

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO: CIÊNCIAS EM GASTROENTEROLOGIA E
HEPATOLOGIA

Análise da morfometria nuclear e textura da cromatina de amostras de carcinoma
hepatocelular de pacientes transplantados hepáticos.

JORDAN BOEIRA DOS SANTOS

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

PORTO ALEGRE

2021

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO: CIÊNCIAS EM GASTROENTEROLOGIA E
HEPATOLOGIA

Análise da morfometria nuclear e textura da cromatina de amostras de carcinoma hepatocelular de pacientes transplantados hepáticos.

JORDAN BOEIRA DOS SANTOS

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Rúbia Denise Ruppenthal

Co-orientadora: Dr.^a Emily Ferreira Salles Pilar

Dissertação apresentada como requisito para obtenção do título de Mestre pelo
Programa de Pós-Graduação: Ciências em Gastroenterologia e Hepatologia da
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

PORTO ALEGRE

2021

CIP - Catalogação na Publicação

Santos, Jordan Boeira dos
Análise da morfometria nuclear e textura da
cromatina de amostras de carcinoma hepatocelular de
pacientes transplantados hepáticos. / Jordan Boeira
dos Santos. -- 2021.

51 f.

Orientadora: Rúbia Denise Ruppenthal.

Coorientadora: Emily Ferreira Salles Pilar.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de
Pós-Graduação em Ciências em Gastroenterologia e
Hepatologia, Porto Alegre, BR-RS, 2021.

1. Patologia. 2. Carcinoma hepatocelular. 3.
Transplante de fígado. 4. Transformação Celular
Neoplásica. 5. Tecnologia biomédica. I. Ruppenthal,
Rúbia Denise, orient. II. Pilar, Emily Ferreira
Salles, coorient. III. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os
dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Agradecimentos

Primeiro de tudo, queria agradecer a Deus por me trazer até aqui, pelas forças para enfrentar todos os desafios, por me manter com saúde num momento tão complicado como o que vivemos, e por acolher minhas preces.

Em relação às pessoas que estiveram do meu lado nesta etapa da minha vida, agradeço em especial meus pais, minha irmã e meus avós, serei eternamente grato por essa família, pelo amor de sempre e apoio incondicional.

Aos meus amigos Carolina, Carla, Manuela, Jacson, Victor e Patrick, pela amizade, por estarem sempre ao meu lado, por aguentarem minhas lamentações e por me animarem nas horas mais sombrias. Ao meu amigo e colega de trabalho Jefferson, uma menção especial por além de todo o apoio pela amizade, também me auxiliou na construção deste trabalho.

Ao Prof^o Thadeu e seu residente Joelson pelo suporte na busca incessante de casos. Ao pessoal do CPE pela oportunidade e auxílio no desenvolvimento das atividades práticas, especialmente a Emily que acompanhou tudo de perto e sempre esteve disposta a ajudar quando necessário.

Um agradecimento super especial ao Rodrigo, nem sei como descrever a importância que teve neste momento, desde o lançamento da ideia ao suporte em todos os momentos, as contribuições no trabalho, as vídeo-chamadas e a grande paciência em me ensinar as técnicas.

E por fim, dedico tudo isso a Prof^a Rúbia, por aceitar orientar-me nessa jornada, por estar sempre presente me oferecendo todo o apoio, por me passar o exemplo de como exercer o papel de professor e a capacidade de se reinventar diante novas situações de ensino. Obrigado pela parceria.

SUMÁRIO

RESUMO	7
ABSTRACT	9
LISTA DE ABREVIATURAS	11
LISTA DE FIGURAS	13
LISTA DE TABELAS	14
LISTA DE QUADROS	15
1. INTRODUÇÃO	16
2. REVISÃO DA LITERATURA	18
2.1 CARCINOMA HEPATOCELULAR (CHC)	18
2.1.1 Epidemiologia	18
2.1.2 Aspectos clínicos	19
2.1.3 Diagnóstico e estadiamento	20
2.1.4 Etiologia	20
2.1.5 Tratamento	22
2.1.6 Transplante Hepático	22
2.2 ASPECTOS FISIOPATOLÓGICOS E HISTOPATOLÓGICOS	25
2.2.1 Fisiopatogenia	25
2.2.2 Histopatologia do CHC	26
2.2.3 Alterações nucleares	27
2.3 MORFOMETRIA NUCLEAR	29

2.3.1 Definição.....	29
2.3.2 Medidas morfométricas de forma e tamanho nuclear.....	30
2.3.3 Média de escala de cinza (MEC).....	32
2.2.4 Textura da cromatina.....	33
2.2.4.1 Fractalidade.....	33
2.2.4.2 Textura da cromatina e dimensão fractal.....	35
2.4 TISSUE MICROARRAY.....	36
3. JUSTIFICATIVA.....	38
4. QUESTÕES DE PESQUISA.....	39
5. HIPÓTESES.....	39
6. OBJETIVOS.....	39
6.1 OBJETIVO GERAL.....	39
6.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	40
ARTIGO ORIGINAL	
CONCLUSÕES.....	41
CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS.....	42
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	44
ANEXO A - Atestado para defesa.....	50
ANEXO B - Carta do orientador.....	51

RESUMO

Introdução: O carcinoma hepatocelular (CHC) é resultado de constantes lesões no fígado capazes de desencadear modificações na estrutura dos hepatócitos. A morfometria nuclear tem se mostrado útil na detecção destas alterações celulares, possibilitando que as mesmas sejam quantificadas, conferindo maior precisão e objetividade na análise histológica. **Objetivo:** Identificar alterações na estrutura nuclear e da textura de cromatina em amostras de CHC de pacientes submetidos ao transplante hepático. **Materiais e métodos:** Foram analisadas amostras de tecido tumoral e tecido adjacente não-neoplásico de 34 indivíduos submetidos à transplante hepático por CHC. Após a confirmação diagnóstica e a seleção da área exata do tumor, os tecidos foram reunidos em blocos de *tissue microarray* utilizados na confecção de lâminas histológicas coradas por Hematoxilina-Eosina. As imagens microscópicas de cada cilindro foram analisadas no software ImageJ quanto aos parâmetros nucleares de área, perímetro, circularidade, diâmetro de Feret, média de escala de cinza, solidez, razão de aspecto e dimensão fractal. Variáveis clínico-patológicas de relevância clínica foram obtidas através de consulta ao prontuário médico. **Resultados:** Dos 34 casos, 55,9% eram homens e 67,6% tinham história de hepatite C. Houve diferenças entre as amostras de CHC e tecido adjacente não-neoplásico quanto ao perímetro ($p=0,025$), circularidade ($p<0,001$), solidez ($p<0,001$), razão de aspecto ($p<0,001$) e dimensão fractal ($p=0,001$). Valores mais altos de média de escala de cinza ($p=0,034$) e o diâmetro de Feret ($p=0,024$) foram associados a pontuações mais elevadas no *Model for End-Stage Liver Disease*. Núcleos com maior área ($p=0,014$) e diâmetro de Feret ($p=0,035$) foram associados a menor sobrevida. Os pontos de corte para diferenciação das

células neoplásicas foram de $\geq 22,05$ μm para perímetro com uma sensibilidade de 88% e especificidade de 85% ($p=0,038$). E de $\geq 1,14$ μm para dimensão fractal com uma sensibilidade de 70% e especificidade de 91% ($p=0,004$). A correlação de Pearson inter-avaliadores teve significância ($p<0,001$) em relação à área, circularidade, diâmetro de Feret, média de escala de cinza e razão de aspecto.

Conclusões: Foi encontrada diferença significativa nas medidas nucleares (perímetro, circularidade, solidez e razão de aspecto) e na textura da cromatina entre as amostras de CHC e tecido adjacente não-neoplásico de pacientes transplantados hepáticos, bem como a associação dessas alterações com características clínicas relevantes (idade, *Model for End-Stage Liver Disease*, recorrência e sobrevida). A análise morfométrica mostrou alta sensibilidade e especificidade quanto ao perímetro e dimensão fractal na discriminação entre hepatócitos neoplásicos e não neoplásicos, apresentando capacidade de replicação inter-observadores.

Palavras-chave: Patologia; Carcinoma hepatocelular; Transplante de fígado; Transformação Celular Neoplásica; Tecnologia biomédica.

ABSTRACT

Background: Hepatocellular carcinoma (HCC) is the result of constant liver damage that can trigger changes in the structure of hepatocytes, leading to a malignant transformation. Nuclear morphometry has been shown to be useful in detecting these cellular changes, allowing them to be quantified and providing greater accuracy and objectivity in histological analysis. **Aim:** To identify differences in nuclear morphometry and chromatin texture in HCC samples from patients undergoing liver transplantation. **Methods:** HCC and adjacent non-neoplastic tissue samples were analyzed from 34 individuals post-liver transplant. The samples were selected upon confirmation of the diagnosis of HCC and indication of the exact location of the tumor in the paraffin block in the analysis by the pathologist. These samples were assembled in 60-cylinder microarray tissue blocks, and from them histological slides stained by Hematoxylin-Eosin were cut and made. Microscopic images of each cylinder were obtained in a capture microscope and analyzed in the ImageJ software for the nuclear parameters of area, perimeter, circularity, Feret's diameter, mean gray value, solidity, aspect ratio and fractal dimension. **Results:** Of the 34 cases, 55.9% were men and 67.6% had a history of hepatitis C. HCC and adjacent non-neoplastic tissue samples differed regarding perimeter ($p=0.025$), circularity ($p<0.001$), solidity ($p<0.001$), aspect ratio ($p<0.001$), and fractal dimension ($p=0.001$). Higher mean gray value ($p=0.034$) and Feret diameter ($p=0.024$) were associated with higher scores in the *Model for End-Stage Liver Disease*. Nuclei with a larger area ($p=0.014$) and Feret diameter ($p=0.035$) were associated with lower survival. The cut-off points for differentiation of neoplastic cells were $\geq 22.05 \mu\text{m}$ for perimeter with a sensitivity of 88% and specificity of 85% ($p =$

0.038). And of $\geq 1.14 \mu\text{m}$ for fractal dimension with a sensitivity of 70% and specificity of 91% ($p=0.004$). Pearson's inter-rater correlation was significant ($p<0.001$) in relation to area, circularity, Feret's diameter, mean gray value and aspect ratio.

Conclusions: A significant difference was found in the nuclear measurements (perimeter, circularity, solidity and aspect ratio) and in the chromatin texture between the samples of HCC and adjacent non-neoplastic tissue from liver transplant patients, as well as the association of these changes with relevant clinical characteristics (age, Model for End-Stage Liver Disease, recurrence and survival). The morphometric analysis showed high sensitivity and specificity regarding the perimeter and fractal dimension in the discrimination between neoplastic and non-neoplastic hepatocytes, with the ability to replicate inter-observer.

Keywords: Pathology; Carcinoma, Hepatocellular; Liver Transplantation; Cell Transformation, Neoplastic; Biomedical Technology.

LISTA DE ABREVIATURAS

AMN	Análise morfométrica nuclear
BCLC	<i>Barcelona Clinic Liver Cancer</i>
CCE	Carcinoma de células escamosas
CDKN2A	Inibidor de quinase dependente de ciclina 2A
CHC	Carcinoma hepatocelular
COX-2	Ciclooxigenase-2
CTP	Child-Turcotte-Pugh
DF	Dimensão fractal
DNA	Ácido desoxirribonucleico
HCPA	Hospital de Clínicas de Porto Alegre
IGFR-II/MP6	Fator de crescimento 2 de manose 6-fosfato semelhante à insulina
MEC	Média de escala de cinza
MELD	<i>Model for End-stage Liver Disease</i>
NS4A	Proteína não estrutural 4A
OMS	Organização mundial da saúde
PMN	Proteína de matriz nuclear

Ra	Relação de aspecto
RNI	Razão normalizada internacional
ROC	Receiver operator characteristic curve
TERT	Promotor da transcriptase reversa da telomerase
TNM	Sistema Tamanho-Número-Metástase
TMA	<i>Tissue microarray</i>
VHB	Vírus da hepatite B
VHC	Vírus da hepatite C

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Distribuição de casos e mortes para as 10 neoplasias mais comuns no mundo em 2020 em ambos os sexos e idades.p.18.

Figura 2. Fisiopatogenia do CHC.p.25.

Figura 3. Estrutura nuclear em células normais e cancerosas.p.28.

Figura 4. Representação da visualização de um *pixel*.p.32.

Figura 5. Medidas de dispersão na mensuração da MEC.p.33.

Figura 6. Princípio da fractalidade.p.34.

Figura 7. Textura de cromatina e dimensão fractal.p.36.

Figura 8: Núcleos de *microarray* para análise de dimensão fractal.p.37.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Critérios para Classificação de Child-Turcotte-Pugh e influência sobre a sobrevida.p.24.

Tabela 2. Classificação conforme *Model for End-stage Liver Disease*.p.24.

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Principais parâmetros morfométricos.p.31.

1. INTRODUÇÃO

O câncer hepático é a terceira principal causa de morte por câncer no mundo, sendo o carcinoma hepatocelular (CHC) o tipo histológico mais comum, correspondendo a 75-85% dos casos¹. A carcinogênese do CHC desenvolve-se de forma lenta mediante um acúmulo de lesões constantes, independentemente da etiologia subjacente. A ocorrência de eventos regenerativos repetidos culmina na cirrose, principal fator de risco do CHC². Entre as modalidades terapêuticas utilizadas no CHC, o transplante hepático é a opção que está associada a menor risco de recorrência tumoral³.

A existência de alterações no núcleo celular envolvendo tamanho, formato e organização da cromatina é comumente constatada em células em transformação maligna, situação que pode desencadear modificações que afetam a expressão gênica⁴.

Em células tumorais, mudanças drásticas na textura da cromatina nuclear são frequentes e encontram-se relacionadas à progressão da doença⁵. A dimensão fractal (DF) destaca-se como um importante parâmetro de avaliação da textura da cromatina, uma vez que caracteriza estruturas complexas que não enquadram-se na geometria Euclidiana⁶.

Os métodos de análise histológica digital, embora já explorados na prática experimental, têm acumulado avanços tecnológicos significativos. Há uma rápida evolução das ferramentas computacionais além do aumento da complexidade de algoritmos⁷. Nesse contexto, a morfometria consiste na mensuração do comprimento, área ou volume de núcleos, células e componentes teciduais⁸, que

surge como um importante recurso na detecção e quantificação de modificações nucleares, com o intuito de diminuir a subjetividade das técnicas de diagnóstico histológico⁹.

A análise morfométrica e de textura de cromatina tem sido empregada em estudos com diferentes tipos de câncer e outras doenças, com resultados promissores quanto às vantagens de sua utilização na discriminação de alterações nucleares. Apesar disso, é notável na literatura uma escassez de estudos que abordam o emprego desta técnica no CHC, necessitando uma maior investigação sobre a relevância de seu uso e possível incorporação na prática clínica.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 CARCINOMA HEPATOCELULAR (CHC)

2.1.1 Epidemiologia

Estima-se que em 2020 o câncer hepático foi o sexto tipo neoplásico mais comumente diagnosticado e a terceira principal causa de morte por câncer em todo o mundo (Figura 1), com a ocorrência de 905.677 novos casos e 830.180 óbitos¹.

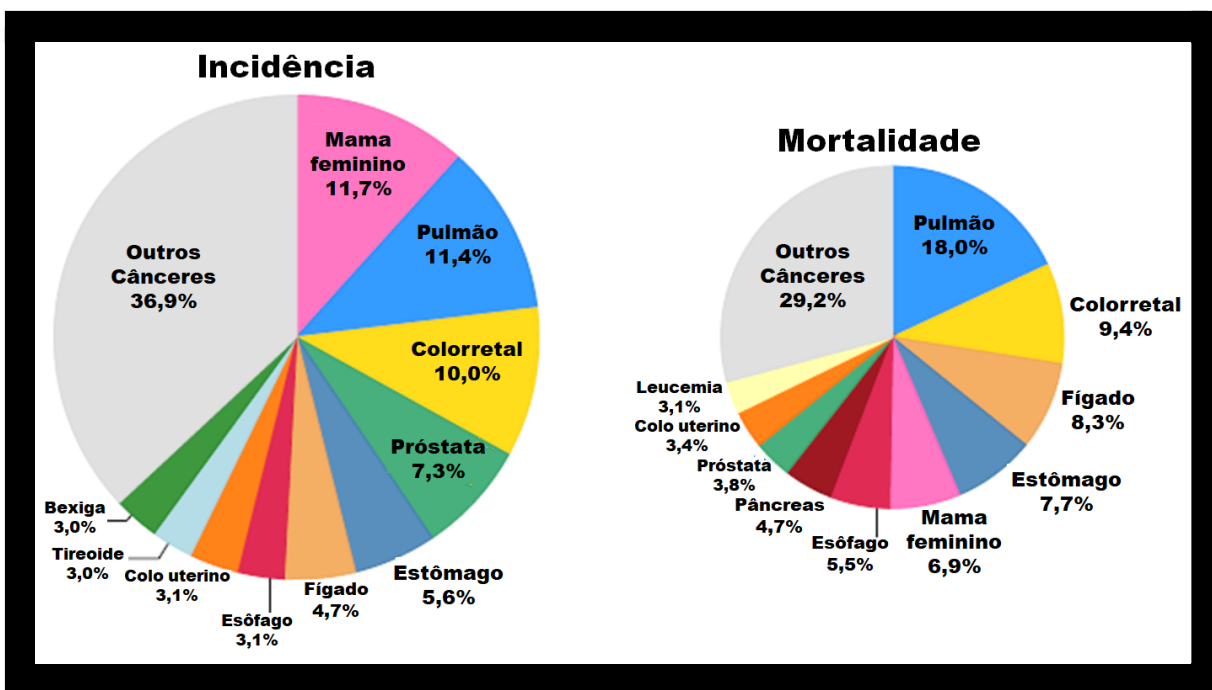


Figura 1. Distribuição de casos e mortes para as 10 neoplasias mais comuns no mundo em 2020 em ambos os sexos e idades. Adaptada de Sung *et al.*, 2021¹.

Na população brasileira, o câncer hepático aparece como a 11^a neoplasia mais frequente com 12.674 novos casos em 2020 sendo a 7^a causa de óbito com 12.139 mortes em 2020¹. Dentre as neoplasias hepáticas, o CHC consiste no tipo histológico predominante, manifestando-se com características agressivas em mais

de 80% dos casos¹⁰.

O CHC dificilmente acomete indivíduos com idade inferior a 40 anos, atingindo seu ápice por volta dos 70 anos de idade³. Ele é normalmente duas vezes mais comum em homens do que em mulheres¹¹. Contudo, em algumas localidades, a taxa se aproxima entre os sexos, mas os fatores de risco associados a essa incidência aumentada em mulheres ainda não foram identificados¹². Sugere-se que a origem desta disparidade seja proveniente de diferenças comportamentais, ingestão de bebidas alcoólicas, reações imunológicas e epigenética¹³⁻¹⁵.

Nas últimas décadas houve grande avanço na compreensão de aspectos epidemiológicos, fatores de risco e desenvolvimento do CHC. Além disso, foram desenvolvidas diversas ações de prevenção, vigilância, detecção precoce, métodos diagnósticos e aprimoramento dos tratamentos disponíveis¹⁶.

2.1.2 Aspectos clínicos

A sintomatologia do CHC é inespecífica, comumente presente somente em pacientes em estágio avançado e relacionada ao comprometimento da fisiologia hepática. Todavia, existe a possibilidade de ocorrência de sinais e sintomas como dor abdominal, massa abdominal palpável à direita, inapetência, distensão da parede abdominal, icterícia, ascite, perda de peso, mal-estar geral, sinais de encefalopatia hepática e hemorragia digestiva^{17,18}.

A típica progressão do CHC envolve o aumento gradual do tumor primário até que este atinja tamanho suficiente para afetar a função hepática ou provocar metástases, principalmente pulmonares. A ocorrência do óbito é normalmente causada por diferentes fatores, que incluem: caquexia, hemorragia gastrointestinal

ou de varizes esofágicas, insuficiência hepática com coma hepático ou pela hemorragia provocada por ruptura do tumor¹⁹.

2.1.3 Diagnóstico e estadiamento

Na maioria dos casos o diagnóstico do CHC é tardio, pois muitos pacientes possuem cirrose compensada concomitante ao CHC, fazendo com que este seja subdiagnosticado até que ocorra uma descompensação da função hepática ou encontre-se em um estágio avançado. Estima-se que em mais de 20% dos casos de CHC haja um quadro cirrótico não identificado previamente ao diagnóstico do CHC²⁰.

No diagnóstico do CHC são consideradas características individuais como a severidade da cirrose hepática e o grau de malignidade do CHC, visto a forte relação entre as duas doenças²¹. O *Barcelona Clinic Liver Cancer (BCLC)* fundamenta-se na avaliação de parâmetros de caráter clínico, sendo considerado como padrão internacional no estadiamento do CHC^{18,22}.

Já o Sistema Tamanho-Número-Metástase (TNM), fundamenta-se nas características do tumor, nos linfonodos e em prováveis metástases. Através dele torna-se possível enquadrar pacientes em categorias que apresentem similaridade de prognósticos entre seus integrantes, auxiliando assim na tomada de medidas terapêuticas²³.

2.1.4 Etiologia

A cirrose hepática segue como fator causal predominante na carcinogênese do CHC, independente da etiologia. Estima-se que 70-80% dos casos de CHC em

países ocidentais, inclusive o Brasil, ocorram em associação com a cirrose hepática decorrente da infecção crônica pelos vírus das hepatites B (VHB) e C (VHC)^{24,25}.

Os portadores de VHB apresentam 10-25% de chance de desenvolverem CHC. A hepatocarcinogenicidade do VHB pode ser minimizada se tomadas medidas terapêuticas adequadas que levem à supressão viral, resultando na redução da ocorrência do CHC de 13,7% para 3,7%, com maior diminuição de risco encontrada em pacientes cirróticos²⁶. Em infectados com VHC, há desenvolvimento de hepatite crônica em 80% dos pacientes, com cerca de 20% dos casos evoluindo para cirrose e CHC²⁶.

Com o objetivo de avaliar a etiologia do CHC na população brasileira, um estudo demonstrou que houve o diagnóstico de cirrose em 98% dos casos, sendo o VHC o fator etiológico predominante. O VHC esteve presente em 54% da amostra, seguido do VHB (16%) e ingestão de álcool (14%). Nas regiões Sudeste e Sul, o VHC permanece como a principal causa de doença hepática, estando presente em cerca de 55% dos casos²⁵.

Outro importante fator contribuinte é a ingestão excessiva de bebidas alcoólicas por provocar o acúmulo de gordura hepática, necro-inflamação, fibrose, cirrose e desnutrição²⁷. O consumo de álcool em associação com a infecção pelo VHC atua de forma sinérgica, elevando a incidência de CHC entre 1,7 e 2,9 vezes quando comparado a ação sozinha do VHC²⁸.

Podem contribuir ainda a contaminação de alimentos com aflatoxinas²⁹, diabetes³⁰, obesidade³¹ e condições de ordem genética como a hemocromatose³². A esteato-hepatite não-alcoólica e a cirrose criptogênica também podem influenciar no desenvolvimento do CHC³³.

2.1.5 Tratamento

A tomada de decisões terapêuticas no tratamento do CHC é complexa, visto que necessita de uma avaliação criteriosa levando em consideração as características do tumor, a extensão da doença, as comorbidades do paciente e a disfunção hepática (com grande potencial exacerbação durante o tratamento)³⁴.

Os principais tratamentos utilizados no CHC com propósito curativo incluem: ressecção cirúrgica, ablação por radiofrequência/microondas, quimioembolização transarterial, transplante hepático e, com menor frequência, a administração de quimioterapia sistêmica³⁵.

2.1.6 Transplante Hepático

Entre as principais medidas terapêuticas aplicadas ao tratamento do CHC, a realização do transplante hepático destaca-se pela elevada capacidade de remissão da doença, possibilitando que em um único procedimento cirúrgico seja removida tanto a massa tumoral quanto tecidos adjacentes comprometidos³⁶. A efetividade da utilização do procedimento de transplante de fígado como medida terapêutica no tratamento do CHC em estágio inicial é comumente reconhecida. Seu êxito provém de numerosas modificações feitas desde a realização do transplante pioneiro no ano de 1963 até o atual momento³⁷. A taxa de sobrevida é de 75% após 4 anos de realização do transplante hepático, se respeitados os critérios de Milão³⁶.

Os critérios de Milão, utilizados desde 1996, determinam que o transplante hepático seja recomendado conforme o número e tamanho dos tumores. Se aplicados, apresentam associação com a diminuição da recidiva e sobrevida praticamente idêntica à de pacientes cirróticos sem CHC³⁸.

Durante o processo de avaliação da elegibilidade de pacientes candidatos aos transplante hepático considera-se como forma de classificação da gravidade da doença a utilização de instrumentos como A Classificação de Child-Turcotte-Pugh (CTP) (Tabela 1) e o *Model for End-stage Liver Disease* (MELD) (Tabela 2)^{39,40}. Ambos consistem em indicadores usados na alocação de candidatos ao transplante na fila de espera pelo órgão doado. São úteis na avaliação do prognóstico, sobrevida e óbito pós-transplante além de incluírem parâmetros relacionados à questão de qualidade de vida³⁹. Para ambos os indicadores, valores elevados representam maior gravidade da doença^{39,40}.

Todavia, apesar da criteriosa escolha dos pacientes para a realização do transplante hepático, estima-se que em 10-20% dos indivíduos pós-transplantados ocorra nova manifestação do CHC. A recidiva tumoral nesta fase consiste no fator de maior impacto sobre a sobrevida do paciente à longo prazo⁴¹⁻⁴³.

Tabela 1. Critérios para Classificação de Child-Turcotte-Pugh e influência sobre a sobrevida

	1 ponto	2 pontos	3 pontos
Bilirrubina sérica (mg/dl)	<2,0	2,0-3,0	> 3,0
Encefalopatia	Nenhum	Mínimo	Coma avançado
Ascite	Nenhuma	Facilmente controlada	Mal controlada
Tempo de Protrombina ou RNI*	0-4 <1,7	4-6 1,7 – 2,3	>6 >2,3
Albumina sérica (g/dl)	> 3,5	3,0-3,5	< 3,0
	Classe A	Classe B	Classe C
Total de Pontos	5-6	7-9	10-15
Sobrevida em 1 ano	100%	81%	45%
Sobrevida em 2 anos	85%	57%	35%

*RNI=Razão Normalizada Internacional. Fonte: Adaptada de Chedid *et al.*,2017.⁴⁴

Tabela 2. Classificação conforme *Model for End-stage Liver Disease (MELD)**

Total de pontos	Classificação mortalidade
40 ou mais	100% de mortalidade
30-39	83% de mortalidade
20-29	76% de mortalidade
10-19	27% de mortalidade
<10	4% de mortalidade

* Fórmula: MELD= 9.57 log(creatina) + 3.78 log(bilirrubina total) + 11.2 log(RNI) + 6.43. Adaptada de Singal; Kamath, 2013.⁴⁵

2.2 ASPECTOS FISIOPATOLÓGICOS E HISTOPATOLÓGICOS

2.2.1 Fisiopatogenia

O CHC costuma desenvolver-se mediante agravamento da cirrose hepática a partir de nódulos regenerativos submetidos a degeneração maligna¹⁷. O fígado em resposta a constantes agressões começa a desenvolver focos displásicos de pequenas e grandes células, sendo estes nódulos considerados as alterações precursoras na carcinogênese do CHC (Figura 2)⁴⁶.

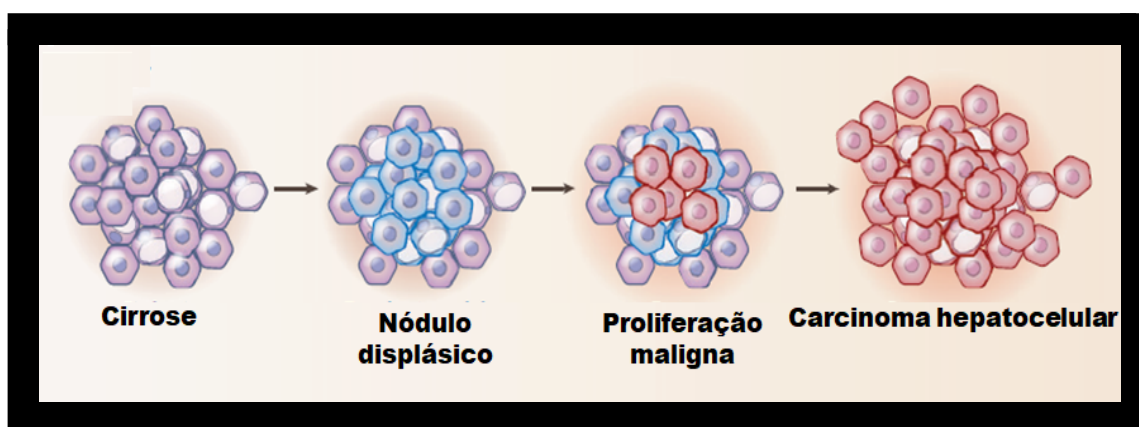


Figura 2. Fisiopatogenia do CHC. Modificações na proliferação celular no desenvolvimento do CHC. Adaptado de Villanueva, 2019.⁴⁷

Alterações moleculares adicionais conferem às células displásicas vantagens na proliferação, invasão e sobrevivência celular, e terminam por completar a transição dos focos displásicos em massas tumorais de CHC⁴⁸. O risco de transformação maligna de nódulos displásicos de baixo e alto grau é de 9% e 32%, respectivamente, elevando-se conforme a passagem do tempo^{49,50}.

As células do CHC apresentam alterações somáticas no DNA, incluindo mutações e aberrações cromossômicas⁵¹. Os tipos mais frequentes de alterações moleculares presentes no CHC incluem:

- Perda da expressão da TP53: alterações em TP53 ocorrem em 30-60% dos casos de CHC, independentemente da etiologia envolvida. A proteína viral NS5A presente no VHC é conhecida por interagir e suprimir a TP53, causando desta forma a desregulação do ciclo celular e da apoptose e respostas celulares a estresses hipóxico, genotípico e relacionados à angiogênese tumoral⁵³⁻⁵⁵.

- Reativação da telomerase: por impedir o encurtamento dos telômeros, confere condição de imortalidade celular ao CHC⁵⁶. Mutações no promotor da transcriptase reversa da telomerase (TERT) encontram-se entre as alterações genéticas de maior frequência no CHC, presentes em cerca de 60% dos casos. Elas já são evidenciadas ainda na fase de nódulos displásicos, sendo o promotor TERT um local comumente utilizado para a inserção do genoma do VHB⁵¹.

- Alterações nos padrões de metilação: metilação aberrante em regiões regulatórias promovem o silenciamento epigenético da expressão gênica^{55,57}. A hipermetilação ocorre principalmente em genes supressores de tumores, como com o inibidor de quinase dependente de ciclina 2A (CDKN2A), E-caderina, BRCA1, fator de crescimento 2 de manose 6-fosfato semelhante à insulina (IGFR-II/MP6) e ciclooxigenase-2 (COX-2), resultando na redução da expressão com influências diretas sobre a carcinogênese e evolução tumoral⁵⁵.

2.2.2 Histopatologia do CHC

Apesar da heterogeneidade microscópica, o CHC caracteriza-se pela formação de trabéculas delimitadas através de espaços semelhantes a sinusóides. Conforme a organização mundial da saúde (OMS)⁵⁸, são considerados três padrões histológicos (trabecular, pseudoglandular e cirroso), com predominância dos casos

de padrão trabecular⁵⁶.

As características histológicas diferem conforme a graduação do CHC. O grau 1 apresenta tumor bem diferenciado, com delicada trabeculação, ocorre aumento da concentração de núcleos por área e uma maior relação núcleo-citoplasma, áreas de depósito de gordura e invasão dos espaços portais e parênquima adjacente. No grau 2 a estrutura trabecular é mantida, contendo principalmente estruturas acinares ou glandulares, com os núcleos já apresentando maior grau de atipia. Já no grau 3 ocorre potencialização da atipia nuclear, múltiplos nucléolos, áreas de arranjo trabecular e células gigantes. Por fim, no grau 4 assume um padrão sólido ou medular de crescimento, possuindo células não coesas e com formas e tamanhos bastante anormais⁵⁶.

2.2.3 Alterações nucleares

A desestruturação do arranjo espacial e de outros componentes nucleares são os principais desencadeadores das modificações na arquitetura nuclear de células neoplásicas, que as diferenciam de uma célula normal⁵⁹. Mudanças no tamanho e forma nucleares foram associadas ao câncer, enquanto núcleos aumentados apresentaram maior poder metastático⁵⁹⁻⁶². O desenvolvimento neoplásico, induz a alterações do DNA e na composição e distribuição de proteínas celulares histonas e não-histonas, acarretando alterações na distribuição da heterocromatina no núcleo⁶³⁻⁶⁵.

Estruturalmente os núcleos se tornam irregulares, devido às alterações na camada proteica que delimita a forma nuclear (lâmina nuclear). Em sua superfície interna, a lâmina se liga à cromatina e na maioria dos tipos de células a lâmina está

associada à heterocromatina. Modificações nessa organização laminar também provocam o aumento da compactação nuclear, e a formação de agregados de heterocromatina grosseiros que passam a ser frequentemente observados⁵⁹.

Há o aparecimento do compartimento perinucleolar - um marcador de organização do genoma associado à metástase - e as proteínas localizadas na matriz nuclear (PMNs) são afetadas. A ausência das PMNs prejudica a formação de estruturas de sustentação da organização espacial de cromatina e o posicionamento de moléculas nucleares. Salienta-se que nem todas essas alterações são observadas simultaneamente em núcleos de células tumorais reais, diferentes anormalidades estão associadas a diferentes tipos de câncer. (Figura 3)⁵⁹.

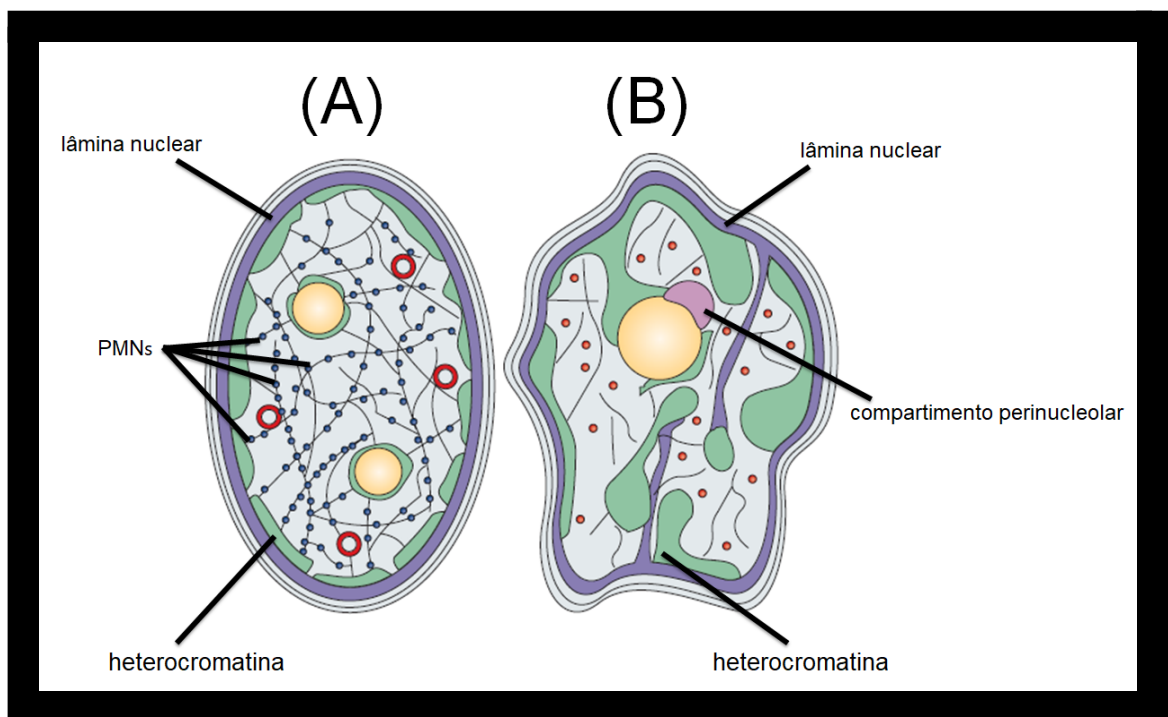


Figura 3. Estrutura nuclear em células normais e cancerosas. (A) Núcleo normal apresentando estrutura laminar regular, com organização da cromatina e presença de PMNs. (B) Núcleo tumoral com irregularidades na disposição da lâmina nuclear, desorganização da cromatina e ausência de PMNs. Compartilhamento perinuclear presente. (PMNs - proteínas de matriz nuclear). Adaptado de Zink *et al.*, 2004.⁵⁹

2.3 MORFOMETRIA NUCLEAR

2.3.1 Definição

A morfometria conceitua-se como um método capaz de descrever dados de natureza quantitativa relacionados a área e formato de um determinado objeto, tanto em níveis microscópicos quanto macroscópicos⁹. Quando aplicada na análise de imagens histológicas, possibilita a obtenção de dados quantitativos de características das células, especialmente na região nuclear. Esses dados podem ser úteis para a distinção entre células normais de células com alterações patológicas, como as presentes em lesões malignas^{66,67}.

A investigação de modificações morfométricas nucleares já foi realizada em diversos estudos em diferentes tipos de neoplasias, incluindo o CHC^{7,68,69}, melanomas⁷⁰, mama⁷¹, carcinomas de células escamosas do pulmão⁷² e carcinoma basocelular⁷³. Nestes estudos são constatadas diferenças significativas entre diferentes medidas morfométricas de núcleos de tecidos normais e as do tecido tumoral.

Nos últimos anos, a morfometria nuclear tem sofrido grandes avanços tecnológicos, aumentando o grau de precisão e eficácia. Desta forma, busca-se cada vez mais tornar a morfometria nuclear uma ferramenta útil que possa auxiliar o patologista no estabelecimento de diagnósticos e prognósticos de maneira menos baseada na subjetividade⁷. Recursos de análise de imagens (como o software ImageJ) têm sido aperfeiçoados constantemente com ajustes destinados a possibilitar uma melhor análise de estruturas biológicas, sendo bastante útil no processo de desenvolvimento da morfometria⁷⁴.

Contudo, apesar de mostrar-se como um recurso tecnológico útil e que demanda baixos custos no contexto da patologia digital, sua utilização mantém-se

ainda bastante limitada a poucos ambientes, ficando restrita a atividades envolvendo a pesquisa científica⁷⁵.



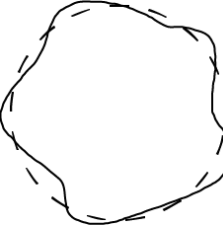
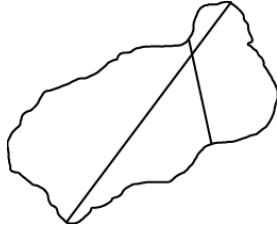
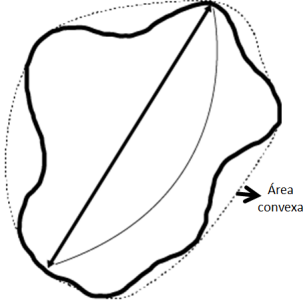
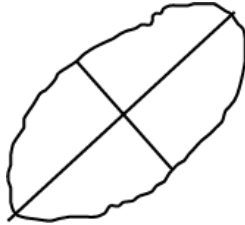
2.3.2 Medidas morfométricas de forma e tamanho nuclear

A análise morfométrica possibilita a mensuração de diferentes parâmetros nucleares com particularidades distintas (Quadro 1). Através destes parâmetros, tornam-se possíveis a descrição e quantificação de características relacionadas à forma e tamanho nucleares, ambos considerados importantes componentes no diagnóstico patológico⁷⁶. Alterações nucleares envolvendo modificações de seu formato e/ou tamanho são usadas na distinção entre as células normais e as afetadas por determinada doença, principalmente nos casos de neoplasias⁷⁷.

Área, perímetro e circularidade são os parâmetros de maior utilização em estudos morfométricos, cujos resultados apontam a clara relação entre eles e as modificações internas e externas do núcleo⁷⁸. Alterações nos valores mensurados destes parâmetros em diferentes estudos estiveram associados a diferenciação de células tumorais e células normais⁷⁹⁻⁸², classificação histológica^{79,83-85,69} e em relação com prognóstico⁸⁶⁻⁸⁸.

A aplicação da análise morfométrica com uso do diâmetro de Feret, solidez e razão de aspecto (Ra) também foram incorporadas gradualmente nos estudos. Estas medidas buscam estabelecer e quantificar relações angulares e lineares, refletindo valores referentes a irregularidades na forma e tamanho do núcleo (L) (A64). Foi demonstrado que alterações na medida destes parâmetros também estão associadas à diferenciação celular de massas tumorais⁸⁹⁻⁹³, à classificação histológica⁹⁴ e a definição de prognóstico⁹⁵.

Quadro 1. Principais parâmetros morfométricos.

Parâmetro	Definição	Função	Ilustração
Área	área dentro do limite selecionado	Indica tamanho da partícula	
Perímetro	comprimento do exterior da área selecionada	Indica tamanho da partícula	
Circularidade 4π (área/perímetro ²)	relação entre área e perímetro	Indica o quanto a área projetada da partícula é similar ao círculo	
Diâmetro de Feret	distância entre duas linhas paralelas tangentes ao perímetro da partícula	Indica tamanho em partículas irregulares	
Solidez Área/Área convexa	relação entre a área projetada pelo envoltório convexo da área	Indica quão compacta é a imagem da partícula	
Razão de aspecto eixo menor/eixo maior	razão entre o eixo maior e o eixo menor	Indica quão alongada é a partícula	

Adaptada e modificada de (A1) Razavi *et al.*, 2020⁸⁹.

2.3.3 Média de escala de cinza (MEC)

Pixel é a denominação atribuída à menor área retangular de um elemento da imagem (Figura 4). Cada pixel é constituído por diversas cores e, através da combinação dessas cores, é possível representar qualquer cor. Os recursos de análise de imagem realizam a seleção automática da tonalidade do *pixel* de maior predominância no núcleo e pixels de tons semelhantes, realizando a distinção e a quantificação desses tons⁷⁵. Na análise digital costuma-se converter imagens histológicas coloridas em escala de cinza⁷³.

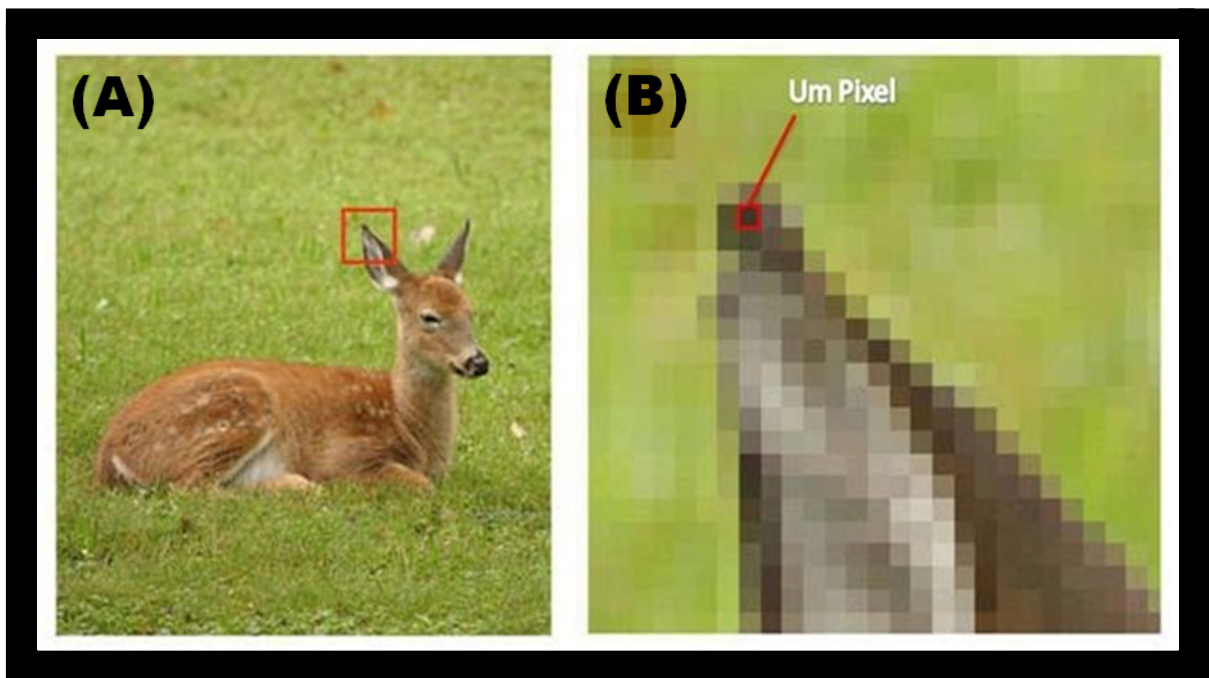


Figura 4. Representação da visualização de um *pixel*. (A) Cena completa. (B) pequeno recorte da imagem ampliado diversas vezes. Estes “quadrinhos” que formam a imagem são os pixels, impossíveis de serem visualizados individualmente a olho nu quando estes se encontram em tamanho natural. Adaptado de Mendaçolli *et al.*,2015⁷³. Fonte da imagem: banco de imagens internet.

A média de escala de cinza (MEC) corresponde ao valor médio da intensidade da coloração de cinza localizada no interior da região selecionada de

interesse. O valor é gerado através da soma dos valores de cinza obtidos dos pixels selecionados divididos pela quantidade total de pixels⁹⁶. O intervalo de valores de cinza entre o valor mínimo e máximo é classificado em conformidade com no intervalo de 0 a 256 tons de cinza (Figura 5)⁹⁶.

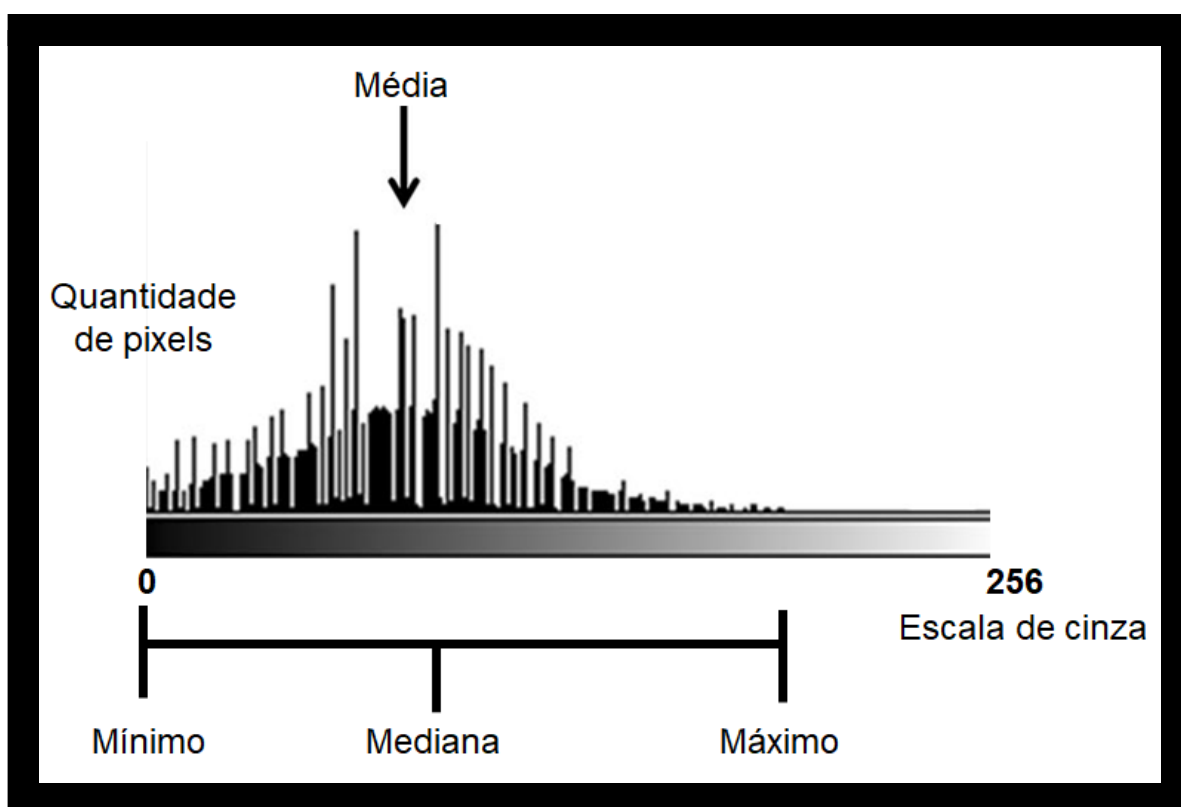


Figura 5. Medidas de dispersão na mensuração da MEC (média de escala de cinza). Adaptado de Matsumoto et al, 2015⁹⁶.

2.2.4 Textura da cromatina

2.2.4.1 Fractalidade

Fractais consistem em estruturas auto-semelhantes, ou seja, que apresentam características semelhantes em diferentes ampliações⁹⁷. Estruturas biológicas são geralmente compostas com base em formatos semelhantes,

entretanto, na maioria das vezes, existe influência de efeitos adicionais, ou seja, a estrutura constituída de partes menores é semelhante, mas não idêntica a toda a estrutura⁹⁸. Na Figura 6 é visto um exemplo de um objeto natural que possui um padrão composto de ramificações em escalas diferentes, todavia, conforme a imagem é aproximada mantém-se em padrões semelhantes, mas não totalmente iguais⁹⁸.

O princípio da organização fractal em diferentes níveis de arquitetura nuclear exerce influência regulatória sobre os genes e na interação dos genes e seus fatores de transcrição⁹⁹.



Figura 6. Princípio da fractalidade. Uma cabeça de brócolis como exemplo de um objeto natural com características fractais em relação ao padrão de ramificação e ao relevo da superfície, que repetem seu padrão em diferentes escalas, mas com algumas imperfeições que são devido a influências adicionais que modificam a imagem ideal durante o crescimento. Ambas imagens em ampliação maior ilustram o limite da janela de escala, ou seja, o final do padrão de ramificação típico. Fonte: Metze *et al.*, 2019⁹⁸.

2.2.4.2 Textura da cromatina e dimensão fractal

Conceitua-se textura como a descrição da aparência genérica de parte de uma determinada imagem, sendo comumente categorizada como aparência macia, arenosa, regular, grosseira, granular, etc¹⁰⁰. No contexto celular, a textura da cromatina nuclear está diretamente associada com a ocorrência de fenômenos epigenéticos, tais como a metilação ou modificação das proteínas histonas e não histonas, que modificam expressivamente a arquitetura nuclear típica de cada tipo de tecido^{101,102}

A análise da textura da cromatina através da avaliação da dimensão fractal (DF) possibilita quantificação de características nucleares que não obedecem às regras da geometria Euclidiana, em que o valor da dimensão representa a dimensionalidade do espaço em que determinado está inserido¹⁰³. A DF representa o nível de irregularidade existente em um fractal, ou seja, a proporção da quantidade de pixels presentes dentro de uma estrutura de formato irregular que repete-se inúmeras vezes na região nuclear¹⁰³.

Para o cálculo da DF, o Box-counting é um dos mais utilizados. O algoritmo para este cálculo leva em consideração uma figura qualquer coberta por um conjunto de quadrados, e calcula o número de quadrados necessários para cobrir toda a figura que é representado por $N(s)$, sendo “s” a escala, ou seja, número de vezes que o lado da imagem será dividido¹⁰⁴.

A utilização da DF como uma forma de estimar a textura da cromatina foi primeiramente sugerida por Takahashi¹⁰⁵ em 1989, predizendo que uma teoria baseada na fractalidade teria futura aplicabilidade em estudos de células neoplásicas⁹⁸. A abordagem da DF hoje possui constante presença em pesquisas, especialmente naquelas envolvendo diferentes tipos de câncer, incluindo CHC¹⁰⁶,

melanoma⁶ e câncer oral¹⁰⁷, nos quais medidas maiores de DF foram encontradas em células com transformação maligna.

Atualmente a DF tem sido abordada com recursos de análise de imagens que, além de quantificá-la, também possibilitam a reconstituição da textura da cromatina em níveis mais avançados, em formato 2,5 e 3D, facilitando uma melhor noção sobre suas características (Figura 7)⁹⁸.

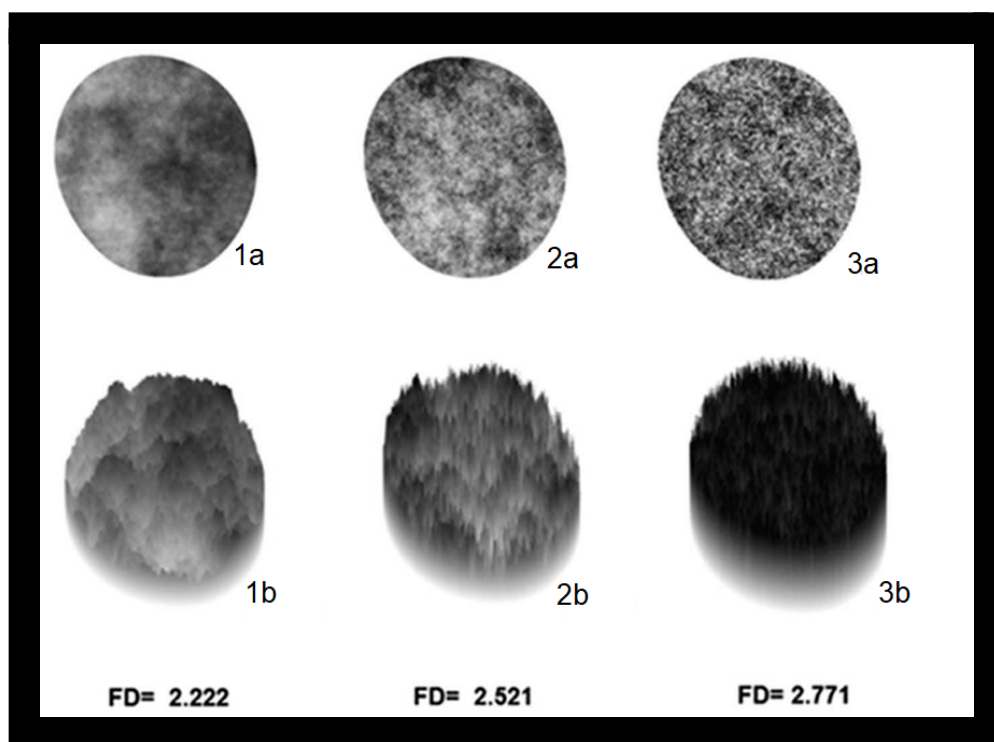


Figura 7. Textura de cromatina e dimensão fractal. Núcleos criados virtualmente representando 3 diferentes valores obtidos na análise da dimensão fractal (1a,2a,3a) e a sua respectiva reconstituição em modelos 2,5D da textura de cromatina (1b,2b,3b). Adaptado de Metze *et al.*,2019⁹⁸.

2.4 TISSUE MICROARRAY

O *tissue microarray* (TMA) consiste numa técnica desenvolvida por Kononen *et al.* (1998)¹⁰⁸, com vasta aceitação presente na literatura científica internacional. Baseia-se fundamentalmente no agrupamento de uma maior quantidade de

amostras de tecido em um único bloco de parafina, possibilitando a realização da análise de marcadores moleculares em grandes proporções¹⁰⁹.

A utilização do TMA apresenta determinadas vantagens como economia de tempo e custos na aquisição de reagentes, tecidos histológicos e imunoglobulinas, além da padronização das reações e melhor compreensão dos resultados obtidos na comparação de casos do mesmo experimento, com a oportunidade de reprodução homóloga das reações e facilitação na realização de pesquisas proveniente do uso do bloco numa maior quantidade de estudos^{109,110}. O TMA apresenta algumas desvantagens, que incluem a possível limitação da representatividade histológica (amostras diminutas) bem como perdas teciduais durante o transcorrer da execução da técnica¹¹¹.

O TMA tem sido incorporado à análise de imagem. Bose *et al.* ao utilizarem o TMA na metodologia de seu estudo de análise de DF nuclear através de imagens de imunohistoquímica de fluorescência e análise quantitativa automatizada, obtiveram maior praticidade na realização das reações e otimização do tempo de captura das imagens (Figura 8)¹⁰⁷.

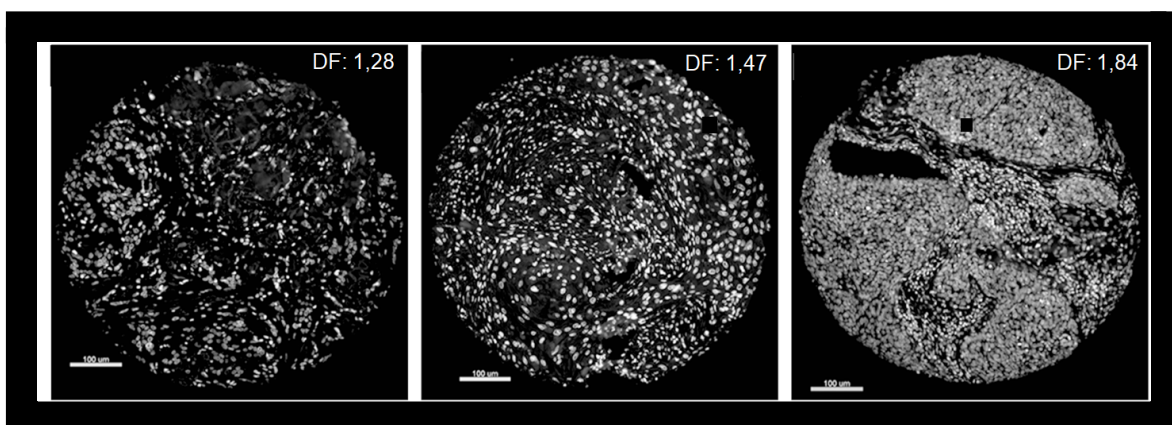


Figura 8. Uso do tissue *microarray* para análise de dimensão fractal (DF). Adaptado de Bose *et al.*, 2015¹⁰⁷.

3. JUSTIFICATIVA

A importância do presente estudo baseia-se em fomentar a literatura com achados sobre a aplicação da análise morfométrica e da textura de cromatina no CHC e, principalmente, estabelecer relações entre estas alterações nucleares com as características clínico-patológicas de pacientes transplantados, visando a validação e futuro emprego destas técnicas na prática clínica.

A escolha do transplante hepático como medida terapêutica no tratamento do CHC já é consolidada na literatura científica, constituindo-se num método já utilizado em cerca de 27% dos casos de CHC devido à alta taxa de remissão da doença³⁶. Entretanto, ainda há uma falta de instrumentos que possam predizer condições prognósticas do paciente no pós-transplante, a associação de características clínico-patológicas e os achados obtidos através da análise morfométrica e da textura de cromatina pode refletir numa maior capacidade de estabelecimento dessas predições e contribuir para um melhor acompanhamento deste grupo de pacientes.

4. QUESTÕES DE PESQUISA

- Existem diferenças nas medidas morfométricas e de textura de cromatina entre amostras de carcinoma hepatocelular quando comparadas ao tecido adjacente não-neoplásico?
- Existe associação dessas diferenças com variáveis clínico-patológicas?

5. HIPÓTESES

- Há diferenças entre as amostras de carcinoma hepatocelular e as de tecido adjacente não-neoplásico quanto às medidas morfométricas e textura de cromatina.
- Há associação entre as medidas morfométricas e textura de cromatina com variáveis clínico-patológicas.

6. OBJETIVOS

6.1 OBJETIVO GERAL

- Identificar alterações na morfologia nuclear e na textura de cromatina em amostras de carcinoma hepatocelular de pacientes submetidos ao transplante hepático, bem como estabelecer relações destas com variáveis de importância clínica.

6.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar a construção de blocos de *tissue microarray* (TMA) para reunir as amostras a serem avaliadas no estudo;
- Quantificar e comparar as alterações nos parâmetros morfométricos no tecido tumoral e tecido adjacente não-neoplásico;
- Relacionar as alterações nos parâmetros morfométricos às principais variáveis clínicas-patológicas dos pacientes transplantados (sexo, idade, número e tamanho dos tumores, grau nuclear, invasão vascular, óbito);
- Associar alterações nos parâmetros morfométricos à variáveis prognósticas (MELD, Child-Pugh, recorrência e sobrevida);
- Avaliar a sensibilidade e especificidade do método de avaliação digital através do software ImageJ na distinção entre núcleos de tecido tumoral e os de tecido adjacente não-neoplásico.

Digestive and Liver Disease

Nuclear morphometry and chromatin texture characteristics of hepatocellular carcinoma samples of liver transplant patients

--Manuscript Draft--

Manuscript Number:	
Article Type:	Original Article
Section/Category:	Regular Articles
Keywords:	Hepatocellular carcinoma; morphometry; chromatin texture; liver transplant
Corresponding Author:	Jordan Boeira dos Santos Universidade Federal do Rio Grande do Sul Porto Alegre, RS BRAZIL
First Author:	Jordan Boeira dos Santos
Order of Authors:	Jordan Boeira dos Santos Jordan Boeira dos Santos Rodrigo Tzovenos Starosta Emily Ferreira Salles Pilar Jefferson Daniel Kunz Joelson Tomedi Carlos Thadeu Schmidt Cerski Rúbia Denise Ruppenthal
Abstract:	<p>Background</p> <p>Nuclear changes are typical in the carcinogenesis of hepatocellular carcinoma (HCC). Morphometry and chromatin texture analysis are quantitative methods for their quantification.</p> <p>Aims</p> <p>Identify differences in nuclear morphometry and in chromatin texture in HCC samples from liver transplant patients and associate them with clinicopathologic variables.</p> <p>Methods</p> <p>HCC and adjacent tissue samples were included from 34 individuals. Samples were collected into tissue microarray blocks; slides were stained with hematoxylin-eosin. Microscopic images were analyzed in ImageJ.</p> <p>Results</p> <p>Of the 34 cases, 55.9% were men and 67.6% had a history of hepatitis C. The samples of HCC and adjacent tissue differed regarding perimeter ($p = 0.025$), circularity ($p = <0.001$), solidity ($p = <0.001$), aspect ratio ($p = <0.001$), and fractal dimension ($p = 0.001$). Higher mean gray value ($p = 0.034$) and Feret diameter ($p = 0.024$) were associated with higher scores in the Model for End-Stage Liver Disease. Nuclei with a larger area ($p = 0.014$) and Feret diameter ($p = 0.035$) were associated with lower survival.</p> <p>Conclusion</p> <p>Nuclear morphometric and textural changes were observed between the samples of HCC and adjacent tissue of liver transplant patients. These changes were associated with clinically relevant variables.</p>

Suggested Reviewers:	Eduardo Cremonese Filippi-Chiela eduardochiela@gmail.com
	Valesca Dall'Alba valba@hcpa.edu.br
	Fernanda Visioli fernanda.visioli@ufrgs.br
Opposed Reviewers:	

Cover Letter

Our study used the technologies of digital cellular analysis available today and by using ImageJ it was possible to quantify the morphometric and fractal dimension (FD) parameters. This study reached results with a significant difference between morphometry and FD levels of the nuclear chromatin texture between HCC and adjacent tissue samples.

The study was also able to point out certain parameters that were related to clinical-pathological variables of the HCC. Our main results refer to MELD scores and survival at 5 years after liver transplantation, suggesting that our method may be useful in assessing the prognosis of patients. Lower nuclear measurements of some parameters (Feret diameter and ncMGV) were associated with higher MELD scores, while larger areas and Feret diameter were linked to lower survival.

We were the first cohort of cases in which it was possible to quantify nuclear alterations in order to differentiate normal hepatocyte nuclei from HCC nuclei, applying the morphometry in slides stained with hematoxylin-eosin, establishing more objective criteria of cell differentiation. Values defined by the ROC curve related to FD are results not used in other studies, which is the novelty in this study.

Furthermore, another differential of the study was regarding the inclusion of tissue samples from liver transplant patients due to HCC. This is a group of individuals who still need better prediction measures for events and/or post-transplant conditions that are related to cellular characteristics involved with malignant transformation.

The manuscript has not been published previously and is not under consideration for publication elsewhere. In case of acceptance of the manuscript, the copyright is transferred to Digestive and Liver Disease. The manuscript is approved by all authors.

Conflicts of interest

All authors declare no competing interests regarding this manuscript.

Jordan Boeira dos Santos,

Rodrigo Tzovenos Starosta,

Emily Ferreira Salles Pilar,

Jefferson Daniel Kunz,

Joelson Tomedi,

Carlos Thadeu Schmidt Cerski,

Rúbia Denise Ruppenthal

1 Nuclear morphometry and chromatin texture characteristics of hepatocellular carcinoma
2
3 samples of liver transplant patients
4
5
6
7
8
9

10 Jordan Boeira dos Santos^a, Rodrigo Tzovenos Starosta^b, Emily Ferreira Salles Pilar^c,
11
12 Jefferson Daniel Kunz^c, Joelson Tomedi^d, Carlos Thadeu Schmidt Cerski^{a,d}, Rúbia Denise
13
14 Ruppenthal^{a,d}
15
16
17

18 ^a Graduate Program in Science in Gastroenterology and Hepatology, Universidade Federal do
19
20 Rio Grande do Sul. 2400 Ramiro Barcelos St, Porto Alegre, RS. 90035-903, Brazil.
21
22
23

24 ^b Department of Pediatrics, Washington University, Saint Louis Children's Hospital, 1
25
26 Children's Place, Saint Louis, MO, USA, 63108.
27
28

29 ^c Laboratorial Research Unit, Experimental Research Center, Hospital de Clínicas de Porto
30
31 Alegre. 2350 Ramiro Barcelos St, Porto Alegre, RS. 90035-903, Brazil.
32
33
34

35 ^d Department of Surgical Pathology, Hospital de Clínicas de Porto Alegre. 2350 Ramiro
36
37 Barcelos St, Porto Alegre, RS. 90035-903, Brazil.
38
39
40

41 Electronic word count: 2420 words.
42
43

44 Corresponding author at: Jordan Boeira dos Santos.
45
46

47 +55 51 9995-8782. E-mail: boeira.jordan@gmail.com
48
49
50

51 Present address: 887 Miguel Tostes St, Porto Alegre, RS. 90430-061, Brazil.
52
53

54 Funding for this study was provided by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de
55
56 Nível Superior (CAPES) and by the Fundo de Apoio a Pesquisa e Eventos do Hospital de
57
58 Clínicas de Porto Alegre (FIPE-HCPA).
59
60
61
62
63
64
65

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

ABSTRACT

Background: Nuclear changes are typical in the carcinogenesis of hepatocellular carcinoma (HCC). Morphometry and chromatin texture analysis are quantitative methods for their quantification. **Aims:** Identify differences in nuclear morphometry and in chromatin texture in HCC samples from liver transplant patients and associate them with clinicopathologic variables. **Methods:** HCC and adjacent tissue samples were included from 34 individuals. Samples were collected into tissue microarray blocks; slides were stained with hematoxylin-eosin. Microscopic images were analyzed in ImageJ. **Results:** Of the 34 cases, 55.9% were men and 67.6% had a history of hepatitis C. The samples of HCC and adjacent tissue differed regarding perimeter ($p=0.025$), circularity ($p<0.001$), solidity ($p<0.001$), aspect ratio ($p<0.001$), and fractal dimension ($p=0.001$). Higher mean gray value ($p=0.034$) and Feret diameter ($p=0.024$) were associated with higher scores in the Model for End-Stage Liver Disease. Nuclei with a larger area ($p=0.014$) and Feret diameter ($p=0.035$) were associated with lower survival. **Conclusion:** Nuclear morphometric and textural changes were observed between the samples of HCC and adjacent tissue of liver transplant patients. These changes were associated with clinically relevant variables.

Keywords: Hepatocellular carcinoma; morphometry; chromatin texture; liver transplant.

1 1. Introduction
2
3

4 Liver cancer is the third leading cause of death by cancer in the world with
5 hepatocellular carcinoma (HCC) being the most common histological type corresponding to
6 75-85% of the cases [1]. Among the therapeutic options for HCC, liver transplantation stands
7 out for its high capacity of inducing remission, leading to a survival rate of 75% after 4 years
8 of surgery [2]. In most cases, HCC develops in a background of liver cirrhosis and stems from
9 hepatic regenerative nodules that undergo malignant degeneration [3-5].
10
11
12
13
14
15
16
17
18

19 The process of hepatocarcinogenesis is complex and involves genetic and epigenetic
20 aspects that trigger malignant changes affecting hepatocytes [6-8]. The change in the
21 distribution of the chromatin, considered to be the first observed at a microscopic level in the
22 malignant transformation process [9], is characterized by alterations in the DNA and structure
23 and distribution of histonic and non-histonic nuclear proteins that modify the disposition of
24 the heterochromatin in the nucleus [10-12]. These alterations may exert influences on
25 chromatin folding, on genome duplication, and on temporal gene expression [13]. Changes in
26 the chromatin texture are frequent in tumor cells and may be associated with disease
27 progression [14].
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41

42 The restructuring of the spatial arrangement and other nuclear components are the
43 main triggers for the modifications in the nuclear architecture of neoplastic cells that
44 differentiate them from a normal cell [15]. The investigation of these nuclear modifications
45 has already been initiated in different types of neoplasms, including HCC [16-18], melanomas
46 [19], lung squamous cell carcinomas [20], and basal cell carcinoma [21], all of which
47 compare neoplastic and healthy nuclei.
48
49
50
51
52
53
54
55
56

57 Morphometry is a method capable of describing data of a quantitative nature related
58 to the area and format of a given object both at microscopic and macroscopic levels [22]. The
59
60
61
62
63
64
65

1 incorporation of technological resources into nuclear morphometric analysis can assist the
2
3 pathologist in discriminating and quantifying subtle characteristics that may not be noticed by
4
5 a subjective analysis [23].
6
7

8
9 The objective of this study was to identify differences in nuclear morphometry and
10
11 chromatin texture in HCC samples from liver transplant patients and to assess potential
12
13 associations of these differences with clinicopathologic variables.
14
15
16
17
18
19

20 21 Methods

22 23 24 Samples

25
26
27 The tissue samples used in the study were from 34 individuals diagnosed with HCC
28
29 submitted to liver transplantation from 2002 to 2014 and stored in the Department of Surgical
30
31 Pathology at the Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA). Clinical-pathological data
32
33 (gender, age, number and size of tumors, nuclear grade, Model for End-Stage Liver Disease
34
35 (MELD), Child-Pugh, recurrence, vascular invasion, death, and 5-year survival) recorded in
36
37 electronic records were used to select the cases followed by separating the paraffin blocks and
38
39 archived slides. This material was analyzed by a pathologist specialized in hepatopathology
40
41 (CTSC) to confirm the diagnosis of HCC and to indicate the exact location of the tumor in the
42
43 sample investigated. A sample of HCC and an adjacent normal tissue was obtained from each
44
45 case, resulting in a total of 68 tissue samples included in the study. Samples were excluded
46
47 from the study if using them could cause depletion of the material stored as well as cases with
48
49 incomplete records data. This study was approved by the HCPA Research Ethics Committee
50
51 under number #18-0551. Research consent was waived by the HCPA Research Ethics
52
53 Committee because of the retrospective nature of the analyses.
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Processing of histological material

Sample areas representing HCC or adjacent normal tissue were used from each individual for preparing tissue microarrays (TMAs) using the T-Sue system (Simport® Scientific, Beloeil, Canada). Two 2.0 mm cylinders were punctured from each original block and transferred to the receptor TMA blocks according to the technique described by Kononen et al. [24]. This resulted in 6 TMAs, 3 of them containing 34 samples of tumor tissue in duplicate and 3 with 34 samples of adjacent normal tissue in duplicate. The TMAs prepared were submitted to microtomy, obtaining 2 sections from each block, which were arranged on histological slides and stained with hematoxylin-eosin.

Imaging

The slides stained in hematoxylin-eosin and mounted were photographed using an optical microscope (OLYMPUS BX51, Ontario, Canada) with an attached camera (OLYMPUS Q-color 5 RTV, Ontario, Canada) using Q-capture Pro 7 software (<https://www.photometrics.com/support/download/qcapture-pro-7>) at a magnification of 1000x. Two pictures were taken with a minimum of 20 visually localized tumor or hepatocellular nuclei from each core present in the TMAs and saved in an image file format (.tiff) to allow better resolution. Next, the image with the highest definition and clarity of each core was selected for being submitted to a digital analysis.

Morphometry

All hepatocellular or tumoral nuclei present in the hematoxylin-eosin images were selected for morphometric analysis by a manual selection method by two researchers (JBS

1 and RTS). A total of 1,548 nuclei were selected from the tumor tissue and 988 nuclei from
2
3 the adjacent parenchyma. Agglomerated or overlapping nuclei were excluded. After selecting
4
5 the nuclei, the images were converted from a native RGB format to an 8-bit in the ImageJ
6
7 version 1.53c (<https://imagej.nih.gov/ij/download.html>) [25] (Figure 1).
8
9

10
11 The following nuclear parameters were analyzed in ImageJ: area (in μm^2), perimeter
12
13 (in μm), circularity, Feret diameter (in μm), mean gray value (MGV), solidity, aspect ratio
14
15 (AR), and fractal dimension (FD) of the nuclear chromatin, the latter obtained through the
16
17 plugin FracLac (<https://imagej.nih.gov/ij/plugins/fraclac/fraclac.html>). Grayscale fractal
18
19 dimension was calculated through volumetric box-counting using gray value as third
20
21 dimension (pseudo-axis).
22
23
24
25

26
27 To eliminate possible artificial differences caused by staining irregularities, the MGV
28
29 was corrected (corrected MGV, cMGV) with the formula $\text{cMGV} = 255 - \text{MGV}$. For
30
31 normalizing the nuclear MGV, 6 areas of the cytoplasm were selected in each image and the
32
33 mean cytoplasmic MGV was considered as representative of the background value. This was
34
35 used to calculate the ncMGV (normalized corrected MGV) by subtracting the gray value
36
37 measured in the background regions ($\text{ncMGV} = \text{cMGV} - \text{background cMGV}$).
38
39
40
41
42
43
44
45

46 Statistical analysis

47
48
49

50 Statistical analysis was performed using the Statistical Package for Social Sciences
51
52 (SPSS) version 18.0 (SPSS Inc., Chicago, USA). The Shapiro-Wilk test was used to test
53
54 normality. All results were expressed as mean \pm standard deviation for continuous variables
55
56 and frequencies for categorical variables. The parametric paired Student's T-test was used to
57
58 compare morphometric values between tumor tissue and adjacent tissue. As for the
59
60
61
62
63
64
65

1 comparisons of values between the different clinical and pathological variables of the tumor,
2
3 the independent-samples Student's T-test or one-way analysis of variance (ANOVA) was
4
5 used. A post-hoc test (Bonferroni test) was not applied due to the low sample size. The
6
7 sensitivity, specificity and area under the receiver operator characteristic (ROC) curve (AUC)
8
9 were calculated for each tumor to determine the validity of the morphometric method. Values
10
11 of $p < 0.05$ were considered statistically significant. Furthermore, regression analysis was used
12
13 to test reproducibility of the morphometric analysis, according to the results obtained by two
14
15 blinded researchers was performed using Pearson correlation.
16
17
18
19
20
21
22
23

24 Results

25
26
27 Thirty-four individuals were included in the study, being 55.9% male; 67.6% of the
28
29 individuals had a history of hepatitis C. Less than or equal to 3 tumors were present in 94.1%
30
31 of the individuals (Table 1).
32
33
34
35

36 A difference between the HCC and the adjacent normal tissue samples was found in
37
38 perimeter ($p=0.025$), circularity ($p < 0.001$), solidity ($p < 0.001$), AR ($p < 0.001$), and FD
39
40 ($p=0.001$) (Table 2). The measurement of Feret diameter in the HCC samples differed
41
42 between the age groups ($p=0.034$), being higher in individuals aged 60 years or over.
43
44 Significant differences were found in MELD scores in relation to ncMGV ($p=0.034$) and
45
46 Feret diameter ($p=0.024$), with both parameters being higher in individuals with MELD
47
48 scores below 20 points. Nuclei with higher measurements of area ($p=0.014$) and Feret
49
50 diameter ($p=0.035$) were found in individuals who had a post-transplant survival time shorter
51
52 than 5 years. The AR measurement differed between the groups in relation to the recurrence
53
54 of the HCC after the transplant ($p=0.048$) with lower values among the individuals who
55
56 relapsed (Table 3).
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1 The ROC curve analysis showed that a perimeter cut-off level of $\geq 22.05 \mu\text{m}$ has a
2 sensitivity of 88% and specificity of 85%, and AUC of 0.647 ($p=0.038$, 95% confidential
3 interval = 0.514–0.780), for neoplastic cells. A FD cut-off level of $\geq 1.14 \mu\text{m}$ had a sensitivity
4 of 70% and specificity of 91%, and AUC of 0.298 ($p=0.004$, 95% confidential interval =
5 0.176–0.421), for neoplastic cells. Other parameters did not show significance in the ROC
6 curve analysis (Figure 2).
7
8
9

10 The Pearson correlation between results obtained by two blinded researchers results
11 was statistically significant in relation to area, circularity, Feret diameter, ncMGV and AR
12 ($p=<0.001$).
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26

27 Discussion

28 In this study, the differences found in the nuclear measurements of the perimeter,
29 circularity, solidity, and AR corroborate the occurrence of irregularities in the normal
30 morphology of hepatocytes as a result of the malignant transformation process and open
31 possibilities for new tools in the histopathological diagnosis of HCC.
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41

42 The existence of nuclear morphometric changes has already been verified in studies
43 with different types of tumors [17,19,26], including studies such as the one by Mendasolli et
44 al. [21], in which significant changes in morphometric and chromatin texture patterns were
45 observed between basal cell carcinoma samples and the unaffected basal epithelium.
46 Additionally in this study, the sclerodermiform type neoplasms presented larger nuclear area
47 and diameter in relation to nodular and superficial types, suggesting that genomic or
48 metabolism differences would also be determinant for independent biological behavior among
49 basal cell carcinoma subtypes.
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1 In relation to HCC, our study demonstrated the applicability of the morphometric
2 analysis as a tool in the differentiation between tumor and adjacent normal tissues. Our data
3
4 complemented the results of Hassan et al. [27] who performed imaging analysis of tumoral
5
6 HCC nuclei and hepatocellular nuclei from surgical tumor-free safe margins in a cohort of
7
8 patients with chronic hepatitis C. A significantly lower nuclear area of tumoral cells and in the
9
10 surgical tumor-free margin hepatocytes was observed in relation to patients without HCC.
11
12 These data are indeed more significant when we consider that most of the patients included in
13
14 our study also have a pre-transplantation history of hepatitis C.
15
16
17
18
19
20

21 In relation to the chromatin texture, the FD in this study was shown to be lower in
22
23 the HCC samples compared to the healthy parenchyma. These findings differ from those
24
25 observed in the study by Gheonea et al. [16], which obtained an increased FD value in HCC
26
27 when compared to that observed in adjacent normal hepatic tissue. Changes in FD values are
28
29 known to indicate generalized changes in nuclear architecture. Increased FD values are
30
31 associated with a larger area and lower chromatin compaction, affecting gene expression and
32
33 leading to neoplastic development and its progression [28]. A possible explanation for our
34
35 lower FD values in tumor tissue is the use of samples from individuals eligible for
36
37 transplantation whose tumors commonly present greater cell differentiation and less tumor
38
39 aggressiveness.
40
41
42
43
44
45

46 In our study we observed that important changes in nuclear morphology may be
47
48 associated with clinically relevant variables. Our main results refer to MELD scores and
49
50 survival at 5 years after liver transplantation, suggesting that our method may be useful in
51
52 assessing the prognosis of patients. Lower nuclear measurements of some parameters (Feret
53
54 diameter and ncMGV) were associated with higher MELD scores, while larger areas and
55
56 Feret diameter were linked to lower survival.
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1 We were the first cohort of cases in which it was possible to quantify nuclear
2 alterations in order to differentiate normal hepatocyte nuclei from HCC nuclei, applying the
3 morphometry in slides stained with hematoxylin-eosin, establishing more objective criteria of
4 cell differentiation. Values defined by the ROC curve related to FD are results not used in
5 other studies, which is the novelty in this study. Sensitivity and specificity values of nuclear
6 perimeter are similar to the values found by Ambroise et al. [29], in which they conducted
7 related nuclear measures from adenocarcinomas and benign effusions showing reactive
8 mesothelial cells established a cutoff level of 33.2 μm for nuclear perimeter. Values higher
9 than 33.2 μm would be indicative of malignancy with a sensitivity of 89.3% and a specificity
10 of 88% in the detection capacity of malignant components.
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24

25 Quantitative analysis is a tool that can be used for developing new diagnostic
26 methods [15]. Image softwares can make possible data checking between different researchers
27 in 100% of the samples measured, which allows the exclusion of manual selections [30]. The
28 correlation of intra-observer metrics was statistically significant in the majority of parameters
29 assessed, which indicates that these findings might be reproducible in future studies and
30 increases the utility of our morphometric method for clinical practice.
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40

41 Despite the innovative aspects reported here on the applicability of the morphometry
42 and on chromatin analysis in HCC, our study does have some limitations. The first is the
43 reduced number of samples since many samples had to be excluded from the analysis due to
44 the loss of tissue integrity caused by the prolonged storage time of the paraffin blocks.
45 Secondly, it is known that cirrhosis, a supra-adjacent alteration in all cases, can interfere with
46 the measurements obtained in the tissue adjacent to the tumor used in comparison with the
47 HCC. Further studies evaluating non-cirrhotic patients are necessary. And finally, in this
48 study we did not investigate the molecular events that could be causing the morphometric
49 differences observed. It is therefore proposed that future studies incorporate the use of
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1 methods to evaluate these events such as chromatin immunoprecipitation associated with
2
3 DNA sequencing for an in-depth elucidation of the mechanisms that trigger the morphometric
4
5 changes observed here.
6
7

8
9 In conclusion, there was a significant difference in nuclear measurements (perimeter,
10 circularity, solidity, and AR) and in chromatin texture (FD) between samples of HCC and
11 adjacent tissue from liver transplanted patients, as well as an association of these alterations
12 with clinically relevant variables (age, MELD score, recurrence, and survival). We found our
13 morphometric analysis to be replicable between observers. We also encountered a high
14 sensitivity and specificity in nuclear perimeter and FD for discriminating between neoplastic
15 and non-neoplastic hepatocytes. Further studies are needed to investigate the applicability of
16 the quantitative analysis to elucidate mechanisms associated with the development of the
17 HCC in order to validate the diagnosis and prognosis of this tool and its future use in clinical
18 practice.
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36

37 Conflicts of interest

38 All authors declare no competing interests regarding this manuscript.
39
40
41
42
43
44
45
46

47 Acknowledgments

48 We are grateful to the Experimental Research Center and Department of Surgical
49 Pathology, HCPA.
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1 References
2
3

4 [1] Sung H, Ferlay J, Siegel RL, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates
5 of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*
6 2021;0:1-41.
7
8

9
10
11 [2] Mancuso A, Perricone G. Hepatocellular Carcinoma and Liver Transplantation: State of
12 the Art. *J Clin Transl Hepatol* 2014;2:176-181.
13
14

15 [3] Chedid MF, Krueh CRP, Pinto MA, et al. Hepatocellular carcinoma: diagnosis and
16 operative management. *Arq Bras Cir Dig* 2017;30:272-78.
17
18

19 [4] Gomes MA, Priolli DG, Tralhão, JG, et al. Hepatocellular carcinoma: epidemiology,
20 biology, diagnosis, and therapies. *Rev Assoc Med Bras* 2013;59:514-24.
21
22

23 [5] Velosa J. Precursor Lesions of Liver Cancer. *J Port Gastreterol* 2011;18:285-297.
24
25

26 [6] Vitobello A, Perner J, Beil J, et al. Drug-induced chromatin accessibility changes associate
27 with sensitivity to liver tumor promotion. *Life Sci Alliance* 2019;2:e201900461.
28
29

30 [7] Farber E. The multistep nature of cancer development. *Cancer Res* 1984;44:4217-23.
31
32

33 [8] Pogribny IP, Rusyn I. Role of epigenetic aberrations in the development and progression
34 of human hepatocellular carcinoma. *Cancer Lett* 2014;342:223-30
35
36

37 [9] Natarajan S, Juneja M, Pallam NK, et al. A novel technique to assess chromatin texture
38 using pixel optical densitometry in oral squamous cell carcinoma. *Microsc Res Tech*
39 2012;75:1119-23.
40
41

42 [10] Bedin V, Adam RL, de Sá BC, et al.. Fractal dimension of chromatin is an independent
43 prognostic factor for survival in melanoma. *BMC Cancer* 2010;10:260.
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

- 1 [11] Adam RL, Silva RC, Pereira FG, et al. The fractal dimension of nuclear chromatin as a
2 prognostic factor in acute precursor B lymphoblastic leukemia. *Cell Oncol* 2006;28:55–59.
3
4
5
6 [12] Ferreira RC, Ward LS, Adam RL, et al. Contribution of nuclear texture analysis for the
7 differential diagnosis of follicular lesions of the thyroid: comparison to immunohistochemical
8 markers. *Arq Bras Endocrinol Metabol* 2009;53:804–10.
9
10
11
12 [13] Yang W, Tian R, Xue T. Nuclear shape descriptors by automated morphometry may
13 distinguish aggressive variants of squamous cell carcinoma from relatively benign skin
14 proliferative lesions: a pilot study. *Tumour Biol* 2015;36:6125-31.
15
16
17
18 [14] Doudkine A, Macaulay C, Poulin N, et al. Nuclear texture measurements in image
19 cytometry. *Pathologica* 1995;87:286-99.
20
21
22
23 [15] Zink D, Fischer AH, Nickerson JA. Nuclear structure in cancer cells. *Nat Rev Cancer*
24 2004;4:677-87.
25
26
27
28 [16] Gheonea DI, Streba CT, Vere CC, et al. Diagnosis system for hepatocellular carcinoma
29 based on fractal dimension of morphometric elements integrated in an artificial neural
30 network. *Biomed Res Int* 2014:239706.
31
32
33
34 [17] Streba CT, Pirici D, Vere CC, et al. Fractal analysis differentiation of nuclear and
35 vascular patterns in hepatocellular carcinomas and hepatic metastasis. *Rom J Morphol*
36 *Embryol* 2011;52:845-54.
37
38
39
40 [18] Xia R, Boroujeni AM, Shea S, et al. Diagnosis of Liver Neoplasms by Computational
41 and Statistical Image Analysis. *Gastroenterology Res* 2019;12:288-98.
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

- 1 [19] Mijovic Z, Kostov M, Mihailovic D, et al. Correlation of nuclear morphometry of
2 primary melanoma of the skin with clinicopathological parameters and expression of tumor
3 suppressor proteins (p53 and p16(INK4a)) and bcl-2 oncoprotein. J BUON 2013;18:471-6.
4
5
6
7
8
9 [20] Nishihira M, Nakazato Y, Tsuchida S, et al. Nuclear Morphometry of Lung Squamous
10 Cell Carcinomas in Cytologic Study. Ann Thorac Cardiovasc Surg 2018;24:303-07.
11
12
13
14 [21] Mendaçolli PJ, Brianezi G, Schmitt JV, et al. Nuclear morphometry and chromatin
15 textural characteristics of basal cell carcinoma. An Bras Dermatol 2015;90:874-8.
16
17
18
19
20 [22] Baak JPA, Oort J. A manual of morphometry in diagnostic pathology, 11rd ed. Berlin,
21 Heidelberg, New York, Tokyo: Springer; 2011.
22
23
24
25 [23] Nunes TWN, Filippi-Chiela EC, Callegari-Jacques SM, et al. Nuclear morphometric
26 analysis in tissue as an objective tool with potential use to improve melanoma staging.
27 Melanoma Res 2019;29:474-82.
28
29
30
31
32
33 [24] Kononen J, Bubendorf L, Kallioniemi A, Bärklund M, Schraml P, Leighton S, Torhorst J,
34 Mihatsch MJ, Sauter G, Kallioniemi OP. Tissue microarrays for high-throughput molecular
35 profiling of tumor specimens. Nat Med 1998;4:844-47.
36
37
38
39
40
41 [25] Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW. NIH Image to ImageJ: 25 years of image
42 analysis. Nat Methods 2012;9:671-75.
43
44
45
46
47
48 [26] Kobayashi S, Saio M, Fukuda T, Kimura K, Hirato J, Oyama T. Image analysis of the
49 nuclear characteristics of emerin protein and the correlation with nuclear grooves and
50 intranuclear cytoplasmic inclusions in lung adenocarcinoma. Oncol Rep 2019;41:133-42.
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1 [27] Hassan S, Mansy SS, Tabak SA, et al. Immunohistochemical and electron microscopic
2 morphometric image analysis of hepatocellular carcinoma in association of HCV infection.
3
4
5
6 Ultrastruct Pathol 2018;42:97-107.
7

8
9 [28] Metze K, Adam R, Florindo JB. The fractal dimension of chromatin - a potential
10 molecular marker for carcinogenesis, tumor progression and prognosis. Expert Rev Mol
11
12
13
14 Diagn 2019;19:299-312.
15

16
17 [29] Ambroise MM, Jothilingam P, Ramdas A. Utility of nuclear morphometry in effusion
18
19
20
21
22 cytology. Asian Pac J Cancer Prev 2014;15:6919-22.

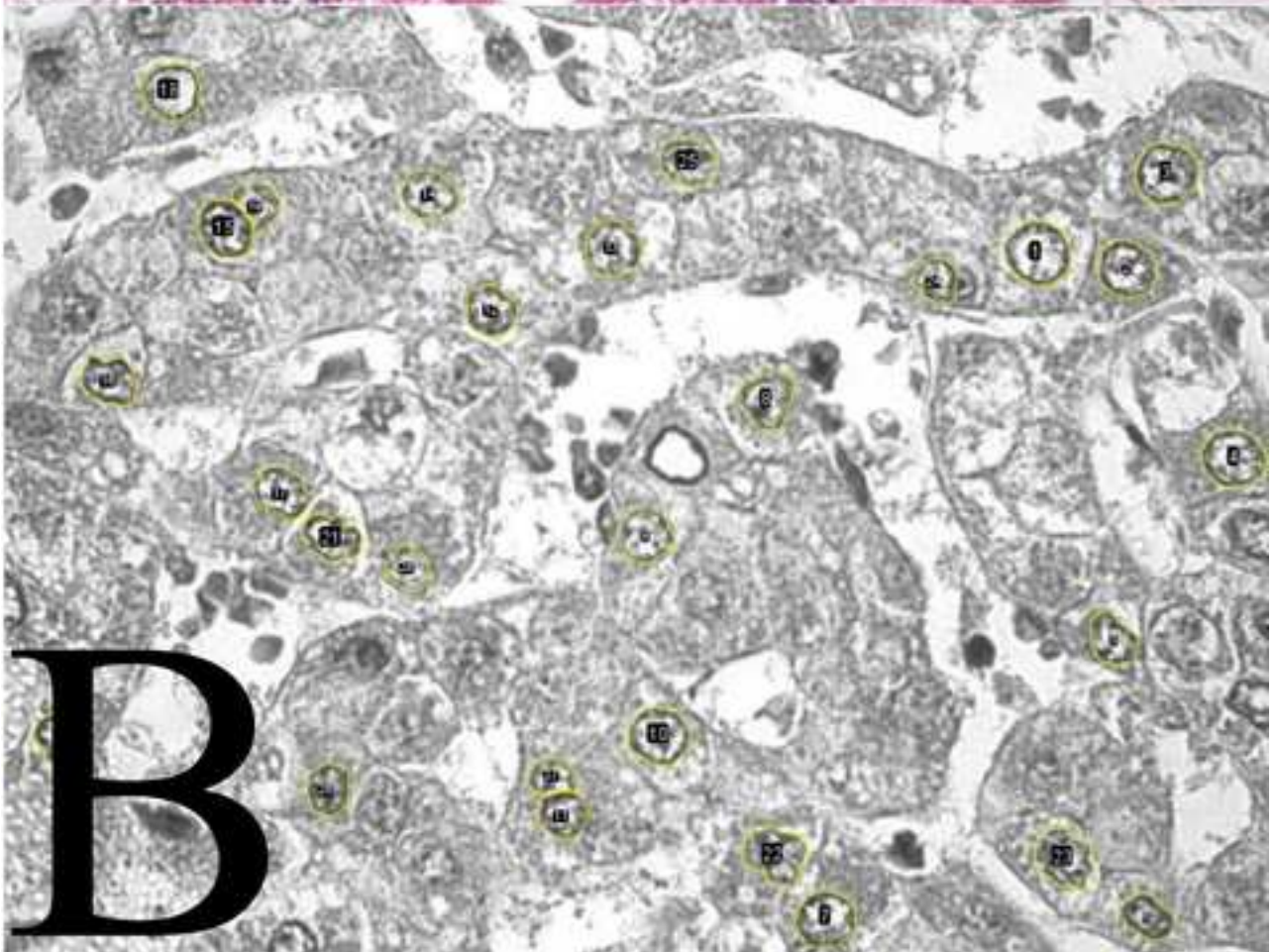
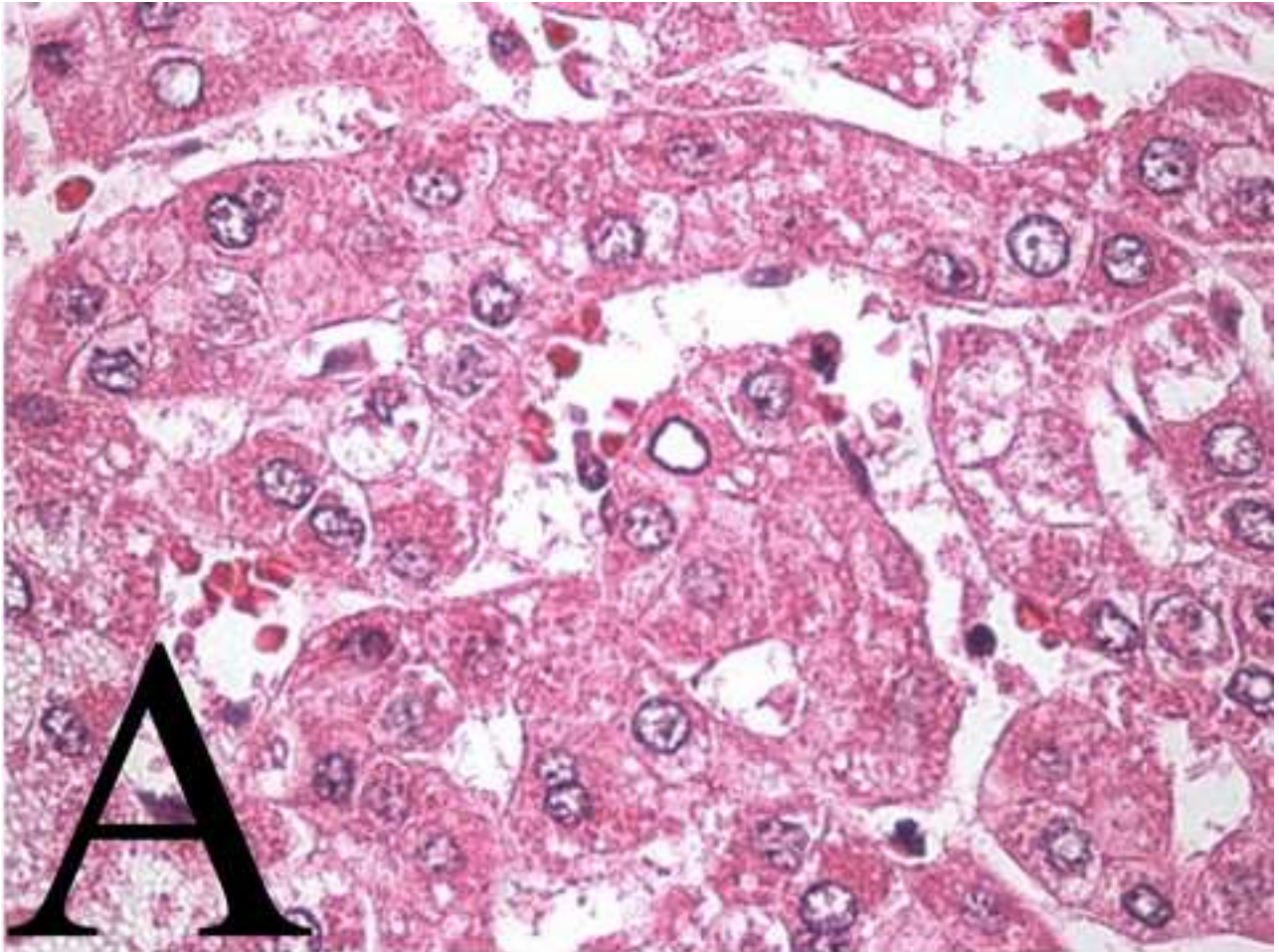
23 [30] Andrea CE, Bleggi-Torres LF, Alves MTS. Nuclear morphometric analysis: description
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

of the methodology and the role of image-editing softwares. J Bras Patol Med Lab
2008;44:51-7.

1 Figure legends
2
3

4 Figure 1: Hepatocytes of tumor tissue. (A) RGB photomicrograph, 1000x. (B) Transformation
5 image from RGB to 8-bit and selected nucleus, 1000x.
6
7

8
9
10 Figure 2: ROC curve of nuclear parameters, which represents the overall diagnostic value of
11 the model in predicting the presence of cell malignancy. (A) Area: area under curve was 0.347
12 ($p=0.064$, 95% confidential interval= 0.209–0.485; cut-off level $\geq 34.42\mu\text{m}^2$). (B) Perimeter:
13 area under curve was 0.647 ($p=0.038$, 95% confidential interval= 0.514–0.780; cut-off level \geq
14 22.05 μm). (C) Circularity: area under curve was 0.030 ($p=0.058$, 95% confidential interval =
15 0.00–0.087; cut-off level $\geq 0.905 \mu\text{m}$). (D) Feret diameter: area under curve was 0.371
16 ($p=0.068$, 95% confidential interval= 0.229–0.514; cut-off level $\geq 77.01 \mu\text{m}$). (E): normalized
17 corrected Mean gray value: area under curve was 0.394 ($p=0.133$, 95% confidential interval=
18 0.257–0.531; cut-off level $\geq 15.51 \mu\text{m}$). (F) Solidity: area under curve was 0.068 ($p=0.054$,
19 95% confidential interval= 0.003–0.133; cut-off level ≥ 0.903). (G) Aspect ratio: area under
20 curve was 0.872 ($p=0.054$, 95% confidential interval= 0.784–0.959; cut-off level ≥ 1.24). (H)
21 Fractal dimension: area under curve was 0.298 ($p=0.004$, 95% confidential interval= 0.176–
22 0.421; cut-off level ≥ 1.14). (p , statistical significance; ncMGV; normalized corrected Mean
23 gray value; FD, Fractal dimension).
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65



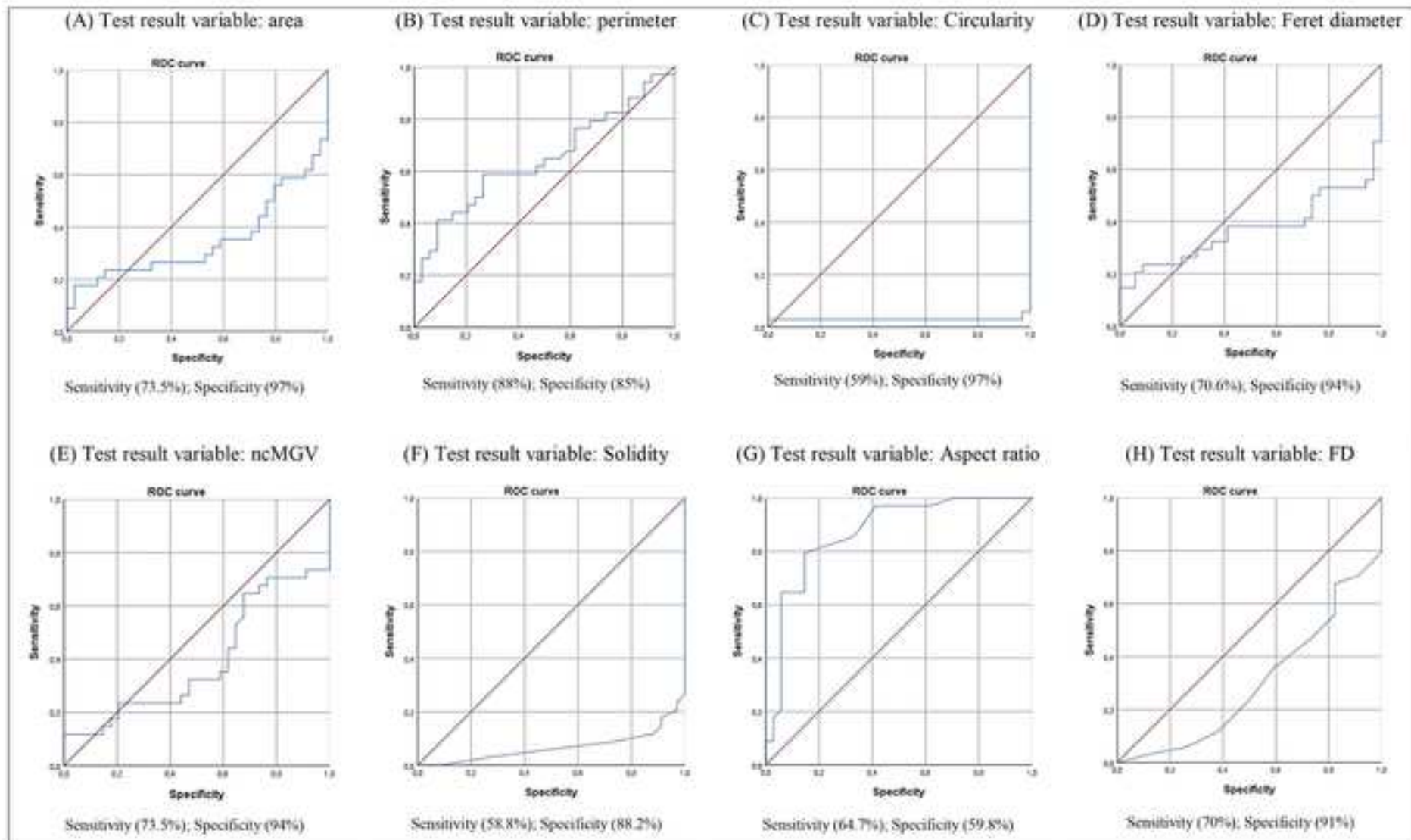


Table 1
Demographic and liver transplant characteristics.

Variable	All (n=34)
Age <60 years, n (%)	17 (50)
Male, n (%)	19 (55.9)
Underlying liver disease, n (%)	
Hepatitis B	2 (5.9)
Hepatitis C	23 (67.6)
Alcohol + HCV	5 (14.7)
Others	4 (11.8)
Nodule size, n (%)	
< or = 3cm	23 (67.6)
>3cm	11 (32.4)
Number of tumors, n (%)	
< or = 3	32 (94.1)
> 3	2 (5.9)
Nuclear grade, n (%)	
1	2 (5.9)
2	18 (52.9)
3	9 (26.5)
Missing	5 (14.7)
MELD score, n (%)	
<20	23 (67.6)
>20	5 (14.7)
Missing	6 (17.6)
Child-Pugh, n (%)	
A	12 (35.3)
B	13 (38.2)
C	3 (8.8)
Missing	6 (17.6)
Recurrent, n (%)	4 (11.8)
Vascular invasion, n (%)	13 (38.2)
Death, n (%)	12 (35.3)

md, median; n, frequency; HCV, hepatitis c virus; cm, centimeter; MELD, model for end-stage liver disease

Table 2
Morphometric and chromatin texture characteristics.

Variable	Tumor - mean \pm SD	Adjacent - mean \pm SD	<i>p-value</i>
Nuclear shape descriptors			
Area (μm^2)	48.65 \pm 14.90	53.51 \pm 7.13	0.066
Perimeter (μm)	26.08 \pm 4.06	24.07 \pm 2.22	0.025
Circularity	0.833 \pm 0.04	0.955 \pm 0.01	<0.001
Feret (μm)	85.33 \pm 14.78	89.80 \pm 5.69	0.094
ncMGV (μm)	22.64 \pm 9.83	25.18 \pm 6.33	0.206
Solidity	0.982 \pm 0.009	0.995 \pm 0.002	<0.001
AR	1.28 \pm 0.08	1.15 \pm 0.06	<0.001
Chromatin texture descriptor			
Fractal dimension	1.16 \pm 0.03	1.19 \pm 0.02	0.001

SD, standard deviation; μm , micrometer; ncMGV, normalized corrected mean grey value; Ra, aspect ratio; *p-value*, statistical significance

Table 3
Comparison between nuclear parameters and clinical-pathological characteristics.

Variables	Area mean±SD	<i>p</i>	Perimeter mean±SD	<i>p</i>	Circularity men±SD	<i>p</i>	Feret mean±SD	<i>p</i>	ncMGV mean±SD	<i>p</i>	Solidity mean± SD	<i>p</i>	AR mean± SD	<i>p</i>	FD mean±SD	<i>p</i>
Sex																
Male	49.84 ± 15.30	0.606	26.92 ± 4.02	0.175	0.834 ± 0.04	0.868	87.36 ± 13.70	0.375	22.27 ± 9.97	0.812	0.981 ± 0.009	0.796	1.26 ± 0.09	0.212	1.17 ± 0.03	0.251
Female	47.13 ± 14.77		25.00 ± 3.98		0.823 ± 0.04		82.76 ± 16.16		23.10 ± 9.97		0.182 ± 0.009		1.31 ± 0.07		1.15 ± 0.03	
Age (years)																
<60	44.68 ± 15.63	0.123	25.68 ± 4.62	0.580	0.837 ± 0.04	0.280	80.01 ± 14.46	0.034	20.11 ± 10.4	0.136	0.980 ± 0.007	0.326	1.27 ± 0.09	0.879	1.17 ± 0.03	0.379
≥or >60	52.61 ± 13.44		26.47 ± 3.50		0.821 ± 0.04		90.65 ± 13.47		25.16 ± 8.7		0.983 ± 0.010		1.28 ± 0.08		1.16 ± 0.03	
Number tumor																
< or = 3	48.19 ± 14.94	0.486	26.01 ± 4.09	0.723	0.837 ± 0.04	0.059	85.12 ± 15.04	0.750	23.01 ± 9.85	0.390	0.982 ± 0.009	0.694	1.28 ± 0.08	0.614	1.16 ± 0.03	0.302
>3	55.91 ± 17.21		27.09 ± 4.58		0.769 ± 0.06		88.64 ± 13.13		16.74 ± 10.34		0.979 ± 0.007		1.25 ± 0.12		1.14 ± 0.05	
Nodule size (cm)																
< or = 3	48.97 ± 11.68	0.884	25.55 ± 3.02	0.385	0.828 ± 0.04	0.859	84.46 ± 14.35	0.628	26.70 ± 1.13	0.784	0.983 ± 0.009	0.379	1.27 ± 0.08	0.507	1.15 ± 0.03	0.128
>3	47.97 ± 20.79		27.19 ± 5.68		0.834 ± 0.02		87.14 ± 16.21		23.32 ± 9.59		0.980 ± 0.009		1.34 ± 0.10		1.18 ± 0.03	
Nuclear grade																
1	58.36 ± 14.18	0.757	27.52 ± 3.45	0.842	0.848 ± 0.02	0.796	94.57 ± 11.27	0.733	30.50 ± 18.15	0.064	0.996 ± 0.001	0.088	1.17 ± 0.01	0.145	1.13 ± 0.03	0.435
2	51.33 ± 13.32		26.25 ± 3.32		0.821 ± 0.04		87.25 ± 14.48		23.89 ± 10.48		0.980 ± 0.008		1.29 ± 0.08		1.16 ± 0.06	
3	50.38 ± 14.44		25.90 ± 3.96		0.843 ± 0.05		85.07 ± 17.57		19.33 ± 6.30		0.981 ± 0.011		1.30 ± 0.09		1.15 ± 0.03	
MELD																
<20	50.99 ± 15.92	0.200	27.02 ± 4.06	0.066	0.828 ± 0.04	0.636	89.50 ± 14.89	0.024	23.84 ± 9.61	0.034	0.982 ± 0.009	0.975	1.28 ± 0.09	0.499	1.16 ± 0.03	0.279
>20	41.42 ± 4.44		23.44 ± 1.21		0.834 ± 0.04		73.17 ± 4.69		13.58 ± 7.13		0.982 ± 0.002		1.31 ± 0.08		1.14 ± 0.04	

Table 3 continued

Variables	Area mean±SD	<i>p</i>	Perimeter mean±SD	<i>p</i>	Circularity men±SD	<i>p</i>	Feret mean±SD	<i>p</i>	ncMGV mean±SD	<i>p</i>	Solidity mean± SD	<i>p</i>	AR mean± SD	<i>p</i>	FD mean±SD	<i>p</i>
Child-Pugh																
A	50.14 ± 19.58		27.64 ± 4.94		0.828 ± 0.03		89.98 ± 17.38		23.18 ± 9.82		0.981 ± 0.009		1.27 ± 0.08		1.16 ± 0.03	
B	49.97 ± 11.65	0.126	25.81 ± 2.98	0.055	0.833 ± 0.04	0.960	85.89 ± 13.64	0.143	22.11 ± 10.91	0.764	0.983 ± 0.008	0.171	1.29 ± 0.09	0.698	1.16 ± 0.03	0.802
C	49.91 ± 4.78		23.82 ± 1.34		0.819 ± 0.05		76.04 ± 3.55		16.90 ± 6.47		0.982 ± 0.002		1.30 ± 0.12		1.15 ± 0.05	
Recurrent																
Absent	48.53 ± 15.29		26.14 ± 4.19		0.823 ± 0.04		85.39 ± 15.40		21.92 ± 9.68		0.982 ± 0.009		1.29 ± 0.08		1.16 ± 0.03	
Present	49.48 ± 13.50	0.908	25.59 ± 3.36	0.802	0.971 ± 0.02	0.957	84.89 ± 10.48	0.951	28.04 ± 10.59	0.248	0.982 ± 0.009	0.921	1.21 ± 0.08	0.048	1.16 ± 0.03	0.946
Vascular inv.																
Absent	48.23 ± 11.07		25.34 ± 2.81		0.827 ± 0.04		84.18 ± 13.80		23.10 ± 9.74		0.984 ± 0.009		1.29 ± 0.09		1.16 ± 0.03	
Present	49.31 ± 20.14	0.862	27.26 ± 5.44	0.256	0.834 ± 0.03	0.469	87.18 ± 16.66	0.574	21.90 ± 10.32	0.736	0.978 ± 0.009	0.123	1.26 ± 0.07	0.334	1.16 ± 0.03	0.504
Death																
No	46.91 ± 16.23		26.10 ± 4.48		0.830 ± 0.03		86.02 ± 16.28		21.62 ± 9.52		0.983 ± 0.008		1.30 ± 0.08		1.16 ± 0.03	
Yes	50.21 ± 12.48	0.657	25.87 ± 3.39	0.829	0.828 ± 0.05	0.339	84.60 ± 11.43	0.836	24.30 ± 11.67	0.475	0.981 ± 0.011	0.658	1.25 ± 0.09	0.290	1.16 ± 0.03	0.892
Survival (years)																
< 5	55.32 ± 14.10		27.08 ± 3.61		0.821 ± 0.04		92.84 ± 14.40		22.09 ± 9.02		0.984 ± 0.008		1.29 ± 0.09		1.16 ± 0.04	
> 5	39.52 ± 10.50	0.014	24.71 ± 4.26	0.273	0.843 ± 0.03	0.132	76.52 ± 8.12	0.035	23.35 ± 11.99	0.076	0.980 ± 0.009	0.412	1.27 ± 0.07	0.440	1.16 ± 0.03	0.923

SD, standard deviation; µm, micrometer; cm, centimeter; ncMGV, normalized corrected mean grey value; Ra, aspect ratio; FD, fractal dimension; MELD, Model End-Stage Liver Disease; Vascular inv., Vascular invasion, *p*, statistical significance

CONCLUSÕES

A análise morfométrica realizada digitalmente mostrou-se efetiva em detectar e quantificar alterações na morfologia nuclear e da textura de cromatina em hepatócitos submetidos à transformação neoplásica.

Os principais achados do estudo são descritos abaixo:

1- A maioria dos parâmetros morfométricos mensurados (perímetro, circularidade, solidez, Ra e DF) apresentaram valores que diferiram entre as amostras de tecido de CHC em relação às de tecido adjacente não-neoplásico de forma significativa, corroborando com a nossa hipótese de que as alterações da morfometria nuclear poderiam ser quantificadas e evidenciadas na comparação entre os dois conjuntos de amostras teciduais analisadas.

2- Encontrou-se associação entre as medidas morfométricas e características clínicas incluindo aquelas relacionadas ao prognóstico de indivíduos transplantados por CHC: escores MELD mais baixos foram relacionados a uma MEC e diâmetro de Feret maiores. Medidas de Ra menores tiveram associação com a recorrência do CHC pós-transplante. E por fim, amostras de núcleos de maior tamanho (área) e diâmetro de Feret estiveram associadas com uma sobrevida pós-transplante inferior a 5 anos. Estabelecer associações entre características tumorais e a clínica é de extrema utilidade, considerando que podem auxiliar na definição de predições prognósticas, ainda escassas no CHC, principalmente em casos que envolvem o transplante hepático como forma de tratamento.

3- Foi possível o estabelecimento de “pontos de corte” de ao menos 2 dos parâmetros avaliados (perímetro e DF), achado relevante que contribui para tornar a análise morfométrica uma ferramenta no diagnóstico histopatológico com maior relevância prática.

CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS

No nosso conhecimento, este é o primeiro relato de emprego de técnicas de quantificação de alterações nucleares para a diferenciação entre núcleos de hepatócitos não-neoplásicos e os de CHC. Realizamos a morfometria nuclear em simples lâminas coradas com hematoxilina-eosina e desta forma estabelecemos critérios mais objetivos (quantitativos) de análise microscópica.

O estudo também foi capaz de apontar alguns parâmetros que estavam relacionados às variáveis clínico-patológicas do CHC. Nossos principais resultados referem-se aos escores MELD e sobrevida em 5 anos após o transplante de fígado, sugerindo que nosso método pode ser útil na avaliação do prognóstico dos pacientes. Além disso, os valores definidos pela curva ROC relacionados a DF são resultados não encontrados em outros estudos, constituindo outra principal novidade. Cabe ressaltar que a aplicabilidade destes resultados na prática clínica ainda carece de maior investigação e o olhar do patologista ainda permanece essencial para a determinação diagnóstica.

Outro diferencial do estudo foi estudar uma coorte de pacientes transplantados. Este é um grupo de indivíduos que ainda necessita ser foco de mais estudos que esclareçam a relação das características celulares envolvidas na transformação maligna com a predição de eventos e/ou condições pós-transplante que afetem o curso do tratamento.

Como perspectivas, caberia a continuação do trabalho para aumento do número de casos e a replicação da metodologia em amostras de outros tecidos. Por fim, durante o desenvolvimento da pesquisa foi realizada a padronização da construção de blocos de TMA junto à equipe da Unidade de Patologia Experimental do HCPA Situação que possibilita que outros estudos se beneficiem na aplicação do

método.

Enfim, conclui-se que houve êxito na execução do presente estudo, com a obtenção de resultados promissores, com potencialidade de incrementar a literatura científica quanto ao assunto abordado. Esperamos que o estudo seja referência para que novos pesquisadores desenvolvam trabalhos que corroborem nossos achados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, Bray F. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*. 2021 Feb 4;0:1-41.
2. Tang A, Hallouch O, Chernyak V, Kamaya A, Sirlin CB. Epidemiology of hepatocellular carcinoma: target population for surveillance and diagnosis. *Abdom Radiol (NY)*. 2018 Jan;43(1):13-25.
3. El-Serag HB. Hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med*. 2011 Sep 22;365(12):1118-27.
4. Yang W, Tian R, Xue T. Nuclear shape descriptors by automated morphometry may distinguish aggressive variants of squamous cell carcinoma from relatively benign skin proliferative lesions: a pilot study. *Tumour Biol*. 2015 Aug;36(8):6125-31.
5. Cunha LL, Ferreira RC, de Matos PS, da Assumpção LV, Ward LS. Both gender and concurrent chronic lymphocytic thyroiditis may influence the nuclear texture of papillary thyroid carcinomas cells. *Endocr Res*. 2014;39(3):126-9.
6. Bedin V, Adam RL, de Sá BC, Landman G, Metzke K. Fractal dimension of chromatin is an independent prognostic factor for survival in melanoma. *BMC Cancer*. 2010 Jun 5;10:260. doi: 10.1186/1471-2407-10-260.
7. Fernández-Barrena MG, Arechederra M, Colyn L, Berasain C, Avila MA. Epigenetics in hepatocellular carcinoma development and therapy: The tip of the iceberg. *JHEP Rep*. 2020 Aug 7;2(6):100167.
8. Eynard HG, Soria EA, Cuestas E, Rovasio RA, Eynard AR. Assessment of colorectal cancer prognosis through nuclear morphometry. *J Surg Res*. 2009 Jun 15;154(2):345-8.
9. Nunes TW, Filippi-Chiela EC, Callegari-Jacques SM, da Silva VD, Sansonowicz T, Lenz G, Roehe AV. Nuclear morphometric analysis in tissue as an objective tool with potential use to improve melanoma staging. *Melanoma Res*. 2019 Oct;29(5):474-482.
10. INCA - Instituto Nacional de Câncer. *Estatísticas de câncer* [access in 2020 Dec 20]. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/numeros-de-cancer>.
11. Lok AS, Seeff LB, Morgan TR, et al. Incidence of hepatocellular carcinoma and associated risk factors in hepatitis C-related advanced liver disease. *Gastroenterology* 2009;136:138-48.
12. Petrick, J.L., Braunlin, M., Laversanne, M. et al. International trends in liver cancer incidence, overall and by histologic subtype, 1978–2007. *Int J Cancer*. 2016;139(7):1534–45.
13. Papatheodoridis, G.V., Idilman, R., Dalekos, G.N. et al. The risk of hepatocellular carcinoma decreases after the first 5 years of entecavir or tenofovir in Caucasians with chronic hepatitis B. *Hepatology*. 2017;66(5):1444–53.
14. Franceschi, S., El-Serag, H.B., Forman, D., Newton, R., and Plummer, M. **Infectious agents, in Cancer Epidemiology and Prevention**, 4th edn. (eds. M. Thun, M.S. Linet, J.R. Cerhan, C.A. Haiman, and D. Schottenfeld), Oxford University Press, Oxford, 2017, p.446.
15. Yu, M.W., Yang, Y.C., Yang, S.Y. et al. Androgen receptor exon 1 CAG repeat length and risk of hepatocellular carcinoma in women. *Hepatology*. 2002;36(1):156–63.
16. Global Burden of Disease Cancer, C. et al. Global, regional, and national cancer incidence, mortality, years of life lost, years lived with disability, and disability- adjusted life- years for 32 cancer groups, 1990 to 2015: a systematic analysis for the global burden of disease study. *JAMA Oncol*. 2017;3:524–548.
17. Gomes MA, Priolli DG, Tralhão, JG, et al. Hepatocellular carcinoma: epidemiology, biology, diagnosis, and therapies. *Rev Assoc Med Bras*. 2013 Sept-Oct;59(5):514-524.
18. Bruix J, Sherman M; Practice Guidelines Committee, American Association for the Study of Liver Diseases. Management of hepatocellular carcinoma. *Hepatology*. 2005 Nov;42(5):1208-36.
19. Kumar V, Abbas AK, Aster JC. *Robbins and Cotran pathologic basis of disease*. 9^a.ed. Canada: Elsevier, 2015.

20. Massarweh NN, El-Serag HB. Epidemiology of Hepatocellular Carcinoma and Intrahepatic Cholangiocarcinoma. **Cancer Control**. 2017 Jul-Sep;24(3):1073274817729245.
21. Vauthey JN, Lauwers GY, Esnaola NF, Do KA, Belghiti J, Mirza N, Curley SA, Ellis LM, Regimbeau JM, Rashid A, Cleary KR, Nagorney DM. Simplified staging for hepatocellular carcinoma. **J Clin Oncol**. 2002 Mar 15;20(6):1527-36.
22. Llovet JM, Brú C, Bruix J. Prognosis of hepatocellular carcinoma: the BCLC staging classification. **Semin Liver Dis**. 1999;19(3):329-38.
23. Judice LF, Mourad OA, Andrade, F. Estadiamento invasivo do mediastino no câncer de pulmão. **Pulmão RJ**. 2009, supl.4:S29-S32.
24. Balogh J, Victor D 3rd, Asham EH, Burroughs SG, Boktour M, Saharia A, Li X, Ghobrial RM, Monsour HP Jr. Hepatocellular carcinoma: a review. **J Hepatocell Carcinoma**. 2016 Oct 5;3:41-53.
25. CARRILHO FJ, Kikuchi L, Branco F, Gonçalves CS, Mattos AA. Clinical and epidemiological aspects of hepatocellular carcinoma in Brazil. **Clinics**. 2010;65(12):1285-90.
26. Balogh J, Victor D 3rd, Asham EH, Burroughs SG, Boktour M, Saharia A, Li X, Ghobrial RM, Monsour HP Jr. Hepatocellular carcinoma: a review. **J Hepatocell Carcinoma**. 2016 Oct 5;3:41-53.
27. Mazzanti R, Arena U, Tassi R. Hepatocellular carcinoma: Where are we? **World J Exp Med**. 20 Feb 2016;6(1):21-36.
28. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA Cancer J Clin**. 2018 Nov;68(6):394-424.
29. Magnussen A, Parsi MA. Aflatoxins, hepatocellular carcinoma and public health. **World J Gastroenterol**. 2013 Mar 14;19(10):1508-12.
30. Davila JA, Morgan RO, Shaib Y, McGlynn KA, El-Serag HB. Diabetes increases the risk of hepatocellular carcinoma in the United States: a population based case control study. **Gut**. 2005 Apr;54(4):533-9.
31. Larsson, S. C., & Wolk, A. . Overweight, obesity and risk of liver cancer: a meta-analysis of cohort studies. **British journal of cancer**. 2007;97(7):1005–08.
32. Harrison SA, Bacon BR. Relation of hemochromatosis with hepatocellular carcinoma: epidemiology, natural history, pathophysiology, screening, treatment, and prevention. **Med Clin North Am**. 2005 Mar;89(2):391-409.
33. Baffy G, Brunt EM, Caldwell SH. Hepatocellular carcinoma in non-alcoholic fatty liver disease: an emerging menace. **J Hepatol**. 2012 Jun;56(6):1384-91.
34. Serper M, Taddei TH, Mehta R, D'Addeo K, Dai F, Aytaman A, Baytarian M, Fox R, Hunt K, Goldberg DS, Valderrama A, Kaplan DE; VOCAL Study Group. Association of Provider Specialty and Multidisciplinary Care With Hepatocellular Carcinoma Treatment and Mortality. **Gastroenterology**. 2017 Jun;152(8):1954-1964.
35. Golabi P, Fazel S, Otgonsuren M, Sayiner M, Locklear CT, Younossi ZM. Mortality assessment of patients with hepatocellular carcinoma according to underlying disease and treatment modalities. **Medicine (Baltimore)**. 2017 Mar;96(9):e5904.
36. Mancuso A, Perricone G. Hepatocellular Carcinoma and Liver Transplantation: State of the Art. **J Clin Transl Hepatol**. 2014 Sep;2(3):176-81.
37. Nissen NN, Menon V, Bresee C, Tran TT, Annamalai A, Poordad F, Fair JH, Klein AS, Boland B, Colquhoun SD. Recurrent hepatocellular carcinoma after liver transplant: identifying the high-risk patient. **HPB (Oxford)**. 2011 Sep;13(9):626-32.
38. Mazzaferro V, Regalia E, Doci R, Andreola S, Pulvirenti A, Bozzetti F, Montalto F, Ammatuna M, Morabito A, Gennari L. Liver transplantation for the treatment of small hepatocellular carcinomas in patients with cirrhosis. **N Engl J Med**. 1996 Mar 14;334(11):693-9.
39. Aguiar MIF, Braga VAB, Almeida PC, Garcia JHP, Lima CA. Severity of liver disease and quality of life in liver transplantation. **Acta paul enferm**. 2016 Jan-Feb; 29(1):107-14.

40. Mariante-Neto G, Fleck AM, Brandão ABM. Liver transplant allocation in adults: advantages and disadvantages of the MELD score. *Clin Biomed Res*. 2014;34(4):342-46.
41. Vivarelli M, Cucchetti A, La Barba G, Ravaioli M, Del Gaudio M, Lauro A, Grazi GL, Pinna AD. Liver transplantation for hepatocellular carcinoma under calcineurin inhibitors: reassessment of risk factors for tumor recurrence. *Ann Surg*. 2008 Nov;248(5):857-62.
42. Bhangui P, Allard MA, Vibert E, Cherqui D, Pelletier G, Cunha AS, Guettier C, Vallee JC, Saliba F, Bismuth H, Samuel D, Castaing D, Adam R. Salvage Versus Primary Liver Transplantation for Early Hepatocellular Carcinoma: Do Both Strategies Yield Similar Outcomes? *Ann Surg*. 2016 Jul;264(1):155-63.
43. Fernandez-Sevilla E, Allard MA, Selten J, Golse N, Vibert E, Sa Cunha A, Cherqui D, Castaing D, Adam R. Recurrence of hepatocellular carcinoma after liver transplantation: Is there a place for resection? *Liver Transpl*. 2017 Apr;23(4):440-447.
44. Chedid MF, Krueel CRP, Pinto MA, Grezzana-Filho TJM, Leipnitz I, Krueel CDP, Scaffaro LA, Chedid AD. Hepatocellular carcinoma: diagnosis and operative management. *Arq Bras Cir Dig*. HEPATOCELLULAR CARCINOMA: DIAGNOSIS AND OPERATIVE MANAGEMENT. *Arq Bras Cir Dig*. 2017 Oct-Dec;30(4):272-278.
45. Singal AK, Kamath PS. Model for End-stage Liver Disease. *J Clin Exp Hepatol*. 2013 Mar;3(1):50-60.
46. Velosa J. Precursor Lesions of Liver Cancer. *J Port Gastroenterol*. 2011 Nov-Dec;18(6):285-297.
47. Villanueva A. Hepatocellular Carcinoma. *N Engl J Med*. 2019 Apr 11;380(15):1450-1462.
48. Torrecilla S, Sia D, Harrington AN, Zhang Z, Cabellos L, Cornella H, Moeini A, Camprecios G, Leow WQ, Fiel MI, Hao K, Bassaganyas L, Mahajan M, Thung SN, Villanueva A, Florman S, Schwartz ME, Llovet JM. Trunk mutational events present minimal intra- and inter-tumoral heterogeneity in hepatocellular carcinoma. *J Hepatol*. 2017 Dec;67(6):1222-1231.
49. Lavarone M, Piscaglia F, Vavassori S, Galassi M, Sangiovanni A, Venerandi L, Forzenigo LV, Golfieri R, Bolondi L, Colombo M. Contrast enhanced CT-scan to diagnose intrahepatic cholangiocarcinoma in patients with cirrhosis. *J Hepatol*. 2013 Jun;58(6):1188-93.
50. Di Tommaso L, Sangiovanni A, Borzio M, Park YN, Farinati F, Roncalli M. Advanced precancerous lesions in the liver. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 2013 Apr;27(2):269-84.
51. Schulze K, Nault J-C, Villanueva A. Genetic profiling of hepatocellular carcinoma using next-generation sequencing. *J Hepatol*. 2016;65:1031-42.
52. Alqahtani A, Khan Z, Alloghbi A, Said Ahmed TS, Ashraf M, Hammouda DM. Hepatocellular Carcinoma: Molecular Mechanisms and Targeted Therapies. *Medicina (Kaunas)*. 2019 Aug 23;55(9):526.
53. Cha C, DeMatteo RP. Molecular mechanisms in hepatocellular carcinoma development. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 2005;19:25-37.
54. Aravalli, RN, Steer CJ, Cressman ENK. Molecular mechanisms of hepatocellular carcinoma. *Hepatology*. 2008;48:2047-2063.
55. Farazi PA, DePinho RA. Hepatocellular carcinoma pathogenesis: from genes to environment. *Nat Rev Cancer*. 2006 Sep;6(9):674-87.
56. Brasileiro Filho G. *Bogliolo Patologia*. 9^a.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2017.
57. Bertino G, Demma S, Ardiri A, Proiti M, Gruttadauria S, Toro A, Malaguarnera G, Bertino N, Malaguarnera M, Malaguarnera M, Di Carlo I. Hepatocellular carcinoma: novel molecular targets in carcinogenesis for future therapies. *Biomed Res Int*. 2014;2014:203693.
58. WHO - World Health Organization. *Cancer* [access in 2021 Feb 26]. Available in: https://www.who.int/health-topics/cancer#tab=tab_1.
59. Zink D, Fischer AH, Nickerson JA. Nuclear structure in cancer cells. *Nat Rev Cancer*. 2004 Sep;4(9):677-87.
60. Edens LJ, White KH, Jevtic P, Li XY, Levy DL. Nuclear size regulation: from single cells to development and disease. *Trends Cell Biol*. 2013;23:151-159.

61. Chow KH, Factor RE, Ullman KS. The nuclear envelope environment and its cancer connections. **Nat Rev Cancer**. 2012;12:196–209.
62. Webster M, Witkin KL, Cohen-Fix O. Sizing up the nucleus: nuclear shape, size and nuclear-envelope assembly. **J Cell Sci**. 2009;122:1477–1486.
63. Ferreira RC, de Matos PS, Adam RL, Leite NJ, Metze K: Application of the Minkowski fractal dimension for the differential diagnosis in thyroid Follicular neoplasias. **Cellular Oncology**. 2006;28:5-6.
64. Adam RL, Silva RC, Pereira FG, Leite NJ, Lorand-Metze I, Metze K: The fractal dimension of nuclear chromatin as a prognostic factor in acute precursor B lymphoblastic leukemia. **Cell Oncol**. 2006;28(1-2):55-9.
65. Montironi R, Scarpelli M, Lopez-Beltran A, Mazzucchelli R, Alberts D, Ranger-Moore J, Bartels HG, Hamilton PW, Einspahr J, Bartels PH: Chromatin phenotype karyometry can predict recurrence in papillary urothelial neoplasms of low malignant potential. **Cell Oncol**. 2007;29(1):47-58.
66. Baak JP, Van Dop H, Kurver PH and Hermans J: The value of morphometry to classic prognosticators in breast cancer. **Cancer**. 1985;56:374-382.
67. van Diest PJ and Baak JP: The morphometric prognostic index is the strongest prognosticator in premenopausal lymph node-negative and lymph node-positive breast cancer patients. **Hum Pathol**. 1991;22:326-330.
68. Streba CT, Pirici D, Vere CC, Mogoantă L, Comănescu V, Rogoveanu I. Fractal analysis differentiation of nuclear and vascular patterns in hepatocellular carcinomas and hepatic metastasis. **Rom J Morphol Embryol**. 2011;52(3):845-54.
69. Xia R, Boroujeni AM, Shea S, Pan Y, Agrawal R, Yousefi E, Fiel MI, Haseeb MA, Gupta R. Diagnosis of Liver Neoplasms by Computational and Statistical Image Analysis. **Gastroenterology Res**. 2019 Dec;12(6):288-298.
70. Mijovic Z, Kostov M, Mihailovic D, Zivkovic N, Stojanovic M, Zdravkovic M. Correlation of nuclear morphometry of primary melanoma of the skin with clinicopathological parameters and expression of tumor suppressor proteins (p53 and p16(INK4a)) and bcl-2 oncoprotein. **J BUON**. 2013 Apr-Jun;18(2):471-6.
71. Bariani SR, Egami MI, Sakano CRSB, Gomes TS, Costa H, Oshima CTF. Nuclear morphometry with complementary technique in cytological grading of breast tumors cells. **Arq bras ciênc saúde**. 2010;35(3):202-7.
72. Nishihira M, Nakazato Y, Tsuchida S, Kuroda H, Imai Y, Chida M. Nuclear Morphometry of Lung Squamous Cell Carcinomas in Cytologic Study. **Ann Thorac Cardiovasc Surg**. 2018 Dec 20;24(6):303-307.
73. Mendaçolli PJ, Brianezi G, Schmitt JV, Marques MEA, Miot HA. Nuclear morphometry and chromatin textural characteristics of basal cell carcinoma. **Bras. Dermatol**. 2015;90(6):874-8.
74. O'Brien J, Hayder H, Peng C. Automated Quantification and Analysis of Cell Counting Procedures Using ImageJ Plugins. **J Vis Exp**. 2016 Nov 17;(117):54719.
75. Andrea CE; Bleggi-Torres LF; Alves MTS. Nuclear morphometric analysis: description of the methodology and the role of image-editing softwares. **J Bras Patol Med Lab**. 2008;44(1):51-57.
76. Kobayashi S, Saio M, Fukuda T, Kimura K, Hirato J, Oyama T. Image analysis of the nuclear characteristics of emerin protein and the correlation with nuclear grooves and intranuclear cytoplasmic inclusions in lung adenocarcinoma. **Oncol Rep**. 2019 Jan;41(1):133-142.
77. Chen B, Co C, Ho CC. Cell shape dependent regulation of nuclear morphology. **Biomaterials**. 2015 Oct;67:129-36.
78. Deacu M, Aşchie M, Boşoteanu M, Petcu L. Nuclear comparative morphometric study between DCIS and normal resting mammary gland tissue. **Rom J Morphol Embryol**. 2011;52(1 Suppl):303-8.
79. Kesarkar K, Tamgadge A, Peirera T, Tamgadge S, Gotmare S, Kamat P. Evaluation of Mitotic Figures and Cellular and Nuclear Morphometry of Various Histopathological Grades of Oral

- Squamous Cell Carcinoma: Comparative study using crystal violet and Feulgen stains. **Sultan Qaboos Univ Med J**. 2018 May;18(2):e149-e154.
80. Roche BAC, Gutiérrez MBG, Pérez RL, Rodríguez YR, de la Paz IT, Luna YA. A morphometric study of cell nuclei in renal cell carcinoma. **Medicent Electrón**. 2018;22(1):36-44.
 81. Poropatich K, Yang JC, Goyal R, Parini V, Yang XJ. Nuclear size measurement for distinguishing urothelial carcinomas from reactive urothelium on tissue sections. **Diagn Pathol**. 2016 Jun 30;11(1):57.
 82. Ohsaki H, Hirakawa E, Kagawa K, Nakamura M, Kiyomoto H, Haba R. Value of computer-assisted quantitative nuclear morphometry for differentiation of reactive renal tubular cells from low-grade urothelial carcinoma. **Cytopathology**. 2010 Oct;21(5):334-8.
 83. Sheela Devi CS, Suchitha S, Veerendrasagar RS. Evaluation of Nuclear Morphometry and Ki-67 Index in Clear Cell Renal Cell Carcinomas: a Five-Year Study. **Iran J Pathol**. 2017 Spring;12(2):150-157.
 84. Schöchlin M, Weissinger SE, Brandes AR, Herrmann M, Möller P, Lennerz JK. A nuclear circularity-based classifier for diagnostic distinction of desmoplastic from spindle cell melanoma in digitized histological images. **J Pathol Inform**. 2014;5(1):40.
 85. Chaurasia JK, Gupta V, Mayank V, Tiwari IR, Joshi D, Goel G, Kapoor N. Role of nuclear morphometry in diagnosis of salivary gland neoplasms. **Diagnostic Cytopathology**. 2020;48(12):1–13.
 86. Veltri RW, Christudass CS, Isharwal S. Nuclear morphometry, nucleomics and prostate cancer progression. **Asian J Androl**. 2012 May;14(3):375-84.
 87. Vedam VK, Boaz K, Natarajan S. Prognostic efficacy of nuclear morphometry at invasive front of oral squamous cell carcinoma: an image analysis microscopic study. **Anal Cell Pathol (Amst)**. 2014;2014:247853.
 88. Sabo E, Beck AH, Montgomery EA, Bhattacharya B, Meitner P, Wang JY, Resnick MB. Computerized morphometry as an aid in determining the grade of dysplasia and progression to adenocarcinoma in Barrett's esophagus. **Lab Invest**. 2006 Dec;86(12):1261-71.
 89. Razavi MA, Wong J, Akkera M, Shalaby M, Shalaby H, Sholl A, Haddad A, Behl P, Kandil E, Lee GS. Nuclear morphometry in indeterminate thyroid nodules. **Gland Surg**. 2020 Apr;9(2):238-244.
 90. Yang W, Tian R, Xue T. Nuclear shape descriptors by automated morphometry may distinguish aggressive variants of squamous cell carcinoma from relatively benign skin proliferative lesions: a pilot study. **Tumour Biol**. 2015 Aug;36(8):6125-31.
 91. Wen CH, Huang MS, Wang SL, Su YC, Yang SF, Chai CY. Diagnostic value of computerized nuclear morphometry for the prediction of malignancy in liver fine needle aspiration cytology. **Acta Cytol**. 2009 Jan-Feb;53(1):77-82.
 92. Parmar D, Sawke N, Sawke GK. Diagnostic application of computerised nuclear morphometric image analysis in fine needle aspirates of breast lesions. **Saudi J Health Sci**. 2015;4(1):51-55.
 93. Yang W, Tian R, Xue T. Nuclear shape descriptors by automated morphometry may distinguish aggressive variants of squamous cell carcinoma from relatively benign skin proliferative lesions: a pilot study. **Tumour Biol**. 2015 Aug;36(8):6125-31.
 94. Aggarwal, G., Singh, S., Marwah, S., Duhan, A., Mathur, S., Marwah, N., Sen, R. Morphometric Analysis in Breast Lesions A Rapid Conjoint to Intraoperative Imprint Smears. **Middle East Journal of Cancer**, 2012;3(1):1-8.
 95. Karino M, Nakatani E, Hideshima K, Nariai Y, Tsunematsu K, Ohira K, Kanno T, Asahina I, Kagimura T, Sekine J. Applicability of preoperative nuclear morphometry to evaluating risk for cervical lymph node metastasis in oral squamous cell carcinoma. **PLoS One**. 2014 Dec 30;9(12):e116452.
 96. Matsumoto N, Ogawa M, Takayasu K, Hirayama M, Miura T, Shiozawa K, Abe M, Nakagawara H, Moriyama M, Udagawa S. Quantitative sonographic image analysis for hepatic nodules: a pilot study. **J Med Ultrason**. 2015 Oct;42(4):505-12.

97. Bedin V, Adam RL, de Sá BC, Landman G, Metze K. Fractal dimension of chromatin is an independent prognostic factor for survival in melanoma. **BMC Cancer**. 2010 Jun 5;10:260.
98. Metze K, Adam R, Florindo JB. The fractal dimension of chromatin - a potential molecular marker for carcinogenesis, tumor progression and prognosis. **Expert Rev Mol Diagn**. 2019 Apr;19(4):299-312.
99. Ghorbani M, Jonckheere EA, Bogdan P. Gene expression is not random: scaling, long-range cross-dependence, and fractal characteristics of gene regulatory networks. **Front Physiol**. 2018;22(9):1446.
100. Haralick RM. Textural features for image classification. **IEE Transactions on systems, man and cybernetics**. 1973.3:610-21.
101. Cremer T, Albiez H, Bolzer A, Kohler D, Kupper K, Stefan M et al. From chromosome territories to a functional nuclear architecture. **Cellular Oncology**. 2005;27:105-6.
102. Gilbert N. Chromatin architecture of the human genome. **Cellular Oncology**. 2005; 27:106-7.
103. Brigham EO. **The Fast Fourier Transform**. 2^o.ed. New Jersey: Prentice Hall, 1998.
104. Burger W, Burge MJ. **Principles of Digital Image Processing**. 1^a.ed. UK: Springer, 2009.
105. Takahashi M. A fractal model of chromosomes and chromosomal DNA replication. **J Theor Biol**. 1989;141:117–136.
106. Atupelage C, Nagahashi H, Kimura F, Yamaguchi M, Tokiya A, Hashiguchi A, Sakamoto M. Computational hepatocellular carcinoma tumor grading based on cell nuclei classification. **J Med Imaging (Bellingham)**. 2014 Oct;1(3):034501.
107. Bose P, Brockton NT, Guggisberg K, Guggisberg K, Nakoneshny SC, Kornaga E, Klimowicz AC, Tambasco M, Dort JC. Fractal analysis of nuclear histology integrates tumor and stromal features into a single prognostic factor of the oral cancer microenvironment. **BMC Cancer**. 2015; 15:409.
108. Kononen J, Bubendorf L, Kallioniemi A, Bärklund M, Schraml P, Leighton S, Torhorst J, Mihatsch MJ, Sauter G, Kallioniemi OP. Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. **Nat Med**. 1998 Jul;4(7):844-7.
109. Andrade VP, Cunha IW, Silva EM, Ayala F, Sato Y, Ferreira SS, Nascimento CF, Soares FA. Tissue microarrays: high throughput and low cost available for pathologists. **J Bras Patol Med Lab**. 2007;43(1):55-60.
110. Wan WH, Fortuna MB, Furmanski P. A rapid and efficient method for testing immunohistochemical reactivity of monoclonal antibodies against multiple tissue samples simultaneously. **J Immunol Methods**. 1987 Oct 23;103(1):121-9.
111. Almeida JS, Costa HO, Lima FO, Pinheiro Jr. N, Oshima CTF, Gomes TS, Franco M. Loss of tissue samples in the tissue microarray: comparison between techniques using commercial adhesive tape, silane-coated microslides by the conventional method and by a modified technique. **Bras Patol Med Lab**. 2008;44(5):359-365.

ANEXO A - Atestado para defesa

ATESTADO

Na qualidade de professora orientadora do aluno Jordan Boeira dos Santos atestando que a dissertação tem condições de ser submetida à banca examinadora e que o pós graduando obteve todos os créditos necessários e demais exigências do nível, exigidas pelo PPG.

Porto Alegre, 09 de março de 2021.



Professora orientadora

ANEXO B - Carta do orientador

CARTA DO ORIENTADOR

Declaro que revisei a versão final da dissertação “Análise da morfometria nuclear e textura da cromatina de amostras de carcinoma hepatocelular de pacientes transplantados hepáticos”, de autoria do mestrando Jordan Boeira dos Santos, tendo constatado que foram feitas as correções sugeridas pela Banca Examinadora, estando apta ao registro da Biblioteca da FAMED em consonância com as normas exigidas por esse PPG.

Porto Alegre, 14 de abril de 2021.



Professora orientadora