



UNIUNEA EUROPEANĂ



GUVERNUL ROMÂNIEI  
MINISTERUL MUNCII, FAMILIEI ȘI  
PROTECȚIEI SOCIALE  
AMPOSDRU



Fondul Social European  
POS DRU 2007-2013



Instrumente Structurale  
2007-2013



MINISTERUL  
EDUCAȚIEI  
CERCETĂRII  
TINERETULUI  
ȘI SPORTULUI

OIPOSDRU



UNIVERSITATEA DE  
MEDICINĂ ȘI  
FARMACIE CRAIOVA

**Investește în oameni!**  
**FONDUL SOCIAL EUROPEAN**  
**Programul Operațional Sectorial Dezvoltarea Resurselor Umane 2007-2013**

**Axa Prioritară: 1**  
**Educația și formarea profesională în sprijinul creșterii economice și dezvoltării societății bazate pe cunoaștere**

**Domeniul Major de Intervenție: 1.5**  
**Programe doctorale și postdoctorale în sprijinul cercetării**

**Titlu proiect**  
**"Dezvoltarea școlilor doctorale prin acordarea de burse tinerilor doctoranzi cu frecvență"**

**Contract nr: POSDRU/88/1.5/S/52826**

**Beneficiar**  
**Universitatea de Medicină și Farmacie din Craiova**

---

**UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE  
DIN CRAIOVA  
FACULTATEA DE MEDICINĂ**

**TEZĂ  
DE  
DOCOTRAT  
- REZUMAT -  
MICRODISECȚIA LASER  
ȘI  
EXPRESIA GENICĂ ÎN  
CARCINOMUL  
HEPATOCELULAR**

*Conducător Științific:*  
Profesor Iancu Emil PLEȘEA

*Doctorand:*  
Corina Gabriela COTOI

**2012**

## CUPRINS

|   |           |
|---|-----------|
| <b>C U P R I N S .....</b>  | <b>I</b>  |
| <b>A B R E V I E R I .....</b>  | <b>V</b>  |
| <b>I N T R O D U C E R E .....</b>  | <b>1</b>  |
| <b>STADIUL CUNOAȘTERII .....</b>  | <b>3</b>  |
| <b>CAPITOLUL I CARCINOMUL HEPATOCELULAR .....</b>                                     | <b>4</b>  |
| <b>EPIDEMIOLOGIE.....</b>   | <b>5</b>  |
| <b>ETIOLOGIE .....</b>  | <b>6</b>  |
| <i>CIROZA HEPATICĂ.....</i>   | <i>7</i>  |
| <i>HEPATITA VIRALĂ .....</i>  | <i>7</i>  |
| <i>AFLATOXINA B1 .....</i>  | <i>11</i> |
| <i>ALCOOLUL .....</i>   | <i>11</i> |
| <i>TUTUNUL .....</i>  | <i>12</i> |
| <i>DIABETUL, OBEZITATEA, SINDROMUL METABOLIC ȘI STEATOZA HEPATICĂ</i><br><i>.....</i> | <i>12</i> |
| <i>BOLI AUTOIMUNE .....</i>   | <i>13</i> |
| <b>CARACTERE CLINICE .....</b>  | <b>13</b> |
| <i>SEMNE ȘI SIMPTOME .....</i>  | <i>13</i> |
| <b>IMAGISTICA .....</b>   | <b>14</b> |
| <b>PATOLOGIE .....</b>  | <b>15</b> |
| <i>MACROSCOPIE.....</i>   | <i>15</i> |
| <i>MICROSCOPIE .....</i>  | <i>16</i> |
| <i>STADIALIZAREA HCC .....</i>  | <i>20</i> |
| <i>PRECURSORI ȘI LEZIUNI INCIPIENTE .....</i>   | <i>23</i> |
| <b>CAPITOLUL II NOI ABORDĂRI ÎN HEPATOCARCINOGENEZĂ....</b>                           | <b>26</b> |
| <b>CĂI DE SEMNALIZARE ÎN CARCINOMUL HEPATOCELULAR .....</b>                           | <b>29</b> |
| <i>CĂI DE SEMNALIZARE ALE PROLIFERĂRII .....</i>                                      | <i>30</i> |

---

|  |           |
|--|-----------|
| <i>CĂI IMPLICATE ÎN INFLAMAȚIE</i> .....   | 33        |
| <i>CĂI IMPLICATE ÎN DEYVOLTAREA FICATULUI ȘI DIFERENȚIEREA<br/>CELULARĂ</i> .....  | 34        |
| <i>CĂI IMPLICATE ÎN NEOANGIOGENEZĂ</i> .....   | 35        |
| <i>GENA SUPRESOARE TUMORALĂ P53</i> .....  | 36        |
| <b>CAPITOLUL III TRATAMENTUL ȘI TERAPIILE ABLATIVE<br/>PRETRANSPLANT ÎN CARCINOMUL HEPATOCELULAR</b> .....                     | <b>38</b> |
| <b>STADIALIZAREA HCC</b> .....   | <b>39</b> |
| <b>METODE TERAPEUTICE</b> .....  | <b>41</b> |
| <i>REZECȚIA CHIRURGICALĂ</i> .....   | 41        |
| <i>TRANSPLANTUL HEPATIC</i> .....  | 42        |
| <i>ABLAȚIA PERCUTANĂ</i> .....   | 43        |
| <i>EMBOlizAREA-CHEMOEMBOLIZAREA TRANSARTERIALĂ</i> .....   | 43        |
| <i>ALTE OPȚIUNI</i> .....  | 44        |
| <b>TERAPII MOLECULARE</b> .....  | <b>45</b> |
| <b>TERAPII ABLATIVE LOCALE PRETRANSPLANT</b> .....   | <b>45</b> |
| <b>CONTRIBUȚIA PERSONALĂ</b> .....   | <b>48</b> |
| <b>SCOPUL STUDIULUI</b> .....  | <b>49</b> |
| <b>CAPITOLUL IV MATERIAL ȘI METODE</b> .....   | <b>50</b> |
| <b>MATERIALE</b> .....   | <b>51</b> |
| <b>METODE</b> .....  | <b>51</b> |
| <i>EXAMENUL MACROSCOPIC</i> .....  | 51        |
| <i>EXAMENUL MICROSCOPIC</i> .....  | 52        |
| <i>MICRODISECȚIA LASER</i> .....   | 52        |
| <i>PURIFICAREA ARN-ULUI TOTAL PRIN MICRODISECȚIE DIN SECȚIUNILE<br/>TISULARE FIXATE ÎN FORMOL ȘI INCLUSE ÎN PARAFINĂ</i> ..... | 56        |
| <i>EVALUAREA PRODUCȚIEI ȘI CALITĂȚII ARN-ULUI TOTAL</i> .....  | 59        |
| <i>ANALIZA CONTROLULUI CALITĂȚII</i> .....   | 59        |

---

|  |            |
|--|------------|
| <i>TEHNICA WHOLE GENOME DASL ASSAY .....</i>   | <i>62</i>  |
| <i>ANALIZA STATISTICĂ.....</i>   | <i>78</i>  |
| <b>CAPITOLUL V REZULTATE ȘI DISCUȚII.....</b>  | <b>83</b>  |
| <b>1. ASPECTE CLINICO-PATOLOGICE .....</b>   | <b>84</b>  |
| <i>INTERPRETAREA DATELOR CLINICE.....</i>  | <i>84</i>  |
| <i>ASPECTE MACROSCOPICE ȘI HISTOLOGICE.....</i>  | <i>86</i>  |
| <b>2. EXTRAȚIA ARN ȘI EVALUAREA CONTROLULUI CALITĂȚII</b>                                  | <b>97</b>  |
| <b>3. REALIZAREA PROFILULUI GENIC .....</b>  | <b>105</b> |
| <i>EXPRESIA GENICĂ ÎN HCC CLASIC COMPARATIV CU DIFERENȚIEREA<br/>COLANGIOCELULARĂ.....</i> | <i>105</i> |
| <i>EXPRESIA GENICĂ ÎN HCC COMPARATIV CU ȚESUTUL HEPATIC ADIACENT<br/>.....</i>             | <i>123</i> |
| <b>C O N C L U Z I.....</b>  | <b>142</b> |
| <b>B I B L I O G R A F I E .....</b>   | <b>145</b> |

## ABBREVIERI

|                 |  |
|-----------------|--|
| <b>A</b>        | Adenină  |
| <b>AFP</b>      | Alfa fetoproteină  |
| <b>ASO</b>      | Oligonucleotide test-specifice (Assay Specific Oligo)                              |
| <b>C</b>        | Citozină   |
| <b>CCd</b>      | Diferențiere colangio-celulară (Cholangiocellular differentiation)                 |
| <b>ADNc</b>     | ADN complementar   |
| <b>DASL</b>     | cDNA-mediated Annealing, Selection, Extension, and Ligation                        |
| <b>Dif Scor</b> | Scor diferențial   |
| <b>ADN</b>      | Acid dezoxiribonucleic   |
| <b>DPV</b>      | Valoarea p de detecție (Detection P-Value)   |
| <b>DSO</b>      | Oligonucleotid anti-sens (Downstream-Specific Oligo)                               |
| <b>FF</b>       | Preparat proaspăt/înghețat (Fresh/Frozen)  |
| <b>FFPE</b>     | Țesut fixat în formol și inclus în parafină (Formalinfixed, paraffin- embedded)    |
| <b>FGF</b>      | Factor de creștere fibroblastic (Fibroblast growth factor)                         |
| <b>G</b>        | Guanină  |
| <b>GO</b>       | Ontologie genică (Gene ontology)   |
| <b>GTP</b>      | Guanozin trifosfat   |
| <b>H-E</b>      | Hematoxină-Eozină  |
| <b>HBV</b>      | Virus hepatitic B (Hepatitis B virus)  |
| <b>HCC</b>      | Carcinom hepatocelular (Hepatocellular carcinoma)                                  |
| <b>HCV</b>      | Virus hepatitic C (Hepatitis C virus)  |
| <b>ICS</b>      | Illumina iScan™ Software   |
| <b>IGF</b>      | Factorul de creștere asemănător insulinei (Insulin-like growth factor)             |
| <b>MAPK</b>     | Protein kinaza activată de mitogeni (Mitogen-activated protein kinase)             |
| <b>ARNm</b>     | ARN mesager  |
| <b>NASH</b>     | Steatohepatită non-alcoolică (Non-alcoholic steatohepatitis)                       |
| <b>OLT</b>      | Transplant hepatic ortoptic (Orthotopic liver transplantation)                     |
| <b>OPN</b>      | Osteopontină   |
| <b>PCR</b>      | Reacția de polimerizare în lanț (Polymerase chain reaction)                        |
| <b>PEN</b>      | Polietilen-naftalat  |
| <b>qPCR</b>     | PCR cantitativă  |
| <b>RIN</b>      | Numărul de integritate ARN (RNA integrity number)                                  |
| <b>ARN</b>      | Acid ribonucleic   |
| <b>RT-PCR</b>   | Real time-PCR  |
| <b>TACE</b>     | Chemoembolizare transarterială (Transarterial chemoembolization)                   |
| <b>TGF-β</b>    | Factorul de creștere de transformare beta (Transforming growth factor-beta)        |
| <b>U</b>        | Uracil   |
| <b>USO</b>      | Oligonucleotid sens (Upstream-Specific Oligo)                                      |
| <b>VEGF</b>     | Factorul de creștere al endoteliului vascular (Vascular endothelial growth factor) |
| <b>WG-</b>      | Genom complet (Whole genome)   |

## INTRODUCERE

Carcinomul hepatocelular (HCC) este al cincelea cel mai frecvent tip de cancer la bărbați și al șaptelea la femei, fiind a treia cauza de deces prin cancer la nivel mondial [<http://globocan.iarc.fr>]. Incidența totală a HCC rămâne crescută în țările în curs de dezvoltare și este în creștere în multe din țările industrializate [Shariff et al. 2009], făcându-l un domeniu de interes pentru cercetătorii de pretutindeni.

Singurul tratament curativ pentru HCC este transplantul hepatic [El-Serag și Mason, 1999; Llovet și colab 2003; Geschwind și colab 2003], dar penuria de donatori de organe poate duce la o perioadă mai lungă în care pacienții trebuie să rămână pe lista de așteptare [Stippel și colab 2003]. Astfel, terapia intervențională radiologică, mai ales embolizarea transarterială (TACE), prezintă un interes în creștere și o importanță deosebită, deoarece este o “punte spre transplant” [Graziadei și colab 2003; Yao și colab 2005; Porrett și colab 2006; Lencioni și colab 2005; Decaens și colab 2005]. Datorită rezultatelor contradictorii ale TACE există încă discuții cu privire la eficiența acesteia [Porrett și colab 2006; Pompili și colab 2005; Ravaioli și colab 2004; Sotiropoulos și colab 2005; Veltri și colab 1998; Majno și colab 1997]. A fost de asemenea sugerat că la anumiți pacienți ar putea induce o forma mai agresivă de HCC, caracterizată printr-un fenotip biliar [Lee și colab 2006; Zen și colab 2011].

De asemenea, patogenia HCC nu este încă bine înțeleasă. Pentru identificarea mecanismelor moleculare și genomice implicate în tumorigeneza hepatică, tehnologia microarray a fost aplicată pe scară largă, mai multe studii ale expresiei genice fiind efectuate în ultimii 10 ani [Maass și colab 2010]. Unul dintre dezavantajele tehnologiei disponibile până de curând a fost limitarea acesteia la ARN-ul extras din țesuturi proaspete/înghețate (FF), sau culturi de celule. Descoperirile recente au făcut posibilă obținerea ARN-ului de bună calitate din țesutul fixat în formol și inclus în prafină (FFPE), ceea ce permite accesul la o resursă de arhivă practic nelimitată, disponibilă pentru studii clinico-patologice retrospective și prospective pe termen lung.

Metoda de evaluare a profilului genic DASL (cDNA-mediated Annealing, Selection, Extension and Ligation) concepută de Illumina Inc. a fost dezvoltată pentru analiza probelor de ARN fragmentat [April și colab 2009; Bibikova și colab 2004a; Bibikova și colab 2004b], care este, de obicei, o consecință a fixării în formol.

Microdisecția laser este o tehnică ce permite izolarea populațiilor de celule specifice [Blatt și Srinivasan 2008] sau a anumitor zone microscopice de interes din mostrele de țesut. Acest lucru permite evaluarea selectivă a expresiei genice în populațiile de celule țintă [Tachikawa și Irie 2004], în special într-un mediu foarte heterogen, cum este țesutul malign.

Am ales acest subiect, în special deoarece face parte din domeniile actuale de interes în cercetare. În plus, nu există nici o publicație în literatura de specialitate care să menționeze utilizarea de probe hepatice FFPE, în combinație cu microdisecția laser și analiza DASL a întregului genom, care conferă un element de originalitate studiului meu. Elucidarea semnăturilor genomice ale HCC poate fi utilizată pentru a ajuta la caracterizarea modificărilor moleculare responsabile pentru dezvoltarea sa și ar putea fi extrem de valoroasă în dezvoltarea de noi markeri tumorali și obiective terapeutice noi.

Vreau să menționez faptul că această lucrare este rezultatul grijii îndelungate a unor oameni care m-au ghidat și m-au învățat tot ce știu și alături de care am lucrat și am învățat să iubesc Anatomia Patologică. Eu îi voi păstra întotdeauna în inima mea și vreau să le mulțumesc din tot sufletul profesorului Emil Pleșea, doctorului Alberto Quaglia și profesoarei Cristiana Simionescu, precum și tuturor celor care m-au ajutat de-a lungul acestui drum.

Nu în ultimul rând vreau să trimit toată dragostea mea părinților mei, pentru că fără ajutorul și sprijinul lor nu aș fi nimic din ceea ce sunt azi ...

---

## **STADIUL CUNOAȘTERII**

Capitolul I – “Carcinomul hepatocelular” descrie în detaliu ultimele date cu privire la epidemiologia carcinomului hepatocelular, etiologia, caracteristicile clinice și aspectele imagistice și histopatologice ale acestuia.

Capitolul II – “Noi abordări în hepatocarcinogeneză” prezintă noile abordări în contextul înțelegerii procesului de hepatocarcinogeneză cu referiri speciale la căile de semnalizare implicate recent în patogeneza acestei afecțiuni.

Capitolul III – “Tratament și terapii ablativ pre-transplant în carcinomul hepatocelular” tratează terapiile curative, ablativ și molecular în HCC, detaliind avantajele și dezavantajele utilizării acestora.

## **CONTRIBUȚIA PERSONALĂ**

### **SCOPUL STUDIULUI**

Studiul a fost conceput pentru a răspunde la următoarele întrebări:

- Există vreo diferență între profilul expresiei genice a carcinomului hepatocelular în comparație cu țesutul hepatic adiacent?
- Există vreo diferență între profilul expresiei genice a tipului classic de HCC comparative cu zonele de diferențiere colangiocelulară, după TACE?

### **MATERIALE**

Douăzeci și nouă de cazuri de HCC care au suferit transplant de ficat sau rezecție, precedate de TACE (doxorubicină 40mg/m<sup>2</sup>) între 2008 și 2010, au fost recuperate din arhiva laboratorului de histopatologie al Institutului de Studii Hepatice al King’s College Hospital, Londra. Înainte de tratamentul TACE, toți nodulii au fost diagnosticați radiologic ca fiind HCC, conform criteriilor Asociației Europene pentru Studiul Ficatului [Bruix și colab 2000] datorită examenului imagistic concordant al leziunilor nodulare arterializate cu eliminare venoasă portală.

### **METODE**

#### **EXAMEN MACROSCOPIC**

Ficații extirpați în timpul intervenției chirurgicale au fost primiți proaspeți și au fost apoi secționați în felii paralele, la interval de aproximativ 1 cm. Douăzeci și opt de cazuri au suferit transplant hepatic și doar unul a fost tratat prin hepatectomie dreaptă.

Procedura de examinare standard a inclus de evaluarea macroscopică, evaluarea numărului, dimensiunii și localizării diferiților noduli tumorali. Ei au fost măsurați în cele 3 dimensiuni, diametrele maxime fiind înregistrate. Ficatul a fost re-examinat după fixare în formol, iar tumorile au fost secționate extensiv. Țesutul fixat în formol a fost inclus în parafină, și secțiunile au fost colorate cu Hematoxilină-Eozină (H-E), ca parte a evaluării histologice de rutină.

#### **EXAMENUL MICROSCOPIC**

Secțiunile microscopice cu probe din fiecare tumoră au fost analizate cu ajutorul unui microscop Olympus. Parenchimul hepatic în care hepatocitele au păstrat o dispoziție în cordoane, cu nuclei colorați, au fost considerate viabile. Zonele de țesut neviabil au fost identificate ca zone de necroză confluentă de coagulare la nivelul parenchimului hepatic, cicatrizare fibroasă și/sau țesut de granulație.



---

Cele mai multe dintre HCC post-TACE examinate în acest studiu au avut focare microscopice de carcinom hepatocelular viabil, precum și țesut lezional cu caracteristici de necroză de coagulare, cicatrizare fibroasă, inflamație și țesut de granulație, concordante cu efectele terapiei. Cazurile fără tumori viabile nu au fost incluse în studiile moleculare ulterioare.

Componenta viabilă a fost evaluată din punct de vedere al diferențierii tumorale și prezența caracteristicilor care sugerează diferențiere combinată hepato-colangiocelulară, cum ar fi formarea de canalicule, structuri glandulare sau alte pattern-uri combinate de creștere [Zen și colab 2011]. A fost examinat de asemenea și ficatul adiacent în secțiunile la distanță față de tumori.

### **MICRODISECTIA LASER**

Țesuturile fixate în formol și incluse în parafină (FFPE) au fost, de asemenea, secționate la grosimea de 5 $\mu$ m folosind un microtom Leica. Secțiunile au fost plasate pe lame speciale fără RN-aze, tapetate cu un strat de naftalat de polietilenă(PEN), apoi disecate cu ajutorul laserului, folosind sistemul Leica LMD 6000.

Sistemul Leica LMD 6000 rulează un software de morfometrie care a permis calculul instantaneu în  $\mu$ m<sup>2</sup> a zonelor selectate pentru microdisecție. O suprafață de aproximativ 10.000.000  $\mu$ m<sup>2</sup> a fost colectată în tuburi de microcentrifugă de 1,5 ml.

### **PURIFICAREA ARN-ULUI TOTAL DIN SECȚIUNI OBȚINUTE PRIN MICRODISECTIE, DIN ȚESUTURI FIXATE ÎN FORMOL ȘI INCLUSE ÎN PARAFINĂ**

Următorul pas a fost purificarea ARN-ului total din secțiunile obținute prin microdisecție laser din țesuturi fixate în formol și incluse în parafină (FFPE), folosind RNeasy QIAGEN ® Kit FFPE pentru purificarea ARN-ului total, după protocol stabilit de către producător.

### **Prezentare generală (adaptat după manualul QIAGEN RNeasy® FFPE Kit)**

Procedura folosește condiții optimizate de lizare care permit ARN-ului total să fie purificat din secțiunile de țesut FFPE. Contaminarea ADN-ului este eliminată în timpul pasului de digestiei cu DNază, împreună cu oricare alte molecule fragmentate care ar putea exista în mostre.

La începutul procesului toată parafina a fost eliminată din secțiunile tisulare FFPE prin tratare cu xilen. Apoi a fost adăugat Etanol 100% pentru a extrage orice urmă reziduală de xilen din eșantion. În continuare, probele au fost incubate într-un tampon de liză optimizat, care conține proteinază K, pentru a elibera ARN-ul din aceste secțiuni. O incubare scurtă la o temperatură mai înaltă a înlăturat parțial punțile dintre acizii nucleici, formate datorită tratamentului cu formol, îmbunătățind randamentul și calitatea ARN-ului. Tratamentul cu DNază care a urmat a fost conceput pentru a elimina tot ADN-ului genomic, inclusiv fragmentele foarte mici care ar putea fi prezente în mostrele de FFPE. În continuare, lizatul a fost amestecat cu tampon RBC. Au fost create condiții adecvate ARN-ului prin adăugarea de etanol. Mostrele au fost apoi transferate într-o coloană pentru centrifugare, RNeasy MinElute, care conținea o membrană pentru legarea ARN-ului, contaminanții fiind înlăturați. ARN-ul a fost apoi diluat în 14  $\mu$ l de apă fără RN-aze.

### **EVELUAREA PRODUCȚIEI ȘI CALITĂȚII ARN-ULUI TOTAL**

Concentrația de ARN purificat a fost determinată cu ajutorul unui spectrofotometru NanoDrop (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE), prin măsurarea absorbanței la 260 nm (A260) și 280 nm (A280).

---

O absorbantă de 1 unitate la 260 nm corespunde la 40 micrograme pe ml de ARN ( $A_{260} = 1 = 40 \mu\text{g} / \text{ml}$ ). Raportul determinărilor de la 260 nm și 280 nm ( $A_{260}/A_{280}$ ) oferă o estimare a purității ARN-ului ținând cont de agenții de contaminare care absorb UV, cum ar fi proteinele. ARN-ul pur are un raport  $A_{260}/A_{280}$  de 1.8-2.0.

Mostrele purificate de ARN total au fost depozitate în congelator la  $-80^\circ \text{C}$  până la controlul calității (QC) și studiul analizei expresiei genice.

### **ANALIZA CONTROLULUI CALITĂȚII**

Controlul calității (QC) a fost realizat cu ajutorul Qubit® Quantitation Platform și Agilent 2100 Bioanalyzer, reprezentând o analiză cu fluorescență și una bazată pe electroforeză.

#### **Testarea cantitativă bazată pe fluorescență – Prezentare generală (adaptată după manualul de instrucțiuni al fluorometrului Qubit®)**

Acest proces folosește un kit de cuantifiare a ARN-ului, pentru a cuantifica probele în vederea realizării metodei DASL a întregului genom.

Deoarece kitul de test Quant-iT™ Kit folosește coloranți selectivi pentru ARN, agenții de contaminare din eșantion nu ar trebui să afecteze cuantificarea. Illumina recomandă utilizarea unui fluorometer, mai degrabă decât a unui spectrofotometru, deoarece fluorometria oferă cuantificare specifică ARN, în timp ce spectrofotometria ar putea măsura și ADN-ul, valorile rezultate nefiind tocmai exacte. Qubit® Quantitation Platform a fost folosit datorită sensibilității mari la determinările cu fluorescență.

#### **Testul electroforetic – Prezentare generală (adaptat după ghidul expertului pentru utilizarea Agilent 2100 bioanalyzer)**

Testele au fost executate cu Agilent 2100 Bioanalyzer, iar datele au fost interpretate cu ajutorul software-ului 2100 expert.

Testele electroforetice se bazează pe principiile tradiționale de electroforeză în gel, dar folosesc cipuri. Fiecare cip este compus din mai multe godeuri pentru mostre și gel, și un godeu pentru un standard extern (scară). Scara conține componente de dimensiuni cunoscute, prin urmare, o curbă standard în funcție de timpul de migrare și de dimensiunea fragmentelor poate fi generată.

Dimensiunea este calculată cu ajutorul timpilor de migrare măsurați pentru fiecare fragment din eșantion. Aria scării este utilizată pentru cuantificare, ceea ce înseamnă că zona de sub scara este comparată cu suma zonelor de vârf din eșantion, neluând în considerare zona de sub markerul "inferior". Soluția marker conține un fragment de 50 bp de ADN și este afișată ca primul vârf în electroferogramă.

Când godeurile și canale sunt ocupate, electrozii sunt conectați la o sursă de tensiune și cipul funcționează ca un circuit electric integrat. Gradientul de tensiune conduce electroforetic biomoleculele ARN, fragmentele mai mici migrând mai repede decât cele mari. În acest fel, moleculele sunt separate în funcție de mărime.

Pe măsură ce moleculele de colorant se intercalează în fragmentele ARN, aceste complexe pot fi detectate cu ajutorul fluorescenței induse de laser. În acest fel, datele sunt transmise ca imagini-bandă și electroferograme. Integritatea probei de ARN total se determină cu ajutorul raportului ribozomal și numărului de integritate (RIN). Numerele de la '1' la '10' sunt folosite pentru a eticheta mostrele, '10' însemnând că nu există degradare și '1' fiind alocat pentru un eșantion complet degradat.

---

## **ANALIZA GENOMICĂ COMPLETĂ PRIN METODA DASL**

Integritatea acizilor nucleici este foarte importantă în analiza microarray. ARN-ul din țesutul FFPE este adesea degradat și modificat chimic [Masuda și colab 1999; Srinivasan și colab 2002]. Metoda DASL (cDNA-mediated Annealing, Selection, extension and Ligation) de analiză a profilului genic a Illumina Inc. este special concepută pentru analiza probelor de ARN fragmentate [April și colab 2009; Bibikova și colab 2004a; Bibikova și colab 2004b].

### **Prezentare generală (ghidul tehnicii DASL de analiză genomică completă)**

Analiza WG-DASL a început prin conversia ARN-ului total în ADNc prin reacția de transcripție inversă. Această reacție a folosit oligo-dT18 biotinitat și primeri aleatori. ADNc biotinitat a fost combinat cu oligonucleotide specifice (ASO), special concepute pentru o secvență continuă, unică, de 50 de nucleotide pe fiecare ADNc. Aceste oligonucleotide sunt compuse din două părți: un oligonucleotid specific sens (USO), care conține o secvență 3'-specifică și un primer PCR 5' universal, precum și un oligonucleotid specific anti-sens (DSO) care conține o secvență 5'-specifică și un primer PCR 3' universal [Fan și colab 2004]. Secvența specifică genică corespunde unei secvențe de captare de pe cipurile cu godeuri. Au fost folosite un număr de 47.000 de perechi de oligonucleotide (sonde), derivate din baza de date informațională de secvențe a Centrului Național pentru Biotehnologie (Build 36.2, Release 38). ASO au fost apoi combinate cu ADNc biotinitat iar amestecul a fost legat de particule paramagnetice conjugate cu streptavidină pentru selecția complexelor ADNc/oligo. A urmat extensia polimerică a USO și legarea de DOS specifice. Produsele rezultate au fost amplificate prin PCR și marcate cu un primer universal fluorescent. Produsele unicateenare marcate au fost apoi hibridizate pe secvențe complementare din cipurile Illumina Whole-Genome Gene Expression Human HT-12 v4, și scanate cu iScan™ Reader.

### **Controlul calității datelor de expresie genică**

Controlul calității (QC) datelor este un pas important în realizarea oricărui studiu microarray al expresiei genice. Illumina Gene Expression BeadChips au caracteristici de control intern pentru a monitoriza calitatea datelor.

Caracteristicile de control ale BeadStudio sunt fie independente sau dependente de mostre. Eșantioanele independente de mostre folosesc oligonucleotide în soluția de hibridizare. Rezultatele slabe ar putea indica o problemă generală cu hibridizarea, spălarea, sau colorarea. Valorile dependente de mostre se bazează pe măsurători efectuate în probele reale. Rezultatele slabe ale acestor controale pot indica o problemă legată de probă sau de marcare.

Variațiile normale ale valorilor martor pot apărea din cauza unor factori, cum ar fi configurarea sistemului, originea probei, precum și tipul de BeadChip. Acești factori fac dificilă determinarea calității datelor prin compararea cu o valoare specifică pentru fiecare QC metric. Pentru a minimiza influența acestor factori, valori relative de control au fost utilizate drept criterii de QC.

Comparații relative ale valorilor de control ar putea fi făcute prin identificarea valorilor aberante prin comparație cu datele curente și istorice. Mostrele pentru orice control dat pot fi rapid identificate în BeadStudio prin utilizarea graficului sumativ al controlului, extrapolându-le pentru a vizualiza valorile QC pentru mostrele individuale.

Pentru a permite detectarea valorilor aberante din eșantion, a fost folosită comanda Illumina "Genes detected".

BeadStudio calculează și raportează o valoare detectată p (Genes Detected), care reprezintă probabilitatea ca un anumit produs de transcripție să fie exprimat la o valoare superioară fondului definit de către probele de control negativ.

---

Acest scor de detectare determina dacă o transcriere pe matrice se numeste detectată. O valoare sub pragul celei definite de utilizator de 0,01 sau 0,05 indică o gena detectată.

Toate probele de pe un anumit BeadChip, preparate din aceeași sursă ar trebui să aibă un număr similar de produși de transcripție detectați. Valorile extreme ar putea indica faptul că probele sunt aberante și ar trebui repetate sau excluse din analiza ulterioară.

## **ANALIZĂ STATISTICĂ**

### **Extragerea de date și normalizarea**

Software-ul Illumina iScan™ (versiunea 3.2 ICS) a fost folosit pentru a extrage și normaliza datele (intensitățile fluorescenței) pentru intensitatea medie a tuturor matricelor. Normalizarea transformă gama de valori de intensitate pentru o serie de cipuri pentru a se potrivi cu o gama de valori țintă bazate pe un fișier de mapare asociat cu fiecare tip de manifest BeadChip și cu fiecare fișier cluster. ICS normalizează datele din fișier \*.Idat pentru o serie BeadChip și generează un semnal genotipic. Datele normalizate și semnalele genotipice au fost salvate în format \*.gtc.

### **Analiza detelor de expresie genică**

Modulul GenomeStudio™ Gene Expression v1.0 a fost folosit pentru a analiza datele expresiei genice folosind fișierul intensitate din imaginile scanate microarray generate de sistemul™ iScan. Acest software poate fi folosit pentru analiza genică, pentru cuantificarea expresiei genice sau pentru diferențierea expresiei genice, analiză care poate determina probabilitatea ca nivelul expresiei genice să se schimbe între două grupuri sau eșantioane.

Acest software face media valorilor pentru fiecare genă detectată, și algoritmi utilizează în mod automat duplicate pentru a furniza estimări ale abundenței relative mRNA și pentru detectarea expresiei genice diferențiale.

Pe scurt, pentru a identifica gene diferențiat exprimate, au fost aplicate următoarele: o valoare de detectare  $p < 0,01$  și un scor diferențial  $> 13$  (care corespunde unei valori a  $p < 0,05$ ) folosind corecția Benjamini și Hochberg pentru Rata de Detecție Negativă, aplicată testelor multiple. În acest studiu, acolo unde este cazul, grupuri de probe au fost folosite ca replici biologici.

### **Metode și algoritmi de normalizare**

Pachetul software Illumina are algoritmi de normalizare care ajustează semnalele din mostre, pentru a minimiza efectele factorilor non-biologici, cum ar fi diferențele dintre matrice și chip-uri. În primul rând, este creată o mostră "virtuală" calculată matematic, care reprezintă intensitățile medii ale probelor în toate mostrele din grup. O normalizare medie a fost utilizată, unde fondul a fost scăzut de la intensități probelor, înainte de a fi scalate, cu un factor egal cu raportul dintre intensitatea medie a eșantionului virtual și intensitatea medie a eșantionului dat. Ca urmare, jumătate din țintele neexprimate ar avea semnale negative, după eliminarea fondului.

### **Algoritmi ai Expresiei Diferențiale**

Pentru a determina diferențele de expresie genică între un grup de probe (grupul condiționat) și un grup de referință, a fost folosit testul  $t$ . Atunci când grupul de referință sau grupul condiționat au conținut cel puțin 2 probe, varianța a fost estimată între eșantioane replicate; altfel varianța a fost calculată în funcție de variația dintre godeuri. Testul  $t$  a presupus varianță egală.

Pentru fiecare probă a fost calculat scorul diferențial (Dif Scor) după cum urmează:

$$\text{Dif Scor} = (10 \operatorname{sgn}(I_{\text{cond}} - I_{\text{ref}}) \log_{10}(p)) \quad I = \text{intensitate}$$

---

Scorul diferențial este o transformare a valorii  $p$  ce oferă o direcție pentru valoarea  $p$  bazată pe diferențele dintre semnalul mediu în grupul de referință și grupul de comparație.

- **Pentru o valoare  $p$  de 0,05, Dif Scor =  $\pm 13$**
- **Pentru o valoare  $p$  de 0,01, Dif Scor =  $\pm 20$**
- **Pentru o valoare  $p$  de 0,001, Dif Scor =  $\pm 30$**

Pentru o anumită genă s-au calculat Dif Scor mediu pentru probele corespunzătoare. Pentru calculul unei valori  $p$  din Dif Scor s-a utilizat următoarea formulă:

$$p = 1/(10[\text{Dif Scor} / 10(\text{sgn}(\text{Icond} - \text{Iref}))])$$

Pentru comparații multiple s-a aplicat rata de detecție negativă Benjamini-Hochberg pentru a reduce șansele de a identifica gene ca rezultate fals negative sau fals pozitive. Principiul acestei corecții este că valoarea  $p$  pentru fiecare genă este clasificată de la cea mai mică la cea mai mare. Cea mai mare valoare a  $p$  nu este modificată. Cea mai mare a doua valoare  $p$  este înmulțită cu numărul total de gene ( $n$ ) în lista de gene și împărțită la rangul său ( $n-1$ ). În cazul în care rezultatul este mai mic decât 0,05, gena este considerată ca fiind semnificativă. A treia cea mai mare valoare a  $p$  este înmulțită ca înainte, adică valoare  $p$  corectată = valoarea  $p$  ( $n/n-2$ ). În cazul în care rezultatul este mai mic de 0,05, acesta este considerat ca fiind semnificativ. Acest proces se repetă pentru toate valorile  $p$  ulterioare.

### **Valoarea $p$ de detecție (DPV)**

Valoarea  $p$  de detecție este probabilitatea ca semnalul unei anumite probe să fie mai mare decât semnalul mediu al controalelor negative. Se calculează cu ajutorul ecuației:

$$DPV = 1 - R/N$$

$R$  = rangul scorului  $Z$  al probelor analitice

$N$  = numărul de controale negative

Scorul  $Z$  se calculează cu ajutorul următoarei ecuații:

$$Z_{ig} = I - \mu_i^{\text{neg}} / \sigma_i^{\text{neg}}$$

$\mu_i^{\text{neg}}$  semnalul mediu al controalelor negative pe proba  $i$  și gena  $g$

$\sigma_i^{\text{neg}}$  deviația standard pe proba  $i$  și gena  $g$

Atunci când probele au fost combinate pentru a forma un grup, pentru scorul  $Z$  s-a realizat o medie. Dacă scorul  $Z$  pentru intensitatea probei a fost mai mic decât cel mai mic scor  $Z$  negativ de control, valoarea  $p$  a fost de 1. Dacă scorul  $Z$  al intensității probei s-a clasat în intervalul scorului  $Z$  pentru martorii negativi, valoarea  $p$  a fost în intervalul 0-1. Dacă scorul  $Z$  al intensității probei a fost mai mare decât cel mai mare scor  $Z$  negativ de control, valoarea  $p$  a fost egală cu 0.

### **Aspecte urmărite**

Analiza statistică a datelor rezultate din aplicarea metodei DASL a întregului genom a fost special concepută pentru a răspunde următoarelor întrebări:

- Există diferențe între profilul expresiei genice a carcinomului hepatocelular în comparație cu țesutul hepatic adiacent?
- Există diferențe între profilul expresiei genice al tipului clasic de HCC în comparație cu zonele de diferențiere cholangiocelulară, după TACE?

---

Tumorile aparținând unui singur caz au fost numite HCC1, HCC2, ..., HCCx, unde x a fost numărul maxim de tumori microdisecate pentru fiecare caz în parte. O bază de gene a fost creată pentru carcinomul hepatocelular, în care a fost inclusă o singură tumoră pentru fiecare caz, deoarece diferența între numărul de mostre pentru comparație a fost prea mare pentru utilizarea tuturor probelor (34 probe HCC vs 19 probe țesut hepatic adiacent). Profilul expresiei genice HCC a fost analizat statistic în comparație cu baza de gene creată pentru țesutul hepatic adiacent corespunzător (19 probe HCCs vs 19 probe țesut hepatic adiacent). Semnalul mediu, valoarea p de detecție și scorul diferențial au fost calculate pentru fiecare genă.

O bază de gene diferită a fost creată pentru diferențierea colangiocelulară, acesta fiind comparată cu fondul genic creat pentru tipul clasic de HCC. Semnalul mediu, valoarea p de detecție și scorul diferențial au fost calculate pentru fiecare genă.

## **REZULTATE ȘI DISCUȚII**

Rezultatele și discuțiile au fost împărțite în patru secțiuni, care acoperă aspectele clinico-patologice și biomoleculare, inclusiv extracția ARN și evaluarea controlului calității, precum și realizarea profilului genic și interpretarea datelor.

### **ASPECTE CLINICO-PATOLOGICE**

Șapte (24%) din cei 29 de pacienți incluși în studiu au fost de sex feminin și 22 (76%) de sex masculin.

Vârsta pacienților la momentul intervenției chirurgicale hepatice a variat între 47 și 67 de ani (medie = 58 ani).

În ceea ce privește etiologia tumorilor, 13 (45%) dintre acestea s-au dezvoltat în contextul infecției HCV, 5 (17%) au fost induse de alcool și 3 (10%) au apărut în contextul infecției cu HVB. Am găsit de asemenea un HCC (3,6%) în ficatul unui pacient cu sindrom Budd-Chiari, 2 (7%) în contextul steatozei hepatice non-alcoolice (NASH), 1 (3,5%) în contextul deficitului de alfa-1 antitripsină și 2 (7%) ca urmare a unor afecțiuni autoimune (hepatită autoimună și sindromul de suprapunere hepatită autoimună/colangită sclerozantă primară). Două cazuri (7%) au avut o etiologie necunoscută.

Unsprezece dintre cei 29 de pacienți incluși în studiu au prezentat concentrații serice crescute de alfa-fetoproteină pre-TACE (38%). Ei au primit între 1 și 4 cicluri de TACE, cu un timp mediu între tratament și procedura de transplant de 7,1 luni (de la 1 la 86 luni). În prezent, 27 (93%) dintre pacienți sunt încă în viață, supraviețuirea medie generală fiind de 35.7 luni (interval 19-77 luni).

Majoritatea explanturilor hepatice (16) au prezentat tumori în lobul drept (55,2%), 10 dintre ele în ambii lobi drept și stâng (34,5%), și doar 3 numai în lobul stâng (10,3%).

Toate tumorile examinate au fost sub 5 cm. Cincisprezece din explanturile hepatice (52%) au prezentat tumoră unică, 7 (24%) au avut 2 tumori, 2 (7%) au avut 3 tumori și 5 (17%) 4 sau mai multe tumori.

Din totalul de 65 de tumori examinate, 51 (78,4%) au prezentat focare viabile și 14 (21,%) au fost în întregime necrozate. În consecință, 7 (24%) din cei 29 de pacienți au fost excluși din studiile ulterioare din cauza absenței țesutului tumoral viabil.

Necroză tumorală extinsă a fost observată la 12 (41,4%) dintre pacienți, zonele de tumoră neviabilă constând dintr-o combinație de necroză, fibroză cicatricială și țesut de granulație.

Carcinomul hepatocelular viabil a prezentat o gamă largă de diferențiere, de la bine la slab diferențiat. Douăzeci și patru dintre nodulii identificați (47%) au fost carcinom hepatocelular moderat diferențiat, 8 (15,5%) dintre ei au fost bine diferențiați și 3 (5,9%), slab

---

diferențiați. Au fost, de asemenea, și tumori cu diferențiere bifazică, 13 (25,5%) dintre ele fiind moderat diferențiate și una (1,96%) bine diferențiată, cu zone de slabă diferențiere și, de asemenea, 2 noduli (3,92%) moderat diferențiați cu mici zone bine diferențiate. Invazia vasculară macroscopică sau microscopică a fost prezentă la 13 din explantele hepatice examinate (44,8%).

Fenotipul tumoral a fost în cea mai mare parte hepatocelular, dar 7 (13,7%) dintre ei au prezentat un fenotip mixt, inclusiv glandular/pseudoglandular și cu componentă colangiocelulară. Etiologia acestor tumori cu fenotip mixt a fost infecția cu HCV în 4 cazuri, celelalte fiind legate de consumul de alcool, sindromul Budd-Chiari și într-un caz NASH.

La examinarea țesutului hepatic adiacent, 26 dintre cazuri (89,6%) au prezentat ciroză și doar 3 cazuri (10,4%) aveau fibroză în punți, fără transformare cirotică.

Evaluarea răspunsului tumoral după terapiile loco+regionale este importantă în determinarea succesului terapeutic și în ghidarea terapiei ulterioare [Vossen și colab 2006].

Studiul de față este în conformitate cu literatura de specialitate, 24,1% dintre pacienții neavând boală reziduală la examenul histopatologic al explantului, necroza tumorală extinsă fiind obținută la 41,4% dintre pacienți, și aproximativ 14% dintre ei prezintă un fenotip mixt hepatocelular-colangiocelular. Etiologia acestei tumori cu fenotip mixt a fost, în majoritatea cazurilor, infecția cu HCV, rezultat care impune investigații suplimentare pentru descoperirea unei posibile corelații între infecția virală și diferențierea colangiocelulară post-TACE a HCC.

Potrivit ghidurilor de practică medicală [Bruix și Sherman 2011], un răspuns complet la TACE este atins la mai puțin de 2% dintre pacienți, rata de răspuns obiectiv variind de la 16% la 60%, 50% dintre pacienți având totuși necroză tumorală extinsă [Bruix și Sherman 2011].

Yao și colab au prezentat un studiu prospectiv, în 2005, abordând tratamentul loco-regional pretransplant [Yao și colab 2005]. Ei au obținut o reducere relevantă a la 70% dintre pacienți, necroza tumorală completă fiind atinsă în 44% dintre cazuri, rezultate superioare celor publicate de Majno și colab, Decaens și colab și Zen și colab [Decaens și colab 2005; Majno și colab 1997; Zen și colab 2011]. Decaens și colab au evaluat două loturi separate, lotul TACE și lotul control (la care nu s-a aplicat TACE), ambele alcătuite din 100 de pacienți. Treizeci la sută dintre pacienții luați în studiu au prezentat necroză sau subtotală [Decaens și colab 2005]. Una dintre primele publicații care se ocupa de TACE aplicat pretransplant a aparținut lui Majno și colab în 1997 [Majno și colab 1997]. Ei au început să aplice TACE pretransplant la sfârșitul anilor 1980, acesta constituind o parte importantă a tratamentului. Cincizeci și patru din cazuri au primit TACE anterior OLT, necroza tumorală completă fiind atinsă în 27%, jumătate din pacienții lor prezentând o reducere a stadiului [Majno și colab 1997]. În 2005 Sotiropoulos și colab săi au raportat rezultate similare, cu regresie tumoră la mai mult de 50% dintre pacienți [Sotiropoulos și colab 2005].

În ceea ce privește necroza tumorală după TACE, Zen și colab au studiat 80 de noduli HCC la 64 de pacienți care au fost transplantați la Institutul de Studii Hepatice între 2004 - 2010. Rezultatele lor au fost comparabile cu cele raportate în ultimul deceniu [Graziadei și colab 2003; Porrett și colab 2006; Decaens și colab 2005; Ravaioli și colab 2004; Majno și colab 1997; Kim și colab 2006; Wong și colab 2004; Yao și colab 2005; Sotiropoulos și colab 2005; Bharat și colab 2006; Cheng și colab 2005].

Morisco și colab [Morisco și colab 2008] au studiat efectul diferitelor modalități de terapie ablativă locală la 26 de pacienți cu HCC, constatând tumorii viabile în majoritatea explanturilor hepatice, alte studii ajungând și ele la concluzii similare [Wong și colab 2004; Marin și colab 2009; Eguchi și colab 2009]. În seria lui Kim și colab [Kim și colab 2006] necroza completă a fost observată în aproximativ o treime din carcinoamele hepatocelulare post-TACE, cu nici o diferență semnificativă în ceea ce privește numărul de tumori, marimea

---

tumorii, nodulii sateliți, invazia capsulară sau vasculară, comparativ cu carcinoamele netratate.

Evaluarea histologică a răspunsului tumoral are multe limitari, chiar și la probele derivate din rezecții chirurgicale sau transplant. Masa tumorală poate fi tăiată în secțiuni subțiri, în special după fixare, chiar cu utilizarea de bare de metal pentru a ghida lama bisturiului sau cuțitului. Chiar și secțiunile de câțiva mm grosime sunt mult prea mari comparativ cu câmpurile microscopice în care sunt evaluate relațiile dintre tumora reziduală și modificările post-TACE.

O altă limitare este reprezentarea histologică a întregii suprafețe tumorale. Acest lucru poate fi realizat pentru tumorile de formă rotundă sau ovală, în care diametrul transversal este de până la aproximativ 20 mm. Secțiuni transversale multiple complete ale întregii suprafețe tumorale pot fi incluse individual în casete convenționale care, în ciuda limitării legate de grosimea secțiunii descrise mai sus, ar reprezenta în mod rezonabil suprafața întregii tumori. În astfel de cazuri, presupunând că grosimea secțiunii este cunoscută și rămâne constantă, iar reprezentarea histologică a tumorii viabile și neviabile se menține de-a lungul grosimii secțiunii, ar fi posibil de calculat volumul tumorii, precum și volumetria proporțională a leziunii viabile și neviabile, sau chiar necroza, cicatricile fibroase, tesutul de granulație și diversele arii de dediferențiere tumorală, probabil cu ajutorul unui software de reconstrucție 3D. O abordare similară ar fi imposibilă pentru tumorile mai mari, cum includerea ar implica un număr mare de blocuri convenționale, cu excepția cazului în care ar fi utilizate "megablocuri" [Cotoi et al 2012a].

Un alt aspect ce trebuie luat în considerare este definiția morfologică a necrozei. Necroza post-TACE în HCC apare microscopic ca o zonă omogenă de material amorf eozinofil, cu fantome celulare în fundal, de multe ori cu menținerea structurii reticulice și a structurii sinusoidale, care pot fi evidențiate prin impregnare argentică sau prin imunohistochimie pentru markeri endoteliali. Adevărata stare a țesutului morfologic "viabil" intercalat între zonele de necroză sau în zonele învecinate rămâne însă, de obicei, necunoscută. Un studiu anterior a arătat ca zonele peritumorale ce par viabile pot fi de fapt defuncte atunci când tehnicile histochemice sunt aplicate pentru a testa funcția enzimatică [Morimoto și colab 2002].

Răspunsul tumorii la tratament ar putea consta și în diferențierea într-un fenotip matur, simulând țesutul non-neoplazic omolog. Acest lucru a fost observat în hepatoblastom [Saxena și colab 1993], și într-un model murin de regresie a HCC și progresia a acestuia în urma activării / inactivării c-mic [Shachaf și colab 2004]. Cu alte cuvinte, țesutul care apare non-neoplazic și viabil ar putea fi mort și / sau neoplazic în diferite combinații.

Terapia ablativă locală este acum utilizată pentru alte organe în afară de ficat, pentru cancer primar sau metastatic, inclusiv pulmonar și renal. Cele mai multe dintre datele din literatura accesată în legătură cu acest subiect sunt orientate clinic și nu oferă multe informații cu privire la aspectele histologice ale țesutului după tratament. Nu au fost raportate alte modificări histologice tumorale pe biopsie sau pe piesele de rezecție, în afară de cele asociate cu necroza de coagulare [Gebauer și colab 2007; Margulis și colab 2004; Steinke și colab 2002].

## **EXTRACȚIA ARN ȘI EVALUAREA CONTROLULUI CALITĂȚII**

Din țesutul fixat în formol, inclus la parafină și izolat prin microdiseție laser, din 22 de cazuri cu tumori viabile, s-a purificat ARN-ului care ulterior a fost analizat spectrofotometric. Concentrația medie a ARN-ului a fost de 42.3 ng / microlitri (interval: 5.4 - 178.1), cu o medie a raportului 260:280 de 1,95 (interval: 1.66 - 2.21).

Șapte din probele nu au trecut de testul controlului calității și nu au fost incluse în evaluarea WG-DASL, astfel, analiza desfașurându-se pe 20 din cele 29 de cazuri inițiale.



---

Este cunoscut faptul că formaldehida reacționează cu acizii nucleici în mai multe moduri. Formarea unei N-metanol (N-CH<sub>2</sub>OH), urmat de un atac electrofil pentru a forma o punte metilenică între grupările amino a fost speculată de Srinivasan și colab [Srinivasan și colab 2002]. Masuda și colab au încercat să demonstreze această ipoteză utilizând oligo ARN. Studiul lor a relevat că reactivitatea bazelor scade în următoarea ordine: U < G < A / C, subliniind faptul că grupul terțiar amino este prima țintă a formolului. [Masuda și colab 1999] Cu acest punct de pornire, McGhee și von Hippel au ajuns la concluzia că segmentul poli (A) al mRNA ar fi puternic modificat de fixare. Astfel, transcripția inversă nu ar sintetiza lanțuri ADNc de cea mai bună calitate, datorită unei atașări inadecvate a oligo (dT) la segmentul poli (A) [McGhee și colab 1977].

Un alt dezavantaj al sintezei ADNc este degradarea ARN-ului cauzată de fixarea în formol, ceea ce înseamnă că ARN-ul purificat din țesuturi FFPE ar putea să nu conțină nici segvența poli (A), nici zona țintă pentru amplificarea PCR [Masuda și colab 1999]. Acest ARN extrem de degradat s-a dovedit a fi util în studiile convenționale microarray [Karsten și colab 2002]. Kitul Illumina WG-DASL folosește primeri aleatori în faza de sinteză a ADNc, în special pentru a contracara dezavantajele fixării în formol, regiunile unice ale genei fiind recunoscute de probe, fără a se limita atașarea probelor doar la capătul 3' a transcripțiilor [Bibikova și colab 2004b].

Mai multe studii au fost efectuate în ultimii ani folosind metoda DASL pentru genom extins, pe diferite țesuturi FFPE normale și patologice, inclusiv cancer mamar, de prostată, ficat, colon și plămâni [Bibikova și colab 2004a; Kibriya și colab 2010; Bibikova și colab 2004b; Hoshida și colab 2008]. Unul dintre aceste studii efectuat pe probe de colon a constatat că seturile de gene exprimate diferit ce au fost identificate în probele FFPE sunt asemănătoare celor identificate în probele proaspăt congelate, dar cu aproximativ 50% mai puține gene detectate în testele care au folosit ARN purificat din țesuturi de FFPE [Bibikova și colab 2004b]. Un alt studiu reproductibil pe prostata, colon, sân și țesut pulmonar, a demonstrat că este posibilă realizarea profilului expresiei genice din ARN-ului extras din țesut FFPE. Prin folosirea metodei DASL și a microarray-urilor universale, în ciuda degradării extinse a materialului, autorii au demonstrat că metoda DASL combină avantajele analizei expresiei genice array cu cele ale qPCR multiplex [Bibikova și colab 2004a]. În interpretarea datelor, importantă a fost recunoașterea faptului că rezultatele metodei DASL reflectă extensia și ligarea oligonucleotidelor de interogare. Măsurarea expresiei genice se face în mod indirect, depinzând de "competiția pentru marcarea", în amplificarea PCR. Astfel, modificările semnalului de hibridizare pot să nu reflecte schimbările în numărul de produși de transcripție în modul cel mai adecvat [Bibikova și colab 2004a].

Hoshida și colab au folosit ARN-ul extras din probe de țesut FFPE macrodisecat de carcinom hepatocelular și țesut hepatic adiacent pentru o analiză genică extinsă prin metoda DASL. Ei au obținut date de înaltă calitate de la 90% dintre pacienții lor, inclusive din probele care au fost depozitate pentru mai mult de 24 de ani [Hoshida și colab 2008].

În 2010 Kibriya și colab au efectuat un studiu privind cancerul de sân, utilizând metoda WG-DASL, și au comparat profilul expresiei genice din probele FFPE cu cel din probele proaspăt congelate (FF). Similaritățile dintre probele FFPE și probele FF în ceea ce privește clasificarea ontologică a genelor, au sugerat ca țesutul FFPE poate fi folosit cu succes pentru identificarea grupurilor de gene care pot fi exprimate în mod diferit în tumori [Kibriya și colab 2010].

Studiul de față confirmă fezabilitatea realizării profilului genic prin combinația dintre microdisecția laser în țesut FFPE, analiza întregului genom prin metoda DASL și analiza diferențială și grupată. Această metodologie se poate aplica la investigarea afecțiunilor hepatice în care diferite sub-populații celulare se află în relație strânsă, datorită configurației microscopice speciale a ficatului, din cauza diluării și contaminării ARN-ului în cazul în care

---

sunt utilizate probe cu țesut integral pentru extracția ARN. Această metodologie este adecvată pentru studii moleculare pe carcinomul hepatocelular, având în vedere heterogenitatea morfologică caracteristică acestei tumori, incluzând aici și varianta mixtă hepatocolangiocelulară [Cotoi și colab 2012b].

## **REALIZAREA PROFILULUI EXPRESIEI GENICE**

### ***PROFILUL EXPRESIEI GENICE A HCC CLASIC COMPARATIV CU DIFERENȚIEREA COLANGIOCELULARĂ***

Așa cum a arătat și literatura de specialitate anterioară, modificările induse de TACE nu sunt doar de ordin morfologic. Kim și colab [Kim și colab 2001] au descris proliferarea tumorală activă și a celulelor endoteliale, în zonele adiacente necrozei, proliferare ce se reduce odată cu creșterea distanței față de țesutul necrozat. Într-un studiu ulterior al lui Sergio și colab [Sergio și colab 2008] pacienții cu imagistică ce demonstrează ablația tumorală parțială, au prezentat concentrații serice ridicate ale VEGF, comparativ cu cei cu răspuns complet, sugerând că TACE incompletă poate induce angiogeneza în tumora reziduală. Nivelurile VEGF, de asemenea, par să se coreleze cu AFP înainte de TACE, confirmând în continuare semnificația prognostică a ambilor parametri [Farinati și colab 2006] și sugerând existența unui subgrup de HCC, caracterizat printr-o biologie mai agresivă [Sergio și colab 2008]. În același studiu al lui Sergio și colab, în plus față de corelarea cu numărul de leziuni, VEGF a relevat și o corelație deosebit de importantă cu supraviețuirea. Nivelurile de VEGF sub medie au avut un caracter predictiv puternic pentru o supraviețuire mai îndelungată: șaptezeci la sută dintre pacienții cu niveluri scăzute ale VEGF erau în viață după 4 ani, iar concentrația VEGF a reprezentat singurul factor predictiv independent pentru supraviețuire [Sergio și colab 2008].

Beta-FGF s-a corelat de asemenea semnificativ cu vascularizația HCC și mărirea tumorii, confirmând faptul că factorii angiogenici sunt produși și eliberați într-o măsură mai mare în tumorile în stadiu mai avansat și puternic vascularizate [Sergio și colab 2008]. De asemenea, creșterea expresiei p53 poate suprima apoptoza și stimula proliferarea în HCC, după TACE [Xiao și colab 2004]. Ravaioli și colab au constatat o expresie mai redusă a e-caderinei în celulele tumorale viabile și a sugerat că necroza parțială poate fi asociată cu pierderea adezivității celulare și dislocarea celulelor tumorale cu eliberarea lor în torentul sanguin [Ravaioli și colab 2004].

Analiza diferențială dintre profilul genic al subpopulației clasice de carcinom hepatocelular și profilul genic din diferențierea colangiocelulară (CCd) a evidențiat 175 de gene a căror expresie a fost semnificativ diferită, dar fără a respecta corecția multiplă Benjamini Hochberg. Un număr total de 72 de gene au avut expresie scăzută în HCC în comparație cu CCd, în timp ce 103 gene s-au dovedit a avea expresie crescută.

Profilul genic a fost analizat în continuare utilizând platforma de analiză a rețelelor de transcripție FunNet [www.funnet.info], un instrument integrativ pentru explorarea interacțiunilor de transcripție în seturi de date microarray de expresie a genelor. O rată de detecție negativă de 5% a fost utilizată pentru a ajusta valorile p de îmbogățire pentru temele analizate. Calculele au fost efectuate prin luarea în considerare a unor niveluri distincte de specificitate reprezentate în ontologia genică (GO). Genele cu expresie crescută, în concordanță cu procesele biologice în contextul ontogeniei genice, sunt mai frecvent implicate în percepția senzorială de miros, răspunsul la stimuli, translație, inițierea translațională, reglarea inițierii translației, procesele de specificare a pattern-urilor, răspunsul la căldură, procesele catabolice ARNm transcrise la nivel nuclear, degradarea mediată non-sens, reglarea proliferării celulare, reglarea secreției de insulină, și migrarea celulelor. S-a arătat că genele cu expresie scăzută sunt mai frecvent implicate în semnalizarea intercelulară, adeziunea celulară, dezvoltarea sistemului nervos, activarea plachetară, localizarea proteinelor

---

celulare, transportul hem, degranularea plachetară, inhibarea creșterii celulare și adeziunea dintre celule și matricea extracelulară.

Genele au fost investigate cu ajutorul Gene Sets Enrichment Analysis – gene families enquiry (<http://www.broadinstitute.org>). În grupul de gene cu expresie crescută au fost identificate o oncogenă, patru factori de transcripție, din care 3 sunt proteine homeodomeniu și 2 gene care aparțin familiei citokinelor și factorilor de creștere. În grupul de gene cu expresie scăzută au fost identificate câte o genă pentru fiecare din următoarele categorii: proteinkinaze, gene supresoare tumorale și markeri de diferențiere celulară, 7 factori de transcripție și 4 citokine și factori de creștere.

Genele cu expresie diferențiată au fost, de asemenea, verificate cu ajutorul bazei de date pentru interacțiuni ale căilor molecular a National Cancer Institute/Nature website ([http://pid.nci.nih.gov/search/batch\\_query.shtml](http://pid.nci.nih.gov/search/batch_query.shtml)) pentru identificarea cailor moleculare în care sunt implicate.

### **PROFILUL EXPRESIEI GENICE ÎN HCC COMPARATIV CU ȚESUTUL HEPATIC ADIACENT**

Analiza diferențială dintre profilul expresiei genice în carcinomului hepatocelular și profilul expresiei genice în țesutul hepatic adiacent a arătat 77 gene care au avut o expresie diferită semnificativ. Un număr total de 60 de gene au avut expresie scăzută în HCC comparative cu profilul expresiei genice în țesutul hepatic înconjurător, în timp ce 17 gene s-au dovedit a avea expresie crescută.

Datele legate de profilul genic au fost analizate în continuare folosind platforma de analiză a rețelelor de transcripție FunNet [[www.funnet.info](http://www.funnet.info)]. Calculele au fost efectuate prin luarea în considerare a unor niveluri distincte de specificitate reprezentate în ontologia genică (GO). Genele cu expresie crescută, în concordanță cu procesele biologice în contextual ontogeniei genice, sunt mai frecvent implicate în inhibarea prometafazei mitotice, răspunsul la factorul de necroză tumorală, răspunsul la interferonul-gamma, modificarea proteinelor prin conjugarea proteinelor mici, răspunsul la stimulii chimici, răspunsul la acidul retinoic, transportul mediat post-Golgi, translația și inițierea translației, calea de semnalizare a receptorului proteic cuplat cu protein G, stimularea cascade kinază I-kapaB/NF-kapaB, stimularea apoptozei. Conform proceselor biologice din ontologia genică, genele cu expresie scăzută s-au dovedit a fi mai frecvent implicate în catabolismul drogurilor, procesele de biosinteză a peroxidului de hidrogen, inhibarea activității peptidazei, activarea complementului-calea lectinei.

Genele au fost investigate cu ajutorul Gene Sets Enrichment Analysis – gene families enquiry (<http://www.broadinstitute.org>), fiind indentificate o oncogenă translocată și două proteinkinaze. În grupul genelor cu expresie scăzută au fost identificate o genă supresoare tumorală/factor de transcripție, o proteinkinază, două gene pentru factori de transcripție și două gene pentru factori de creștere.

Genele cu expresie diferențiată au fost, de asemenea, verificate cu ajutorul bazei de date pentru interacțiuni ale căilor molecular a National Cancer Institute/Nature website ([http://pid.nci.nih.gov/search/batch\\_query.shtml](http://pid.nci.nih.gov/search/batch_query.shtml)) pentru identificarea cailor moleculare în care sunt implicate.

Tehnologia microarray a fost aplicat pe scară largă, cu scopul identificării mecanismelor moleculare și genomice implicate în carcinogeneza hepatică. În ultimii zece ani, au fost realizate un număr mare de studii al profilului expresiei genice.

Lau și colab [Lau și colab 2000] au fost primii care au folosit tehnologia microarray pentru a compara profilurile expresiei genice în HCC și țesuturi hepatice fără cancer, mai multe studii similare fiind efectuate de la acea dată.

---

Mai multe căi genetice cu expresie modificată au fost identificate prin intermediul unor analize microarray, comparând HCC cu țesutul hepatic adiacent non-tumoral. Căile de semnalizare TGF-B, MAPK, IGF-2, Jak / STAT, Wnt și p53 au fost unele dintre aceste rețele genetice modificate [Delpuech și colab 2002; Okabe și colab 2002; Iizuka și colab 2002; Wurmbach și colab 2007; Boyault și colab 2007], categoriile de gene exprimate diferit fiind cel mai frecvent implicate în progresia ciclului celular, apoptoză, răspuns imun, clivarea ARN, sistemul de reparare a ADN-ului, degradarea proteinelor, adeziunea celulară, enzimele metabolice, detoxifiere, matrice extracelulară, citoschelet, și de asemenea, citokine, factori de creștere, oncogene, gene supresoare tumoral, și protein de legare a GTP-ului [Delpuech și colab 2002; Okabe și colab 2002; Chen și colab 2002; Tsai și colab 2006; Zindy și colab 2005; Wang și colab 2009]. Toate aceste constatări au fost confirmate de către studiul de față.

Un număr foarte mare de gene au avut o expresie genică semnificativ crescută în HCC, cum ar fi cele ce reglementează proliferarea celulară, sistemul de reparare a ADN-ului [Delpuech și colab 2002; Zindy și colab 2005], conținutul matricei extracelulare și al citoscheletului [Delpuech și colab 2002; Tsai și colab 2006], precum și cele care codifică proteinele secretate [Wang și colab 2009]. În studiul meu, în urma analizei amănunțite a literaturii de specialitate, cel mai mare grup de gene cu expresie crescută au fost, de asemenea, implicate în creșterea și proliferarea tumorală și în sinteza proteinelor.

În HCC, comparativ cu țesutul hepatic non-tumoral, expresia cea mai redusă au avut-o genele asociate cu răspunsul imun [Delpuech și colab 2002; Chen și colab 2002; Tsai și colab 2006; Wang și colab 2009], detoxificare [Delpuech și colab 2002; Iizuka și colab 2002; Tsai și colab 2006], codificarea enzimelor metabolice [Delpuech și colab 2002; Okabe și colab 2002; Chen și colab 2002, Tsai și colab 2006; Wang și colab 2009], și genele implicate în codificarea unei game largi de proteie plasmatică [Delpuech și colab 2002; Chen și colab 2002; Tsai și colab 2006]. Studiul meu este în conformitate cu literatura de specialitate, cele mai multe gene cu expresie redusă pe care le-am identificat fiind implicate, în ordine, în creșterea și proliferarea celulară, apoptoză, în răspunsul inflamator și în căile metabolice. Faptul că rezultatele mele sunt comparabile cu cele din literatura de specialitate, poate fi extrapolat și folosit ca un control intern pentru validitatea tuturor datelor de expresia genică care le-am analizat în această lucrare.

Analiza microarray a relevat, de asemenea, diferențe în expresia genelor între tipul clasic de HCC și CCd. Literatura de specialitate anterioară studiului meu a subliniat mai mult decât diferențe morfologice între cele două, dar o analiza a genomului nu a mai fost efectuată.

Numărul mare de gene cu expresie diferită arată că există o modificare semnificativă a semnalului genetic. Nu este clar dacă această modificare este marca unei agresivități crescute, studii suplimentare fiind necesare pentru a valida această ipoteză, incluzând cazuri de recidivă tumorală și supraviețuire pe termen lung, pe care nu am fost în măsură să le abordez în această lucrare, din cauza numărului mic de cazuri analizate.

Căile genetice ce par a avea o expresie mai redusă în tipul clasic de HCC, comparativ cu CCd sunt legate de proliferarea și supraviețuirea celulară, o cercetare amplă a literaturii dezvăluind rolul lor în progresia ciclului celular și în apoptoză.

Unul dintre dezavantajele acestor metode, cum și studiul de față a arătat, este faptul că multe gene individuale, exprimate diferit în HCC în comparație cu țesutul hepatic adiacent, nu pot fi confirmate de la un studio microarray la altul. Prin urmare, concentrarea atenției pe categoriile de gene mai sus menționate pare mai utilă.

A fost, de asemenea, sugerat ca țesutul FFPE poate fi folosit cu succes în microarray-uri în locul țesutului FF, pentru identificarea grupurilor de gene care pot fi exprimate diferit în tumori, dar nu și a unor gene individuale, din cauza variației numărului și conținutul listei de gene detectate [Kibriya și colab 2010].

---

Un alt dezavantaj al tehnicilor utilizate în studiul meu este faptul că măsurarea expresiei genice prin metoda WG-DASL a fost făcută în mod indirect, depinzând de "competiția pentru marcarea", în amplificarea PCR. Astfel, modificările semnalului de hibridizare pot să nu reflecte schimbările în numărul de produși de transcriptie în modul cel mai adecvat [Bibikova și colab 2004a]. De asemenea, expresia genelor a fost evaluată doar la nivel de mARN, care poate sau nu să fi echivalentă cu expresia proteică. Acest lucru deschide o ușa pentru viitoare studii, în scopul validării rezultatelor.

Profilul genic al HCC poate fi folosit la caracterizarea modificărilor moleculare responsabile pentru dezvoltarea HCC și ar putea fi extrem de valoros în descoperirea unor noi markeri tumorali. În plus, noi ținte terapeutice pot fi identificate prin intermediul metodei WG-DASL, în special atunci când este utilizată în asociere cu microdisecția laser și extragerea ARN din țesuturi la parafină.

## **CONCLUZII**

Evaluarea histologică a tumorilor post-TACE a arătat că distrugerea tumorii a fost obținută la 42,85% dintre pacienți, cu distrugerea completă la 25% dintre aceștia, rezultate ce confirmă în mare datele descrise în literatura de specialitate.

Cele mai multe dintre tumorile post-TACE viabile au fost moderat diferențiate, dar au existat, de asemenea, și tumori bifazice, prezentând un amestec de pattern moderat diferențiat cu pattern bine sau slab diferențiat. Paisprezece la suta dintre acestea au prezentat un fenotip mixt hepato-colangiocelular, observație care sprijină ideea unei diferențieri fenotipice asociate cu TACE.

În acest studiu am prezentat o abordare nouă a profilului expresiei genice pe baza combinației microdisecției laser pe țesut FFPE și analiză genomică completă prin metoda DASL. Am reușit obține semnale de expresie genică din carcinom hepatocelular, precum și din țesut hepatic adiacent cirotic sau necirotic. Tehnica whole genome DASL assay poate fi utilizată pe probe FFPE obținute prin microdisecție laser, în ciuda degradării compoziției chimice a ARN, oferind posibilitatea de a investiga anumite populații de celule dintr-un material histologic arhivat. Astfel, analiza diferențială și grupată a fost fezabilă pentru investigarea profilurilor expresiei genice obținute.

Rezultatele statistice au arătat că cele mai mari grupuri de gene cu expresie crescută în HCC comparativ cu țesutul hepatic adiacent sunt implicate în creșterea și proliferarea tumorală, și sinteza proteică. Grupurile de gene cu expresie scăzută sunt legate de apoptoză, creșterea și proliferarea celulară, răspunsul inflamator și căile metabolice. Aceste rezultate sunt similare cu cele găsite în literatura de specialitate.

Rezultatele au aratat, de asemenea, o diferență în profilul expresiei genice în HCC clasic în comparație cu diferențierea colangiocelulară a tumorii după TACE, care par a fi legate de, dar nu limitate la supraviețuirea celulară și potențialul invaziv. Aceste rezultate creează premisele unor studii viitoare, adăugând în același timp informații prețioase într-un domeniu care abia începe să fie descoperit.

În continuare se pot efectua analize diferențiale și pe grupuri în diferitele subtipuri de HCC (HCC clasic și cu diferențiere colangiocelulară) și între HCC dezvoltate în diferite contexte etiologice, cu scopul obținerii unei imagini mai clare asupra patogeniei cancerului hepatic.

---

Este, de asemenea, necesară validarea studiului prin intermediul imunohistochimiei și RT-PCR, în încercarea de a identifica gene unice, care pot fi vizate în terapia carcinomului hepatocelular, sau care ar putea explica diferitele aspecte morfologice ale HCC după TACE, acestea putând fi cheia pentru un tratament mai bun al malignității.

**BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ**

1. \*\*\* [http://pid.nci.nih.gov/search/batch\\_query.shtml](http://pid.nci.nih.gov/search/batch_query.shtml); accessed on September, 2012.
2. \*\*\* <http://www.broadinstitute.org>; accessed on September, 2012.
3. \*\*\* [www.funnet.info](http://www.funnet.info), accessed on September, 2012.
4. \*\*\* <http://globocan.iarc.fr/factsheet.asp>, accessed on July, 2012;
5. April C, Klotzle B, Royce T, Wickham-Garcia E, Boyaniwsky T, Izzo J, Cox D, Jones W, Rubio R, Holton K, Matulonis U, Quackenbush J, Fan JB (2009) Whole-genome gene expression profiling of formalin-fixed, paraffin-embedded tissue samples, *PLoS One*, 4(12):e8162.
6. Bharat A, Brown DB, Crippin JS, Gould JE, Lowell JA, Shenoy S, Desai NM, Chapman WC (2006) Pre-liver transplantation locoregional adjuvant therapy for hepatocellular carcinoma as a strategy to improve longterm survival, *J Am Coll Surg*, 203(4):411-420.
7. Bibikova M, Talantov D, Chudin E, Yeakley JM, Chen J, Doucet D, Wickham E, Atkins D, Barker D, Chee M, Wang Y, Fan JB (2004) Quantitative gene expression profiling in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues using universal bead arrays, *Am J Pathol*, 165(5):1799-1807 (a).
8. Bibikova M, Yeakley JM, Chudin E, Chen J, Wickham E, Wang-Rodriguez J, Fan JB (2004) Gene expression profiles in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues obtained with a novel assay for microarray analysis, *Clin Chem*, 50(12):2384-2386 (b).
9. Blatt R, Srinivasan S (2008) Defining disease with laser precision: laser capture microdissection in gastroenterology, *Gastroenterology*, 135(2):364-369.
10. Boyault S, Rickman DS, de RA, Balabaud C, Rebouissou S, Jeannot E, Hérault A, Saric J, Belghiti J, Franco D, Bioulac-Sage P, Laurent-Puig P, Zucman-Rossi J (2007) Transcriptome classification of HCC is related to gene alterations and to new therapeutic targets, *Hepatology*, 45(1):42-52.
11. Bruix J, Sherman M, Llovet JM, Beaugrand M, Lencioni R, Burroughs AK, Christensen E, Pagliaro L, Colombo M, Rodés J; EASL Panel of Experts on HCC (2001) Clinical management of hepatocellular carcinoma. Conclusions of the Barcelona-2000 EASL conference. European Association for the Study of the Liver, *J Hepatol*, 35(3):421-430.
12. Bruix J, Sherman M; American Association for the Study of Liver Diseases (2011) Management of hepatocellular carcinoma: an update, *Hepatology*, 53(3):1020-1022.
13. Chen X, Cheung ST, So S, Fan ST, Barry C, Higgins J, Lai KM, Ji J, Dudoit S, Ng IO, Van De Rijn M, Botstein D, Brown PO (2002) Gene expression patterns in human liver cancers, *Mol. Biol. Cell*, 13(6):1929-1939.
14. Cheng YF, Huang TL, Chen TY, Chen YS, Wang CC, Hsu SL, Tsang LL, Sun PL, Chiu KW, Jawan B, Eng HL, Chen CL (2005) Impact of preoperative transarterial embolization on the treatment of hepatocellular carcinoma with liver transplantation, *World J Gastroenterol*, 11(10):1433-1438.
15. Decaens T, Roudot-Thoraval F, Bresson-Hadni S, Meyer C, Gugenheim J, Durand F, Bernard PH, Boillot O, Boudjema K, Calmus Y, Hardwigsen J, Ducerf C, Pageaux GP, Dharancy S, Chazouilleres O, Dhumeaux D, Cherqui D, Duvoux C (2005) Impact of pretransplantation transarterial chemoembolization on survival and recurrence after liver transplantation for hepatocellular carcinoma, *Liver Transpl*, 11(7):767-775.
16. Delpuech O, Trabut JB, Carnot F, Feuillard J, Brechot C, Kremsdorf D (2002) Identification, using cDNA macroarray analysis, of distinct gene expression profiles associated with pathological and virological features of hepatocellular carcinoma. *Oncogene*, 21:2926-2937.
17. Eguchi S, Hidaka M, Tomonaga T, Miyazaki K, Inokuma T, Takatsuki M, Okudaira S, Yamanouchi K, Miyaaki H, Ichikawa T, Tajima Y, Kanematsu T (2009) Actual therapeutic efficacy of pretransplant treatment on hepatocellular carcinoma and its impact on survival after salvage living donor liver transplantation, *J Gastroenterol*, 44:624-629.

18. El-Serag HB, Mason AC (1999) Rising incidence of hepatocellular carcinoma in the United States, *N Engl J Med*, 340(10):745-750.
19. Fan JB, Yeakley JM, Bibikova M, Chudin E, Wickham E, Chen J, Doucet D, Rigault P, Zhang B, Shen R, McBride C, Li HR, Fu XD, Oliphant A, Barker DL, Chee MS (2004) A versatile assay for high-throughput gene expression profiling on universal array matrices, *Genome Res*, 14(5):878-885.
20. Farinati F (1996) Tamoxifen treatment in hepatocellular carcinoma, *Gastroenterology*, 111(1):272-274.
21. Gebauer B, Werk M, Lopez-Hänninen E, Felix R, Althaus P (2007) Radiofrequency Ablation in Combination with Embolization in Metachronous Recurrent Renal Cancer in Solitary Kidney after Contralateral Tumor Nephrectomy, *Cardiovasc Intervent Radiol*, 2007, 30(4):644-649.
22. Geschwind JF, Ramsey DE, Choti MA, Thuluvath PJ, Huncharek MS (2003) Chemoembolization of hepatocellular carcinoma: results of a metaanalysis, *Am J Clin Oncol*, 26(4):344-349.
23. Graziadei IW, Sandmueller H, Waldenberger P, Koenigsrainer A, Nachbaur K, Jaschke W, Margreiter R, Vogel W (2003) Chemoembolization followed by liver transplantation for hepatocellular carcinoma impedes tumor progression while on the waiting list and leads to excellent outcome, *Liver Transpl*, 9(6):557-563.
24. Hoshida Y, Villanueva A, Kobayashi M, Peix J, Chiang DY, Camargo A, Camargo A, Gupta S, Moore J, Wrobel MJ, Lerner J, Reich M, Chan JA, Glickman JN, Ikeda K, Hashimoto M, Watanabe G, Daidone MG, Roayaie S, Schwartz M, Thung S, Salvesen HB, Gabriel S, Mazzaferro V, Bruix J, Friedman SL, Kumada H, Llovet JM, Golub TR (2008) Gene Expression in Fixed Tissues and Outcome in Hepatocellular Carcinoma, *N Engl J Med*, 359(19):1995-2004.
25. Iizuka N, Oka M, Yamada-Okabe H, Mori N, Tamesa T, Okada T, Takemoto N, Tangoku A, Hamada K, Nakayama H, Miyamoto T, Uchimura S, Hamamoto Y (2002) Comparison of gene expression profiles between hepatitis B virus- and hepatitis C virus-infected hepatocellular carcinoma by oligonucleotide microarray data on the basis of a supervised learning method, *Cancer Res*, 62:3939-3944.
26. Karsten SL, Van Deerlin VM, Sabatti C, Gill LH, Geschwind DH (2002) An evaluation of tyramide signal amplification and archived fixed and frozen tissue in microarray gene expression analysis, *Nucleic Acids Res*, 30(2):E4.
27. Kibriya MG, Jasmine F, Roy S, Paul-Brutus RM, Argos M, Ahsan H (2010) Analyses and interpretation of whole-genome gene expression from formalin-fixed paraffin-embedded tissue: an illustration with breast cancer tissues, *BMC Genomics*, 11:622.
28. Kim DY, Choi MS, Lee JH, Koh KC, Paik SW, Yoo BC, Shin SW, Choo SW, Do YS, Rhee JC (2006) Milan criteria are useful predictors for favorable outcomes in hepatocellular carcinoma patients undergoing liver transplantation after transarterial chemoembolization, *World J Gastroenterol*, 12(46):6992-6997.
29. Kim YB, Park YN, Park C (2001) Increased proliferation activities of vascular endothelial cells and tumour cells in residual hepatocellular carcinoma following transcatheter arterial embolization, *Histopathology*, 38(2):160-166.
30. Lau WY, Lai PB, Leung MF, Leung BC, Wong N, Chen G, Leung TW, Liew CT (2000) Differential gene expression of hepatocellular carcinoma using cDNA microarray analysis. *Oncol. Res*, 12:59-69.
31. Lee JS, Heo J, Libbrecht L, Chu IS, Kaposi-Novak P, Calvisi DF, Mikaelyan A, Roberts LR, Demetris AJ, Sun Z, Nevens F, Roskams T, Thorgeirsson SS (2006) A novel prognostic subtype of human hepatocellular carcinoma derived from hepatic progenitor cells, *Nat Med*, 12(4):410-416.
32. Lencioni R, Della Pina C, Bartolozzi C (2005) Percutaneous image-guided radiofrequency ablation in the therapeutic management of hepatocellular carcinoma, *Abdom Imaging*, 30(4):401-408.



33. Llovet JM, Burroughs A, Bruix J (2003) Hepatocellular carcinoma, *Lancet*, 362 (9399):1907–1917.
34. Maass T, Sfakianakis I, Staib F, Krupp M, Galle PR, Teufel A (2010) Microarray-Based Gene Expression Analysis of Hepatocellular Carcinoma, *Current Genomics*, 11:261-268.
35. Majno PE, Adam R, Bismuth H, Castaing D, Ariche A, Krissat J, Perrin H, Azoulay D (1997) Influence of preoperative transarterial lipiodol chemoembolization on resection and transplantation for hepatocellular carcinoma in patients with cirrhosis, *Ann Surg*, 226(6):688–701.
36. Margulis V, Matsumoto ED, Lindberg G, Tunc L, Taylor G, Sagalowsky AI, Cadeddu JA (2004) Acute histologic effects of temperature-based radiofrequency ablation on renal tumor pathologic interpretation, *Urology*, 64(4): 660–663.
37. Marin HL, Furth EE, Olthoff K, Shaked A, Soulen MC (2009) Histopathologic outcome of neoadjuvant image-guided therapy of hepatocellular carcinoma, *J Gastrointest Liver Dis*, 18:169-176.
38. Masuda N, Ohnishi T, Kawamoto S, Monden M, Okubo K (1999) Analysis of chemical modification of RNA from formalin-fixed samples and optimization of molecular biology applications for such samples, *Nucleic Acids Res*, 27(22):4436-4443.
39. Morimoto M, Sugimori K, Shirato K, Kokawa A, Tomita N, Saito T, Tanaka N, Nozawa A, Hara M, Sekihara H, Shimada H, Imada T, Tanaka K (2002) Treatment of hepatocellular carcinoma with radiofrequency ablation: radiologic-histologic correlation during follow-up periods, *Hepatology*, 35(6):1467-1475.
40. Morisco F, Stigliano R, Godfrey A, Leandro G, Patch D, Davidson B, Rolles K, Dhillon A, Dhillon AP, Quaglia A, Burroughs AK (2008) Efficacy of loco-regional ablation therapy of HCC in a population of liver transplanted patients, *Dig Dis Sci*, 53:1131-1137.
41. Okabe H, Satoh S, Kato T, Kitahara O, Yanagawa R, Yamaoka Y, Tsunoda T, Furukawa Y, Nakamura Y (2001) Genome-wide analysis of gene expression in human hepatocellular carcinomas using cDNA microarray: identification of genes involved in viral carcinogenesis and tumor progression. *Cancer Res*, 61:2129- 2137.
42. Pompili M, Mirante VG, Rondinara G, Fassati LR, Piscaglia F, Agnes S, Covino M, Ravaioli M, Faggioli S, Gasbarrini G, Rapaccini GL (2005) Percutaneous ablation procedures in cirrhotic patients with hepatocellular carcinoma submitted to liver transplantation: Assessment of efficacy at explant analysis and of safety for tumor recurrence, *Liver Transpl*, 11(9):1117-1126.
43. Porrett PM, Peterman H, Rosen M, Sonnad S, Soulen M, Markmann JF, Shaked A, Furth E, Reddy KR, Olthoff K. (2006) Lack of benefit of pre-transplant locoregional hepatic therapy for hepatocellular cancer in the current MELD era, *Liver Transpl*, 12(4):665–673.
44. Ravaioli M, Grazi GL, Ercolani G, Fiorentino M, Cescon M, Golfieri R, Trevisani F, Grigioni WF, Bolondi L, Pinna AD (2004) Partial necrosis on hepatocellular carcinoma nodules facilitates tumor recurrence after liver transplantation, *Transplantation*, 78(12):1780–1786.
45. Saxena R, Leake JL, Shafford EA, Davenport M, Mowat AP, Pritchard J, Mieli-Vergani G, Howard ER, Spitz L, Malone M, et al (1993) Chemotherapy effects on hepatoblastoma. A histological study, *Am J Surg Pathol*, 17(12):1266-1271.
46. Sergio A, Cristofori C, Cardin R, Pivetta G, Ragazzi R, Baldan A, Girardi L, Cillo U, Burra P, Giacomini A, Farinati F (2008) Transcatheter arterial chemoembolization (TACE) in hepatocellular carcinoma (HCC): the role of angiogenesis and invasiveness, *Am J Gastroenterol*, 103:914-921.
47. Shachaf CM, Kopelman AM, Arvanitis C, Karlsson A, Beer S, Mandl S, Bachmann MH, Borowsky AD, Ruebner B, Cardiff RD, Yang Q, Bishop JM, Contag CH, Felsher DW (2004) MYC inactivation uncovers pluripotent differentiation and tumour dormancy in hepatocellular cancer, *Nature*, 431(7012):1112-1117.
48. Shariff MI, Cox IJ, Gomaa AI, Khan SA, Gedroyc W, Taylor-Robinson SD (2009) Hepatocellular carcinoma: current trends in worldwide epidemiology, risk factors, diagnosis and therapeutics, *Expert Rev gastroenterol hepatol*, 3(4):353-367.

49. Srinivasan M, Sedmak D, Jewell S (2002) Effect of fixatives and tissue processing on the content and integrity of nucleic acids, *Am J Pathol*, 161(6):1961-1971.
50. Steinke K, Habicht JM, Thomsen S, Soler M, Jacob AL (2002) CT-Guided Radiofrequency Ablation of a Pulmonary Metastasis Followed by Surgical Resection, *Cardiovasc Intervent Radiol*, 25(6):543-546.
51. Stippel DL, Kasper HU, Schleimer K, Benz C, Hölscher AH, Beckurts KT (2003) Underestimation of nodules while staging hepatocellular carcinoma prior to neoadjuvant treatment on waiting list for transplantation, *Transplant Proc*, 35(4):1423-1424.
52. Tachikawa T, Irié T (2004) A new molecular biology approach in morphology: basic method and application of laser microdissection, *Med Electron Microsc*, 37(2):82-88.
53. Tsai CC, Huang KW, Chen HF, Zhan BW, Lai YH, Lee FH, Lin CY, Ho YC, Chao YW, Su YC, Jane SW, Chen YC, Hsu CI, Li PH, Hsu HC, Suzuki Y, Sugano S, Lin JY (2006) Gene expression analysis of human hepatocellular carcinoma by using full-length cDNA library, *J. Biomed. Sci*, 13:241-249.
54. Veltri A, Robba T, Anselmetti GC, Martina MC, Regge D, Grosso M, Fava C (1998) Computerized tomography with lipiodol in hepatocarcinoma. Assessment of its diagnostic accuracy with anatomic-pathological control, *Radiol Med*, 96(1-2):81-86.
55. Vossen JA, Buijs M, Kamel IR (2006) Assessment of tumor response on MR imaging after locoregional therapy, *Tech Vasc Interv Radiol*, 9(3):125-132.
56. Wang YL, Zhu ZJ, Teng DH, Yao Z, Gao W, Shen ZY (2012) Glypican-3 expression and its relationship with recurrence of HCC after liver transplantation, *World J Gastroenterol*, 18(19):2408-2414.
57. Wong LL, Tanaka K, Lau L, Komura S (2004) Pre-transplant treatment of hepatocellular carcinoma: assessment of tumor necrosis in explanted livers, *Clin Transplant*, 18(3):227-234.
58. Wurmbach E, Chen YB, Khitrov G, Zhang W, Roayaie S, Schwartz M, Fiel I, Thung S, Mazzaferro Y, Bruix J, Bottinger E, Friedman S, Waxman S, Llovet JM (2007) Genome-wide molecular profiles of HCV-induced dysplasia and hepatocellular carcinoma, *Hepatology*, 45:938-947.
59. Xiao EH, Li JQ, Huang JF (2004) Effects of p53 on apoptosis and proliferation of hepatocellular carcinoma cells treated with transcatheter arterial chemoembolization, *World J Gastroenterol*, 10:190-194.
60. Yao FY, Hirose R, LaBerge JM, Davern TJ 3rd, Bass NM, Kerlan RK Jr, Merriman R, Feng S, Freise CE, Ascher NL, Roberts JP (2005) A prospective study on downstaging of hepatocellular carcinoma prior to liver transplantation, *Liver Transpl*, 11(12):1505-1514.
61. Zen C, Zen Y, Mitry RR, Corbeil D, Karbanová J, O'Grady J, Karani J, Kane P, Heaton N, Portmann BC, Quaglia A (2011) Mixed phenotype hepatocellular carcinoma after transarterial chemoembolization and liver transplantation, *Liver Transpl*, 17(8):943-954.
62. Zindy P, Andrieux L, Bonnier D, Musso O, Langouët S, Campion JP, Turlin B, Clément B, Thérét N (2005) Upregulation of DNA repair genes in active cirrhosis associated with hepatocellular carcinoma, *FEBS Lett*, 579(1):95-99.

***Bibliografie personală***

63. Cotoi CG, Khorsandi S, Plesea IE, Quaglia A (2012) Histological aspects of post-TACE hepatocellular carcinoma, *Rom J Morfol Embryol*, 53(3 Suppl):677-682.
64. Cotoi CG, Khorsandi S, Plesea IE, Quaglia A (2012) Whole-genome DASL gene expression profiling of hepatocellular carcinoma sub-populations isolated by laser microdissection on formalin- fixed and paraffin-embedded Liver Tissue Samples, *Rom J Morfol Embryol*, 53(4):893-902.