Gal3 expression was more frequent in hepatitis B-related HCC that accomplishes for only 10.2% of our population.

In previous studies using HCC cell lines, inhibition of galectin 3 expression resulted in diminished cellular proliferation, migration and invasion (10)(11)(12). Corroborating these findings, Serizawa et al. described that Gal3 knockdown mice developed smaller and less invasive tumours when exposed to carcinogens (20). Of note, we observed a marked association between Gal3 expression and vascular invasion, proving *in vivo* the results of experimental studies.

The clinical relevance of Gal3 expression in HCC patients submitted to liver transplantation is still poorly understood. Matsuda et al. observed a shorter recurrence-free survival in Gal3-positive HCC patients submitted to tumour resection in a Japanese cohort (14). Similarly, Jiang et al. evaluated 165 HCC-resected patients from China and found a significantly shortened survival in Gal3-positive cases, but no difference in risk of recurrence (11).

Importantly, we could not detect in our cohort any effect of Gal3 in recurrence risk when vascular invasion was absent, while there was a trend to association between vascular invasion in the absence of Gal3 and the TR risk. However, the combination galectin 3 and vascular invasion positivity increased substantially risk of recurrence (HR 5.88). This observation brought together with previous experimental data, suggests that vascular invasion may be the mechanism by which Gal3 induces tumour recurrence.

Galectin 3 expression seems to enhance the deleterious influence of vascular invasion in recurrence, suggesting that it may act in other steps of carcinogenesis such as cell migration and adhesion to endothelium (21).

In addition to the prognosis relevance of galectin 3, new therapeutic approach (such as Gal3c recombinant) targeting this lectin has shown promising results in pre-clinical studies by reducing the capability of invasion and migration of HCC cultured cells (22). Another drug with anti-Gal3 property, GR-MD-02, was used and well tolerated in NASH patients with portal hypertension (23). These studies open a line of research on Gal3 as a therapeutic target in HCC.

Our study has some cohort-inherent limitations that diminished the number of included patients, such as missing paraffin-embedded samples, complete tumour necrosis due to pre-transplant bridging therapies and loss of follow-up of some patients out of reach. Possibly, our results can have overestimated the incidence of tumour recurrence, because the cases with total tumour necrosis were excluded.

In short, our results strongly suggest that, when combined to vascular invasion, galectin 3 increases risk of post-transplant HCC recurrence. Further investigations are necessary to evaluate the practical applications of this finding in HCC management. Galectin 3 may become a molecular target for therapeutic intervention in HCC-patients submitted to liver transplantation.

REFERENCES

1. Akinyemiju T, Abera S, Ahmed M, Alam N, Alemayohu MA, et al. The Burden of Primary Liver Cancer and Underlying Etiologies From 1990 to 2015 at the Global, Regional, and National Level: Results From the Global Burden of Disease Study 2015. *JAMA Oncol.* 2017 Dec 1;3(12):1683–91. DOI 10.1001/jamaoncol.2017.3055
2. Wang H, Naghavi M, Allen C, Barber RM, Carter A, Casey DC, et al. Global, regional, and national life expectancy, all-cause mortality, and cause-specific mortality for 249 causes of death, 1980–2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. *Lancet.* 2016;388(10053):1459–544. DOI 10.1016/S0140-6736(16)31012-1
3. Petrick JL, Braunlin M, Laversanne M, Valery PC, Bray F, McGlynn KA. International trends in liver cancer incidence, overall and by histologic subtype, 1978-2007. *Int J Cancer.* 2016 Oct 1;139(7):1534–45. DOI 10.1002/ijc.30211
4. Galle PR, Forner A, Llovet JM, Mazzaferro V, Piscaglia F, Raoul J, et al. EASL Clinical Practice Guidelines: Management of hepatocellular carcinoma. *J Hepatol.* 2018 Jul;69(1):182–236. DOI 10.1016/j.jhep.2018.03.019
5. Adam R, Karam V, Delvart V, O’Grady J, Mirza D, Klempnauer J, et al. Evolution of indications and results of liver transplantation in Europe. A report from the European Liver Transplant Registry (ELTR). *J Hepatol.* 2012;57(3):675–88. DOI 10.1016/j.jhep.2012.04.015
6. Yang JD, Larson JJ, Watt KD, Allen AM, Wiesner RH, Gores GJ, et al. Hepatocellular Carcinoma Is the Most Common Indication for Liver Transplantation and Placement on the Waitlist in the United States. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2017;15(5):767–775.e3. DOI 10.1016/j.cgh.2016.11.034
7. Mazzaferro V, Regalia E, Doci R, Andreola S, Pulvirenti A, Bozzetti F, et al. Liver Transplantation for the treatment of small Hepatocellular Carcinomas in Patients With Cirrhosis. *N Engl J Med.* 1996;334(11):693–9. DOI 10.1056/NEJM199603143341104

8. Sciacchitano S, Lavra L, Morgante A, Ulivieri A, Magi F, De Francesco GP, et al. Galectin-3: One Molecule for an Alphabet of Diseases, from A to Z. *Int J Mol Sci*. 2018 Jan 26;19(2):E379. DOI 10.3390/ijms19020379
9. Hu Z, Jiang X, Xu Y, Lu N, Wang W, Luo J, et al. Downregulation of galectin-3 by EGF mediates the apoptosis of HepG2 cells. *Mol Cell Biochem*. 2012 Oct 4;369(1–2):157–65. DOI 10.1007/s11010-012-1378-8
10. Zheng D, Hu Z, He F, Gao C, Xu L, Zou H, et al. Downregulation of galectin-3 causes a decrease in uPAR levels and inhibits the proliferation, migration and invasion of hepatocellular carcinoma cells. *Oncol Rep*. 2014 Jul;32(1):411–8. DOI 10.3892/or.2014.3170
11. Jiang S-S, Weng D-S, Wang Q-J, Pan K, Zhang Y-J, Li Y-Q, et al. Galectin-3 is associated with a poor prognosis in primary hepatocellular carcinoma. *J Transl Med*. 2014 Sep 27;12(1):273–87. DOI 10.1186/s12967-014-0273-3
12. Song L, Tang J, Owusu L, Sun M, Wu J, Zhang J. Galectin-3 in cancer. *Clin Chim Acta*. 2014 Apr;431:185–91. DOI 10.1016/j.cca.2014.01.019
13. Li X, Chen Q, Yin D, Shi S, Yu L, Zhou S, et al. Novel role of semaphorin 3A in the growth and progression of hepatocellular carcinoma. *Oncol Rep*. 2017 Jun;37(6):3313–20. DOI 10.3892/or.2017.5616
14. Matsuda Y, Yamagiwa Y, Fukushima K, Ueno Y, Shimosegawa T. Expression of galectin-3 involved in prognosis of patients with hepatocellular carcinoma. *Hepatol Res*. 2008;38(11):1098–111. DOI 10.1111/j.1872-034X.2008.00387.x
15. Dong R, Zhang M, Hu Q, Zheng S, Soh A, Zheng Y, et al. Galectin-3 as a novel biomarker for disease diagnosis and a target for therapy (Review). *Int J Mol Med*. 2017 Dec 5;41(2):599–614. DOI 10.3892/ijmm.2017.3311
16. Funasaka T, Raz A, Nangia-Makker P. Galectin-3 in angiogenesis and metastasis. *Glycobiology*. 2014 Oct 1;24(10):886–91. DOI 10.1093/glycob/cwu086
17. Farhad M, Rolig AS, Redmond WL. The role of Galectin-3 in modulating tumour growth and immunosuppression within the tumour microenvironment.

- Oncoimmunology. 2018 Jun 3;7(6):e1434467-1–8. DOI 10.1080/2162402X.2018.1434467
18. Hsu D, Dowling CA, Jeng G, Chen J, Yang R, Liu F. Galectin-3 Expression Is Induced in Cirrhotic Liver and Hepatocellular Carcinoma. *Int J cancer*. 1999;81(4):519–26.
 19. Wanninger J, Weigert J, Wiest R, Bauer S, Karrasch T, Farkas S, et al. Systemic and hepatic vein galectin-3 are increased in patients with alcoholic liver cirrhosis and negatively correlate with liver function. *Cytokine*. 2011 Sep;55(3):435–40. DOI 10.1016/j.cyto.2011.06.001
 20. Serizawa N, Tian J, Fukada H, Baghy K, Scott F, Chen X, et al. Galectin 3 regulates HCC cell invasion by RhoA and MLCK activation. *Lab Invest*. 2015 Oct 6;95(10):1145–56. DOI 10.1038/labinvest.2015.77
 21. Chen C, Duckworth CA, Zhao Q, Pritchard DM, Rhodes JM, Yu LG. Increased circulation of galectin-3 in cancer induces secretion of metastasis-promoting cytokines from blood vascular endothelium. *Clin Cancer Res*. 2013;19(7):1693–704. DOI 10.1158/1078-0432.CCR-12-2940
 22. Wang M, Tian F, Ying W, Qian X. Quantitative proteomics reveal the anti-tumour mechanism of the carbohydrate recognition domain of Galectin-3 in Hepatocellular carcinoma. *Sci Rep*. 2017 Dec 12;7(1):5189. DOI 10.1038/s41598-017-05419-5
 23. Chalasani N, Garcia-Tsao G, Goodman Z, Lawitz E, Abdelmalek M, Rinella M, et al. A multicenter, randomized, double-blind, PLB-controlled trial of Galectin-3 inhibitor (GR-MD-02) in patients with NASH cirrhosis and portal hypertension. *J Hepatol*. 2018 Apr;68(sup1):S100–1. DOI 10.1016/S0168-8278(18)30420-3

Table 1 – Clinical, laboratorial and histological characteristics of 148 HCC patients submitted to liver transplantation

Characteristic	Number (%)
Pre-operatives	
Age over 60 years	86 (58.1%)
Male sex	116 (78.4%)
Aetiology of liver disease	
Hepatitis C	77 (52.0%)
Hepatitis B	15 (10.2%)
Non-viral causes	56 (37.8%)
MELD score over 12 (n=140)	56 (40.0%)
AFP level over 10 ng/mL (n=134) *	88 (65.7%)
Bridging therapy (n = 131)	102 (77.9%)
Downstaging	18 (12.2%)
Lymphocyte count less than 1000/mm ³ (n = 139) **	56 (40.3%)
Waiting time longer than 90 days (n = 143)	68 (47.6%)
Peri-operatives	
Cold ischemia time longer than 600 minutes (n = 140)	13 (9.3%)
Warm ischemia time longer than 50 minutes (n = 131)	13 (9.9%)
Donor's age over 60 years (n = 145)	14 (9.7%)
Intraoperative blood transfusion (n = 132)	74 (56.1%)
Surgical technique (n = 141)	
Conventional	98 (69.5%)
Piggyback	43 (30.5%)
Histopathological	
Staging beyond Milan Criteria	50 (33.8%)
More than three nodules	29 (19.7%)
Main nodule diameter larger than 5 cm	20 (13.6%)
Vascular invasion (n = 136)	
Absent	63 (46.3%)
Microvascular	60 (44.1%)
Macrovascular	13 (9.6%)
Tumour differentiation grade (n = 141)	
Well/moderately differentiated	134 (95.0%)
Poorly differentiated	7 (5.0%)
Partial tumour necrosis	80 (54.8%)
Post-operatives	
Use of mTOR inhibitors (n = 113)	23 (20.7%)
First month tacrolimus level above 10ng/mL (n = 119) §	65 (54.6%)
Lymphocyte count less than 500/mm ³ (n = 117) ¶	6 (5.1%)

HCC, hepatocellular carcinoma; MELD, model for end stage liver disease; AFP, alpha fetoprotein.

* AFP last value before liver transplantation

** Lymphocyte blood count just before liver transplantation

§ Major value of tacrolimus serum level in the first month after liver transplantation

¶ Lymphocyte count at the end of the first month after liver transplantation

Table 2 – Immunohistochemical characteristics of Galectin 3 tumour expression in HCC patients submitted to liver transplantation

Characteristic	Number (%)
Gal3 tumour expression	
Negative	112 (75.7%)
Positive	36 (24.3%)
Tumour cell percentage expressing Gal3	
< 5%	112 (75.7%)
5 to 25%	19 (12.8%)
25 to 50%	10 (6.8%)
> 50%	7 (4.7%)
Tumour Gal3 expression intensity	
Negative	112 (75.7%)
Weak	6 (4.0%)
Moderate	12 (8.1%)
Strong	18 (12.2%)
Gal3 cytoplasmic expression	
Negative	112 (75.7%)
Positive	36 (24.3%)
Gal3 nuclear expression	
Negative	143 (96.6%)
Positive	5 (3.4%)
Combined variable (Gal3 – vascular invasion)*	
Gal3 negative/ vascular invasion absent	55 (40.4%)
Gal3 positive/ vascular invasion absent	8 (5.9%)
Gal3 negative/ vascular invasion present	49 (36.0%)
Gal3 positive/ vascular invasion present	24 (17.7%)

Gal3, galectin 3; HCC, hepatocellular carcinoma

* In six cases, information about vascular invasion was unavailable (n = 136)

Table 3 – Univariate and Multivariate Analyses of clinic-histological characteristics associated to Gal3 tumour expression in HCC patients submitted to liver transplantation

Characteristic	Galectin 3		Crude OR (95% CI)	p	Adjusted OR (95% CI)	p*
	Positive (n/%)	Negative (n/%)				
Hepatitis B						
Negative	29 (80.6%)	104 (92.9%)	1	-		
Positive	7 (19.4%)	8 (7.1%)	3.14(1.05-9.38)	0.033	3.42 (1.06-11.02)	0.039
Hepatitis C						
Negative	21 (58.3%)	50 (44.6%)	1	-		
Positive	15 (41.7%)	62 (55.4%)	0.58(0.27-1.3)	0.156		
Main nodule diameter						
5cm or less	30 (83.3%)	97 (86.6%)	1	-		
Larger than 5 cm	6 (16.7%)	14 (12.5%)	1.38(0.49-3.92)	0.54		
Missing	-	1				
Number of nodules						
Three or less	28 (77.8%)	90 (80.4%)	1	-		
More than 3	8 (22.2%)	21 (18.7%)	1.22(0.49-3.07)	0.66		
Missing	-	1				
Differentiation grade						
Well/moderately	31 (86.1%)	103 (91.9%)	1	-		
Poorly differentiated	4 (11.1%)	3 (2.7%)	4.4 (0.94-20.87)	0.06	5.08 (0.97-26.7)	0.055
Missing	1	6				
Vascular invasion						
Absent	8 (22.2%)	55 (49.1%)	1	-		
Present	24 (66.7%)	49 (43.7%)	3.37 (1.39-8.18)	0.006	3.49 (1.24-9.79)	0.018
Missing	4	8				
Tumour staging (MC)						
Milan-in	18 (50.0%)	80 (71.4%)	1	-		
Milan-out	18 (50.0%)	32 (28.5%)	2.5 (1.16-5.4)	0.018	1.2 (0.47-3.05)	0.7

Gal3, galectin 3; HCC, hepatocellular carcinoma; OR, *odds ratio*; MC, Milan Criteria

* Multiple logistic regression including the variables: hepatitis B, differentiation grade, vascular invasion and tumour staging

Table 4 – Univariate Analyses of Factors Associated to Tumour Recurrence in HCC patients submitted to liver transplantation

Characteristic	HR (IC 95%)	p
Pre-operative		
Age over 60 years	0,79(0,39 - 1,61)	0,520
Male sex	2,46 (0,75 – 8,11)	0,138
MELD score over 12 points	0,70 (0,34 - 1,47)	0,346
Viral aetiology	3,12(1,20 - 8,12)	0,020
AFP level over 10ng/ml *	1,93(0,86 – 4,30)	0,110
Bridging Therapy	1,90(0,66 - 5,47)	0,234
Waiting list longer than 90 days	4,95 (2,02 - 12,1)	<0,001
Peri-operative		
Cold ischemia time longer than 600 minutes	1,0(0,30-3,30)	0,997
Warm ischemia time longer than 50 minutes	0,45(0,06-3,29)	0,429
Donor age over 60 years	1,81(0,69-4,74)	0,228
Intra-operative blood transfusion	1,14(0,54-2,39)	0,729
Surgical technique (conventional/piggyback)	1,20(0,55-2,60)	0,649
Histopathological		
More than three nodules	3,05 (1,46 – 6,36)	0,003
Main nodule diameter larger than 5 cm	3,21(1,43 - 7,23)	0,005
Poorly differentiated tumour	1,53 (0,46 – 5,07)	0,482
Vascular invasion	5,71(2,32-14,07)	<0,001
Staging beyond Milan criteria	3,58(1,76-7,28)	<0,001
Tumour galectin 3 expression	2,55(1,24-5,28)	0,011
Partial tumour necrosis	2,07(0,91-4,68)	0,079
Combined variable (Gal3/vascular invasion)		
Gal3 negative/vascular invasion absent	1	
Gal3 positive//vascular invasion absent	1,22(0,14 – 10,43)	0,857
Gal3 negative/vascular invasion present	4,63(1,65 – 13,02)	0,003
Gal3 positive/vascular invasion present	9,30(3,14 – 27,49)	<0,001
Post-operative		
Lymphocyte count less than 500/mm ³ ¶	1,40 (0,33 – 5,91)	0,645
Tacrolimus serum levels above 10ng/ml §	0,71 (0,35 – 1,43)	0,343
Use of mTOR inhibitor	1,56 (0,69 – 3,54)	0,282

HCC, hepatocellular carcinoma; HR, *hazard ratio*; CI 95%, confidence interval of 95%; MELD, model for end stage liver disease; AFP, alfafetoprotein; Gal3, galectin 3

* Last AFP measurement before transplantation.

¶ Lymphocyte count one month after transplantation

§ Highest tacrolimus sérum levels in the first month after transplantation.

Tabela 5 – Multivariate Analyses of Factors Associated to tumour recurrence in HCC patients submitted to liver transplantation

Characteristic	Adjusted HR (95% CI)	p*
Combined variable (Gal3/vascular invasion)		
Gal3 negative/vascular invasion absent	1	
Gal3 positive//vascular invasion absent	1.21 (0.14 – 10.45)	0.863
Gal3 negative/vascular invasion present	2.63 (0.89 – 7.76)	0.080
Gal3 positive/vascular invasion present	5.88 (1.81 – 19.12)	0.003
Tumour staging		
Within Milan Criteria	1	-
Beyond Milan Criteria	2.36 (1.04 – 5.35)	0.040
Waiting time		
Lessen than 90 days	1	-
Longer than 90 days	4.13 (1.64 – 10.36)	0.002
Aetiology		
Non-viral causes	1	-
Viral hepatitis (B or C)	2.76 (1.01 – 7.55)	0.047

HCC, hepatocellular carcinoma; HR, hazard ratio; 95% CI, 95% confidence interval, Gal3, galectin 3

* Cox proportional regression

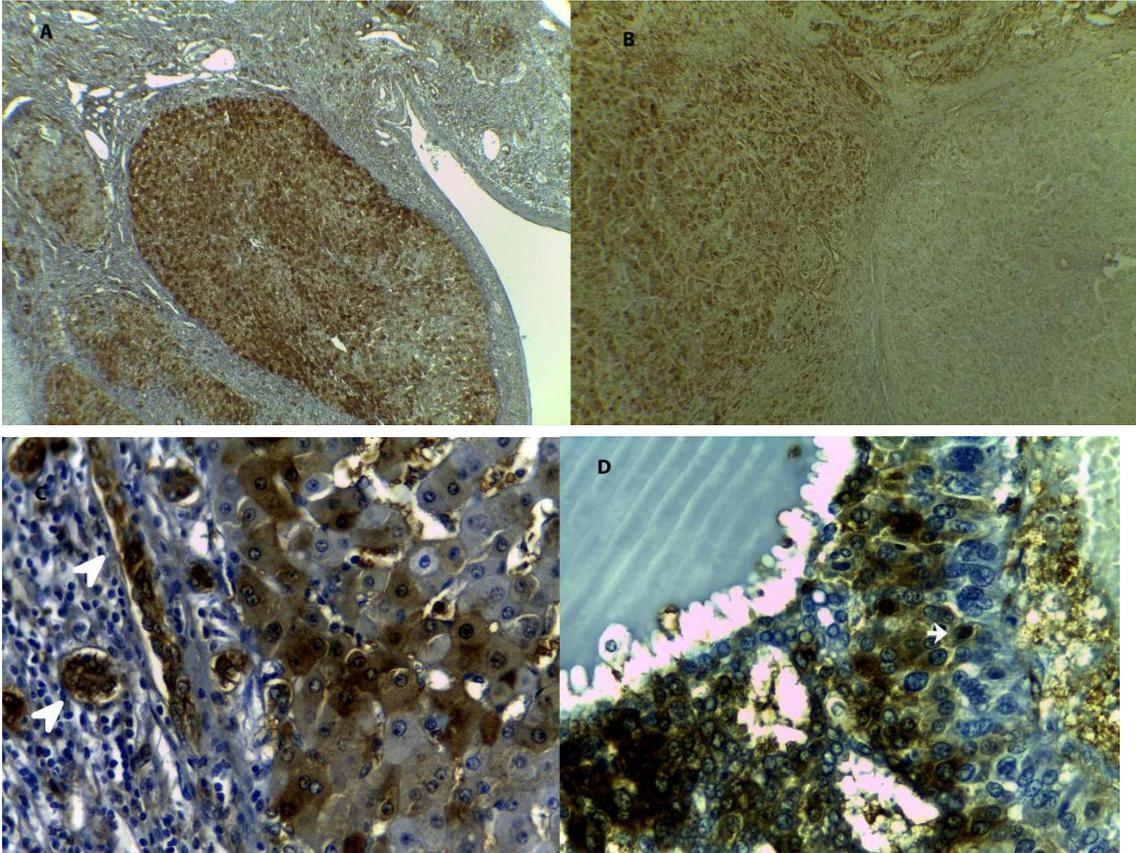


Figure 1 – Immunohistochemical staining for Galectin 3 in explanted livers with Hepatocellular Carcinoma. A) Tumour nodule expressing Gal3 in more than 50% cells (40x); B) Heterogeneous tumour expression of Gal3, showing areas with strong and weak staining (40x); C) Galectin 3 expression in ductal cells (arrow heads, 100x); D) Strong Gal3 expression in a tumour nodule, showing also nuclear expression (arrow, 100x).

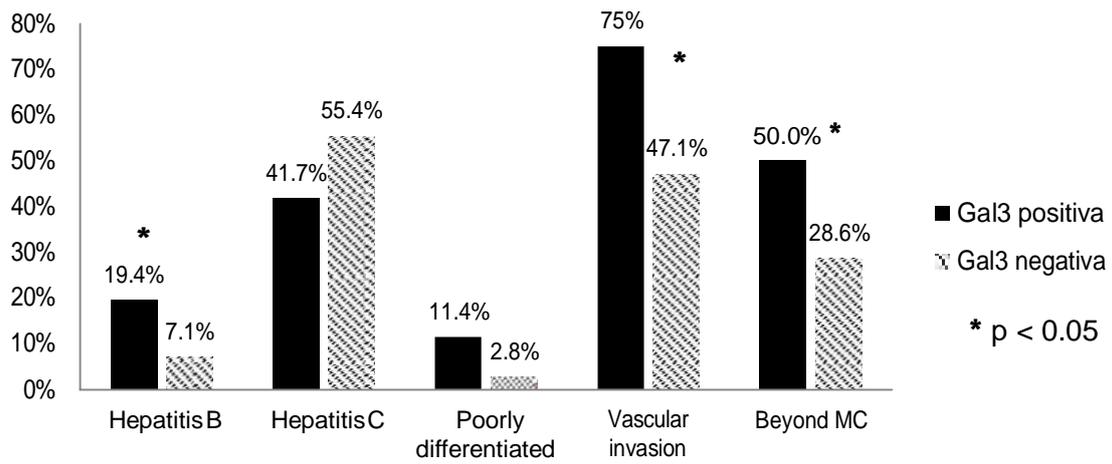


Figure 2 – Factors associated to Galectin 3 tumour expression in HCC patients submitted to liver transplantation

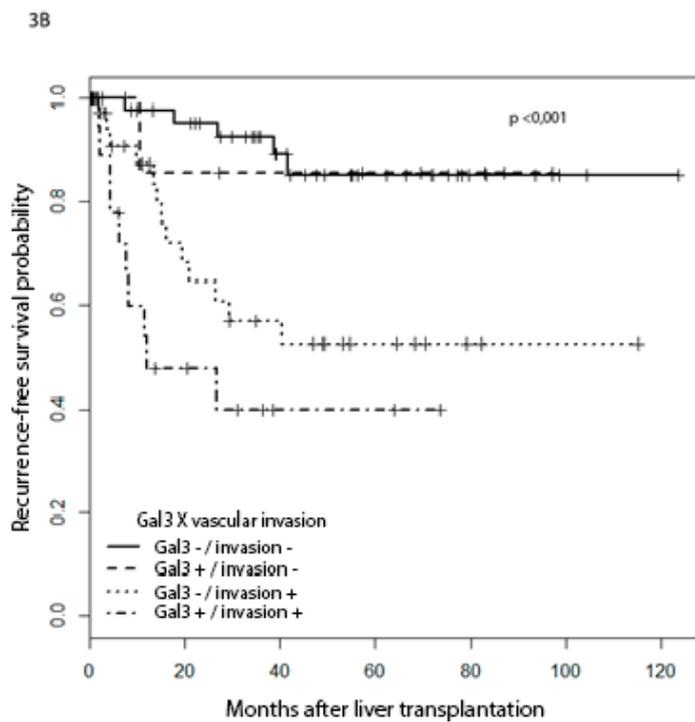
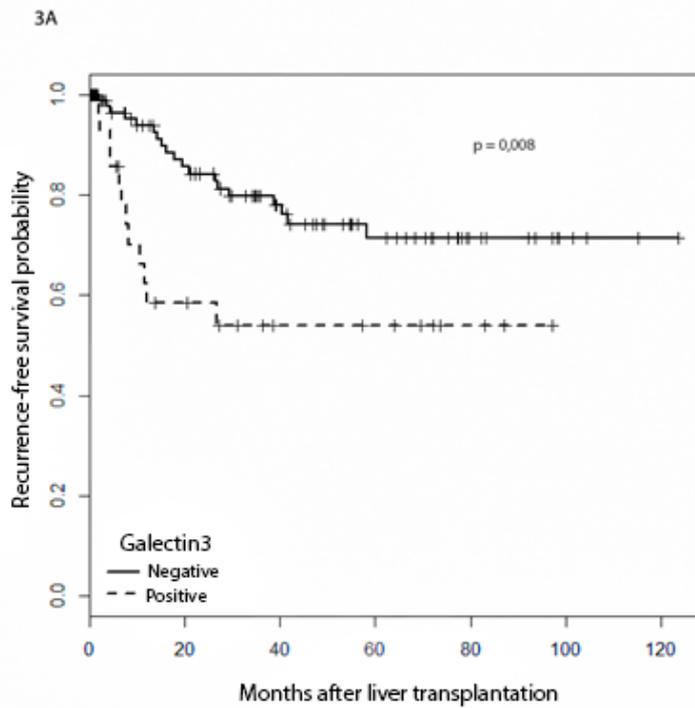


Figure 3 – Kaplan Meier curves of recurrence-free survival in HCC patients submitted to liver transplantation: 3A) according to Gal3 expression, p log rank = 0.008; B) according to combined variable Gal3/vascular invasion, p log-rank < 0.001

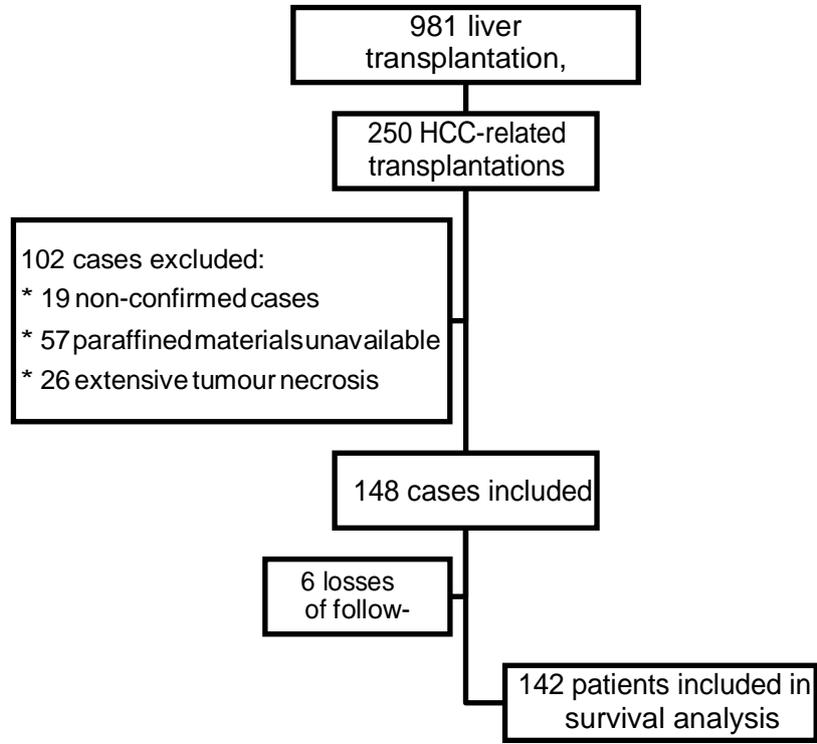
Supplementary material**Figure S1 – Study population recruitment**

Table S1 – Tumour recurrence incidence rate, global and according to Gal3 expression and liver disease, in HCC patients submitted to liver transplantation

Conditions	Patients number	Tumour recurrences number	Incidence rate (100 person-years)*	95% CI
All patients**	142	31	7.92	5.57 – 11.3
Galectin 3 expression				
Negative	109	19	5.98	3.82 – 9.38
Positive	33	12	16.20	9.21 – 28.6
Liver disease aetiology				
Hepatitis C	76	21	10.00	6.52 – 15.30
Hepatitis B	15	5	11.80	4.90 – 28.30
Non-viral causes	51	5	3.60	1.50 – 8.64

HCC, hepatocellular carcinoma

*Median follow-up time = 33 months (range from one day to 10.2 years)

** 6 patients lost follow-up

Table S2 – Estimated recurrence free-survival at one and three years after liver, global and according to HCC-recurrence risk factors.

Característica	RFS first year % (95% CI)	RFS third year % (95% CI)
All patients	86.1% (79.8%-92.9%)	73.3% (65.1%- 82.6%)
Gal3 expression		
Negative	93.9% (88.8%- 99.2%)	79.7% (71.0%- 89.5%)
Positive	62.3% (46.3%- 83.9%)	53.9% (37.7%- 77.3%)
Aetiology		
Non-viral causes	94.7% (87.9%- 100%)	84.3% (72.4%- 98.2%)
Hepatitis B or C	81.2% (72.5%- 91.0%)	66.8% (56.3%- 79.3%)
Waiting time		
Lesser than 90 days	98.0% (94.2%-100%)	87.0% (77.8%- 97.3%)
Longer than 90 days	73.2% (62.1%- 86.3%)	60.4% (48.2%- 75.7%)
Nodule number		
Three or less	90.8% (84.9%- 97.1%)	77.5% (68.8%- 87.3%)
More than three	65.1% (47.1%- 89.9%)	54.2% (35.9%- 81.8%)
Main nodule diameter		
Smaller than 5 cm	88.1%(81.8%- 95.0%)	77.5% (69.2%- 86.7%)
Larger than 5 cm	72.7% (52.8%-100%)	41.5% (20.3%- 85.0%)
Vascular invasion		
Absent	96.0% (90.7%- 100%)	91.6% (84.0%- 99.9%)
Microvascular	82.6% (71.6%- 95.3%)	55.8% (41.6%- 75.0%)
Macrovascular	40.0% (17.1%- 93.8%)	26.7% (8.3%-85.8%)
Combined variable (Gal3/vascular invasion)		
Gal3 negative/vascular invasion absent	97.7%(93.4%-100%)	92.5%(84.7%-100%)
Gal3 positive//vascular invasion absent	85.7%(63.3%-100%)	85.7%(63.3%- 100%)
Gal3 negative/vascular invasion present	87.3%(76.3%- 99.8%)	56.9%(41.0%- 78.9%)
Gal3 positive/vascular invasion present	53.8%(34.7%- 83.5%)	39.9%(21.6%- 73.5%)
Tumour staging		
Within Milan Criteria	93.1% (87.4%- 99.1%)	82.4% (73.8%- 92.0%)
Beyond Milan Criteria	71.2% (57.5%- 88.2%)	53.2% (38.1%-74.4%)

HCC, hepatocellular carcinoma; RFS, recurrence-free survival; 95% CI, 95% confidence interval

APÊNDICE E – VERSÃO DO ARTIGO 2 EM INGLÊS

Obs.: Artigo submetido ao periódico LIVER CANCER (Karger Publishers)

Title: Galectin 3 expression and the clinical presentation of Hepatocellular Recurrence after Liver Transplantation

Authors: Norma Arteiro Filgueira^{1,2,3}, Matheus Filgueira Bezerra⁴, Norma Thomé Jucá^{3,5}, Erika Cavalcante Maranhão⁵, Aline Alves Lopes², Bernardo Times de Carvalho³, Paulo Sérgio Vieira de Melo³, Américo Gusmão Amorim³, Claudio Moura Lacerda³, Heloísa Ramos Lacerda^{1,2,6}

Affiliation:

¹ Tropical Medicine Post-Graduation Program, Federal University of Pernambuco

² Internal Medicine Department, Federal University of Pernambuco

³ Liver Transplantation Unit, Oswaldo Cruz Hospital, Pernambuco University

⁴ Keizo Asami Immunopathology Laboratory, Federal University of Pernambuco

⁵ Pathology Department, Hospital das Clínicas, Federal University of Pernambuco

⁶ Clinical Medicine Department, Pernambuco University

Corresponding author:

NORMA ARTEIRO FILGUEIRA, Av. Beira Rio, nº 591, apto 501, Madalena, Recife – PE, Brazil, CEP 50.610-100, Phone: 55-81-999754958, e-mail: norma.arteiro@hotmail.com

KEYWORDS:

Hepatocellular carcinoma – Liver transplantation – Galectin 3 – Recurrence – Survival analysis

Grant support:

None

Disclosures:

Authors have no conflict of interest to declare

ABSTRACT

Introduction and objectives: The recurrence of hepatocellular carcinoma (HCC) after transplantation results in a usually short survival and has no well-defined therapeutic protocol. The expression of galectin-3 seems to be associated with a worse prognosis in patients with HCC submitted to surgical resection. Thus, the objective of this study is to describe the clinical outcome of patients who developed recurrence of HCC after transplantation, analysing the impact of tissue expression of galectin-3 on the tumour clinical presentation and patient survival.

Methods: A cohort study including patients who developed HCC recurrence after transplant at a referral centre in north-eastern Brazil was held. The patients were followed between the time of tumour recurrence (TR) and death. The association between the tumour expression of galectin-3 (Gal3), determined by immunohistochemistry of the explant, and the characteristics of the TR and survival after transplantation were analysed.

Results: We identified 36 cases of TR among 212 patients with HCC submitted to liver transplantation. In 50% of these cases, TR was diagnosed in the first year after transplantation. Only 5.6% of the cases presented TR restricted to graft and 50% developed both hepatic and extra-hepatic involvement. The organs most often affected are the liver, lungs, and bones. An association was found between the tissue expression of Gal3 and the occurrence of early TR (OR 24.4; 95% CI 2.1-278.2; $p < 0.001$) and the development of pulmonary metastases (OR 7.62; 95% CI 1.15 - 50.5; $p = 0.03$). After a median follow-up of 24.2 months after transplantation, six patients were alive (16.7%). The median survival after transplantation was 24.9 months (95% CI 18.4 - 50.3 months). An independent association was observed between the expression of Gal3 and post-transplant mortality due to TR (HR 3.53; 95% CI 1.24 - 10.0; $p = 0.018$).

Conclusion: These results suggest that, in patients who develop recurrence of HCC after liver transplantation, tissue expression of Gal3 can be associated with the development of pulmonary metastases and reduction of survival.

INTRODUCTION

Initial experiences with liver transplantation (LT) to treat hepatocellular carcinoma (HCC) were disappointing. In 1996, Mazzaferro et al. described a five year survival rate of 75% for patients with tumours within Milan criteria (1), making LT the best therapeutic option for selected cases of unresectable HCC. Despite the use of these criteria, tumour recurrence (TR) still develops in 10 to 20% of cases(2).

HCC recurrence after LT has a poor prognosis, with survival of around one year and without well-defined treatment protocol (3). Few studies have investigated the predictive factors of survival after TR, which seems to be influenced by both biological aspects of the tumour as well as characteristics of the receptor.

Galectin-3 (Gal3) is a carbohydrate-binding protein that is involved in several mechanisms of oncogenesis, such as the stimulation of proliferation, invasion, migration and adhesion of tumour cells (4). Preliminary studies in patients submitted to resection of HCC found an association between tissue expression of Gal3 and unfavourable prognosis (5) (6).

Accordingly, the objective of this study was to describe the clinical outcome of patients who developed HCC recurrence after LT, analysing the influence of tissue expression of Gal3 on clinical presentation and survival after transplantation.

METHODS

Study design and population

An ambispective cohort study begun in 2014 evaluated all HCC patients submitted to LT by the Liver Transplant Unit of the Oswaldo Cruz and Jayme da Fonte Hospitals (Recife, Pernambuco, Brazil) from 1999 to 31/12/2016. 36 cases of TR were identified, which were consecutively included in the present study. Patients were followed for at least one year after LT.

Collection of baseline and treatment-related information

From 2014, the transplanted patients were included in the accompanying protocol for monitoring TR, which was composed by imaging examination of the abdomen and computed tomography scan of the chest, every six months during the first two years and then annually.

Tumour recurrence was defined by one of the following criteria (in order of priority): histological confirmation of recurrence of HCC in any organ, the appearance

of a lesion in a imaging study suggestive of hepatic recurrence or extra-hepatic metastasis of HCC, a progressive increase of serum alpha fetoprotein (AFP) associated with clinical manifestations suggestive of TR (wasting syndrome), information from medical records or death certificate. The date of the TR was defined as the date of the imaging examination that identified for the first time the lesion diagnosed later as recurrence and this was considered early when identified within the first 12 months after LT.

After the diagnosis of TR in any organ, the patients were submitted to periodic assessment, including determination of AFP, imaging of the chest and abdomen and bone scintigraphy. The therapeutic modality was determined for each case according to the criteria of the assistant doctor, since there is no standardised treatment protocol. Treatments used for the TR were classified as locoregional therapy (LRT), which includes surgical resection, chemoembolization and radiofrequency ablation or systemic therapy, represented by the use of sorafenib and/or chemotherapy. Whenever possible, the patients underwent surgical resection of the tumour lesions. In recent years, after the diagnosis of RT, mTOR inhibitors have been included in the immunosuppressive regimen.

The end date of the follow-up period was defined as the date of death or 31/12/2017 for those patients who were still in follow-up. The post-transplant survival was defined as the interval in months between the date of transplantation and the final date for follow-up. Post-recurrence survival was defined as the interval in months between the date of the TR and the final date of follow-up.

Baseline variables studied included sex, age, aetiology of liver disease, last value of AFP before the LT, data from the histopathological analysis of the explant (number and size of the nodules, vascular invasion, degree of cellular differentiation and staging according to the Milan criteria), tumour expression of Gal3 and use of mTOR inhibitors. After recurrence, information was collected on recurrence time, serum level of AFP, first organ affected, location of TR, schema of immunosuppression after TR and treatments for the TR. The variables whose results were available in at least 80% of the cases were taken into account.

Analysis of the explant

The explants were submitted to conventional histopathological analysis and immunohistochemistry targeting Gal3. The explanted liver was submitted to cross-

section cuts with 1.0 to 1.5 cm thickness to detect, count and measure tumour nodules. Microscopic analysis, performed by the same pathologist, determined the neoplastic nature of the node, the presence of vascular invasion and the degree of cell differentiation. Only the nodules with viable tumour cells were considered for analysis, thus the nodules with total necrosis were not accounted for. Tumour staging was based on the Milan criteria (MC) (1).

For analysis of the tissue expression of galectin 3 by IHC, 6 µm thick histological sections were obtained from the stored paraffin blocks which, after trimming on silanised slides, were dewaxed with xylol and rehydrated in alcohol. Antigenic recovery was performed with citrate buffer pH 6.0, heated for 30 minutes. Then inhibition of endogenous peroxidase and incubation with anti-galectin 3 mouse IgG monoclonal antibody, clone H-5 SC 374253 (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, USA) at a dilution of 1: 300 was carried out for 16 hours at 4°C. The slides were then washed and incubated successively with secondary and tertiary antibody (Spring reveal® kit, Spring Biosciences Corporation, Pleasanton, USA). Staining revelation was performed with diaminobenzidine and counterstaining with haematoxylin. In an attempt to reduce the possible measurement bias, the IHC analysis was performed by a single pathologist who was unaware of the clinical aspects of the case. The analysis of the IHC was only performed after the end of the cohort follow-up, to avoid the inclusion of a detection bias into patient's follow-up.

Ethical issues

The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki of 1975. Data collection began after approval of the project by the Research Ethics Committees of the Health Sciences Centre of the Federal University of Pernambuco and the Oswaldo Cruz University Hospital and the patients signed an Informed Consent Term. In cases in which death occurred before the beginning of the study, information was collected by reviewing the medical records or death certificates, under the authorisation of the management of the relevant sectors.

Statistical analysis

Initially the data were grouped in the form of measures of central tendency and proportions. The quantitative variables were categorised according to the reference value of the laboratory method (AFP), median values (age) or pre-established criteria

(characteristics of the tumour that make up the Milan criteria). Pearson's chi-square test and, when necessary, Fisher's exact test were used to compare proportions. In order to verify the association between the clinical and histological characteristics and the outcome variables, the crude and adjusted odds ratios were calculated after multiple logistic regression and were reported with 95% confidence intervals.

The probabilities of survival after transplantation were estimated by the Kaplan-Meier method and compared using the log-rank test. The uni and multivariate hazard ratios for factors associated with mortality after transplantation were calculated by the Cox proportional regression models and reported with 95% confidence intervals.

The maximum probability of error for rejection of the null hypothesis was set at 5% ($p < 0.05$). The data was entered into Microsoft Excel® 2010 worksheets and statistical analysis was performed with the Survival package of the R program for Windows®, version 3.2.2 (2015-R Foundation for Statistical Computing).

RESULTS

Study Population

Thirty-six cases of tumour recurrence were identified among 212 patients with HCC submitted to liver transplantation between 1999 and 2016 and included in this study, with a median follow-up of 29.3 months (5.43 recurrences per 100 persons-year; 95% CI 2.4 - 11.7). Information was collected on the follow-up of these 36 patients until death or until the end of the study period, with no losses to follow-up. Table 1 presents the population of patients with TR, composed of a majority of men (88.9%), suffering from chronic hepatitis C (61.2%), with a median age of 60 years. The majority of these presented AFP levels in the pre-LT above 10 ng/mL (80.6% of cases), tumours beyond the Milan criteria (63.9%), well or moderately differentiated (90.9%) and with vascular invasion (75.8%). IHC for Gal3 was performed in 31 cases, being positive in 12 of them (38.7%). In five cases, IHC for Gal3 could not be performed, four of them due to the unavailability of the paraffin block and absence of viable tumour cells in one explant (Table 1).

Clinical presentation and treatment of tumour recurrence

The informations relating to the post-transplant HCC recurrence are described in Table 1. TR was identified at 1.8 to 69 months after the LT, with a median of 13.8

(95% CI 10.5 - 26.7) months, been considered early in 50% of the cases. Ten (27.8%) of 36 TR were diagnosed after the second year post-LT (Figure 1). After TR, the AFP was above 10 ng/mL in 60.6% of cases. The first organs affected by TR were liver (22.2%), lung (25.0%), bone (25.0%) and others (27.8%). Two patients (5.6%) presented graft-restricted TR, while 16 (44.4%) exhibited only extra-hepatic involvement and 18 (50%) developed both hepatic and extra-hepatic TR.

Metastasis occurred in the graft in 18 cases (50%), 17 (47.2%) in the lung, 17 (47.2%) in the bone, 12 (33.3%) in the lymph node, 6 (16.7%) in the adrenal glands, 2 (5.5%) in the abdominal and thoracic wall, 2 (5.5%) in the brain, 2 (5.5%) in the peritoneum and 1 (2.8%) in the spleen. Twenty-five patients (69.4%) had more than one site of TR. Three of the 17 patients with bone metastases suffered vertebral lesion with paraplegia by medullary compression.

Regarding the treatment performed after the diagnosis of TR, 50% of the cases were submitted to only supportive therapy or there was no time for institution of treatment. Ten patients (27.8%) underwent one or more LTR modalities, such as pulmonary segmentectomy (3), transarterial chemoembolization (3), adrenalectomy (2), bone resection (2), radiofrequency in liver and/or adrenal lesion (2), tumour resection in the abdominal wall (1), hepatic resection (1) and splenectomy (1). Seventeen patients (47.2%) received one or more modalities of systemic therapy, such as sorafenib (17) and chemotherapy (4). Nine cases (25.0%) received a combination of locoregional and systemic therapy. mTOR inhibitors were used in the immunosuppressive regimen in 14 (38.9%) patients after RT.

Association between tissue expression of Gal3 and time and location of the TR

Analysing the association of Gal3 expression with TR characteristics, 11 (91.7%) of the 12 patients whose tumours expressed Gal3 developed RT before the end of the first year post-transplantation (early RT), in contrast to 5 (26.3%) of the 19 patients whose tumours did not express Gal3. Table 2 shows the associations between the time of RT diagnosis and clinical and histological characteristics. An association between Gal3 tissue expression and the development of early RT was observed, both in the univariate analysis (OR 30.8, 95% CI 3.1-303.4, $p < 0.001$), and after multivariate adjustment (OR 24.4, 95% CI 2.1-278.2, $p = 0.01$).

Ten (83.3%) of the 12 patients with Gal3-positive tumours developed pulmonary metastases during the post-TR follow up, which occurred in 6 (31.6%) of

the 19 patients with Gal3-negative tumours. Table 3 presents the factors associated with the development of pulmonary metastasis after post-transplant HCC-recurrence. The expression of Gal3 was associated with the occurrence of pulmonary metastases, both in the univariate analysis (OR 10.83; 95% CI 1.8-65.5; $p=0.009$) and after adjustment for other factors (OR 7.62; 95% CI 1.15-50.5, $p=0.03$). No association was identified between Gal3 expression and other sites of TR. TR in the graft developed in 33.3% of patients with Gal3-positive tumours and in 63.1% of the Gal3-negative tumours (OR 0.29; 95% CI 0.06 - 1.33) and bone metastases developed in 58.3% of the Gal3-positive and 42.1% of the Gal3-negative patients (OR 1.92; 95% CI 0.44 - 8.33).

Mortality after transplantation

After a median post-transplantation follow-up period of 24.2 months, six patients were alive (16.7%). The post-transplant survival ranged from 3.1 to 99.4 months, with estimated median survival of 24.9 (95% CI 18.4 - 50.3) months, estimating the existence of 80.5% (95% CI 68.6% - 94.6%) survivors at the end of the first year after LT and 39.9% (95% CI 26.5% - 60.2%) at the end of the third year.

Survival after recurrence ranged from 0.3 to 63.3 months, with estimated median of 9.25 (95% CI 3.7 - 21.2) months, estimating the presence of 44.1% (95% CI 30.4% - 63.9%) of patients alive at the end of the first year post-recurrence and 18.5% (95% CI 8.5 - 40.6%) at the end of the third year.

Table 4 presents the risk factors associated with post-transplant mortality in patients who developed HCC recurrence. In the univariate analysis, a significant association was observed between the expression of Gal3 and the higher risk of mortality after transplantation (HR 2.93; 95% CI 1.21 - 7.11; $p=0.018$) (Figure 2). Another factor associated with post-transplant tumour-related mortality was the site of the first recurrence. Bone (HR 3.59; 95% CI 1.08 - 11.97; $p= 0.037$) and lung involvement (HR 3.97; 95% CI 1.20 - 13.12; $p = 0.024$) as the first site of recurrence were associated with a higher risk of death, when compared to other sites. Implementation of combined therapy (LRT and systemic therapy) was associated with a lower risk of post-transplant mortality, when compared to supportive therapy (HR 0.26; 95% CI 0.10 - 0.70; $p = 0.007$).

Tissue expression of Gal3 was associated independently with mortality after transplantation (HR 3.53; 95% CI 1.24 - 10.01; $p = 0.018$). The implementation of anti-tumour treatment, either as single (HR 0.14; 95% CI 0.04 - 0.53; $p = 0.003$) or combined modality (HR 0.08; 95% CI 0.02 - 0.34; $p < 0.001$) was associated with a lower risk of death after adjustment by Cox proportional regression.

DISCUSSION

The results of this study suggest that, in patients who developed HCC recurrence after liver transplantation, the expression of Gal3 by the tumour may be associated with an early recurrence, pulmonary metastases and decreased survival.

TR after transplantation is usually an early event. In the present study, the median interval for the diagnosis of TR was 13.8 months, in agreement with published reports, which indicate a recurrence-free survival of approximately 12 to 15 months (7) (8) (9) (10) (11). It is speculated that the early TR can be explained by the existence of extra-hepatic metastases that were not detected by conventional pre-transplant examinations or by the existence of circulating cell clones that engraft distantly to organs in the postoperative period. Late TR seems to be a consequence of engrafting of latent cells that have remained dormant for a long period after transplant (3).

A correlation was observed between Gal3 expression and early TR. No study evaluated the repercussion of Gal3 expression in the scenario of liver transplantation. Matsuda et al., studying patients undergoing surgical resection, had already described the association of Gal3 with early tumour recurrence. They observed that recurrence-free survival at the end of the first year post-resection was 77.8% in Gal3-negative patients compared to only 44.1% in the Gal3-positive. However, at the end of five years, the rate of TR was similar between the two groups (5).

TR after transplantation tends to be a systemic process. In this sample, only 5.6% of the cases presented TR restricted to the graft, with 50% of cases showing both graft and extra-hepatic involvement. Similar findings were also reported by Roh et al., who observed TR in multiple organs in 71% of cases (12).

Lung metastases were observed in 47.2% of cases in this sample. Lung is one of the main sites of post-transplant HCC recurrence. Sapisochin et al. described the presence of pulmonary metastasis in 42.9% of 121 patients who developed TR (9). However, the risk factors for its development have not been assessed.

A significant association between Gal3 expression in HCC and the development of lung metastases was observed in this study (OR 7.62). Jiang et al. studied 165 patients submitted to resection of HCC and observed the development of distant metastases in 9.5% of patients with Gal3-positive and in none of the Gal3-negative tumours (6).

Experimental studies with melanoma cell cultures revealed that Gal3 seems to participate in various stages of the metastasising process to the lung. Gal3 stimulated *in vitro* adhesion of circulating tumour cells to the endothelium, secretion of matrix-metalloproteinases that degrade basal membrane, promotion of endothelial cell motility in metastatic lung parenchyma and angiogenesis (13) (14). Studies with CHC cells are required to assess the participation of Gal3 in metastatic processes to the lung to check whether these findings are reproduced in this type of tumour.

The association of Gal3 expression with the reduction in survival of patients who developed HCC recurrence after transplantation was also observed in this study (HR 3.53). There are no published data on the role of Gal3 in CHC survival after transplantation, but some authors have observed a reduction in survival of patients undergoing resection of Gal3-positive HCC (OR between 4.2 and 7.5) (5) (6).

Anti-cancer treatment was used only in 50% of cases in this sample. Although the use of some anti-tumour therapies has been associated with better survival, it is important to analyse these results with caution, because this study is purely observational and the patients were not comparable. Given the unusual condition and poor prognosis, there is none randomised intervention studies on the treatment of TR after transplantation. There are reports of better survival rates in patients submitted to resection of the TR, but the resectable lesions could be more localised and indolent (9) (11). Observational studies suggest that use of Sorafenib in recurrences not eligible for resection may increase the post-transplant survival (15). Further studies with a combination of surgical therapies and medications are needed to assess the superiority of results regarding post-transplant survival.

Promising results were reported from a study with HCC cell cultures treated with recombinant Gal3c, which prevents the binding of Gal3 to integrin and thus inhibits its activity, leading to a reduction in cellular viability and invasive and migration capacities (22). This study opens a line of research on Gal3 as a therapeutic target in HCC.

In conclusion, albeit the limitations of an observational study with a small number of participants, these results suggest that in patients who develop post-transplant HCC recurrence, tissue expression of Gal3 may be associated with a poor prognosis, with a higher risk of early recurrence, lung metastases and reduced survival. The development of drugs with anti-Gal3 activity may, hypothetically, provide benefits to this group of patients.

REFERENCES

1. Mazzaferro V, Regalia E, Doci R, Andreola S, Pulvirenti A, Bozzetti F, et al. Liver Transplantation for the treatment of small Hepatocellular Carcinomas in Patients With Cirrhosis. *N Engl J Med*. 1996 Mar;334(11):693–9.
2. Mazzaferro V, Bhoori S, Sposito C, Bongini M, Langer M, Miceli R, et al. Milan criteria in liver transplantation for hepatocellular carcinoma: An evidence-based analysis of 15 years of experience. *Liver Transplant*. 2011 Oct;17(S2):S44–57.
3. De’Angelis N, Landi F, Carra MC, Azoulay D. Managements of recurrent hepatocellular carcinoma after liver transplantation: A systematic review. *World J Gastroenterol*. 2015 Oct;21(39):11185–98.
4. Song L, Tang J, Owusu L, Sun M, Wu J, Zhang J. Galectin-3 in cancer. *Clin Chim Acta*. 2014 Apr;431:185–91.
5. Matsuda Y, Yamagiwa Y, Fukushima K, Ueno Y, Shimosegawa T. Expression of galectin-3 involved in prognosis of patients with hepatocellular carcinoma. *Hepatol Res*. 2008;38(11):1098–111.
6. Jiang S-S, Weng D-S, Wang Q-J, Pan K, Zhang Y-J, Li Y-Q, et al. Galectin-3 is associated with a poor prognosis in primary hepatocellular carcinoma. *J Transl Med*. 2014 Sep 27;12(1):273–87.
7. Roayaie S, Schwartz JD, Sung MW, Emre SH, Miller CM, Gondolesi GE, et al. Recurrence of Hepatocellular Carcinoma After Liver Transplant: Patterns and Prognosis. *Liver Transplant*. 2004 Apr;10(4):534–40.
8. Toso C, Cader S, Glenda AM, Morel P, Mentha G, Kneteman NM. Factors predicting survival after post-transplant hepatocellular carcinoma recurrence. *J*

- Hepatobiliary Pancreat Sci. 2013 Mar;20(3):342–7.
9. Sapisochein G, Goldaracena N, Astete S, Laurence JM, Davidson D, Rafael E, et al. Benefit of Treating Hepatocellular Carcinoma Recurrence after Liver Transplantation and Analysis of Prognostic Factors for Survival in a Large Euro-American Series. *Ann Surg Oncol*. 2015 Jul 4;22(7):2286–94.
 10. Nagai S, Mangus RS, Kubal CA, Ekser B, Fridell JA, Klingler KR, et al. Prognosis after recurrence of hepatocellular carcinoma in liver transplantation: Predictors for successful treatment and survival. *Clin Transplant*. 2015 Dec;29:1156–63.
 11. Bodzin AS, Lunsford KE, Markovic D, Harlander-Locke MP, Busuttil RW, Agopian VG. Predicting Mortality in Patients Developing Recurrent Hepatocellular Carcinoma After Liver Transplantation. *Ann Surg* . 2017 Jul;266(1):118–25.
 12. Roh Y-N, David Kwon CH, Song S, Shin M, Man Kim J, Kim S, et al. The prognosis and treatment outcomes of patients with recurrent hepatocellular carcinoma after liver transplantation. *Clin Transplant*. 2014 Jan;28(1):141–7.
 13. Dange MC, Srinivasan N, More SK, Bane SM, Upadhya A, Ingle AD, et al. Galectin-3 expressed on different lung compartments promotes organ specific metastasis by facilitating arrest, extravasation and organ colonization via high affinity ligands on melanoma cells. *Clin Exp Metastasis*. 2014 Aug;31(6):661–73.
 14. Chen C, Duckworth CA, Zhao Q, Pritchard DM, Rhodes JM, Yu LG. Increased circulation of galectin-3 in cancer induces secretion of metastasis-promoting cytokines from blood vascular endothelium. *Clin Cancer Res*. 2013 Apr;19(7):1693–704.
 15. Sposito C, Mariani L, Germini A, Flores Reyes M, Bongini M, Grossi G, et al. Comparative efficacy of sorafenib versus best supportive care in recurrent hepatocellular carcinoma after liver transplantation: A case-control study. *J Hepatol*. 2013 Jul;59(1):59–66.

Table 1 - Clinical and histological characteristics of 36 patients who developed post-transplant HCC recurrence

Characteristic	Number (%)
Before the diagnosis of tumour recurrence	
Males	32 (88.9%)
More than 60 years old by liver transplantation	18 (50.0%)
Aetiology of liver disease	
Hepatitis C	22 (61.2%)
Hepatitis B	7 (19.4%)
Non-viral causes	7 (19.4%)
AFP higher than 10 ng/mL before transplantation	29 (80.6%)
Largest tumour nodule size above 5 cm	8 (22.9%)
More than three tumour nodules	12 (34.3%)
Vascular tumour invasion (n = 33) §	25 (75.8%)
Poorly differentiated tumours (n= 33) ¶	3 (9.1%)
Staging beyond Milan criteria	23 (63.9%)
Galectin 3 tumour expression (n = 31) ¥	12 (38.7%)
Use of mTOR inhibitors before TR	7 (19.4%)
After the diagnosis of tumour recurrence	
Time of diagnosis of TR	
Early	18 (50.0%)
Late	18 (50.0%)
AFP after TR higher than 10 ng/mL (n=33) £	20 (60.6%)
First organ affected by tumour recurrence	
Liver	8 (22.2%)
Lung	9 (25.0%)
Bone	9 (25.0%)
Other	10 (27.8%)
Location of tumour recurrence	
Only hepatic	2 (5.6%)
Extra-hepatic	16 (44.4%)
Both	18 (50.0%)
Recurrence in the graft at any time	18 (50.0%)
Lung metastasis at any time	17 (47.2%)
Bone metastasis at any time	17 (47.2%)
Use of mTOR inhibitors after recurrence	14 (38.9%)
Treatment performed	
Supportive therapy	18 (50.0%)
Systemic therapy alone	8 (22.2%)
Locoregional therapy alone	1 (2.8%)
Combination of locoregional and systemic therapies	9 (25.0%)

HCC, hepatocellular carcinoma; AFP, alpha fetoprotein; TR, tumour recurrence

§ Information on vascular invasion was unavailable in three pathological reports

¶ Information on the degree of differentiation was unavailable in three pathological reports

¥ IHC Analysis of galectin-3 not performed in five cases: four due to unavailability of paraffin material and one for absence of viable tumour cells in the explant

£ Result of AFP levels after TR not available in three records

Table 2 – Univariate and Multivariate Analyses of Factors Associated to Early Post-transplant HCC Recurrence

Characteristic	Recurrence Time		OR (95% CI)	p	Adjusted OR (95% CI)	p
	Early	Late				
Gal3 expression						
Negative	5 (27.8%)	14(77.8%)	1		1	
Positive	11 (61.1%)	1 (5.5%)	30.8(3.1-303.4)	<0.001	24.4(2.1-278.2)	0.01
<i>Missing</i>	2 (11.1%)	3 (16.7%)				
Vascular invasion						
Absent	2 (11.1%)	6 (33.4%)	1		1	
Present	15 (83.4%)	10(55.5%)	4.5(0.75-26.9)	0.08	6.5(0.3-128.2)	0.22
<i>Missing</i>	1 (5.5%)	2 (11.1%)				
Tumour staging						
Milan-in	5 (27.8%)	8 (44.4%)	1			
Milan-out	13 (72.2%)	10(55.6%)	2.1(0.5-8.3)	0.30		
Pre-transplant AFP						
≤ 10 ng/mL	3 (16.7%)	5 (27.8%)	1			
> 10 ng/mL	15 (83.3%)	13(72.2%)	1.9(0.4-5.4)	0.43		
Differentiation degree						
Well/moderately	16 (88.9%)	14(77.8%)	1			
Poorly	1 (5.55%)	2(11.1%)	0.4(0.04-5.36)	0.52		
<i>Missing</i>	1 (5.55%)	2 (11.1%)				

HCC, hepatocellular carcinoma; OR, odds ratio; Gal3, galectin 3; AFP, alpha fetoprotein

Table 3 – Univariate and Multivariate Analyses of Factors Associated to Lung Metastasis Ocurrence in Post-transplant HCC Recurrence

Characteristic	Lung metastases		OR (95% CI)	p	Adjusted OR (95% CI)	p
	Present	Absent				
Gal3 expression						
Negative	6 (35.3%)	13(68.5%)	1		1	
Positive	10(58.8%)	2 (10.5%)	10.83(1.8-65.5)	0.009	7.62(1.15-50.5)	0.03
<i>Missing</i>	1 (5.9%)	4 (21.0%)				
Vascular invasion						
Absent	2 (12.5%)	6 (31.5%)	1		1	
Present	14 (87.5%)	11(58.0%)	3.82(0.64-22.7)	0.14	5.32(0.41-68.8)	0.20
<i>Missing</i>	1 (5.9%)	2 (10.5%)				
Tumour staging						
Milan-in	6 (35.3%)	7 (36.8%)	1			
Milan-out	11 (64.7%)	12 (63.2%)	1.07(0.27-4.2)	0.2		
Pre-transplant AFP						
≤ 10 ng/mL	4 (23.5%)	4 (21.1%)	1			
> 10 ng/mL	13 (76.5%)	15(78.9%)	0.87(0.18-4.2)	0.85		
Differentiation degree						
Well/moderately	15 (88.2%)	15(79.0%)	1			
Poorly	1 (5.9%)	2 (10.5%)	0.5(0.04-6.12)	0.58		
<i>Missing</i>	1 (5.9%)	2 (10.5%)				

HCC, hepatocellular carcinoma; OR, odds ratio; Gal3, galectin 3; AFP, alpha fetoprotein

Table 4 – Univariate and Multivariate Analyses of Factors Associated to Post-transplant mortality in patients with HCC recurrence

Characteristic	HR (95% CI)	p	Adjusted HR (95% CI)	p
Transplant related				
More than 60 years old	0.58(0.27-1.25)	0.166		
Male sex	0.92(0.27-3.10)	0.890		
Aetiology				
Non-viral causes	1			
Hepatitis C	1.92(0.63-5.83)	0.248		
Hepatitis B	2.40(0.60-9.66)	0.218		
Pre-transplant AFP above 10ng/mL	1.32(0.53-3.25)	0.552		
Poorly differentiated tumour	0.76(0.18-3.25)	0.709		
Vascular invasion	2.52(0.93-6.85)	0.069		
Staging beyond Milan criteria	1.67(0.76-3.67)	0.200		
Galectin 3 tumour expression	2.93(1.21-7.11)	0.018	3.53 (1.24-10.01)	0.018
Tumour recurrence-related				
Post-recurrence AFP above 10 ng/mL	1.41(0.63-3.12)	0.402		
First organ affected by TR				
Other	1		1	
Graft	2.90(0.83-10.10)	0.99	4.07(0.93-17.81)	0.063
Bone	3.59(1.08-11.97)	0.037	3.05(0.72-12.97)	0.130
Lung	3.97(1.20-13.12)	0.024	2.99(0.85-10.44)	0.087
Graft recurrence	1.03(0.48-2.18)	0.940		
Bone metastases	1.25(0.59-2.63)	0.561		
Lung metastases	2.11(0.98-4.57)	0.056		
Recurrence treatment				
Supportive	1		1	
Monotherapy	0.49(0.20-1.22)	0.125	0.14(0.04-0.53)	0.003
Combined therapy	0.26(0.10-0.70)	0.007	0.08(0.02-0.34)	<0.001

HCC, hepatocellular carcinoma; HR, hazard ratio; AFP, alpha fetoprotein; TR, tumour recurrence

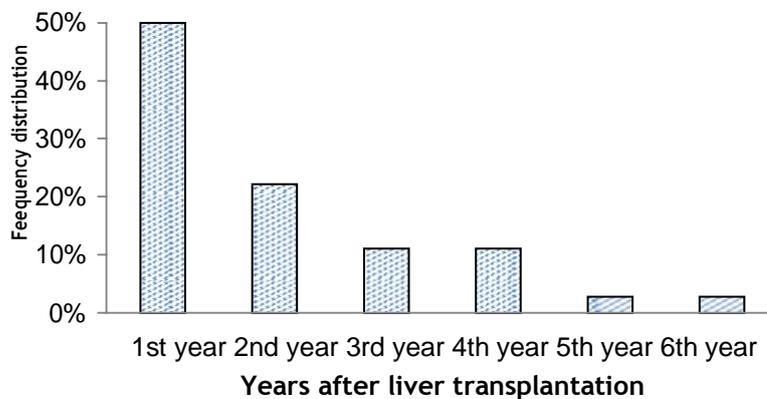


Figure 2 – Time of HCC-recurrence diagnosis after liver transplantation

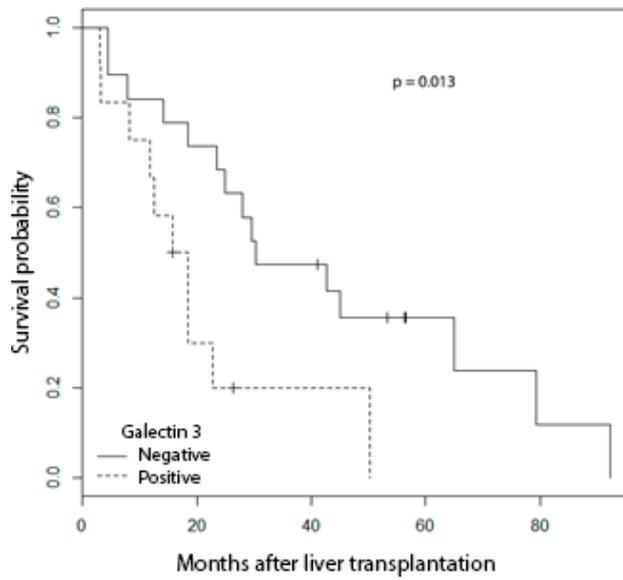


Figure 2 – Kaplan Meier curves of post-transplant survival in patients with HCC-recurrence, according to galectin3 expression, p log-rank = 0.013

ANEXO A – PARECER CONSUBSTANCIADO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DA UFPE



UNIVERSIDADE FEDERAL DE
PERNAMBUCO CENTRO DE
CIÊNCIAS DA SAÚDE/UFPE



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: EXPRESSÃO TECIDUAL DE GALECTINAS COMO FATOR DE RISCO PARA RECORRÊNCIA TUMORAL APÓS TRANSPLANTE HEPÁTICO POR HEPATOCARCINOMA SECUNDÁRIO A HEPATITE C

Pesquisador: NORMA ARTEIRO FILGUEIRA

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 34576814.0.0000.5208

Instituição Proponente: Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 777.863

Data da Relatoria: 03/09/2014

Apresentação do Projeto:

Trata-se de um estudo que se propõe a relacionar a expressão tecidual das galectinas 1,3 e 9 nos fígados explantados por Carcinoma Hepato Celular com o risco de recorrência tumoral e sobrevida pós-transplante, comparando com pacientes portadores de Carcinoma Hepato Celular secundário a hepatite C e outros agentes etiológicos.

O estudo tem como finalidade o curso de doutorado pela aluna Norma Arteiro Filgueira sob a orientação da Prof.Dra. Heloisa Ramos Lacerda de Melo.

Desenho do estudo: Coorte ambispectivo, incluindo todos os pacientes com CHC submetidos a transplante na Unidade de Transplante de Fígado dos Hospitais

Oswaldo Cruz e Jayme da Fonte (HUOC/HJF) desde 1999, para avaliar a recorrência tumoral e a sobrevida. Os materiais dos explantes serão submetidos a revisão histopatológica para pesquisa dos fatores de mau prognóstico e também a imuno-histoquímica para galectinas 1,3 e 9. No componente retrospectivo, serão buscados dados sobre possível recorrência tumoral e sobrevida, através de análise de prontuários, contato telefônico com familiares ou médico assistente, atestado de óbito ou por avaliação clínica dos sobreviventes. No componente prospectivo do estudo, os pacientes submetidos a transplante por esta indicação serão seguidos pessoalmente pelo pesquisador, com intervalos máximos de três meses, por um período mínimo de um ano. Nos atendimentos clínicos serão colhidas informações demográficas sobre a hepatite C e realizada a monitorização das recidivas sendo estimado um total de 300 monitorizações, que serão divididas em dois grupos: Grupo 1 constituído por 180 pacientes com CHC associado a Hepatite C e o Grupo 2 formado por 120 pacientes com CHC de outras etiologias.

Instituições que participarão do estudo: Hospitais Oswaldo Cruz , Jaime da Fonte e o LIKA.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Avaliar a associação da expressão tecidual de galectinas em fígados explantados com a recorrência do carcinoma hepatocelular (CHC) póstransplante.

Objetivo Secundário:

1. Descrever o padrão de expressão tecidual de galectinas 1, 3 e 9 em fígados explantados por CHC.
2. Comparar a expressão tecidual das galectinas em portadores de CHC secundário a Hepatite C com a de portadores de CHC por outras etiologias
3. Relacionar a expressão tecidual das galectinas com fatores histológicos determinantes de prognóstico, como: diâmetro e número dos nódulos, invasão microvascular e grau dediferenciação celular.
4. Determinar a incidência de recorrência tumoral e a sobrevida após transplante hepático por CHC.
5. Comparar a incidência de recorrência do CHC após transplante nos pacientes portadores de Hepatite C com a do grupo com outras etiologias.
6. Avaliar a associação entre a recorrência do CHC pós-transplante e

características do HCV, como genótipo e viremia na ocasião do transplante.

7. Analisar a associação da recorrência do CHC no pós-transplante com a expressão tecidual das galectinas e os dados histológicos do explante.

8. Determinar a sobrevida global e livre de recorrência tumoral na população geral de transplantados e de acordo com a expressão tecidual das galectinas 1, 3 e 9.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Quanto aos riscos e desconfortos, o participante poderá se sentir constrangido(a) em prestar informações sobre seus sintomas e dados da sua doença e poderá ficar ansioso(a) pela realização de exames de acompanhamento. Há a possibilidade de quebra de sigilo ou extravio de documentos, condição amenizada pelo compromisso assumido pela pesquisadora com o cuidadoso manuseio do material da pesquisa.

Benefícios:

Não estão previstos benefícios diretos, entretanto como benefícios indiretos os resultados desta pesquisa servirão para identificar uma forma de prever quais pacientes poderão apresentar recorrência do tumor após o transplante. Para que esses possam ser melhor acompanhados e tratados. A identificação de um grupo com maior risco de recorrência tumoral após transplante hepático poderá ser usada para restringir a este subgrupo a realização de exames de monitorização de recorrência, reduzindo custos e riscos inerentes aos procedimentos.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de um importante estudo cujos resultados poderão contribuir para se identificar marcadores relacionados a recidivas de Carcinoma hepatocelular associados a hepatite C e outras etiologias.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Folha de Rosto redigida de forma adequada.

TCLE redigido de forma adequada, contempla todas as etapas do projeto. Cartas de anuência do hospital Oswaldo Cruz e LIKA anexadas Autorizações para manuseio de prontuários e material biológico anexadas Termo de confidencialidade anexado

Curriculum vitae da pesquisadora e orientadora na plataforma lattes.

Cronograma estima início da coleta de dados no período de 01/10/2014 a 29/12/2017

Orçamento de R\$ 13.539,00 referentes a material de laboratório sob a responsabilidade da pesquisadora. Carta de anuência do Hospital Jaime da Fonte não anexada.

Continuação do Parecer: 777.863

Recomendações:

Sem recomendações

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Anexar carta de anuência do Hospital Jaime da Fonte

Situação do Parecer:

Pendente

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

O Colegiado aprova o parecer do protocolo em questão e o mesmo encontra-se em pendência. O(A) pesquisador(a), deverá atender as considerações do parecer consubstanciado e corrigindo as pendências indicadas, diretamente no projeto de pesquisa(PBrasil) e no projeto completo em WORD e, caso necessário, no modelo do TCLE- estacando todas as modificações com MARCADOR AMARELO, nos 2(dois)projetos. O (A) pesquisador (a) tem 60 dias para responder aos quesitos formulados pelo CEP em seu parecer. Após esse prazo, o projeto será considerado arquivado (res.466/12).

RECIFE, 03 de Setembro de 2014

Assinado por:

GERALDO BOSCO

LINDOSO COUTO

(Coordenador)



UNIVERSIDADE FEDERAL DE
PERNAMBUCO CENTRO DE
CIÊNCIAS DA SAÚDE/UFPE



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: EXPRESSÃO TECIDUAL DE GALECTINAS COMO FATOR DE RISCO PARA RECORRÊNCIA TUMORAL APÓS TRANSPLANTE HEPÁTICO POR HEPATOCARCINOMA SECUNDÁRIO A HEPATITE C

Pesquisador: NORMA ARTEIRO FILGUEIRA

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 34576814.0.0000.5208

Instituição Proponente: Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 798.004

Data da Relatoria: 22/09/2014

Apresentação do Projeto:

Indicado no relatório inicial.

Objetivo da Pesquisa:

Indicado no relatório inicial.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Indicado no relatório inicial.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Indicado no relatório inicial.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Indicado no relatório inicial.

Recomendações:

s/recomendação.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Aprovado

Continuação do Parecer: 798.004

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

O Colegiado aprova o parecer do protocolo em questão e o pesquisador está autorizado para iniciar a coleta de dados.

Projeto foi avaliado e sua APROVAÇÃO definitiva será dada, após a entrega do relatório final, na PLATAFORMA BRASIL, através de “Notificação” e, após apreciação, será emitido Parecer Consubstanciado.

RECIFE, 19 de Setembro
de 2014

Assinado por:

**GERALDO BOSCO
LINDOSO COUTO
(Coordenador)**

**ANEXO B – PARECER CONSUBSTANCIADO DO COMITÊ DE ÉTICA EM
PESQUISA DO COMPLEXO HOSPITALAR HUOC-PROCAPE**

COMPLEXO HOSPITALAR
HUOC/PROCAPE



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Elaborado pela Instituição Coparticipante

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: EXPRESSÃO TECIDUAL DE GALECTINAS COMO FATOR DE RISCO PARA RECORRÊNCIA TUMORAL APÓS TRANSPLANTE HEPÁTICO POR HEPATOCARCINOMA SECUNDÁRIO A HEPATITE C

Pesquisador: NORMA ARTEIRO FILGUEIRA

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 34576814.0.3002.5192

Instituição Proponente: Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 856.974

Data da Relatoria: 28/10/2014

Apresentação do Projeto:

Trata-se de um estudo que se propõe a relacionar a expressão tecidual das galectinas 1,3 e 9 nos fígados explantados por Carcinoma Hepato Celular com o risco de recorrência tumoral e sobrevida pós-transplante, comparando com pacientes portadores de Carcinoma Hepato Celular secundário a hepatite C e outros agentes etiológicos. Utilizando o hospital Universitário Oswaldo Cruz com entidade coparticipante

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Avaliar a associação da expressão tecidual de galectinas em fígados explantados com a recorrência do carcinoma hepatocelular (CHC) póstransplante.

Objetivo Secundário:

1. Descrever o padrão de expressão tecidual de galectinas 1, 3 e 9 em fígados explantados por CHC.
2. Comparar a expressão tecidual das galectinas em portadores de CHC secundário a Hepatite C com a de portadores de CHC por outras etiologias
3. Relacionar a expressão tecidual das galectinas com fatores histológicos determinantes de prognóstico, como: diâmetro e número dos nódulos, invasão microvascular e grau de diferenciação celular.
4. Determinar a incidência de recorrência tumoral e a sobrevida após transplante hepático por CHC.
5. Comparar a incidência de recorrência do CHC após transplante nos pacientes portadores de Hepatite C com a do grupo com outras etiologias.
6. Avaliar a associação entre a recorrência do CHC pós-transplante e características do HCV, como genótipo e viremia na ocasião do transplante.

7. Analisar a associação da recorrência do CHC no pós-transplante com a expressão tecidual das galectinas e os dados histológicos do explante.

8. Determinar a sobrevida global e livre de recorrência tumoral na população geral de transplantados e de acordo com a expressão tecidual das galectinas 1, 3 e 9.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Quanto aos riscos e desconfortos, o participante poderá se sentir constrangido(a) em prestar informações sobre seus sintomas e dados da sua doença e poderá ficar ansioso(a) pela realização de exames de acompanhamento. Há a possibilidade de quebra de sigilo ou extravio de documentos, condição amenizada pelo compromisso assumido pela pesquisadora com o cuidadoso manuseio do material da pesquisa. Benefícios:

Não estão previstos benefícios diretos, entretanto como benefícios indiretos os resultados desta pesquisa servirão para identificar uma forma de prever quais pacientes poderão apresentar recorrência do tumor após o transplante. Para que esses possam ser melhor acompanhados e tratados. A identificação de um grupo com maior risco de recorrência tumoral após transplante hepático poderá ser usada para restringir a este subgrupo a realização de exames de monitorização de recorrência, reduzindo custos e riscos inerentes aos procedimentos

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de um importante estudo cujos resultados poderão contribuir para se identificar marcadores relacionados a recidivas de Carcinoma hepatocelular associados a hepatite C e outras etiologias.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Folha de Rosto redigida de forma adequada.

TCLE redigido de forma adequada, contempla todas as etapas do projeto.

Cartas de anuência do hospital Oswaldo Cruz e LIKA anexadas

Autorizações para manuseio de prontuários e material biológico anexadas

Termo de confidencialidade anexado

Curriculum vitae da pesquisadora e orientadora na plataforma lattes disponíveis Cronograma estima início da coleta de dados no período de 01/10/2014 a 29/12/2017

Orçamento de R\$ 13.539,00 referentes a material de laboratório sob a responsabilidade da pesquisadora.

Carta de anuência do Hospital Jaime da Fonte anexada.

Recomendações:

Atualizar data de início da coleta de dados após aprovação do comitê de ética da unidade coparticipante

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Aprovado com recomendação para substituir a data de início da coleta de dados

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Aprovado com recomendação para substituir a data de início da coleta de dados
RECIFE, 04 de Novembro de 2014

Assinado por:

RAQUEL ROFFÉ

(Coordenador)

Endereço: Rua Arnóbio Marques, 310

CE 50.100-

Bairro: Santo Amaro

P: 130

UF: PEMunicípio: RECIFE

E-mail:

Telefo (81)3184-

Fax: (81)3184-[cep_huoc.procaprocape@yahoo.com.](mailto:cep_huoc.procaprocape@yahoo.com.br)

ne: 1460

1271

br

ANEXO C – TERMO DE AUTORIZAÇÃO PARA CONSULTA AOS PRONTUÁRIOS



AUTORIZAÇÃO DE USO DE DADOS

Declaramos para os devidos fins que cederemos à pesquisadora NORMA ARTEIRO FILGUEIRA, o acesso aos dados de prontuários, para serem utilizados na pesquisa: EXPRESSÃO TECIDUAL DE GALECTINAS COMO FATOR DE RISCO PARA RECORRÊNCIA TUMORAL APÓS TRANSPLANTE HEPÁTICO POR HEPATOCARCINOMA SECUNDÁRIO A HEPATITE C, que está sob a orientação da Profa. HELOÍSA RAMOS LACERDA DE MELO.

Esta autorização está condicionada ao cumprimento da pesquisadora aos requisitos da Resolução 466/12 e suas complementares, comprometendo-se a mesma a utilizar os dados pessoais dos sujeitos da pesquisa, exclusivamente para os fins científicos, mantendo o sigilo e garantindo a não utilização das informações em prejuízo das pessoas e/ou das comunidades.

Antes de iniciar a coleta de dados a pesquisador deverá apresentar o Parecer Consubstanciado devidamente aprovado, emitido por Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos, credenciado ao Sistema CEP/CONEP.

Recife, 07 de agosto de 2014.

Prof. Dr. Claudio Moura Lacerda
Chefe do Serviço de Cirurgia Geral e
Transplante Hepático
CRM-4545 - Reg. 07649 - HUOC

Prof. Claudio Moura Lacerda de Melo



HOSPITAL UNIVERSITÁRIO OSWALDO CRUZ
Rua Arnóbio Marques n. 310 – Santo Amaro – Recife – PE
CEP: 50100-130 – Fones: (81) 3184.1200 – Fax: (81) 3184.1489
C.N.P.J: 11022597/0013-25

ANEXO D – TERMO DE AUTORIZAÇÃO PARA USO DE MATERIAL BIOLÓGICO

Vital Lira CRM 1194
 Edna Cristina Sales CRM 4515
 Norma Thomé Jucá CRM 4802
 Rosa Azevedo Foinquinos CRM 8335
 Ana Paula Matos CRM 10157
 Mariana Lira CRM 17780

SPAC

STUDIO DE
 PATOLOGIA CIRÚRGICA

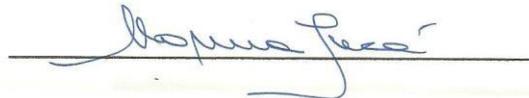
AUTORIZAÇÃO DE USO DE MATERIAL BIOLÓGICO

Declaramos para os devidos fins, que cederemos à pesquisadora Norma Arteiro Filgueira, o acesso aos blocos de parafina dos materiais de fígado provenientes de transplante hepático para serem utilizados na pesquisa: EXPRESSÃO TECIDUAL DE GALECTINAS COMO FATOR DE RISCO PARA RECORRÊNCIA TUMORAL APÓS TRANSPLANTE HEPÁTICO POR HEPATOCARCINOMA SECUNDÁRIO A HEPATITE C, que está sob orientação da Prof^a. HELOÍSA RAMOS LACERDA DE MELO.

Esta autorização está condicionada ao cumprimento do (a) pesquisador (a) aos requisitos da Resolução 466/12 e suas complementares, comprometendo-se o (a) mesmo (a) a utilizar os dados pessoais dos sujeitos da pesquisa, exclusivamente para os fins científicos, Mantendo o sigilo e garantindo a não utilização das informações em prejuízo das pessoas e/ou das comunidades.

Antes de iniciar a coleta de dados o/a pesquisador/a deverá apresentar o Parecer Consubstanciado devidamente aprovado, emitido por comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos, credenciado ao Sistema CEP/CONEP.

Recife, 07 de agosto de 2014



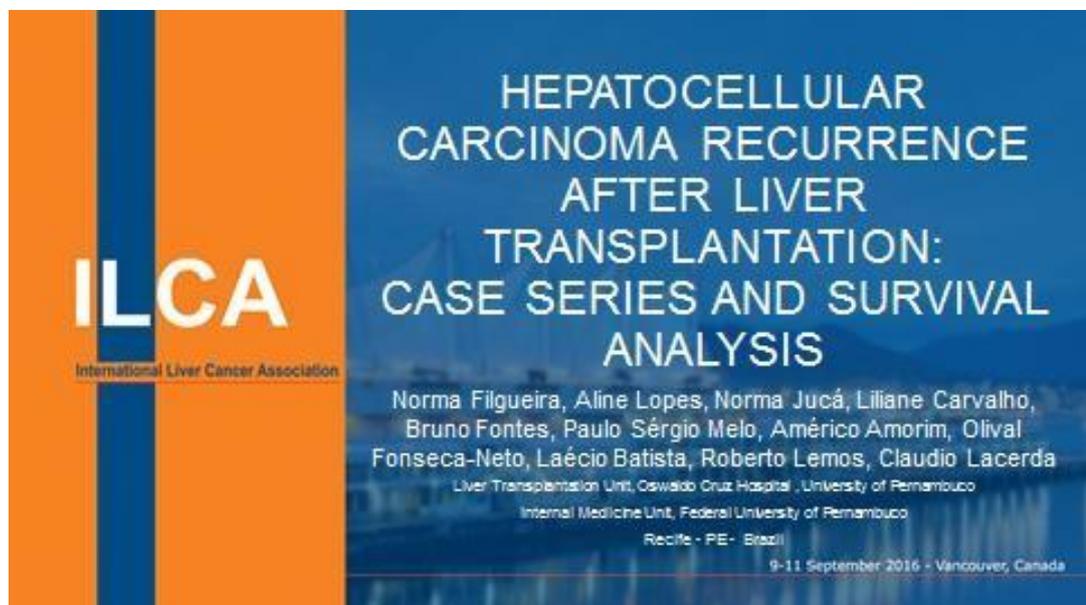
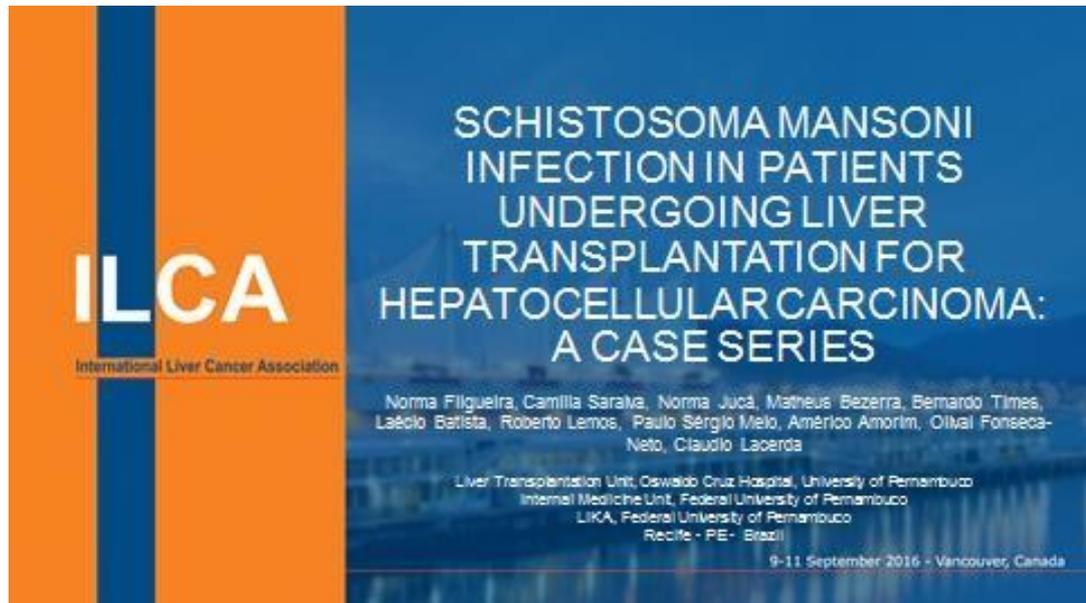
Dra Norma Thomé Jucá
 CREMEPE 4802

CENTRAL: Rua Antônio Gomes de Freitas, 110 – Ilha do Leite – Recife/PE – CEP: 50.070-480 – Fone: (81) 3221.5545
 POSTOS: Hospital Esperança (Ilha do Leite) – Fone: (81) 3221.8176 / Hospital Jayme da Fonte (Graças) Fone: (81) 3222.5253 / Hospital Memorial São José (Derby) – Fone: (81) 3316.5800 / Centro Diagnóstico Santa Joana (Boa Vista) – Fone: (81) 3416.6060 / EndoSabin (Boa Viagem) – Fone: (81) 3326.2346 Digest (Madalena) – Fone: (81) 2137.5410

ANEXO E – OUTROS PRODUTOS DESTA LINHA DE PESQUISA

Trabalhos apresentados na 10th ILCA Annual Conference

Realizada em Vancouver, 9 a 11 de setembro de 2016



Trabalhos apresentados no XXIV Congresso Brasileiro de Hepatologia Realizado em Recife, 4 a 7 de outubro de 2017

PRÊMIO AMAURI COUTINHO

TL-P-4222

Fibrose hepática esquistossomótica e carcinoma hepatocelular (CHC) - série de casos de pacientes submetidos a transplante hepático

Norma Arteiro **Filgueira**, Camilla Maria de Alencar **Saraiva**, Norma Thomé **Jucá**, Matheus Filgueira **Bezerra**, Bernardo Times de **Carvalho**, Olival Cirilo **Fonseca Neto**, Paulo Sérgio Vieira de **Melo**, Américo **Amorim**, Claudio Moura **Lacerda**

Contexto - Especula-se que infecções parasitárias possam ter papel na carcinogênese através de alterações na resposta inflamatória do hospedeiro. A associação entre *Schistosoma haematobium* e carcinoma escamocelular de bexiga já é bem definida. A associação entre Esquistossomose Mansonii (EM) e CHC vem sendo avaliada, todavia, os estudos carecem de material histopatológico que analise o fígado *in totum*. **Objetivo** - Identificar a frequência de explantes apenas com fibrose esquistossomótica em pacientes submetidos a Transplante Hepático (TH) por CHC, descrevendo suas características e dos explantes. **Métodos** - Estudo de coorte com 170 pacientes submetidos a TH por CHC no período de 1999 a dezembro de 2016. **Resultados** - Foram identificados seis casos (3,5%) com fibrose hepática esquistossomótica pela análise do explante. Desses, cinco eram do sexo masculino, a idade ao transplante variou de 34 a 70, com mediana de 53 anos e todos eram procedentes de áreas endêmicas. Em três pacientes (50%), a indicação do TH foi por acometimento bilobar; nos demais por sinais de insuficiência hepática. Todos os explantes mostravam a fibrose portal estrelada típica da fibrose de Symmers e em 4 (66,7%) havia granulo mas esquistossomóticos ativos. Análise histopatológica mostrou ausência de cirrose, esteatose, hepatopatias outras, sem trombose completa de veia porta. **Conclusão** - A presente série de casos é a primeira a descrever associação entre CHC e EM baseada na análise *in totum* do fígado, permitindo excluir outras hepatopatias associadas.

Hospital das Clínicas da UFPE e Unidade de Transplante de Fígado do Hospital Oswaldo Cruz, Brasil.

TL-4153

Análise dos critérios do Ministério da Saúde para concessão de situação especial para transplante hepático por carcinoma hepatocelular

Liliane de Andrade **Carvalho**, Norma Arteiro **Filgueira**, Norma Thomé **Jucá**, Erika Cavalcante **Maranhão**, Shirley Michele Santos **Monteiro**, Karla Bezerra **Ribeiro**, Roberto Souza **Lemos**, Laécio Leitão **Batista**, Priscylla Jennie Monteiro **Rabêlo**, Olival Cirilo Lucena da **Fonseca Neto**, Américo Gusmão **Amorim**, Paulo Sérgio Vieira de **Melo**, Claudio Moura **Lacerda**

Contexto - O diagnóstico de Carcinoma Hepatocelular (CHC) em cirróticos pode ser definido com base em aspectos radiológicos, dispensando a morbidade da biópsia tumoral. A legislação brasileira, através da Portaria 2600/2009, definiu critérios para concessão de pontuação especial no MELD para

viabilizar o transplante hepático (TH) para o tratamento do CHC. Torna-se essencial a análise crítica desses critérios para otimizar a acurácia diagnóstica e assim evitar TH desnecessários. **Objetivo** - Analisar o desfecho dos pacientes que receberam pontuação especial para CHC pela Câmara Técnica Estadual (CTE) da Central de Transplantes, comparando o diagnóstico radiológico pré-operatório com a histologia do explante. **Métodos** - Estudo transversal, analítico, retrospectivo. Para coleta de informações, foi solicitada à CTE a relação nominal dos pacientes que receberam pontuação especial por CHC entre setembro de 2012 e dezembro de 2016, a partir do que foi feita pesquisa nos prontuários de uma unidade de transplante para revisão dos critérios utilizados no diagnóstico da neoplasia e do resultado do estudo histopatológico do explante. **Resultados** - Foram analisados 97 pacientes que receberam pontuação especial pela CTE, dos quais 21 (21,7%) não foram submetidos ao TH, seja por perda de seguimento (5), óbito (4), ainda em fila de espera (4), progressão tumoral (2), resposta completa ao tratamento ponte (2) ou mudança de diagnóstico (2). Dos 76 pacientes transplantados, três foram excluídos por indisponibilidade do resultado do explante. Dos 73 explantes analisados, seis (8,2%) não confirmaram o diagnóstico de CHC, configurando um valor preditivo positivo de 91,8% para os critérios diagnósticos do Ministério da Saúde. Os casos discordantes foram representados por: adenoma (2), colangiocarcinoma (2), hemangioma (1) e nódulo de regeneração (1). Os exames de imagem utilizados para definição do diagnóstico foram: ressonância magnética (4), tomografia computadorizada (1) e ultrassonografia com contraste (1), que mostraram "lavagem" do contraste nas fases venosas em todos os casos. **Conclusão** - Foram observados seis casos de discordância entre o diagnóstico pré-operatório por imagem e o histopatológico do explante (valor preditivo positivo de 91,8%). Os efeitos drásticos de um diagnóstico equivocado, principalmente quando não existem outras indicações para o TH, obrigam a comunidade médico-científica a buscar o aprimoramento constante dos critérios diagnósticos para CHC.

Hospital das Clínicas da UFPE; Unidade de Transplante de Fígado do Hospital Oswaldo Cruz.

PO-4120

Mortalidade por neoplasia primária de fígado no estado de Pernambuco: uma série temporal de 1999 a 2015

Paulo Miranda Cavalcante Neto, Marcela de Melo Cavalcanti e Leitão, Arthur Lyra Miranda Cavalcante, Norma Arteiro Filgueira

Contexto - A neoplasia primária de fígado (NPF) é a segunda causa de mortalidade por câncer em todo o mundo, sendo o carcinoma hepatocelular (CHC) responsável por cerca de 80% dos casos, enquanto o colangiocarcinoma intra-hepático (CCI) responde por 15 a 20% do total. Estudos epidemiológicos locais são importantes para o conhecimento da dimensão do problema na região e fornecimento de subsídios para medidas de prevenção e tratamento. **Objetivo** - Descrever a evolução temporal da mortalidade por NPF no estado de Pernambuco no período de 1999 a 2015. **Métodos** - Série temporal analisando os dados do Sistema de Informação de Mortalidade (SIM) dos falecidos no estado de Pernambuco entre 1999 e 2015, buscando-se os CIDs C22.0 (CHC) e C22.1 (CCI) em qualquer das lacunas destinadas à causa do óbito ou doenças associadas, a partir dos quais foi calculada a taxa de mortalidade proporcional (TMP) por NPF e os dois subtipos histológicos (CHC e CCI). Os dados foram analisados pelo programa Excel e pelo StatCalc do Epi-Info 7.2.1.0. **Resultados** - A TMP por NPF geral mediana no período estudado foi de 202/100.000 óbitos/ano, tendo variado de 72/100.000 óbitos no ano 2000 a 317/100.000 óbitos em 2013, determinando uma tendência crescente estatisticamente significativa ($\chi^2=221,5$, $p<0,001$). A TMP mediana por CHC no período estudado foi de 146/100.000 óbitos/ano, tendo variado de 51/100.000 óbitos em 2000 a 189/100.000 óbitos em 2011, com tendência temporal mostrando crescimento significativo ($\chi^2=65,5$, $p<0,001$). A TMP por CCI também mostrou aumento progressivo, tendo tido a mediana de 44/100.000 óbitos/ano no período global e variado de 21/100.000 óbitos em 1999 a 158/100.000 óbitos em 2014 ($\chi^2=206,3$, $p<0,001$). Quando comparados os períodos de 1999 a 2006 e 2007 a 2015, observou-se um crescimento da TMP de 85,9%, 66,3% e 131,6%, para NPF, CHC e CCI, respectivamente. Quando analisadas as TMP distribuídas por gênero, observou-se uma relação 1,25 vezes maior no sexo masculino para o CHC, enquanto a TMP por CCI foi 2,22 vezes maior no sexo feminino. **Conclusão** - O estudo demonstrou uma tendência crescente na TMP por CHC e CCI no estado de Pernambuco nos últimos 17 anos, corroborando as estatísticas de outros países ocidentais, mas surpreendentemente identificando uma elevada proporção de casos de óbito por CCI, que corresponderam a 33% dos óbitos por NPF, especialmente nos últimos três anos, quando se aproximou ou até mesmo superou a do CHC.

Hospital das Clínicas da UFPE, PE, Brasil.

PO-4375

Ultrassonografia com contraste de microbolhas na diferenciação entre trombo hemático versus invasão tumoral de veia porta: Ensaio Iconográfico

Roberto de Souza Lemos, Laécio Leitão Batista, Francisco Aristóteles Coelho Sarmento Neto, Norma Arteiro Filgueira, Adriana Ferraz de Vasconcelos, Claudio Moura Lacerda

Contexto - A invasão tumoral da veia porta (ITVP) é evento de mau prognóstico na evolução do carcinoma hepatocelular (CHC), pois define a disseminação extra-hepática da doença e exclui o paciente da possibilidade de transplante hepático. Por outro lado, o desenvolvimento de trombose hemática portal (THP) é complicação comum em cirróticos e não interfere no estadiamento do CHC. Toma-se essencial, portanto, diferenciar a THP da ITVP, por meio da caracterização da vascularização arterial do trombo. O ultrassom com contraste de microbolhas (CEUS), por meio do acompanhamento em tempo real da dinâmica do contraste, permite boa caracterização da microvasculatura de nódulos hepáticos ou ausência de vascularização nos tecidos desvascularizados, com excelente definição das fases arterial, portal e tardia. Tecnicamente, portanto, a avaliação por CEUS permite definir se existe vascularização do trombo, classificando-o como tumoral ou hemático. **Objetivo** - Apresentar as imagens da técnica de ultrassonografia com microbolhas de uma série de pacientes com trombose portal, classificando-a como tumoral ou hemática de acordo com sua irrigação/preenchimento pelo contraste. **Métodos** - Série de casos de pacientes submetidos a CEUS, utilizando microbolhas de hexafluoreto de enxofre (Sonovue®) para a avaliação de lesões hepáticas focais nos quais foi identificada a presença de trombose portal. **Resultados** - Entre novembro de 2014 e maio de 2015, 7,80 pacientes realizaram CEUS, para o diagnóstico complementar de hemangiomas, hiperplasias nodulares, adenomas, hepatocarcinomas e outras lesões focais. Destes, oito pacientes apresentavam laudos de ultrassom convencional, tomografia e/ou ressonância do abdome com diagnóstico de trombose inespecífica de veia porta. A CEUS identificou que seis desses pacientes apresentaram dinâmica de contraste com aumento de ecogenicidade em fase arterial (*wash-in*) e clareamento rápido (*wash-out*), característico de hepatocarcinoma, indicando ITVP. Os outros dois apresentavam ausência de vascularização do trombo, configurando THP. Imagens selecionadas desses casos são apresentadas nesse trabalho. **Conclusão** - Nossa série inicial com ultrassonografia com contraste de microbolhas – CEUS evidenciou que este pode ser um método útil, seguro e de baixo custo na avaliação da trombose porta em pacientes com cirrose e CHC.

Unidade de Transplante de Fígado do Hospital Oswaldo Cruz, Hospital das Clínicas da UFPE, PE, Brasil.

PO-4675

Carcinoma hepatocelular como apresentação de Síndrome de Budd-Chiari

Pedro Barbosa de Albuquerque **Maranhão**, Thiago Mendes Fonseca dos **Santos**, Maria Eduarda Pires Lins e **Silva Lima**, Deborah de Sá Pereira **Belfort**, Bruno Rodrigo de **Fontes**, Emilio Henrique Melo de **Lima**, Christyanne Maria Rodrigues Barreto de **Assis**, Clézio Cordeiro de Sá **Leitão**, Laércio **Leitão**, Roberto **Lemos**, Norma Arteiro **Filgueira**

Contexto - A Síndrome de Budd-Chiari (SBC) é uma doença hepática rara causada pela oclusão do efluxo venoso hepático. O ponto de obstrução pode se localizar nas veias hepáticas ou na porção terminal da veia cava inferior (VCI). A incidência, características e fatores de risco do carcinoma hepatocelular (CHC) como consequência da SBC não estão bem determinados, mas autores orientais encontraram incidência cumulativa de CHC em pacientes com obstrução da via de saída venosa hepática de 3,5% aos 10 anos, 9,5% aos 15 anos e 29,5% aos 20 anos. No entanto, essa prevalência parece ser menor nos países ocidentais. São considerados fatores de risco para CHC em SBC: presença de cirrose, obstrução da VCI e elevado gradiente de pressão venosa hepática. **Objetivo** - Descrever caso de paciente com SBC diagnosticada durante investigação etiológica de CHC. **Métodos** - Relato de caso através de revisão de prontuário e imagens. **Resultados** - Relatamos o caso de um paciente de 34 anos com queixas antigas de aumento de volume abdominal e edema de membros inferiores. Ao exame físico não foi constatada a presença de ascite, sendo observada extensa rede de colaterais em abdome e dorso. A tomografia de abdome mostrou fígado aumentado de volume, sem padrão cirrótico definido, com seis nódulos, os dois maiores com padrão vascular típico de CHC, além de trombose da VCI retro-hepática. A alfa fetoproteína estava em níveis muito elevados (2490 ng/mL). O maior nódulo foi biopsiado, confirmando o diagnóstico de CHC bem diferenciado. Analisamos o trombo da VCI com ultrassom com microbolhas, que não observou vascularização do mesmo, descartando a possibilidade de invasão tumoral da VCI. Nesse exame foi identificada oclusão de veias hepáticas e pontes venosas intrahepáticas, caracterizando a SBC como etiologia da doença hepática, que persistia indeterminada até então. **Conclusão** - É comum o achado de nódulos hepáticos regenerativos benignos em pacientes com SBC, sendo importante a vigilância quanto ao desenvolvimento de CHC e a diferenciação entre eles. O paciente em questão apresentava seis imagens nodulares, das quais apenas duas preenchiam critérios para CHC. O USG com contraste de microbolhas é método não invasivo que pode ser útil na avaliação de trombos vasculares e na diferenciação entre nódulos regenerativos e tumorais.

Artigo aceito para publicação

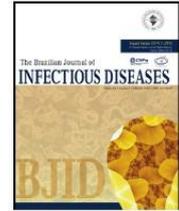
BJID-822; No. of Pages 3

ARTICLE IN PRESS

BRAZ J INFECT DIS 2018;xxx(xx):xxx-xxx



The Brazilian Journal of
INFECTIOUS DISEASES

www.elsevier.com/locate/bjid**Brief communication****Schistosomal liver fibrosis and hepatocellular carcinoma – case series of patients submitted to liver transplantation**

Norma Arteiro Filgueira^{a,*}, Camilla Maria de Alencar Saraiva^a, Norma Thomé Jucá^b,
Matheus Filgueira Bezerra^c, Claudio Moura Lacerda^b

^a Universidade Federal de Pernambuco, Hospital das Clínicas, Serviço de Clínica Médica, Recife, PE, Brazil

^b Universidade de Pernambuco, Hospital Universitário Oswaldo Cruz, Unidade de Transplante de Fígado, Recife, PE, Brazil

^c Universidade Federal de Pernambuco, Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA), Recife, PE, Brazil