

UNIVERSITATEA “OVIDIUS” CONSTANTA

FACULTATEA DE MEDICINA

Disciplina: Anatomie Patologică

TEZA DE DOCTORAT

**Aspecte epidemiologice, clinico-paraclinice,
morfopatologice și imunohistochimice în
carcinomul hepatocelular dezvoltat
pe ciroza hepatică**

REZUMAT

Coordonator științific :

Prof. Univ. Dr. Așchie Mariana

Doctorand:

Elena Banciu (Mocanu)

CONSTANTA

2012

Cuprins

PARTEA I – STADIUL ACTUAL AL CUNOSTINTELOR IN DOMENIU	
Lista de abrevieri	
Introducere	1
Capitolul I	
1.1 Aspecte embriologice în cursul dezvoltării ontogenetice a ficatului	2
Bibliografie selectivă	
1.2 Anatomia laparoscopică a ficatului.....	7
Bibliografie selectivă	
1.3 Histologia ficatului.....	12
Bibliografie selectivă	
1.4 Funcțiile ficatului.....	23
Bibliografie selectivă	
Capitolul II	
2.1 Epidemiologie.....	26
Bibliografie selectivă	
2.2 Etiopatogenie.....	31
Bibliografie selectivă	
2.3 Leziuni hepatice premaligne.....	35
Bibliografie selectivă	
2.4 Tablou clinico-paraclinic.....	40
Bibliografie selectivă	
Capitolul III	
3.1 Aspecte morfopatologice ale cancerului hepatic.....	50
Bibliografie selectivă	
3.2 Histochimie, histoenzimologie și imunohistochimie.....	63
Bibliografie selectivă	
PARTEA A II-A: CONTRIBUTIA PERSONALA LA DEZVOLTAREA CUNOSTINTELOR IN DOMENIU	
Capitolul IV	
4.1 Scopul și obiectivele cercetării.....	81
Capitolul V	
5.1 Material și metodă.....	84
5.2 Prelucrare statistică.....	105
Capitolul VI	
Rezultate	
6.1 Aspecte epidemiologice.....	106
Bibliografie selectivă	
6.2 Aspecte etiologice.....	110
Bibliografie selectivă	

6.3 Aspecte clinico-paraclinice.....	118
Bibliografie selectivă	
6.4Aspecte macroscopice.....	138
Bibliografie selectivă	
6.5Aspecte microscopice.....	152
Bibliografie selectivă	
6.6Aspecte imunohistochimice.....	184
Bibliografie selectivă	
6.7Stadializare, factori histologici de prognostic, evoluție	
naturală.....	212
Bibliografie selectivă	
Discuții.....	221
Bibliografie selectivă	
Concluzii.....	232
Anexe.....	238
Bibliografie în ordine alfabetică.....	249

Carcinomul hepatocelular (CHC) este cea mai frecventă tumoră malignă hepatică care apare la specia umană, reprezentând 90% din totalul tumorilor hepatice maligne. Reprezintă a șasea mare neoplazie umană și a treia cauză de mortalitate prin cancer în întreaga lume. Incidența este de 500.000– 1.000.000 cazuri noi / an în întreaga lume. Indicele de mortalitate prin CHC atinge 94%.

Teza de doctorat abordează o temă de cercetare de mare interes științific legată de studiul complex al carcinoamelor hepatocelulare dezvoltate pe ciroza hepatică, ținând cont de faptul că incidența hepatocarcinoamelor este în creștere în România și pot apărea la orice vârstă, mai frecvent după 60 de ani.

Un diagnostic timpuriu îmbunătățește supraviețuirea pacienților prin aplicarea tratamentului în stadii precoce, în care boala poate fi controlată. De asemenea, cunoașterea caracteristicilor morfologice, histochemice și imunohistochimice ale hepatocitelor este de mare importanță prin posibilitatea aplicării de noi terapii care să fie mai puțin toxice pentru pacient și cu rezultate superioare în controlul bolii.

Prin faptul că afectează și persoanele aflate încă în activitate, hepatocarcinoamele au implicații sociale și economice. Drept urmare orice studiu asupra diagnosticului patologiei maligne hepatice este util atât medicului, cât și pacientului.

Lucrarea structurată și elaborată conform scopului propus, este alcătuită din 2 părți: Partea I - **Stadiul actual al cunoștințelor în domeniu** – care prezintă nivelul cunoașterii printr-o sinteză bibliografică referitoare la subiectul tratat, expusă pe parcursul a trei capitole și Partea a II-a – **Contribuții personale la dezvoltarea cunoștințelor în domeniu** - cuprinde un număr de trei capitole ale căror titluri marchează etapele esențiale ale demersului de cercetare științifică realizat.

În *capitolul I* sunt prezentate noțiunile introductive și respectiv elemente de embriologie, anatomie laparoscopică, histologie și fiziologie ale ficatului.

În *capitolul II* sunt relatate epidemiologia și etiopatogenia carcinomului hepatocelular, insistându-se asupra factorilor etiologici variați implicați în etiologia acestuia. De asemenea sunt prezentate leziunile hepatice premaligne precum și manifestările clinice și investigațiile de laborator utile în hepatocarcinom, iar în *capitolul III* este descrisă clasificarea tumorilor hepatice, aspectele morfopatologice ale hepatocarcinomului cu descrierea formelor macroscopice și microscopice în concordanță cu clasificarea aflată în uz.

Capitolul IV exprimă clar și concis obiectivele propuse în proiectul de cercetare elaborat (în principal implicațiile tehnicilor de imunohistochimie în stabilirea unui algoritm de diagnostic pentru carcinomul hepatocelular dezvoltat pe ciroza hepatică).

Capitolul V, definește materialul studiat (piese de rezecție hepatică provenite de la 40 de pacienți, diagnosticați cu carcinom hepatocelular, în perioada 01.01.2005 – 30.12.2009, în cadrul Institutului Clinic Fundeni) și tehnicile clasice și moderne de investigație; acesta este completat prin analiza statistică a cazuisticii de tip observațional prospectiv-retrospectiv, reținând și interpretând datele semnificative statistic, relevante pentru studiu.

În **capitolul VI** sunt prezentate rezultatele, corelațiile și discuțiile histopatologice și respectiv imunohistochimice pe cazurile studiate. Studiul imunohistochimic a avut la bază un panel de anticorpi imunohistochimici utili în confirmarea diagnostică prin prisma particularităților morfologice ale hepatocitelor (Vegf și p 53) și gradul lor de proliferare (Ki 67). De asemenea, acest capitol prezintă numeroase reprezentări imagistice care completează și susțin comentariile și discuțiile.

Parcurgând succesiunea etapelor cercetării efectuate, în **capitolul următor** sunt prezentate discuțiile asupra rezultatelor obținute, în concordanță cu cercetările realizate la nivel mondial.

Ultima parte este reprezentată de concluziile obținute în urma studiului evidențiind cele mai importante elemente prezentate.

Acest cadru teoretic a fost îmbogățit de rezultatul unei documentări riguroase, ca urmare a consultării unei bibliografii care însumează aproximativ 173 de titluri, reprezentând lucrări de referință în domeniu, alături de informații extrem de recente.

Teza este ilustrată prin cele 169 de fotografii, 30 de tabele și 42 de grafice.

Analiza clinică, urmată de analizarea pieselor de rezecție hepatică prin tehnici clasice și imunohistochimice a unui număr important de cazuri oferă o imagine semnificativă nu numai asupra morfologiei acestei boli, ci și asupra inter-relațiilor funcționale cu micromediul în care se dezvoltă, pe care îl influențează și de care este influențată.

Scopul Și Obiectivele Generale Ale Cercetări

Alegerea temei tezei de doctorat se datorează faptului că în practica anatomo-patologică am remarcat o frecvență crescută a patologiei hepatice dominată de leziunile displazice și tumorale.

Importanța diagnosticării acestor leziuni, rezidă din necesitatea aplicării unei terapii eficiente adaptate fiecărei leziuni în parte și nu în ultimul rând, fiecărui caz.

Lucrarea de față are drept scop găsirea de corelații între aspectele epidemiologice, clinico-paraclinice, morfopatologice și imunohistochimice, care să constituie bazele elaborării unor algoritmi de diagnostic utili atât în identificarea tipului histologic al tumorilor dar și în stabilirea celei mai bune opțiuni de conduită terapeutică în scopul reducerii morbidității și potențialului evolutiv al tumorilor hepatice.

Am urmărit măsurarea gradului de asociere epidemiologică prin determinarea frecvenței factorilor de risc în lotul test și lotul martor, precum și prin determinarea forței asociației epidemiologice dintre factorii de risc studiați și prezența CHC.

Material și metodă

Studiul meu include 40 de pacienți cu carcinom hepatocelular care au fost internați în perioada ianuarie 2005 - decembrie 2009 în Departamentul de Chirurgie Generală și Transplant Hepatic al Institutului Clinic Fundeni și un lot martor ce cuprinde 80 de pacienți care nu au CHC, internați în 3 departamente diferite: dermatologie, oftalmologie și ORL.

Lotul martor a fost folosit doar în etapa studiului etiologic. Loturile sunt similare în ceea ce privește vârsta (± 5 ani) și sexul pacienților. Pacienții din lotul martor au fost internați în aceeași perioadă, nu au alte boli de ficat sau alte neoplasme, iar factorii de risc implicați în patologiile respective sunt total diferiți.

Materialul de studiu este reprezentat de anamneza și examenul clinic al pacienților internați pe perioada prospectivă a studiului și examinarea macroscopică, microscopică și imunohistochimică a pieselor operatorii de rezecție hepatică în serviciul de Anatomie Patologică al aceleiași instituții și de foile de observație ale pacienților pentru partea retrospectivă a studiului.

Pentru fiecare caz studiat, datele analizate le-am cuprins în fișe de studiu originale, perfectând un formular electronic

Studiul meu s-a axat pe conturarea unui profil morfopatologic și imunohistochimic al hepatocarcinoamelor care asociază sau nu ciroza hepatică, dar detaliază și aspecte clinice și paraclinice relevante.

Prelucrarea Statistică

Datele obținute le-am introdus într-un tabel de contingență 2xn, iar prelucrarea și analiza informațiilor am realizat-o cu ajutorul programului SPSS versiunea 19.0.

Pentru forma descriptivă am folosit frecvențele absolute și relative în prezentarea componenței lotului.

Pentru variabilele cantitative am calculat indicatorii de localizare (medie, mediană) dar și de dispersie. Am reprezentat grafic distribuția de frecvență a variabilelor luate în studiu.

Pentru măsurarea forței asociației epidemiologice în studiul nostru am folosit raportul cotelor (Odds Ratio, OR reprezintă raportul dintre cota bolii la expuși și cota bolii la neexpuși) și fracțiunea etiologică a riscului atribuibil (FRA%).

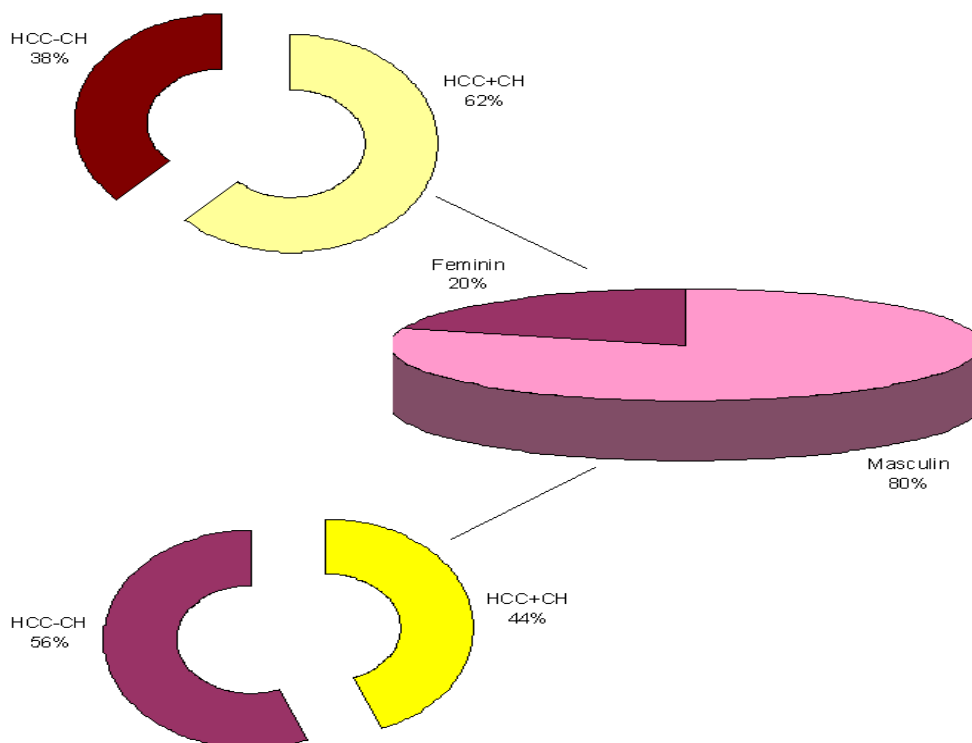
Pentru aprecierea nivelului de semnificație statistică am calculat testul χ^2 Mantel-Haenszel.

Compararea valorii markerilor pe subgrupe definite după diagnostic, s-a realizat folosind testul t Student și testul One Way ANOVA. În cadrul testului am verificat și condiția de egalitate a varianțelor, pentru a avea încredere în rezultatul ANOVA.

O valoare a lui $p \leq 0,05$ a fost considerată semnificativă statistic.

Rezultate și discuții

În lotul celor 40 de cazuri cu CHC se regăsesc 32 (80%) de bărbați și 8 (20%) femei, cu un raport M:F de 4:1, majoritatea locuind în mediul urban.



Graficul nr. 1: Distribuția pacienților luați în considerare pentru studiul imunohistochimic în funcție de sex

Vârsta medie a pacienților incluși în studiu a fost 54,6 ani cu o deviație standard de ± 11.7 , iar vârsta minimă a fost 27 de ani, cea maximă fiind de 76 de ani, unii autori însă raportând o vârstă medie a pacienților cu CHC de 40 de ani.

Cea mai frecvent afectată a fost decada a 5-a de vârstă, tumorile epiteliale hepatice maligne apărând la 25 dintre pacienți (52%), cel mai frecvent fiind tipul trabecular de hepatocarcinom, atât la femei cât și la bărbați.

În studiul meu procentul fumătorilor este de 82,5%, fiind apropiat de procentul fumătorilor (70,5%) raportat într-o publicație a Uniunii Internaționale Împotriva Cancerului (UICC), iar riscul de a dezvolta CHC este proporțional cu numărul de țigări consumate zilnic.

Procentul celor care consumă alcool (85%) în studiul meu este de 8 ori mai mare decât media națională (10%), raportată într-o statistică oficială a Ministerului Sănătății.

Aspecte epidemiologice, clinico-paraclinice, morfopatologice și imunohistochimice în
carcinomul hepatocelular dezvoltat pe ciroza hepatică

Pe baza datelor calculate și prezentate în tabelul nr. 1 pentru consumul de alcool valoarea calculată a OR (de 3,4 pentru un IC 95% cuprins în intervalul 1,18-10,25) indică faptul că riscul de a dezvolta CHC este semnificativ mai mare la persoanele care au declarat un consum constant de etanol față de cele care nu au acest factor de risc comportamental.

Tabelul nr. 1: Distribuția subiecților în funcție de consumul de alcool, tutun și prezența markerilor hepatitelor B și C

Factor de risc	Cazuri		Control		OR	IC 95%	P value	FRA %	χ^2 M-H
	Nr.	%	Nr.	%					
Consum de alcool									
Da	34	85	50	623					
Nu	6	15	30	37	3,4	1,18-10	0,01	58,8	6,38
Consum de țigări									
Da	33	83	34	43					
Nu	7	17	46	57	6,38	2,34-18	<0,001	84,3	17,16
Status HBV									
Ab HBs +	27	70	13	16					
Ab HBs -	13	30	67	84	10,7	4,05-29	<0,001	90,6	31,26
Status HCV									
Anti HCV +	8	20	9	11					
Anti HCV -	32	80	71	89	1,97	0,62 – 6	0,19	49,2	1,67
Ciroza hepatica									
Prezentă	19	47	17	22					
Absentă	21	53	63	78	3,3	1,3-8,2	0,003	69,7	8,68

În ceea ce privește riscul reprezentat de consumul de țigări, valoarea calculată a OR (de 6,38 pentru un IC 95% cuprins în intervalul 2,34-18,06) indică faptul că probabilitatea de a dezvolta CHC este de 6 ori mai mare la persoanele care au declarat acest comportament.

Pentru pacienții care prezintă Ag HBs pozitiv s-a calculat un OR de 10,7 cu un interval de confidență cuprins între 4,05-29. Astfel, despre infecțiile virale hepatice B se poate afirma cu un grad mare de certitudine că reprezintă un factor de risc pentru apariția CHC ($p_v < 0,01$).

Anticorpul Anti HCV a fost depistat pozitiv la 8 pacienți cu carcinom hepatocelular, pentru care s-a calculat un OR de 1,97 (IC 95% 0,62-6,25) și o fracțiune etiologică a riscului atribuit de 50%. Conform rezultatelor obținute în acest studiu, despre

Aspecte epidemiologice, clinico-paraclinice, morfopatologice și imunohistochimice în carcinomul hepatocelular dezvoltat pe ciroza hepatică infecțiile virale hepatice C nu putem avea o concluzie clară deoarece valorile obținute prin aplicarea testelor statistice nu au atins semnificația statistică ($p_v=0,19$).

Pentru pacienții care au carcinom hepatocelular asociat cirozei hepatice s-a calculat un OR de 3,3 cu un interval de confidență cuprins între 1,3 și 8,2. Astfel, despre ciroza hepatică se poate afirma cu un grad mare de certitudine că reprezintă un factor de risc pentru apariția CHC ($p_v=0,003$).

Determinarea fracțiunii etiologice a riscului atribuibil ne indică faptul că în studiul nostru 69,7% din cazurile de CHC pot fi atribuite cirozei hepatice.

Deci, din datele prezentate în tabelul nr. 2 reiese faptul că riscul de a dezvolta CHC este de 8 ori mai mare în cazul celor care fumează mai mult de 20 de țigări pe zi și de 5 ori mai mare în cazul celor care consumă mai mult de 80 de grame de etanol pur zilnic în comparație cu abținții.

Calcululele efectuate ne indică faptul că riscul de a face CHC crește proporțional cu doza de alcool ingerată. De asemenea, diferențe semnificative statistic se observă doar în cazul celor care consumă mai mult de 80 g/zi etanol ($p_v=0,002$).

Tabelul nr. 2: Relația doză-efect în ceea ce privește consumul de alcool și tutun

Factor de risc	Cazuri		Control		OR	IC 95%	P value	χ^2 M-H
	Nr.	%	Nr.	%				
Consum de țigări								
Nu	7	17,5	46	57,5				
≤1 pachet/zi	12	30	14	17,5	5,63	1,65-19,92	0,001	10,23
>1 pachet/zi	21	52,5	16	20	8,63	2,79-27,72	<0,001	19,07
Consum de alcool								
Nu	6	15	30	37,5				
1-79 g/zi	16	40	33	41,25	2,42	0,76-8,05	0,09	2,73
≥80 g/zi	18	45	17	21,25	5,29	1,57-18,58	0,002	9,45

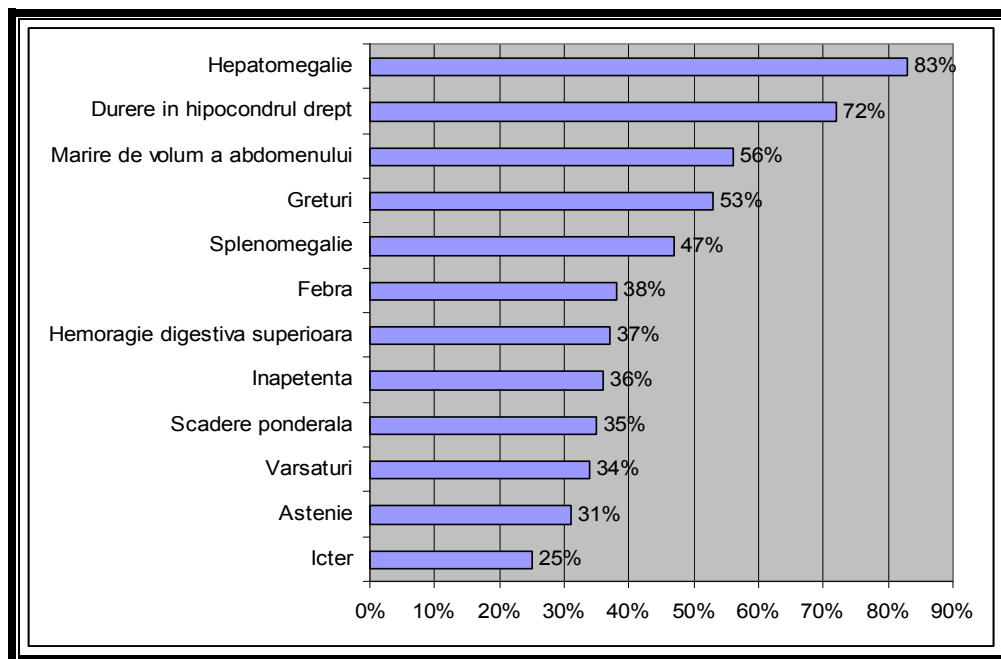
Manifestările clinice generale sunt subiective și nespecifice și se confundă cu cele ale cirozei hepatice.

Timpul scurs de la apariția simptomatologiei până la punerea diagnosticului a fost diferit de la un caz la altul, între 1 lună și 2 ani.

Durerea abdominală a fost prezentă în 72,5% din cazurile de CHC și a fost localizată în cadranul drept superior sau în epigastru și a fost descrisă cel mai frecvent ca o durere continuă.

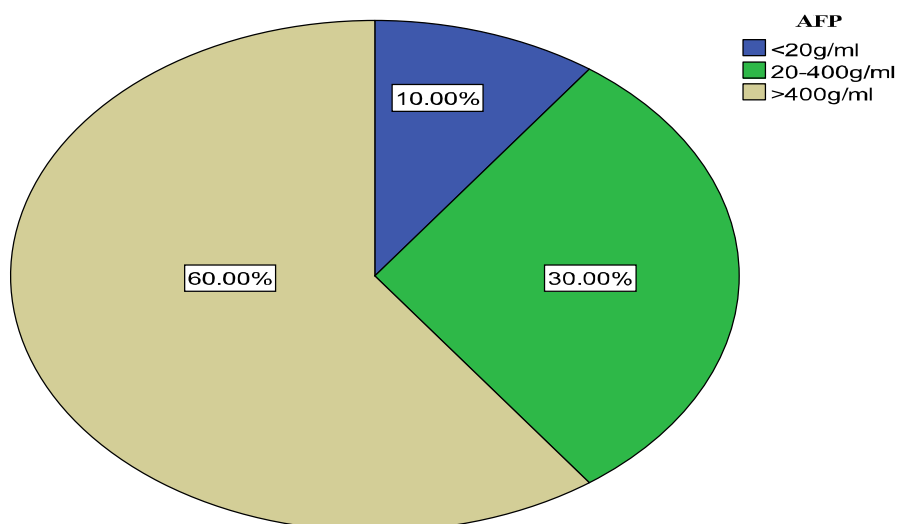
Distensia abdominală datorată unei mase abdominale sau ascitei a fost prezentă în 50% din cazuri.

Ascita a fost depistată în 55% din cazuri, media nivelului de proteine fiind cam de 2,5g/100ml.



Graficul nr. 2: Simptomatologia carcinomului hepatocelular

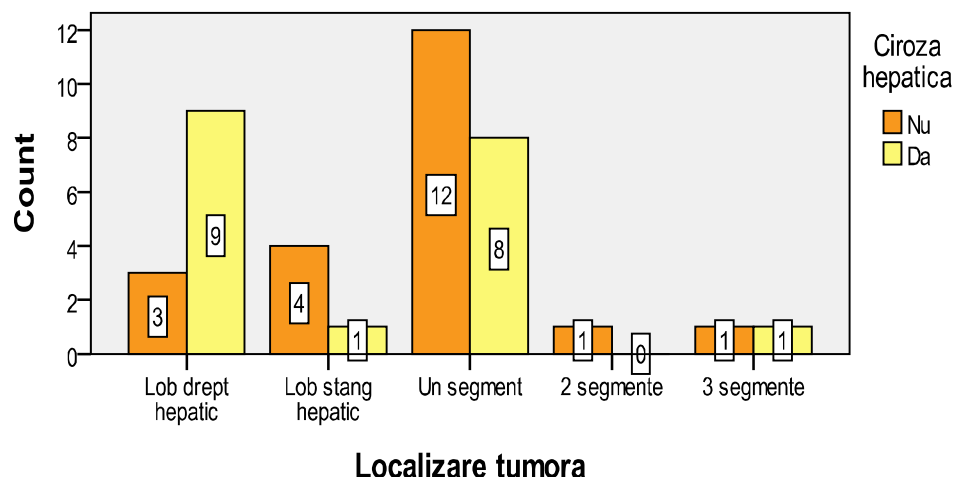
Hepatomegalia palpabilă se întâlnește în 66% din cazurile de pacienți cu vârste până în 70 de ani și în toate cazurile de CHC la pacienți cu vârste peste 70 de ani.



Graficul nr. 3: Distribuția nivelului de alfa fetoproteina

Alte simptome au fost: scădere ponderală în 35% din cazuri, inapetență 35%, icter 25%, febră 37,5%, constipație.

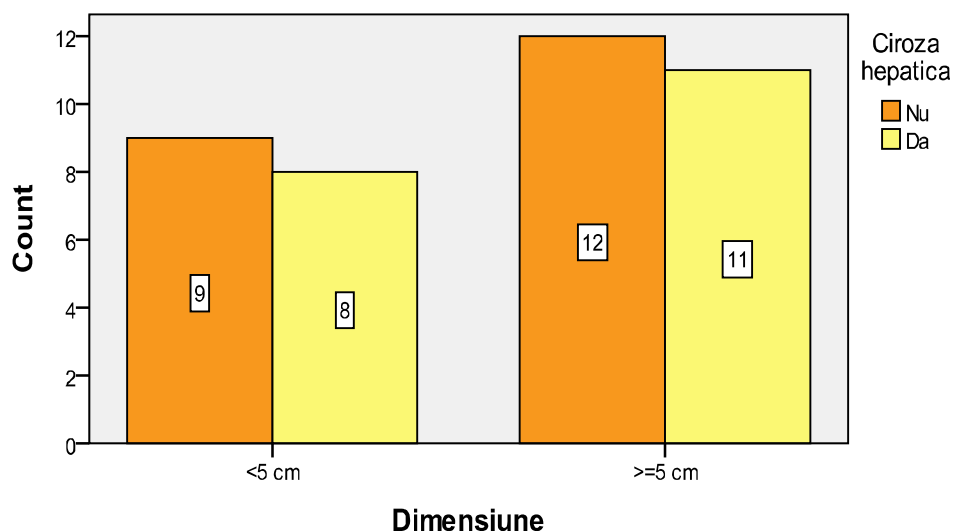
Nivelul mediu al AFP a fost de 552.22 ng/ml cu o deviație standard ± 679.12 cu valori cuprinse între 18 și 4019 ng/ml. 60% din pacienți au avut valori ale AFP mai mari de 400 ng/ml(Graficul nr. 3).



Graficul nr. 4: Distribuția în funcție de sex, vârstă, prezența cirozei hepatice și localizarea tumorală

Examenul macroscopic a fost realizat în funcție de tipul piesei operatorii și a urmărit dimensiunile, aspectul, forma, culoarea și consistența.

Se observă o predominanță a localizării tumorale la nivelul lobului drept hepatic pentru sexul masculin și la nivelul unui singur segment în ceea ce privește sexul feminin.



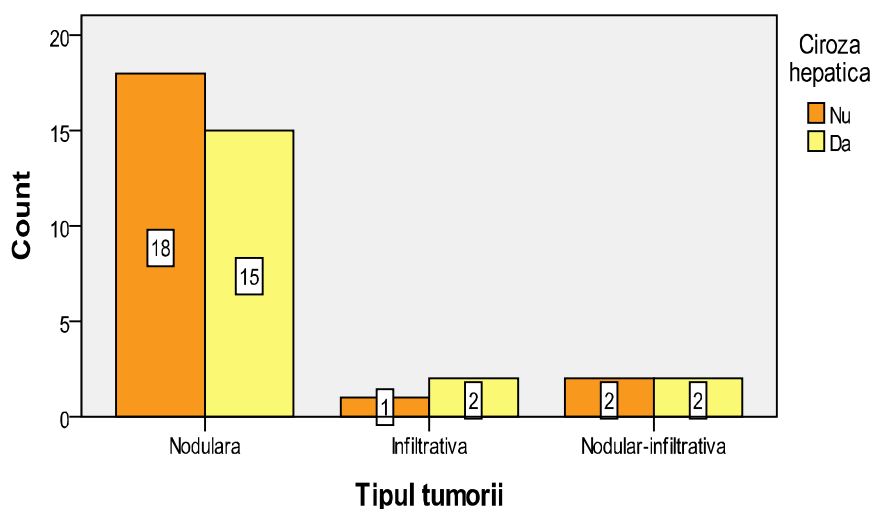
Graficul nr. 5: Repartiția pacienților în funcție de dimensiunea tumorală

Cel mai frecvent un singur segment sau întreg lobul hepatic drept au fost acoperite de tumoră pentru cazurile de hepatocarcinom care asociază ciroză hepatică (Graficul nr. 4).

Atât la sexul feminin cât și la cel masculin cele mai multe formațiuni tumorale au avut diametrul mai mare de 5 cm (Graficul nr. 5). 42% din cazurile de CHC care au asociat ciroza hepatică au avut diametrul tumoral <5 cm, iar restul de 58% au avut diametrul ≥ 5 cm.

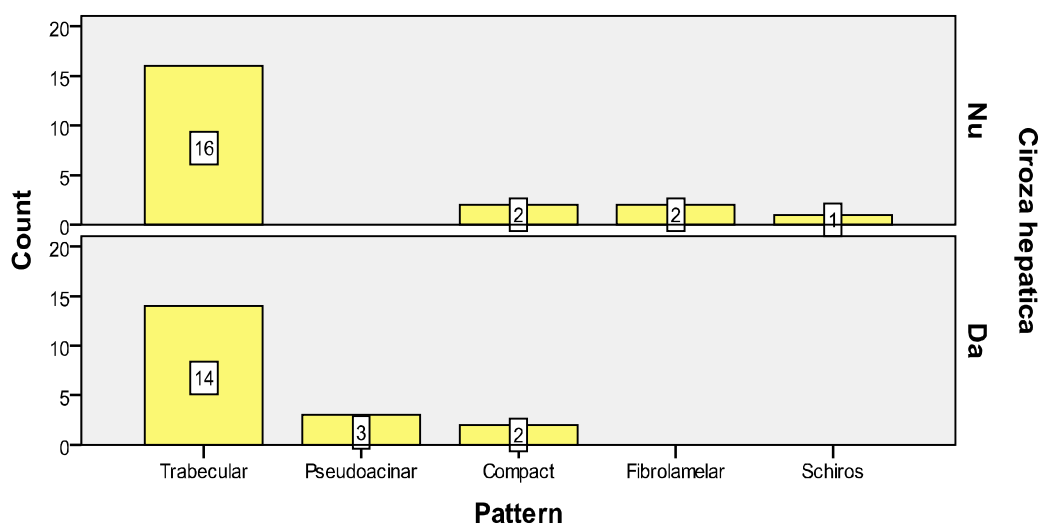


Figura nr. 1: Carcinom hepatocelular uninodular în lobul drept hepatic pe ficat cirotic(după W.Y. Lau - Hepatocellular carcinoma pg. 216)



Graficul nr. 6: Distribuția cazurilor de CHC în funcție de tipul tumoral și sex, vârstă, prezența cirozei hepatice

Cele mai multe tumori au fost nodulare (33 de cazuri) (Figura nr.1) atât în cazul pacienților de sex feminin (7 cazuri) cât și în cel al pacienților de sex masculin (26 de cazuri) (Graficul nr. 6). De asemenea, și în ceea ce privește vârsta și asocierea cu ciroza hepatică tot forma nodulară a fost cel mai frecvent întâlnită .



Graficul nr. 7: Distribuția cazurilor în funcție de patternul tumoral

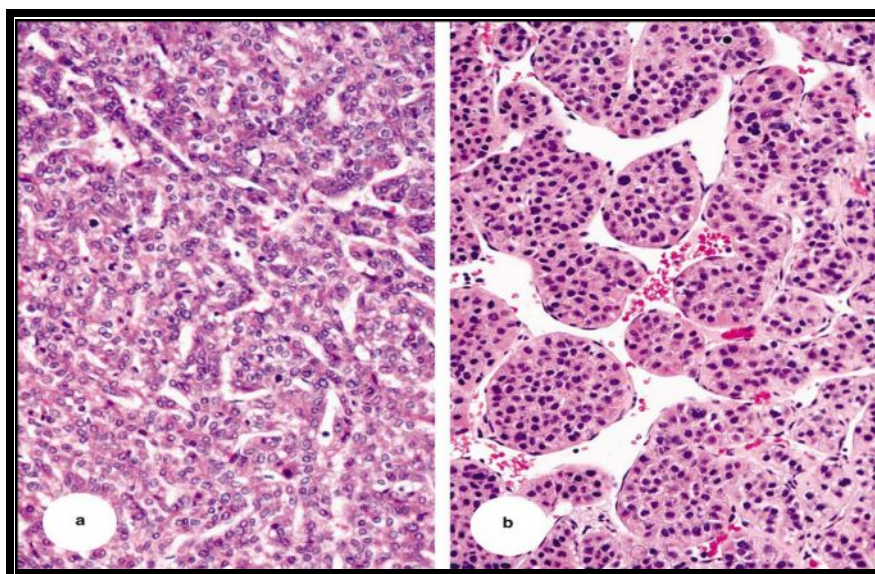


Figura nr. 2: Carcinom hepatocelular: a) Patern microtrabecular, b) Patern macrotrabecular hepatocelular (sursa:

<http://www.nature.com/modpathol/journal/v20/n1s/full/3800682a.html>)

În acest studiu au fost introduși 30 de pacienți cu carcinom hepatocelular de tip trabecular (Figura nr.2), 3 cu pattern pseudoglandular (Figura nr. 3), 4 cu pattern compact (Figura nr. 4), 2 cu pattern fibrolamelar (Figura nr. 5) și doar un caz cu pattern schiros.

În ceea ce privește numărul persoanelor care au prezentat ciroza, acesta este de 19, dintre care cei mai mulți au prezentat tipul histopatologic trabecular, 14 și doar 3 hepatocarcinoame au avut pattern acinar și 2 de tip compact. Tipurile histopatologice schiros și fibrolamelar nu s-au regăsit printre cazurile de tumora hepatică dezvoltată pe ciroză hepatică (Graficul nr.7).

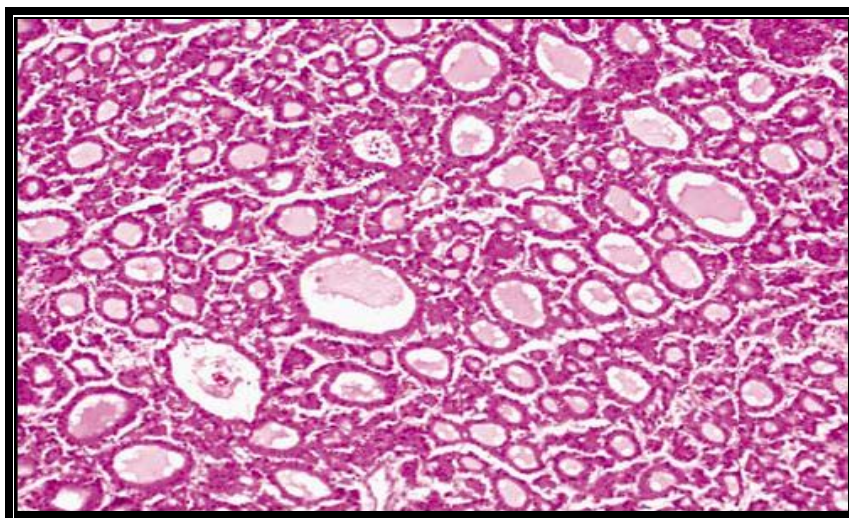


Figura nr. 3: Carcinom hepatocelular – Patern pseudoglandular (sursa:
<http://www.nature.com/modpathol/journal/v20/n1s/full/3800682a.html>)

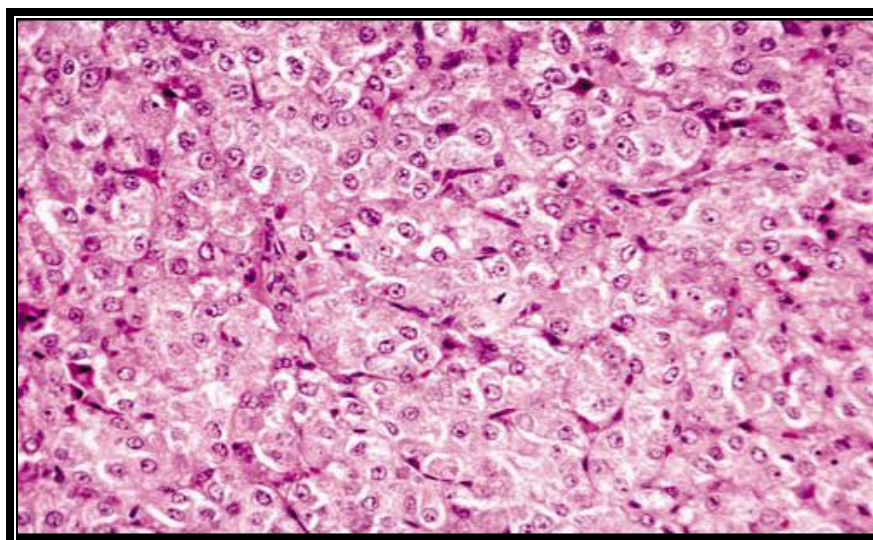


Figura nr. 4: Carcinom hepatocelular – Patern compact (sursa:
<http://www.nature.com/modpathol/journal/v20/n1s/full/3800682a.html>)

Din punct de vedere citologic, în 1984 s-a propus o clasificare a HCC în 3 tipuri: bine diferențiat, slab diferențiat și pleiomorf cu celule mari.

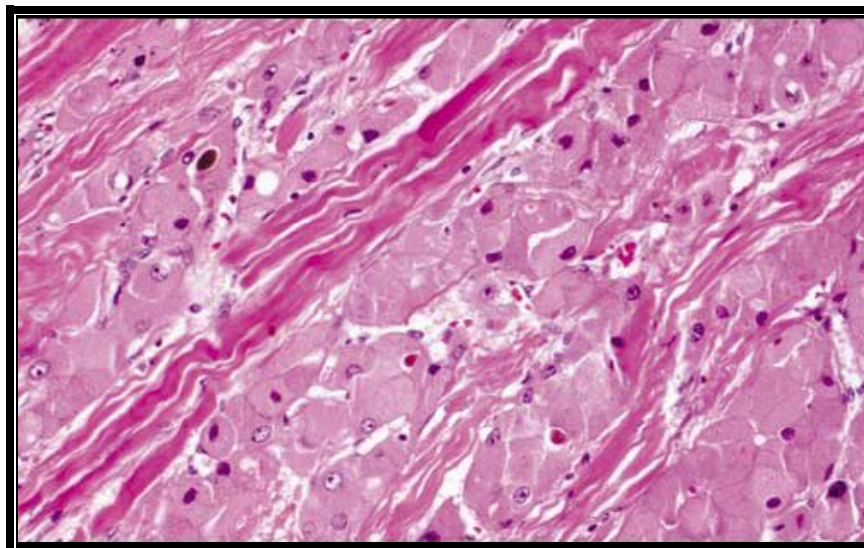
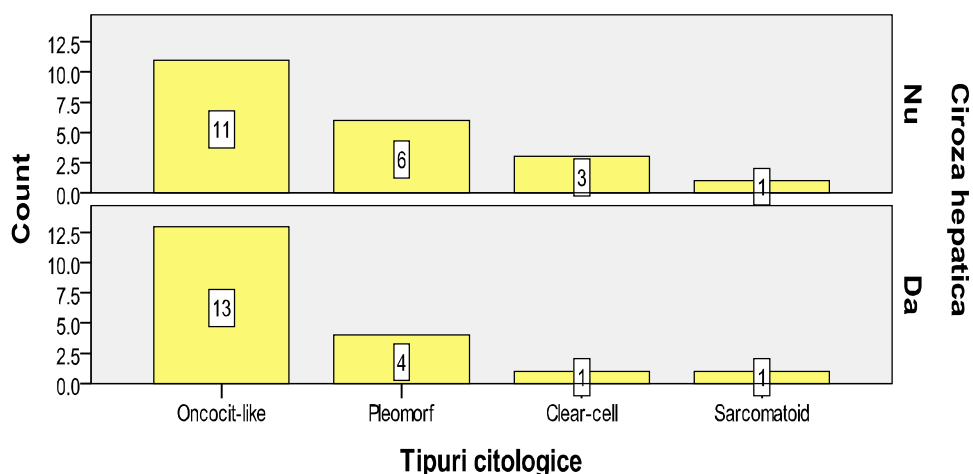


Figura nr. 5: Carcinom hepatocelular tipul fibrolamelar (sursa: <http://www.nature.com/modpathol/journal/v20/n1s/full/3800682a.html>)

Hepatocarcinoamele trabeculare au apărut mai frecvent pe ficat cirotic decât celelalte tipuri histopatologice și au asociat tipurile citopatologice hepatocyte-like sau pleiomorf.



Graficul nr. 8: Distribuția cazurilor în funcție de tipul citopatologic și sex, vârstă sau asocierea cu ciroză hepatică

O proporție semnificativă de carcinoame hepatocelulare se asociază cu ciroza, care

poate fi clinic silențioasă. Pacientul poate evolua de la hepatita cronică cu virus B la ciroză cu noduli macroregenerativi sau border-line, care conțin leziuni displazice, ce se pot transforma malign.

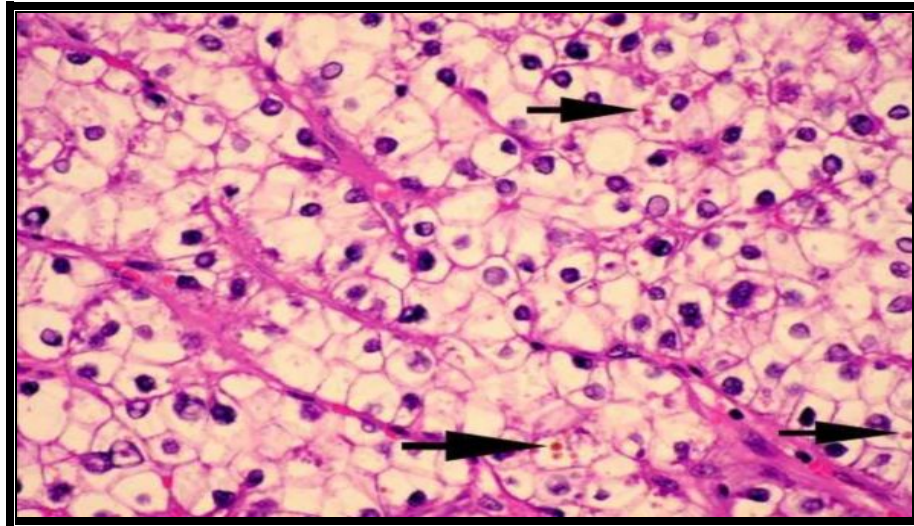


Figura nr. 6: Carcinom hepatocelular - varianta “cu celule clare”
(<http://www.pathpedia.com/Education/eAtlas/Histopathology/>)

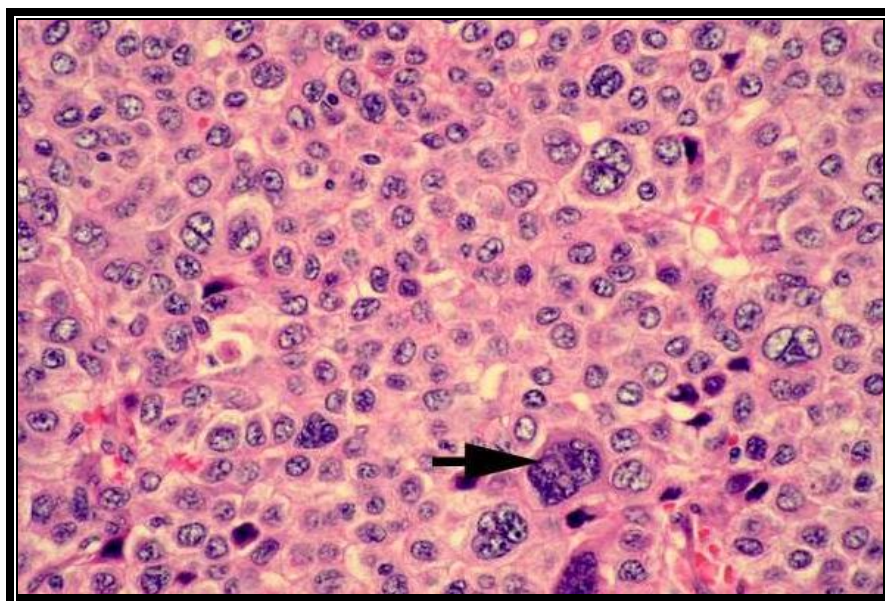


Figura nr. 7: Carcinom hepatocelular slab diferențiat, varianta pleomorfă/cu “celule gigante”
(<http://www.pathpedia.com/Education/eAtlas/Histopathology/>)

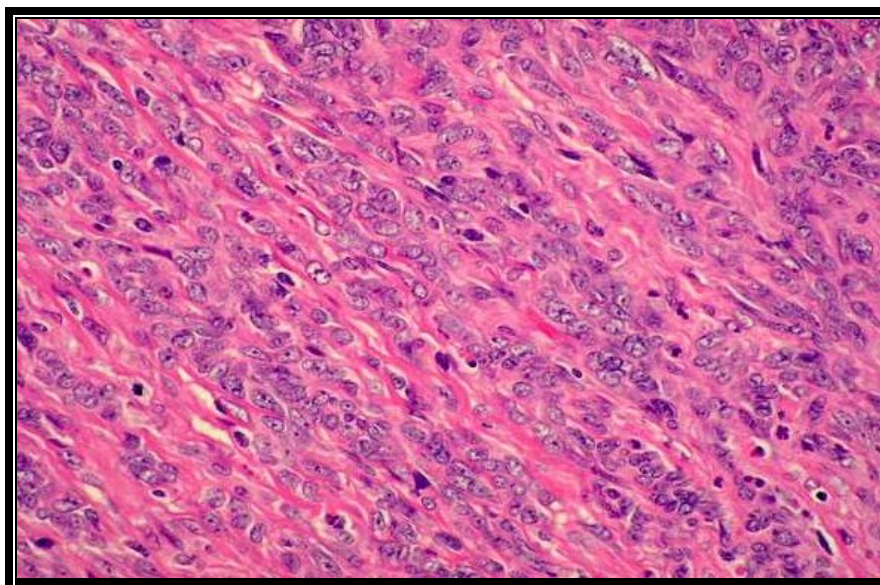


Figura nr. 8: Carcinom hepatocelular - varianta sarcomatoidă/ “spindle cell” (<http://www.pathpedia.com/Education/eAtlas/Histopathology/>)

CHC asociat cu ciroza are o tendință mai mare de a se împrăști în tot ficatul decât cel apărut pe un ficat normal. Cazurile de HCC dezvoltat pe ficat cirotic au fost raportate nu numai în legătură cu HBV sau HCV, ci și în asociere cu ciroza alcoolică.

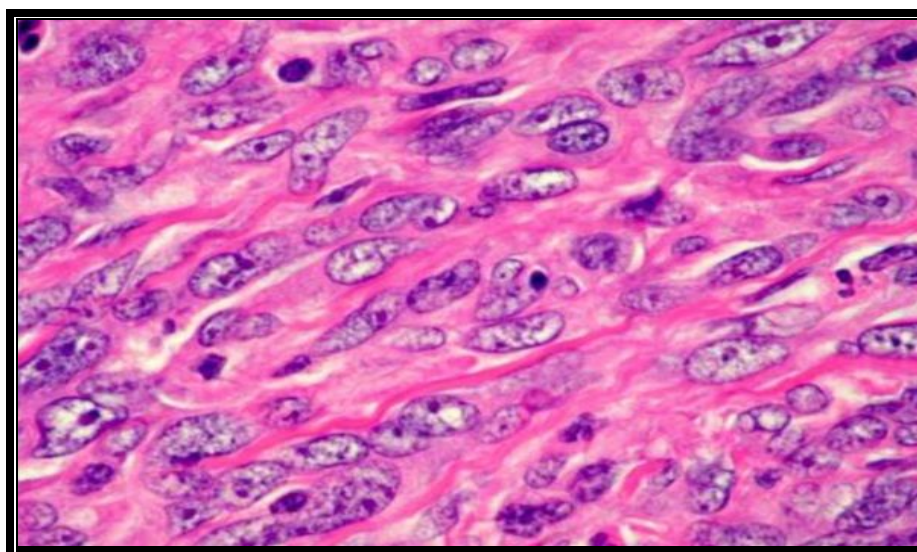
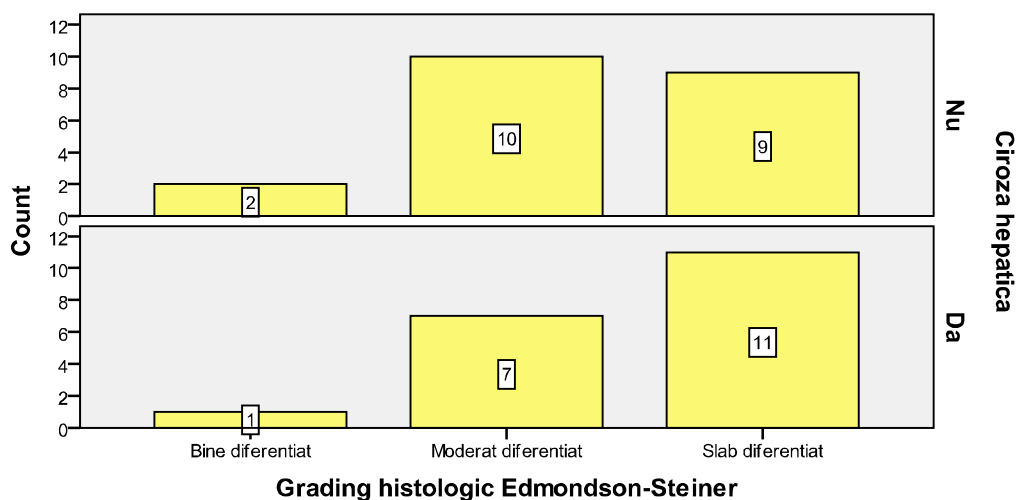


Figura nr. 9: Carcinom hepatocelular – varianta cu celule fusiforme (<http://www.pathpedia.com/Education/eAtlas/Histopathology/>)

Luând în discuție cazurile în care carcinomul hepatocelular asociază ciroza hepatică acestea au prezentat în marea lor majoritate tipul citologic oncocit-like (13 cazuri), pleomorf (4 cazuri) și câte 1 caz din tipurile cu celule clare și sarcomatoid (Graficul nr. 8, figurile nr. 6-9).

În lotul de studiu se regăsesc 3 cazuri de carcinom hepatocelular bine diferențiat, 17 cazuri moderat diferențiat și 20 de cazuri cu CHC slab diferențiat.

Dintre cazurile care asociază ciroză hepatică cele mai multe au fost slab diferențiate (11 cazuri), 7 cazuri moderat diferențiate și un singur caz de carcinom hepatocelular bine diferențiat (Graficul nr.9, figura nr. 10).



Graficul nr. 9: Stadializarea Edmondson Steiner (grading histologic) în funcție asocierea carcinomului hepatocelular cu ciroza hepatică

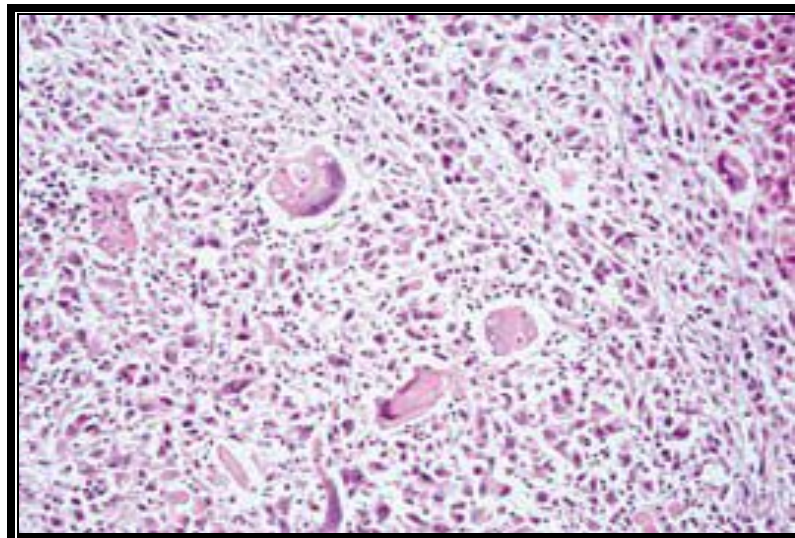
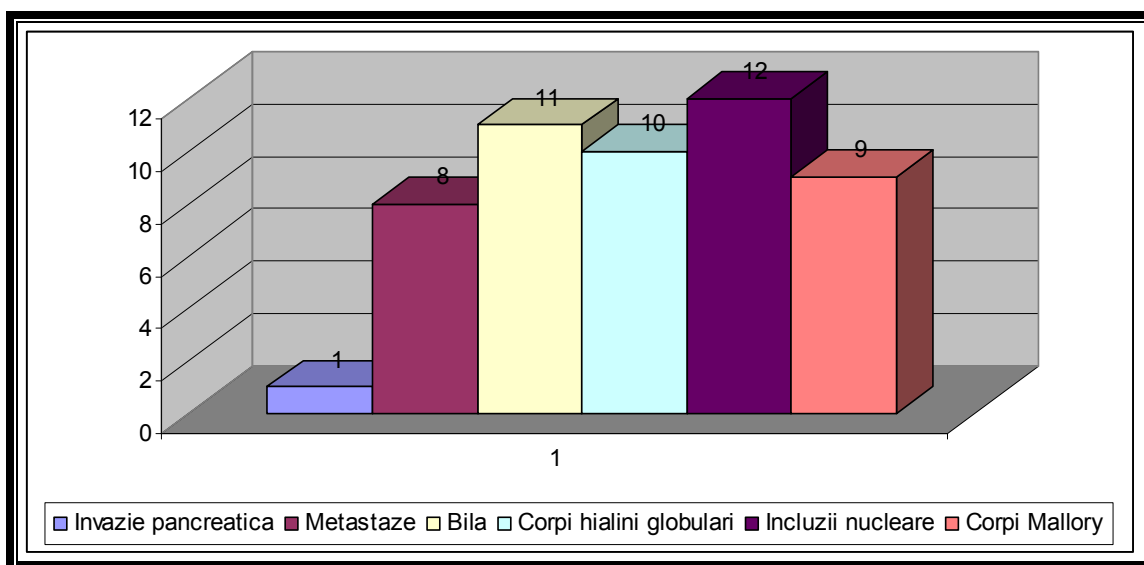


Figura nr. 10: CHC slab diferențiat dezvoltat pe ficat cirotic (HE, × 100).

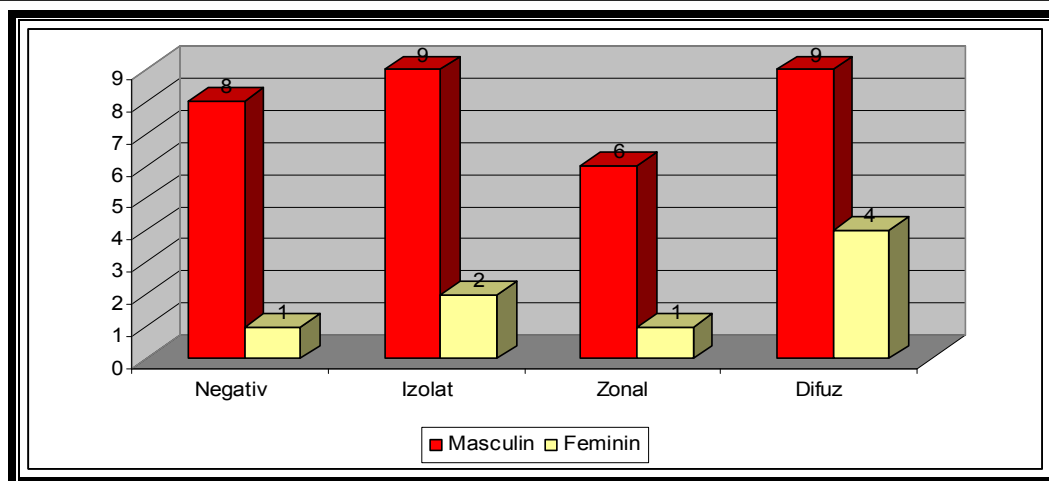
Alte elemente histopatologice găsite în lotul nostru au fost: invazia vasculară (4 cazuri), invazia pancreatică (1 caz), prezența de metastaze (8 cazuri), peliosis-ul (6 cazuri), precum și mitoze atipice sau granuloame nespecifice.



Graficul nr. 10: Elemente histopatologice găsite în lotul studiat

Bila a fost observată în 11 cazuri, corpi hialini globulari în 10 cazuri, incluzii nucleare în 12 cazuri, corpi Malory în 9 cazuri, ultimile 2 fiind asociate în general cu CHC dezvoltat pe ficat cirotic și cu necroză tumorală (Graficul nr. 10).

Alte caractere speciale histopatologice înregistrate la cazurile noastre au fost prezența glicogenului (evidențiat prin reacția PAS), steatoza, fibroza (în tipul schiros), prezența mucusului (1 caz) și a celulelor gigante (în tipurile pleomorfe).



Graficul nr. 11: Imunoexpresia Ki-67 în funcție de distribuția pe sexe

Expresia imunoreactivității a fost intens pozitivă în câte 15, 13 și respectiv 9 cazuri când s-au folosit markerii imunohistochimici VEGF, Ki 67 și respectiv p 53. Cel mai frecvent expresia imunoreactivității a fost negativă în cazul p 53 în 11 cazuri, iar în ceea ce privește markerul VEGF doar în 5 cazuri imunoexpresia a fost negativă.

Ki 67 a fost negativ în 9 cazuri (22,5%) și pozitiv în 31 de cazuri, sub forma izolată (+, 27,5%) (Figura nr.11), zonală (++, 17,5%) sau difuză (+++, 32,5%) (Figura nr. 12). Atât în cazurile de hepatocarcinom de tip trabecular care s-au dezvoltat pe ciroza hepatică, cât și în cele care nu au asociat ciroza hepatică, adică în câte 27,5% din cazuri, imunoexpresia Ki 67 a fost pozitivă. În cazurile care au asociat ciroza hepatică patternul cel mai frecvent a fost cel trabecular, urmat fiind apoi de cel pseudoglandular și compact, dar la diferențe semnificative.

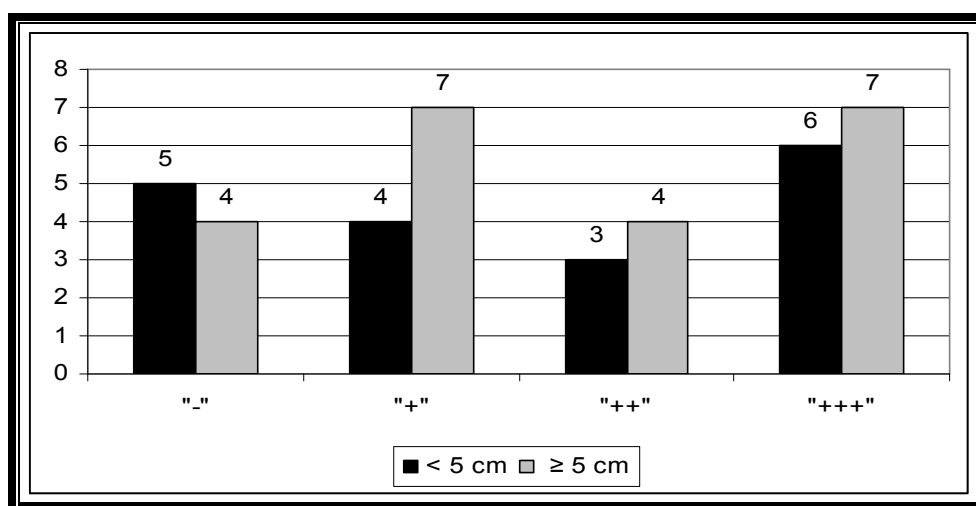
La sexul feminin, imunoexpresia predominantă a fost cea intens pozitivă în 50 % din cazuri, fiind urmată de cea izolată în 25% din cazuri și în câte un caz expresia a fost pozitivă focal, respective negativă (Graficul nr.11). În ceea ce privește distribuția în cazurile de hepatocarcinom apărute în rândul bărbaților, 8 cazuri nu au prezentat imunoexpresie pentru Ki 67, câte 9 cazuri au avut expresie zonală și respective izolată, iar în 6 cazuri expresia Ki 67 a fost difuză.

Tabelul nr. 3: Corelația Pearson între Ki 67 și vârsta pacienților

Corelație Vârstă- Ki-67	
Coeficient de corelație Pearson (r)	0.109
p value (p _v)	0.504

N	40
---	----

Pentru a analiza asociația dintre expresia Ki 67 și vârsta pacienților diagnosticați cu CHC am utilizat coeficientul de corelație Pearson. Rezultatul denotă o corelație pozitivă dar nesemnificativă statistic pentru cele două caracteristici ($r=0.109$, $p_v = 0.504$, bilateral) (Tabelul nr.3).



Graficul nr. 12: Imunoexpresia Ki-67 în funcție de dimensiunea tumorii

În ceea ce privește dimensiunea tumorală, am împărțit cele 40 de cazuri în 2 grupe: cele care măsoară mai puțin de 5 cm ($n=18$) și cele care au ≥ 5 cm ($n=22$).

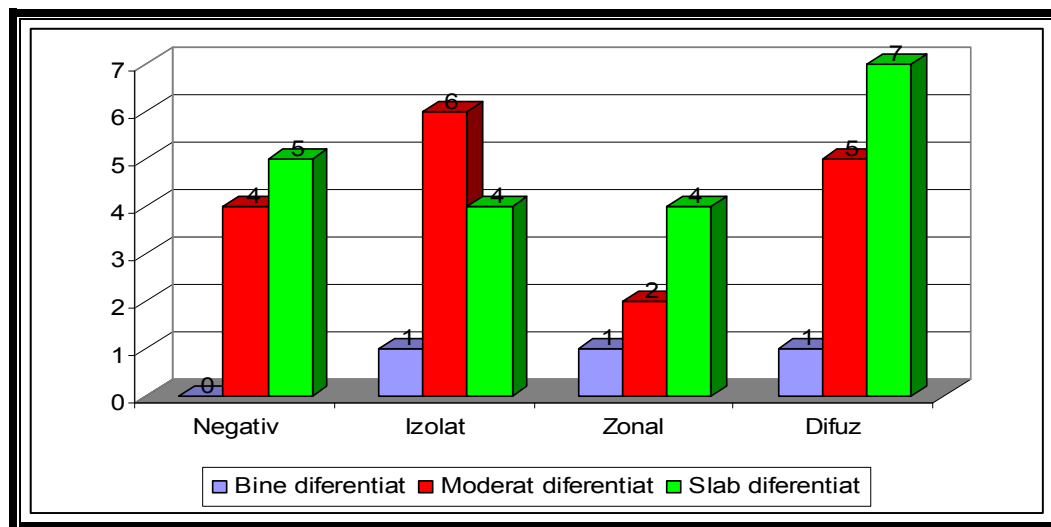
Dintre tumorile care au o dimensiune mai mică de 5 cm, 6 cazuri (33,3%) au o expresie a Ki 67 intens pozitivă, 3 cazuri (16,6%) sunt zonal pozitive, 4 cazuri (22,2%) sunt izolat pozitive și 5 cazuri sunt negative (Graficul nr.12).

Printre cele 22 de cazuri cu dimensiuni mai mari sau egale cu 5 cm câte 7 cazuri sunt difuz pozitive, respective izolat pozitive și câte 4 cazuri sunt difuz pozitive, respectiv negative.

Tabelul nr. 4: Corelația Pearson între Ki 67 și dimensiunea tumorală

Corelație Ki-67 – Dimensiune tumorală	
Pearson Correlation (r)	0.035
p value (p_v)	0.832
N	40

Aplicând testul de corelație Pearson nu există nicio asociație semnificativă statistic între imunoexpresia Ki 67 și dimensiunea tumorii ($r = 0.035$, $p_v=0.832$) (Tabelul nr. 4)



Graficul nr. 13: Gradingul histologic Edmondson Steiner în funcție de imunoexpresia Ki 67

În ceea ce privește relația dintre gradingul histologic și imunoexpresia Ki 67, toate cele 3 cazuri de tumoră bine diferențiată sunt pozitive la Ki 67, câte un caz pentru fiecare grad de pozitivitate (Graficul nr.13).

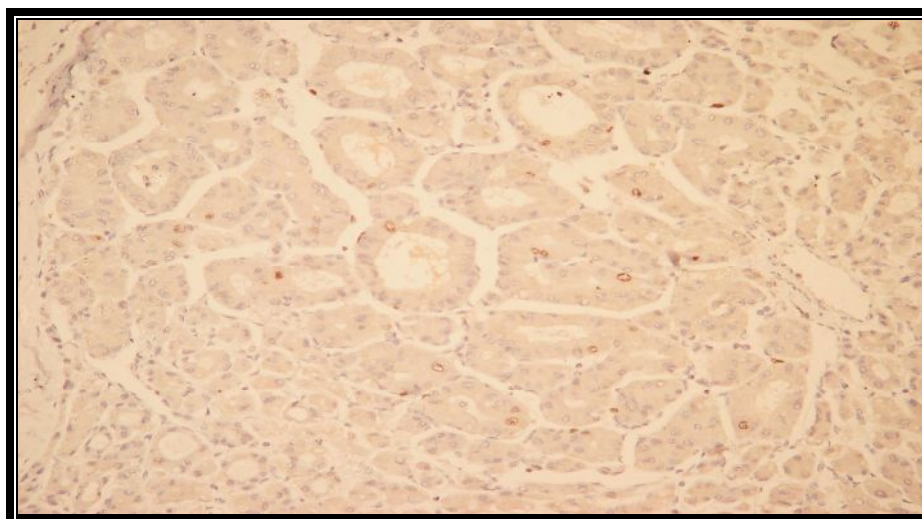
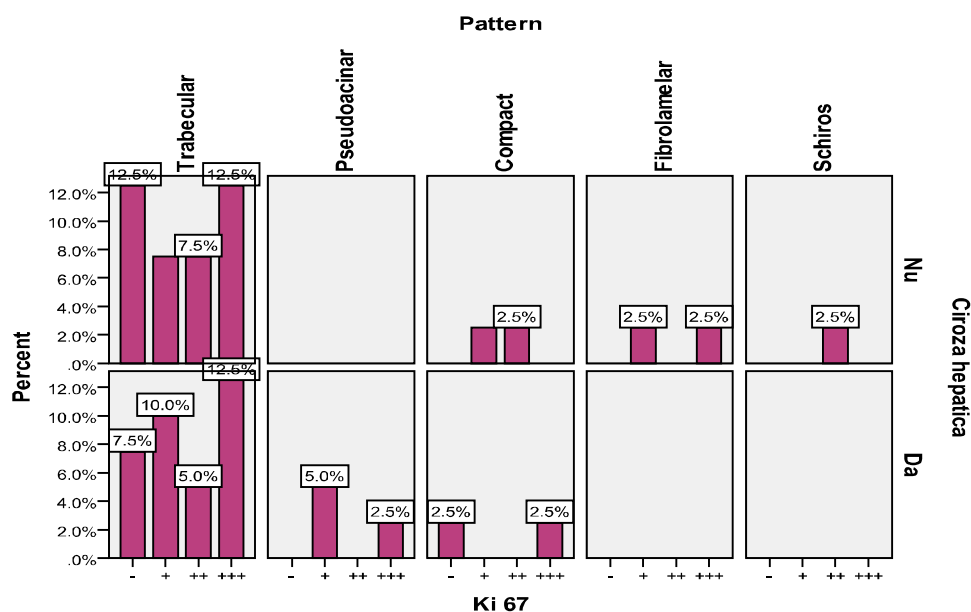


Figura nr. 11: Imunoreactivitate scazuta pentru Ki-67 intr-un carcinom hepatic cu arhitectura predominant acinara, 200x (sursa: Prosonohep 6216)



Graficul nr. 14: Imunoreactivitatea Ki 67 in functie de asocierea hepatocarcinomului de diferite tipuri histopatologice cu ciroza hepatica

Pentru cele 17 cazuri moderat diferențiate, imunoexpresia Ki 67 este distribuită astfel: 5 cazuri (29.4%) au o expresie a Ki 67 intens pozitivă, 2 cazuri (11.7%) sunt zonal pozitive, 6 cazuri (35.2%) sunt izolat pozitive și 4 cazuri (23.5%) sunt negative.

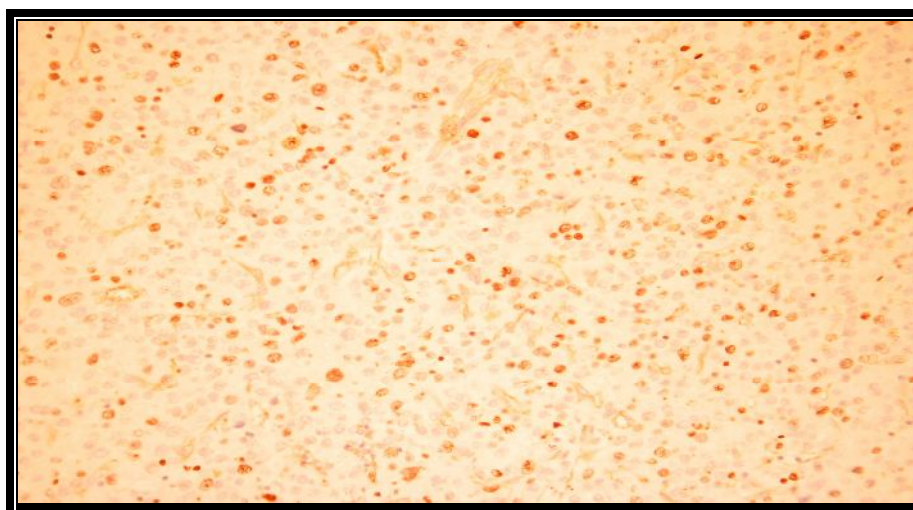
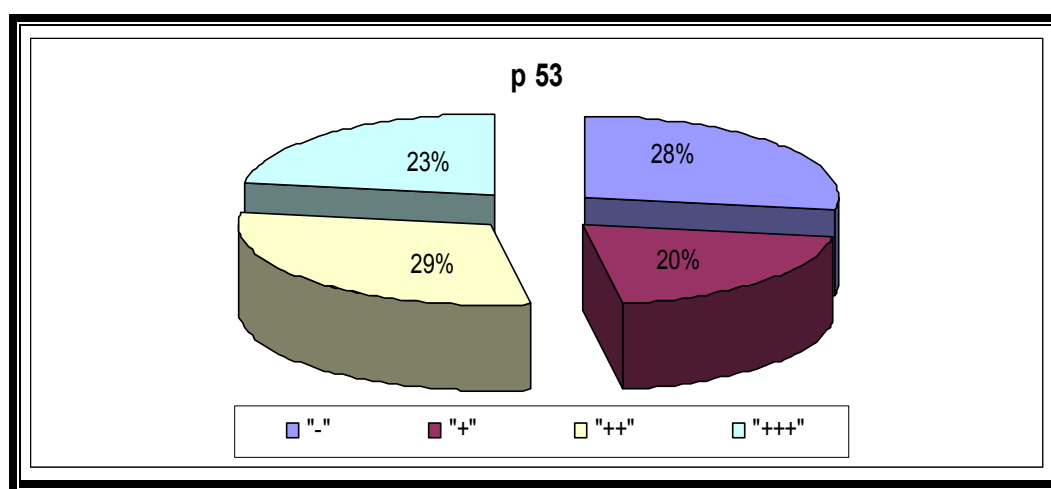


Figura nr. 12: Imunoreactivitate intensa pentru markerul de proliferare Ki-67 (>70% dintre celulele tumorale), 200x(sursa: Prosonohep .6216)

În ceea ce privește imunoreactivitatea Ki 67, acesta a fost intens pozitiv cel mai frecvent în carcinoamele hepatocelulare cu patternul trabecular, în proporții egale, 12,5% în ceea ce privește asocierea sau nu a cirozei hepatice. Patternurile schiros și fibrolamelar nu s-au regăsit în cazurile de CHC care asociau ciroza hepatică.

Printre cazurile de carcinom hepatocelular slab diferențiat se regăsesc 7 cazuri (35%) cu imunoexpresie intens pozitivă, 4 cazuri (20%) zonal pozitive, 4 cazuri (20%) izolat pozitive, iar restul de 5 cazuri (25%) sunt negative.

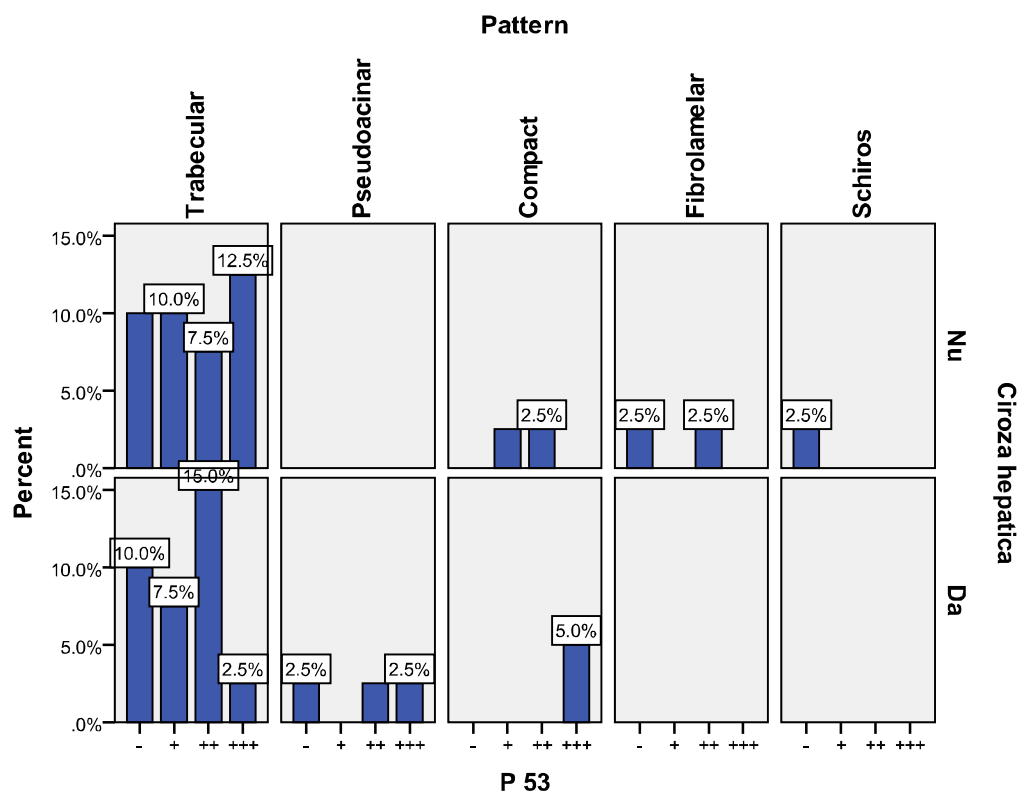


Graficul nr. 15: Expresia imunoreacției la p 53 în carcinomul hepatocelular

Expresia proteinei p53 a fost pozitivă în 29 din cele 40 de cazuri (72,5%) și negativă în 11 cazuri, adică în 27,5% din cazuri. P53 a fost pozitiv difuz în 22,5% din cazuri, pozitiv zonal în 30 % și respectiv pozitiv doar izolat în 20% din cazuri.

Imunoreactivitatea p 53 a fost depistată difuz pozitivă în 2 cazuri de carcinom compact, într-un singur caz de carcinom pseudoglandular și în 6 cazuri cu pattern trabecular.

Expresia imunoreactivității p 53 a fost pozitivă (Figura nr. 13) în 37,5% din cazurile de carcinom hepatocelular care nu asociau ciroza hepatică și în 35% din cazurile de carcinom hepatocelular care asociau ciroza hepatică, dintre care 5 cazuri au prezentat reactivitate intens pozitivă din rândul celor cu pattern trabecular care nu asociau ciroza hepatică și un caz care asocia ciroza hepatică. P53 a fost negativ în 5 cazuri de hepatocarcinom dezvoltat pe ciroza hepatică și în 6 cazuri fără ciroza hepatică.



Graficul nr. 16: Imunoreactivitatea P 53 în funcție de asocierea hepatocarcinomului de diferite tipuri histopatologice cu ciroza hepatică

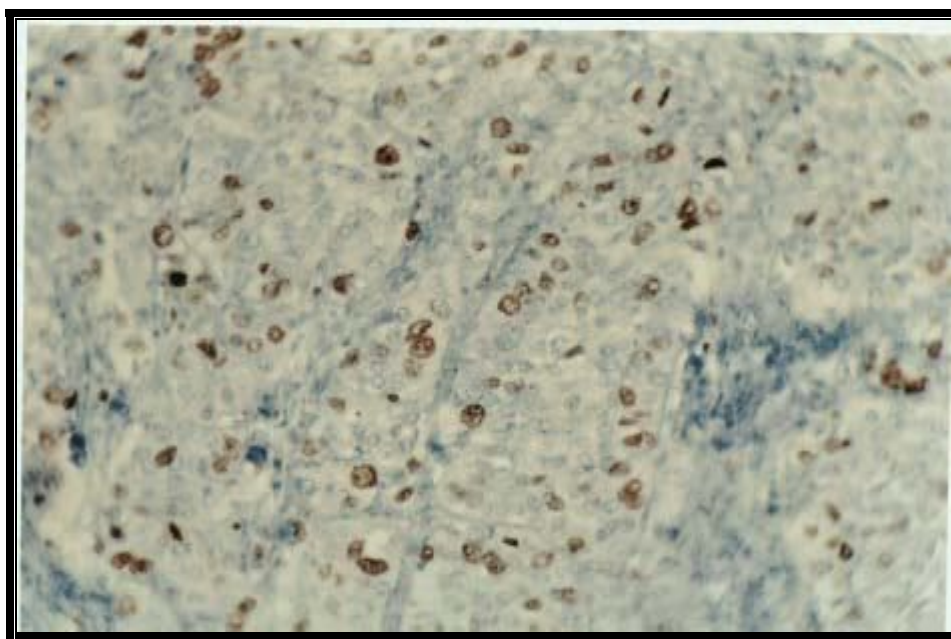
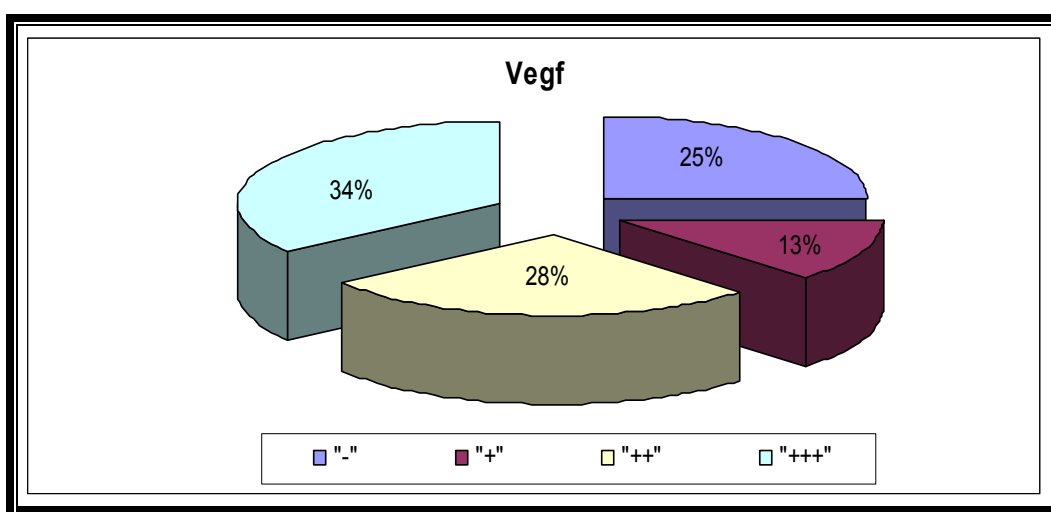


Figura nr. 13: Imunoreacție pozitivă la p 53 în CHC(sursa: Prosonohep .6216)

Expresia VEGF a fost observată în citoplasma celulară, iar patternul colorației a fost omogen. În unele cazuri aproape toate celulele canceroase au fost imunopozitive pentru VEGF, pe când în alte cazuri, celulele canceroase au fost imunonegative. Expresia VEGF nu a fost identificată în epiteliile normale.

Expresia Vegf a fost negativă în 10 din cele 40 de cazuri examinate (25%) și “+”, “++”, “+++” în 5, 11 și respectiv 14 cazuri de carcinoma hepatocelular (Figurile 14,15).



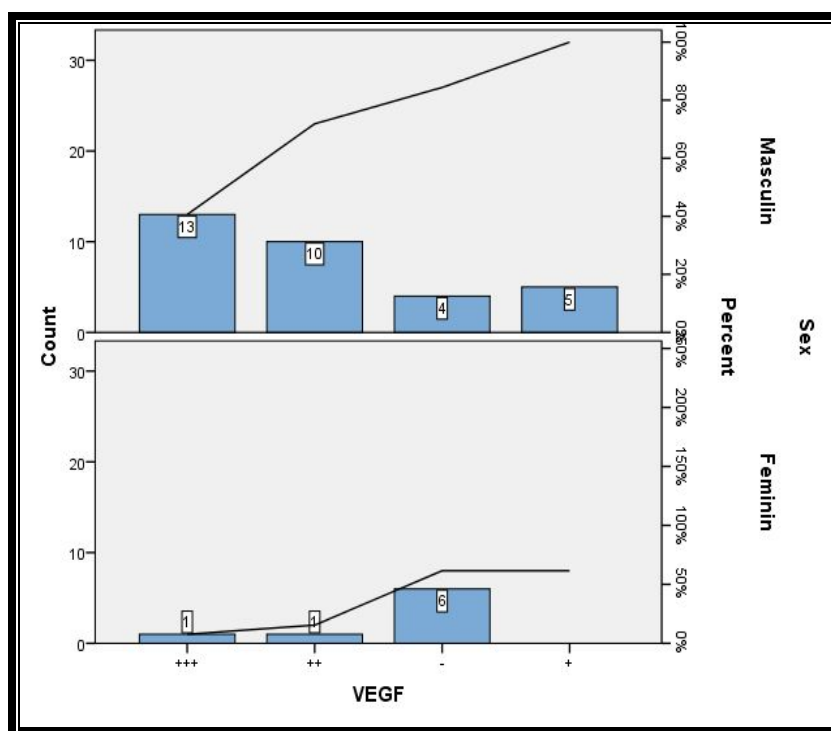
Graficul nr. 17: Expresia imunoreacției la VEGF în carcinomul hepatocelular

Se observă diferență semnificativă statistic între valoarea medie a VEGF la genul masculin și cea obținută pentru pacienții de sex feminin. Pentru sexul masculin valoarea medie este de 53,90%, iar pentru sexul feminin 20%. Valoarea obținută pentru $t=2,338$, mai mare decât valoarea t -tabelar pentru 10 grade de libertate, care este 2,228. $P=0,041$. Se poate afirma deci cu un grad mare de siguranță că exprimarea imunohistochimică a VEGF este influențată semnificativ statistic de sexul pacienților, prezentând valori mai mari în cazul celor de sex masculin. Rezultatele sunt detaliate în tabelul următor:

Tabelul nr. 5: Aplicarea testului t

t-Test	Masculin	Feminin
Media	53.90625	20
Varianța	983.4425	1435.714
Nr. cazuri	32	8
t Stat	2.338658	
P (T<=t) one-tail	0.020717	

t Critical one-tail	1.812461
P (T<=t) two-tail	0.041434
t Critical two-tail	2.228139



Graficul nr. 18: Distribuția Pareto a expresiei Vegf în funcție de sex

Distribuția Pareto a expresiei imunohistochimice a VEGF evidențiază că pentru 6 din totalul de 8 femei (75%) din lotul studiat imunoexpresia VEGF a fost negativă. În ceea ce privește imunoexpresia VEGF în rândul bărbaților predominante au fost cazurile intens pozitive ”+++”, într-un procent de 40,06%, urmate de ”++” cu 32,25% și ”-” cu 12,5%.

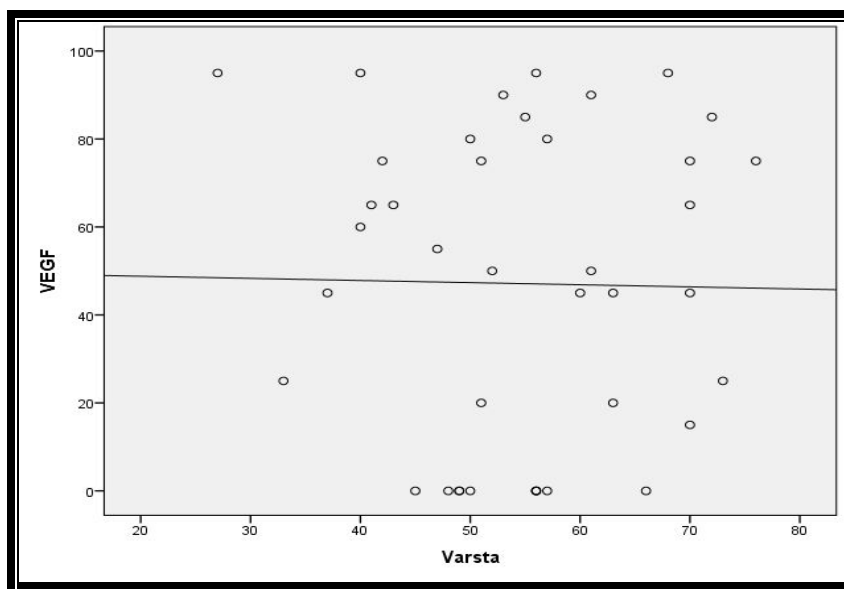
Pentru a analiza nivelul de asociere între valorile VEGF și vârsta pacienților diagnosticați cu CHC, am utilizat coeficientul de corelație Pearson. Valoarea medie a VEGF a fost 47,12%, iar vârsta medie 54,6 ani. Rezultatul obținut reprezintă o corelație negativă, nesemnificativă între cele două caracteristici ($r=-0,016$, $p=0,921$, bilateral).

Tabelul nr. 6: Coeficientul de corelație Pearson pentru imunoreactivitatea Vegf în funcție de vârstă

Coeficientul de corelație Pearson -Vârstă/Expresie Vegf	
r	-.016
p	.921

N	40
---	----

În figura următoare este reprezentat un grafic de tip scatterplot unde sunt reprezentate valorile VEGF în funcție de vârstă. Se observă că trendline-ul este unul orizontal, deci valorile VEGF nu sunt influențate în nici un fel de vârstă.



Graficul nr. 19: Imunoexpresia Vegf în funcție de vârstă

Prin aplicarea testului de corelație Pearson se observă că nu există o asociere semnificativă statistic între valorile VEGF și dimensiunea tumorală ($p=0.398$).

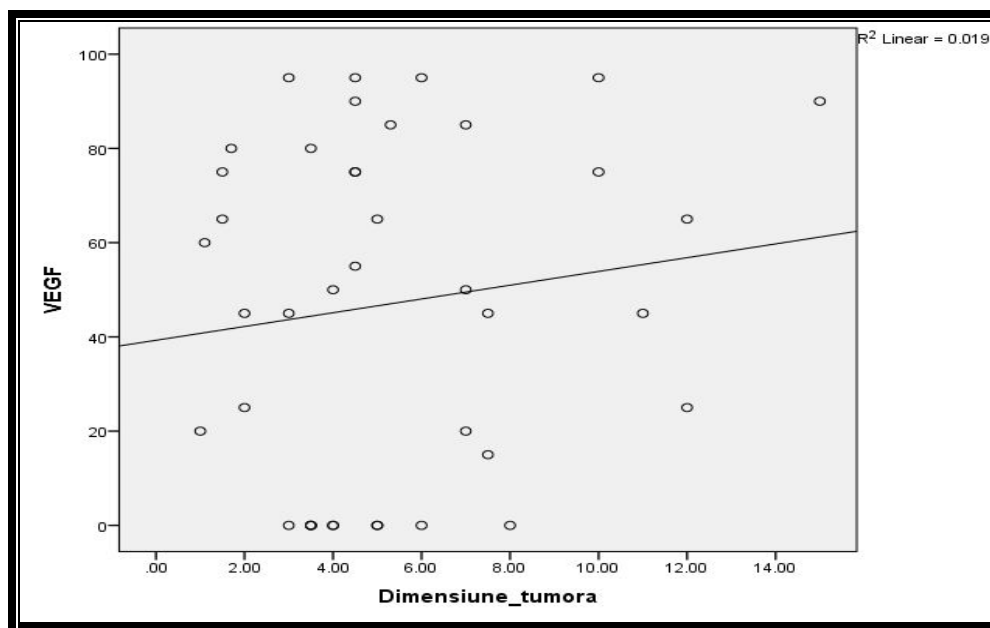
Tabelul nr. 7: Coeficientul de corelație Pearson pentru imunoreactivitatea Vegf în funcție de dimensiunea tumorii

Coeficientul de corelație Pearson-Dimensiune tumorală/Expresie Vegf	
r	.137
p	.398
N	40

Deși în graficul 20 se observă un trendline ușor ascendent (exprimarea VEGF crește odată cu creșterea dimensiunilor tumorale, coeficientul de determinare r^2 are o valoare

Aspecte epidemiologice, clinico-paraclinice, morfopatologice și imunohistochimice în
carcinomul hepatocelular dezvoltat pe ciroza hepatică
foarte mică (0,019) deci dimensiunea tumorii are un efect foarte mic asupra imunoexpresiei VEGF.

În ceea ce privește relația dintre expresia Vegf și dimensiunea tumorală, 30 din cazurile de CHC cu un diametru tumoral mai mare de 3 cm au avut imunoreactivitate difuz și zonal pozitivă. 9 din cele 10 cazuri cu imuno reacție negativă pentru Vegf au un diametru tumoral relativ mare, cuprins între 3,5 și 8 cm.



Graficul nr. 20: Imunoexpresia Vegf în funcție de dimensiunea tumorală

În ceea ce privește relația dintre expresia Vegf și gradul histologic, din cele 3 tumori bine diferențiate 1 a fost negativă pentru Vegf, iar celelalte 2 au fost intens pozitive (Tabelul nr. 8).

Cele 17 cazuri moderat diferențiate au avut următoarea distribuție: 6 cazuri (35,5%) intens pozitive, 2 cazuri (11.7%) zonal pozitive, 4 cazuri (33.4%) izolat pozitive, iar restul de 5 cazuri (29.4%) au fost negative.

Tabelul nr. 8: Analiza valorilor medii ale VEGF în funcție de gradul histologic

VEGF			
Grading histologic Edmondson-Steiner	Media	N	Deviația standard
Bine diferențiat	56.67	3	50.083

Aspecte epidemiologice, clinico-paraclinice, morfopatologice și imunohistochimice în
carcinomul hepatocelular dezvoltat pe ciroza hepatică

Moderat diferențiat	45.88	17	37.426
Slab diferențiat	46.75	20	32.577

Pentru cele 20 de cazuri slab diferențiate distribuția a fost următoarea: 5 cazuri (25%) intens pozitive, 7 cazuri (35%) zonal pozitive, 3 cazuri (15%) izolat pozitive, iar restul de 4 cazuri (20%) au fost negative.

Tabelul nr. 9: Testul statistic One Way Anova pentru gradingul histologic și expresia VEGF

	Sum of Squares	Grade de libertate	Mean Square	F	P value
One Way Anova	302.194	2	151.097	.117	.889

Se observă valori medii ale VEGF mai mari în cazul unui grading histologic bine diferențiat (56,67%). Valorile medii cele mai mici se observă pentru tumorile moderat diferențiate (45,88%).

Pentru a determina dacă diferențele observate sunt semnificative statistic am utilizat testul statistic One Way Anova. Valoarea obținută pentru p este 0,889, deci ipoteza nulă nu poate fi respinsă, în concluzie gradingul histologic nu influențează valoarea expresiei VEGF (Tabelul nr. 9).

Tabelul nr. 10: Valorile medii ale VEGF în funcție de patternul tumoral

VEGF			
Pattern	Media	N	Deviatia standard
Trabecular	44.50	30	34.625
Pseudoacinar	81.67	3	15.275
Compact	25.00	4	37.859
Fibrolamelar	80.00	2	21.213
Schistos	45.00	1	.
Total	47.12	40	35.044

Valorile medii ale VEGF în funcție de patternul tumoral sunt prezentate în tabelul următor. Valoarea medie pentru patternul trabecular (care reprezintă 75% din cazuri) este de 44,5%. Cea mai puternică exprimare a VEGF se înregistrează în cazul patternului Pseudoacinar (81,67%) și Fibrolamelar (80%). Valoarea medie cea mai redusă se înregistrează în cazul patternului Compact (25%) (Tabelul nr.10).

Tabelul nr. 11: Testul statistic One Way Anova pentru patternul tumoral și expresia VEGF

	Sum of Squares	Grade de libertate	Mean Square	F	P value
One Way Anova	7910.208	4	1977.552	1.731	.165

Prin utilizarea testului Anova se demonstrează faptul că diferențele observate în ceea ce privește expresia VEGF și pattern nu sunt semnificative statistic (Tabelul nr. 11).

VEGF a fost pozitiv în țesutul tumoral în 35 de cazuri (87,5%) izolat, zonal sau difuz. De asemenea, VEGF a fost mai frecvent pozitiv în tipul trabecular de hepatocarcinom, 16 cazuri care nu au asociat ciroza hepatică și 10 cazuri care au asociat ciroza hepatică.

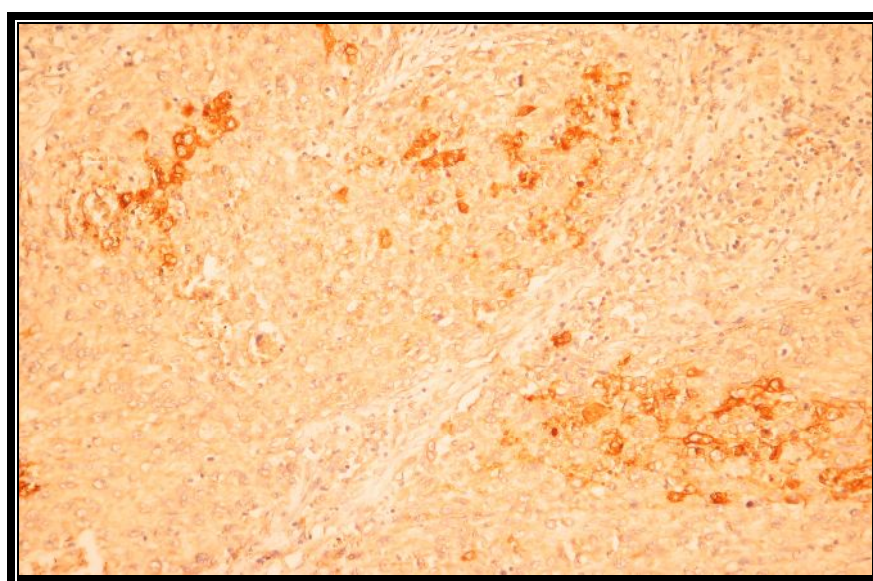


Figura nr. 14: Imunoreactivitate celulara prezenta focal pentru VEGF in tesutul tumoral, 200x(sursa: Prosonohep .6216)

Infiltrarea capsulei Glisson ($p = 0.1$), invazia vasculară ($p = 0.2$) și metastazele ($p = 0.8$) au fost observate mai frecvent la pacienții cu imunoexpresie pozitivă la Vegf decât la cei la care expresia a fost negativă.

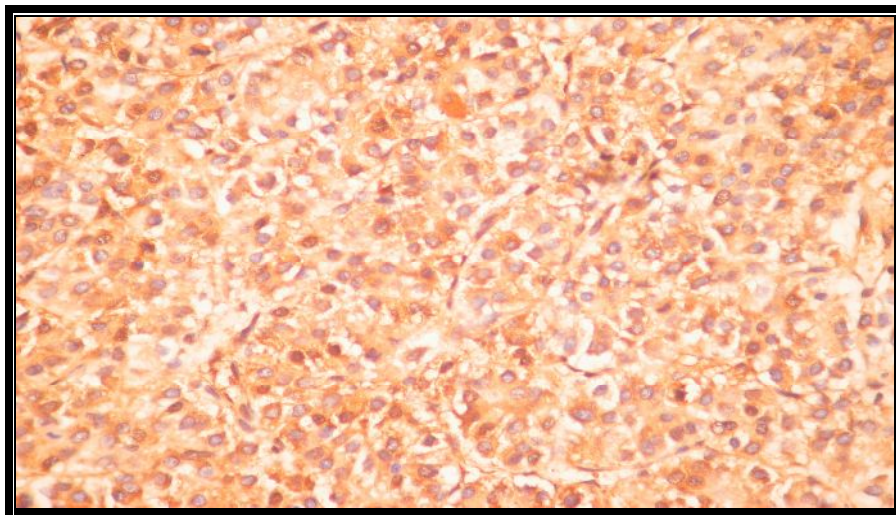


Figura nr. 15: VEGF pozitiv focal în tesutul carcinomatos – grupuri de celule cu imunoreactivitate citoplasmatică, 400x(sursa: Prosonohep .6216)

Si în ceea ce privește imunoreacția pozitivă a Vegf, ca și în cazul Ki 67, patternul trabecular a fost cel mai frecvent, 25% pentru cazurile de carcinom hepatocelular care asociază ciroza hepatică și 40% pentru cazurile care nu se însoțesc de ciroză.

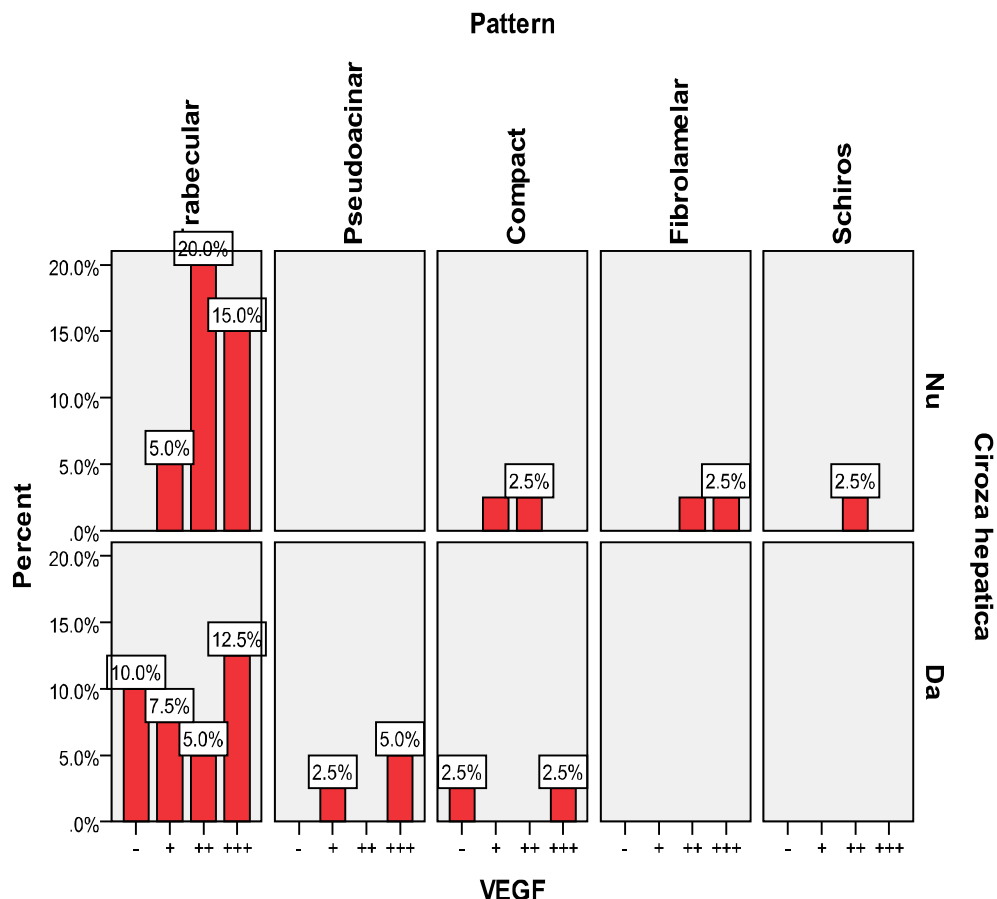
Acest studiu indica faptul ca tumorile cu un indice al Ki 67 crescut si expresiile p53 si VEGF de asemenea crescute tind sa aiba un risc de recurenta crescut. 7 cazuri de tumori cu dimensiuni mici si 23 de cazuri de tumori de dimensiuni mari au prezentat un index al Ki 67 crescut, respectiv 2 si 13 cazuri in cazul expresiei crescute a proteinei p53 si 1 si 17 in cazul VEGF.

Expresia proteinei p53 in leziunile maligne avansate indica faptul ca aceasta anomalie poate aparea in stadiile avansate ale HCC. Am observat o stransa corelatie intre expresia Ki 67 si cea a p53. Toate cazurile pozitive pentru p53 au avut structura trabeculara sau compacta cu un grad crescut de proliferare.

Coloratiile imunohistochimice pentru Ki 67 , p53 si VEGF pot ajuta foarte mult in ceea ce priveste decizia unei rezectii curative in HCC.

Unii autori au raportat ca indexul Ki 67 sau expresia proteinei p53 pot da informatii cu privire la stadiul clinic al bolii. Astfel indexul Ki 67 corespunde gradului histologic de

Aspecte epidemiologice, clinico-paraclinice, morfopatologice și imunohistochimice în
carcinomul hepatocelular dezvoltat pe ciroza hepatică
defectiere, fiind semnificativ scăzut în tumorile mici, încapsulate și crescute în tumorile de
dimensiuni mari și încapsulate.



Graficul nr. 21: Imunoreactivitatea VEGF în funcție de asocierea hepatocarcinomului de diferite tipuri histopatologice cu ciroza hepatică

Lucrarea de față se înscrie într-un efort multidisciplinar care încearcă prin metode convenționale și moderne, asociate unor observații clinice să rețină câteva date noi morfopatologice ce ar putea lărgi cunoștințele de bază despre hepatocarcinom.

Deși sunt dificil de prezis cu exactitate viitoarele schimbări în domeniul epidemiologiei bolilor, unii experți au sugerat că incidența globală a CHC va continua să crească în următorii câțiva ani până când se va ajunge la un platou în 2015-2020.

Studiul imunohistochimic prezent demonstrează valoarea markerilor moleculari în diagnosticul pozitiv și monitorizarea tumorilor hepatice și constituie o pledoarie în includerea de rutină a examenelor imunohistochimice în diagnosticul pacienților cu tumori hepatice, în detectarea și screeningul în stadii incipiente a diferitelor grade de malignitate.

Studiul a fost limitat de materialul de lucru, a cărui structură nu poate fi compusă din loturi omogene de studiu care ar permite realizarea unor analize comparative exacte. Un alt factor limitativ a fost cel legat de panel-ul de markeri disponibili în laboratoarele de profil și de calitatea materialelor arhivate, utilizate în cadrul studiului retrospectiv.

Rezultatele marcajului IHC prezintă multe variabile, printre care cele mai importante ar fi: situs-ul prelevării și respectiv al realizării marcajului și subiectivitatea interpretării corelației, datorită intensității invariabile de imunocolorare.

Rezultatele obținute oferă noi perspective privind diagnosticul clinic, stadializarea și prognosticul cancerului hepatic, necesitând realizarea unui studiu extensiv privind cuantificarea markerilor tumorali hepatici pe trialuri clinice mai largi.

Perspectivile viitoare ale IHC urmăresc identificarea unor markeri mai specifici pentru diagnosticarea și monitorizarea postterapeutică și în identificarea de noi ținte moleculare utile în arsenalul terapeutic al viitorului.